HAL open science

Identification et étude des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation du facteur antiviral APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1 : l'E3 ubiquitine-ligase CHIP, un nouvel acteur de ces mécanismes ?

Cédric Verriez

▶ **To cite this version:**

Cédric Verriez. Identification et étude des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation du facteur antiviral APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1 : l'E3 ubiquitine-ligase CHIP, un nouvel acteur de ces mécanismes ?. Virologie. Université de Strasbourg, 2023. Français. ⟨NNT : 2023STRAJ078⟩. ⟨tel-04893242⟩

HAL Id: tel-04893242

https://theses.hal.science/tel-04893242v1

Submitted on 17 Jan 2025

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.

Autorisation HAL

HAL Authorization

Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École doctorale Sciences de la vie et de la santé | ED 414 Université de Strasbourg

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

UPR9002 – Architecture et Réactivité de l'ARN

THÈSE présentée par :

Cédric VERRIEZ

soutenue le : **29 septembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Identification et étude des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation du facteur antiviral APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1 : l'E3 ubiquitine-ligase CHIP, un nouvel acteur de ces mécanismes ?

THÈSE dirigée par :

Dr PAILLART Jean-Christophe	Directeur de recherches, IBMC, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr ZAMBORLINI Alessia	Professeur des universités, CEA, Université Paris-Saclay
Dr OHLMANN Théophile	Directeur de recherches, CIRI, ENS Lyon

EXAMINATRICE :

Dr MEIGNIN Carine	Professeur des universités, IBMC, Université de Strasbourg

Comme je l’indique ensuite dans mes remerciements, la musique m’a accompagné tout au long de ma thèse, que ce soit lors des manips, de lectures d’articles, ou de la rédaction de ce manuscrit. Ce manuscrit a notamment été rédigé en la compagnie des œuvres des groupes Leech, Villagers of Ioannina city, Vildhjarta, ou encore Rivers of Nihil.

Leur écoute n’est néanmoins pas obligatoire pour accompagner la lecture de cette rédaction !

این نیز بگذرد
(īn nīz bogzarad)

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier mon jury, les Pr Alessia Zamborlini, Dr Théophile Ohlmann et Pr Carine Meignin d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.
Je remercie aussi les Pr Maria Dimitrova et Pr Olivier Rohr pour avoir fait partie de mon comité de suivi individuel et avoir évalué et guidé mon travail en cours de route.
Je remercie aussi Sidaction, pour les actions que l'association mène et son financement de la recherche, pour l'opportunité qu'elle m'a donnée de poursuivre mes travaux sur une 4ème année, et finalement pour l'incroyable expérience qu'a été les Universités des Jeune Chercheurs.

Mes remerciements vont ensuite à Jean Christophe. Merci beaucoup de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse et de découvrir ce que cela représentait, d'entrevoir le métier de chercheur. Merci pour ton apprentissage et ton encadrement, même si j'ai souvent pu être récalcitrant. Ainsi, merci pour ton investissement et merci d'être resté présent et disponible. Merci aussi pour la quatrième année, je dois bien admettre que ce manuscrit aurait été moins intéressant à écrire sans elle. Finalement, 4 ans c'est long et court à la fois.

Par avance, et en anticipation de ma mémoire fluctuante, je m'excuse auprès des personnes légitimes que j'aurai pu oublier dans les lignes suivantes, et les remercie !

Merci aux autres membres de l'équipe, Valérie, Serena, Roland, Anne pour leur entourage, soutien, et conseils. Anne Caro : 👏. Merci pour ta bonne humeur constante (et les quelques photos de Nelly). Rithu, bonne chance pour la suite et fin de thèse, may the SHAPE experiments work well ! Lisa : Ruhrr 🤘. Have fun avec la microscopie, qu'elle soit fluorescente ou électronique. Florine : que tes vœux de production de protéines s'exaucent et te soient favorables, entre autres. Erwan, je n'oublierais jamais l'otamatone grâce à toi. Merci pour les montages photo, les bonnes vannes sur l'ordi de Benjamin, pour les préparations culinaires toujours excellentes… Merci à Antoine pour les rigolades au labo, les cafés autour des mêmes et vidéos, et surtout pour tes conseils techniques autour des manips ; tu auras un peu été la suite spirituelle de Benjamin sur ces aspects. Finalement, Benjamin. On a passé beaucoup trop de bons moments et rigolades pour les énumérer. Un grand merci pour tout ça, ainsi que pour ton temps, ta disponibilité constante et ta patience sans pareille face à toutes mes questions mêmes les plus naïves, ta pédagogie et ta rigueur. Tu as été un vrai soutien et pilier dans là où j'en suis aujourd'hui.

Merci aux autres collègues de l'IBMC pour la bonne ambiance de travail dans le bâtiment au quotidien, pour les échanges informels, les soirées d'institut, les bars post PhD-seminar. Mention à Antoine C., David L., les crystalos, Petr, Léna, Faustine… Merci aussi à ceux qui auront contribué à mes travaux (la plateforme de spectrométrie, Béatrice…) et pour les échanges constructifs et scientifiques que j'ai pu avoir avec certains d'entre vous, et surtout merci aux diverses personnes que je suis allé fréquemment importuner avec mes questions techniques ou expérimentales. Alexis, pour toi qui représentes tout ça à la fois (et ô combien j'ai pu venir te poser des questions) : 👆.

Merci à Tanja de m'avoir encadré en stage de M2 sur ton sujet de thèse et de m'avoir transmis le virus. Je n'oublierai pas non plus ton grand amour pour Baby Shark et ton maniement de calendriers ou de stylos face à Orian. Merci aussi pour tout le travail que tu as effectué sur ce projet désormais commun. Je tiens aussi à remercier Christopher, Anastasiya et Amélie, qui sont venus travailler avec moi sur ce même sujet, même pour un court laps de temps ; j'espère que j'ai aussi réussi à vous intéresser et surtout à vous transmettre des connaissances et des bonnes pratiques et réflexions ! Christopher, je suis toujours déçu de ne pas avoir réussi à te faire boire toutes les solutions du labo. Merci Amélie pour le travail et les efforts que tu as fournis. Je sais que le stage n'a pas toujours été facile pour toi, j'espère que tu en retireras les côtés positifs et qu'il t'aura été utile ; aucune expérience n'est entièrement

bonne à jeter. Les manips que tu as effectué en parallèle des miennes, et que je n'aurai pas forcément eu le temps de faire moi-même ont été un apport non négligeable à ce manuscrit.
Plus particulièrement Anastasiya, merci pour ta bonne humeur et ta motivation, et même si je n'étais pas toujours motivé à lancer une manip à 16 h le vendredi, j'ai beaucoup apprécié le temps partagé avec toi. Je suis peut-être encore une « черна станция », on ne change pas une équipe qui gagne, mais l'était sûrement moins durant ton stage.

Merci à tous les amis qui ont été présents autour de moi durant la thèse, qui ont été un soutien et un moteur constants.

La Team du RU : Laborde, NoémI, la dame du CDI, et la dernière venue, MissFlo, pour les repas toujours dans la bonne humeur et dans les bonnes blagues (si, si on y croit). Orian n'aura toujours pas fait de retour sur l'ananas néanmoins. Merci pour les soirées bar, raclette, ou Unlock chez notre chauve favori. Mathilde : uwu 👉👈. Que les States soient avec toi hein. Malgré 4 ans de quotidien pas loin de toi Noémie, je ne comprends toujours pas ton engouement pour Afida ni pour Faustine Bollaert. Un jour peut-être.

Merci à Ludo pour la relation épistolaire sur ces 4 ans (enfin moi qui te spam sur Messenger quoi). Merci pour ton sel qui embellissait immanquablement mes journées lorsque tu le déversais.

La team « Master », Maïlys/Hortense/Flora, Quentin, Maxime, Lucas, Floriane, nos fréquentes retrouvailles ciné ou jeux de société étaient toujours un réel plaisir et permettait parfois de bien se changer les idées ; merci pour tout ça.

À l'interface de la team « Master » et de la team… « Team » ; merci Charlotte pour les balades ou les prêts de filou. Merci simplement pour notre amitié, pourvu qu'elle dure.

La team « BTS », David, Marco, Julie, Mariane et Shelby… (surtout Shelby en réalité, vous le savez tous). Merci d'avoir été présent, pour des retrouvailles toujours agréables, décontractées et pas prises de têtes, que ce soit en bar ou chez les uns et les autres comme pour des raclettes de Noël. Nos entrevues étaient sûrement moins fréquentes que ce que l'on aurait tous espéré, mais la vie est une force implacable n'est-ce pas… Mais ça les rendait d'autant plus appréciables ! Et si on se voit encore après tout ce temps, ça me semble pas trop mal engagé pour durer :). J'attends donc les prochaines retrouvailles avec hâte. Merci plus particulièrement à toi David, que j'harcèle avec mes messages et partages de musiques auxquels tu réponds toujours… J'arriverai à te trainer dans d'autres concerts, je le sais !

Enfin, Orian à l'interface de tout ça ; ami et voisin de bureau/paillasse. Merci pour les discussions scientifiques ainsi que les bons conseils sur la gestion de vie de labo ou de la thèse. Mais surtout merci pour tous les bons moments au quotidien, les cafés partagés (souvent les miens, contre mon grès), ta (trop) grande force de persuasion pour aller au kebab ou au Namsan, les moments musiques, les différents /r et memes, et les fous rires. PS : Non, je n'arrêterais pas les blagues.

Merci à mes parents pour leurs encouragements à faire ce qui me plaît depuis aussi loin que je m'en souvienne, et merci à vous pour votre soutien au cours de ma thèse. Merci aussi Yann et Artus pour les sessions gaming & discussion du dimanche soir.

Finalement, merci à Spotify, ou plutôt à toute une myriade d'artistes, de m'avoir suivi en musique tout au long de la thèse, dans la concentration, dans la déception comme dans l'euphorie. Mon quotidien de thésard aurait été plus morne sans cet accompagnement.

Tables des matières

Remerciements .....
Abréviations .....
Liste des figures .....

Introduction .....

Chapitre I : SIDA et VIH **1**
1) Épidémiologie 1
2) Origine et répartition 3
3) Transmission et physiopathologie de la maladie 6
   1. Transmission et tropisme du VIH 7
   2. Physiopathologie de la maladie 9
4) Traitements 11
   1. Historique des antirétroviraux 11
   2. Cibles de la thérapie antirétrovirale combinée (cART) 12
   3. *Treatment as prevention* (TasP) et dépistage 13
   4. Prophylaxie préexposition (PreP) 15
   5. Résistance aux ARV et variabilité génétique 15
   6. Futurs challenge des cART 18
   7. Latence virale et autres perspectives de traitements : le HIV cure 19
   8. Vaccins anti-VIH 22
5) Organisation génomique du VIH-1 24
6) Cycle réplicatif du VIH-1 27
   1. Reconnaissance et fusion 27
   2. Entrée nucléaire, décapsidation, transcription inverse et intégration 28
   3. Transcription, épissage et expression protéique 32
   4. Assemblage, bourgeonnement et maturation 34

Chapitre II : Immunité innée et facteurs de restriction **38**
1) L'immunité intrinsèque 38
   1. Le continuum de l'immunité 38
   2. Détecter et alarmer : les PRR et la transduction du signal 40
   3. Les voies de l'interféron 43
2) Les facteurs de restriction 46
3) Facteurs de restriction : le cas du VIH-1 51

Chapitre III – APOBEC3G et Vif **54**
1) Article de revue « Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein » 54
2) De nouveaux régulateurs et partenaires du tandem A3G-Vif 72

Chapitre IV : La protéostase et la co-chaperonne E3 ligase CHIP **76**
1) Protéostase : repliement, stabilité, et dégradation des protéines 76
2) La co-chaperonne et E3 ligase CHIP/STUB1 82
3) Protéostase, CHIP, et VIH 85

Objectifs ***88***

Résultats ***92***

Chapitre I : draft de manuscript "CHIP/STUB1: a new regulator of the APOBEC3G antiviral factor expression involved in HIV-1 replication" **93**
1) Discussion complémentaire et limitations de l'étude 148

Chapitre II : Étude des relations entre l'hélicase UPF1 et les protéines APOBEC3G et Vif.....152
1) Méthodes 153
2) Étude des interactions UPF1-Vif-A3G et d'UPF1 en contexte viral 153
1. UPF1/RENT1 interagit avec Vif et A3G de manière indépendante de l'ARN 153
2. Étude d'UPF1 dans le cycle viral 156
3) Discussion 160
4) Limitations 164

***Conclusions et perspectives*.....165**

***Références*.....173**

***Annexes*.....189**

Article original « A conserved uORF regulates APOBEC3G translation and is targeted by HIV-1 Vif protein to repress the antiviral factor » 190

Revue de littérature « Les APOBEC3 : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes ».....222

Éléments de valorisation.....260

Abréviations

(+) ; (-)	Acide nucléique de polarité positive ou négative
A3 ; A3G	APOBEC3, APOBEC3G
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc ; ADNg ; ADNv	ADN cellulaire, génomique ou viral
ADNsb	ADN simple brin
ALLN	N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal
APOBEC	*Apolipoprotéins B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*
ARN	Acide ribonucléique
ARNm ; ARNg ; ARNt	ARN messager, génomique ou de transfert
ARNsb ; ARNdb	ARN simple brin ou double brin
ARV	Antirétroviraux
BG	Barrière génétique
bNAb	*Broadly neutralising antibodies*
CA	Capside
cART	*Combined antiretroviral therapy*
CASA	*Chaperone-assisted selective autophagy*
CBF-β	*Core-binding factor subunit beta*
CC	*Coiled coil*
CCR5	*C-C motif chemokine receptor 5*
CD4	*Cluster of differentiation 4*
CDS	Coding DNA sequence
CHIP	*Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*
CMA	*Chaperone-mediated autophagy*
co-IP	Co-immunoprécipitaiton
CRF	*Circulating recombinant forms*
CXCR4	*C-X-C motif chemokine receptor 4*
DIS	Dimerization initiation site
DNase	Désoxyribonucléase
dNTPase	désoxynucleoside triphosphohydrolase
DUB	*Deubiquitinating enzymes*
HSH	Hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes

Hsp	*Heat-shock protein*
HUSH	*Human silencing hub*
IFN	Interféron
IL	Interleukine
INNTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
IP	Immunoprécipitation
IRES	*Internal ribosome entry site*
ISG	*Interferon-stimulated gene*
kDa	kilodalton
LB	Lymphocyte B
LNTP	*Long term non-progressor*
LT	Lymphocyte T
LTR	*Long terminal repeat*
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
NPC	*Nuclear pore complex*
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PBS	Primer binding site
PEP	*Post-exposure prophylaxis*
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PreP	*Pre-exposure prophylaxis*
PRR	*Pattern recognition receptor*
Psi	Packaging signal
PTC	Premature termination codon
PTM	*Post-translational modification*
PVVIH	Personnes vivant avec le VIH
RBP	*RNA-binding protein*
RENT1	*Regulator of nonsense transcripts 1*
RF	*Restriction factor*
RLR	*RIG-I-like receptors*
RLU	*Relative light unit*
RNase	Ribonucléase

RNP	Ribonucléoprotéine
RRE	Rev-responsive element
RT	*Reverse-transcriptase*
RTC	*Retrotranscription complexe*
RUNX1/2	*Runt-related transcription factor 1/2*
SAMHD1	*SAM domain and HD domain-containing protein 1*
SD	*Splice donor*
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV	*Simian immunodeficiency virus*
SL	*Stem-loop*
STUB1	*STIP1 homology and U-box containing protein 1*
TAR	*Trans-activation response*
TasP	*Treatment as prevention*
Tat	*Trans-activator of transcription*
TDR	*Transmitted drug resistance*
TLR	*Toll-like receptors*
TPR	*Tetratricopeptide repeat*
TSS	*Transcription start site*
Ub	Ubiquitine
uORF	*Upstream open reading frame*
UPF1	*Up-frameshift suppressor 1*
UPS	*Ubiquitination-proteasome system*
USP	*Ubiquitin-specific peptidases*
UTR	*Untranslated region*
VCBCCR	Complexe Vif/CBF-β/EloB/EloC/CUL5/Rbx2
Vif	*Viral infectivity factor*
VIH / HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	*Virus-like particle*

Liste des figures

Figure 1 : Prévalence du VIH chez les adultes de 15-49 ans au niveau mondial en 2020. 2
Figure 2 : Cascade du dépistage et du traitement du VIH au niveau mondial en 2020 3
Figure 3 : Relation et diversité des souches de VIH et SIV. 5
Figure 4 : Progression de l'infection à VIH..... 10
Figure 5 : Classes d'inhibiteurs antirétroviraux et modes d'action..... 12
Figure 6 : Réservoirs viraux et latence : localisations anatomiques, types cellulaires cibles et déterminants moléculaires..... 21
Figure 7 : Représentation de l'organisation génomique du VIH-1 et de sa particule virale. 25
Figure 8 : Import du matériel génétique viral au noyau. 29
Figure 9 : Schéma de la transcription inverse..... 31
Figure 10 : Assemblage, bourgeonnement et maturation des particules virales du VIH-1. 35
Figure 11 : Le spectre de défenses antivirales chez l'Homme. 38
Figure 12 : Voies de détection et de signalisation des acides nucléiques viraux. 41
Figure 13 : Transduction du signal par les voies interféron. 45
Figure 14 : Caractéristiques courantes des facteurs de restriction. 47
Figure 15 : Facteurs de restriction anti-VIH-1. 52
Figure 16 : Structure du complexe VCBC avec hA3G et de l'ARN. 73
Figure 17 : Le réseau de la protéostase. 76
Figure 18 : Dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome. 78
Figure 19 : Voies de l'autophagie. 81
Figure 20 : CHIP et ses interactions avec les *Heat shock protein* 84
Figure 21 : Régulation de la traduction d'A3G 90

Figures du draft de manuscript "CHIP/STUB1: a new regulator of the APOBEC3G antiviral factor expression involved in HIV-1 replication"

Figure 1: Proteins significantly associated with A3G mRNA in different conditions..... 106
Figure 2: Effect of Vif on A3G mRNA-associated proteins in the absence of A3G protein. 107
Figure 3: Effect of Vif on A3G mRNA-associated proteins in the presence of A3G protein..... 108
Figure 4: CHIP interacts with both Vif and A3G in an RNA-independent manner. 110
Figure 5: CHIP K30 residue is essential for its interaction with Vif and A3G. 112
Figure 6: CHIP inhibits A3G expression through a proteasome-independent manner. 113
Figure 7: CHIP reduces A3G packaging upon overexpression and is packaged in HIV VLP. 114
Figure 8: CHIP downregulates A3G expression. 116
Figure 9: CHIP increases viral protein expression and impairs Vif packaging. 118
Figure 10: CHIP reduces HIV-1 infectivity. 119
Figure 11: Hypothetical models for CHIP-Vif-A3G interaction. 123
Figure 12: A3G contains a KFERQ-like motif. 124
Figure S1: Effect of A3G protein on A3G mRNA interactome. 135
Figure S2: Comparison of proteins whose association with WT and ΔuORF mRNA is regulated by Vif. 136
Figure S3: Interaction of Vif with selected proteins. 137
Figure S4: Differential expression of CHIP mutants. 138
Figure S5: CHIP does not affect Vif expression. 139
Figure S6: Full-scale histogram of Figure 8B. 140

Figure 22 : Représentation schématique d'UPF1 et de ses domaines fonctionnels 152

Figure 23 : UPF1 interagit à la fois avec Vif et A3G indépendamment de l'ARN. 155
Figure 24 : UPF1 est encapsidée dans les VLP du VIH 156
Figure 25 : Analyse de l'impact du silencing d'UPF1 sur les niveaux d'A3G. 157
Figure 26 : Impact du silencing d'UPF1 sur les niveaux d'expression des protéines virales..... 159
Figure 27 : Impact du silencing d'UPF1 sur l'infectiosité des VLP. 160
Figure 28 : Représentation des interactions A3G-Vif-CHIP. 171

Introduction

Chapitre I : SIDA et VIH

1) Épidémiologie

Il y a 40 ans, en été 1981, des cliniciens de New York et de Californie rapportent l'observation d'un clustering inhabituel de cas de maladies rares chez de jeunes hommes homosexuels auparavant sains, telles que le sarcome de Kaposi, et des infections opportunistes telles que des pneumonies à *pneumocystis*, ainsi que des lymphadénopathies persistantes (Fauci, 2003). Ces patients, immunodéprimés, étaient infectés par une maladie mortelle nommée Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) en 1982, et dont l'agent étiologique est un rétrovirus identifié en 1983 par la chercheuse française Françoise Barré-Sinoussi et son équipe (Barre-Sinoussi et al., 1983), nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) en 1986. La même année, le VIH-2 est aussi identifié (Clavel et al., 1986). En 1984 Margaret Heckler, secrétaire à la Santé et aux Services sociaux des États-Unis, annonce l'espoir d'avoir un vaccin contre le virus sous deux ans.

Aujourd'hui, le nombre de personnes ayant été infectées par le VIH depuis le début de l'épidémie est estimé à environ 80 millions, dont 40 millions de personnes décédées suite de maladies liées au SIDA et 38 millions vivant encore avec le virus. Ce virus et le syndrome qu'il entraine représentent encore un problème majeur et global de santé publique : en 2021, c'est près d'1,5 million d'infections qui ont eu lieu dans le monde, ainsi que 650 000 décès. En France le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) est estimé à environ 200 000, et environ 6 000 nouvelles infections ont été recensées en 2021.

L'épidémie de VIH trouve son origine sur le continent africain et comme le montre la carte de prévalence du VIH en 2020 (**Figure 1**), bien que l'épidémie soit mondiale, elle a surtout fait rage dans les pays à revenus moyens ou limités d'Afrique subsaharienne. À l'échelle du globe, c'est 65 à 70 % des PVVIH qui habitent sur le continent africain. En Afrique du Sud on compte plus de 10 % de PVVIH au sein de la population adulte, et en Eswatini, pays ayant la plus haute prévalence, plus d'un adulte sur quatre est infecté par le virus. Les moyens de prévention et de surveillance sont ainsi encore primordiaux dans les pays à revenus moyens ou limités, pour endiguer la propagation de l'infection ; d'autant plus que beaucoup de PVVIH dans ces pays n'ont pas connaissance de leur statut, ou sont diagnostiqués tardivement.

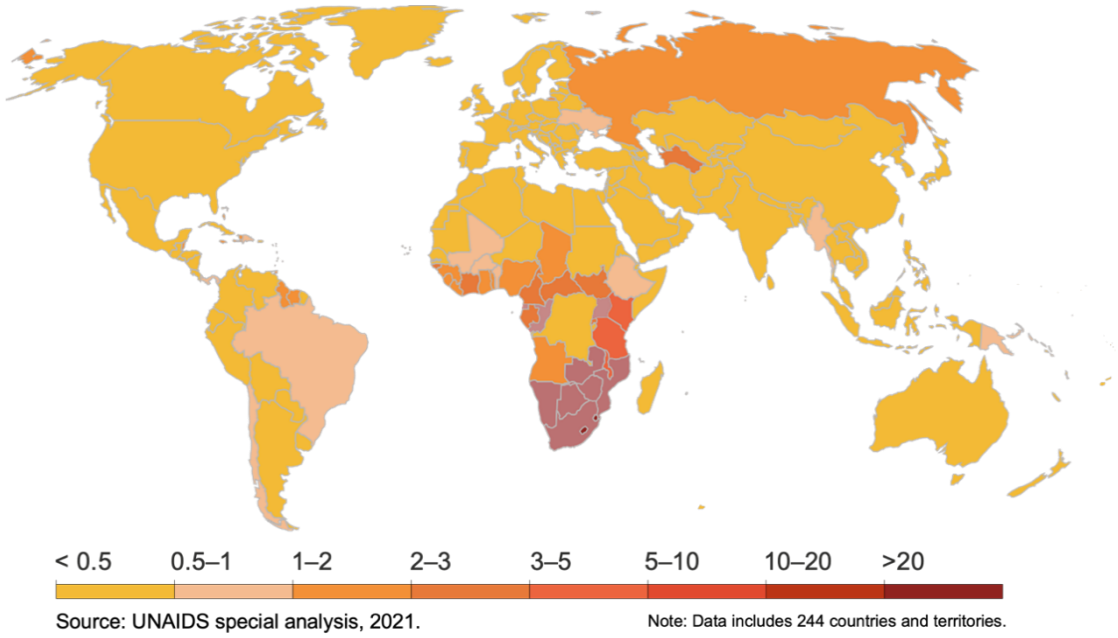


Figure 1 : Prévalence du VIH chez les adultes de 15-49 ans au niveau mondial en 2020. Le pourcentage de PVVIH dans un pays par rapport à la population totale de ce dernier est indiqué selon l'échelle de couleur sous la carte. Figure adaptée de « Analyse spéciale de l'ONUSIDA, 2021 ».

Parmi les PVVIH, 29 millions ont accès à la thérapie antirétrovirale, soit 75 % des malades (ONUSIDA, 2021). L'accès à la thérapie antirétrovirale combinée (cART) est en augmentation au cours du temps mais doit encore s'accroitre pour atteindre les objectifs souhaités par l'ONUSIDA. Ce programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida coordonnant les actions à l'échelle mondiale pour lutter contre la pandémie VIH/sida établit ses objectifs et actions en accord avec les objectifs de développement durable pour 2030 énoncés par l'ONU, dont l'objectif 3.3 vise notamment à mettre fin à l'épidémie de SIDA d'ici 2030. Pour s'approcher de ce but l'ONUSIDA propose la stratégie 95-95-95, qui correspond à : 95 % des PVVIH connaissent leur statut sérologique ; 95 % des personnes connaissant leur séropositivité reçoivent un traitement antirétroviral ; et 95 % des personnes sous traitement ont une charge virale indétectable. La stratégie 90-90-90, bâtie sur le même principe, était l'objectif fixé pour l'année 2020 ; celui-ci était proche d'être atteint en 2021 (**Figure 2**), avec 84 % des PVVIH connaissant leur statut sérologique, 87 % de ces personnes ayant accès à un traitement et 90 % des personnes traitées ayant une charge virale contrôlée. Cette dernière proportion correspond à 66 % de l'ensemble des PVVIH. Du fait de la prévalence du VIH en Afrique subsaharienne, assurer un accès large et fiable à la cART dans ces pays reste une priorité, pour le niveau de vie des PVVIH ainsi qu'en tant qu'outil de prévention.

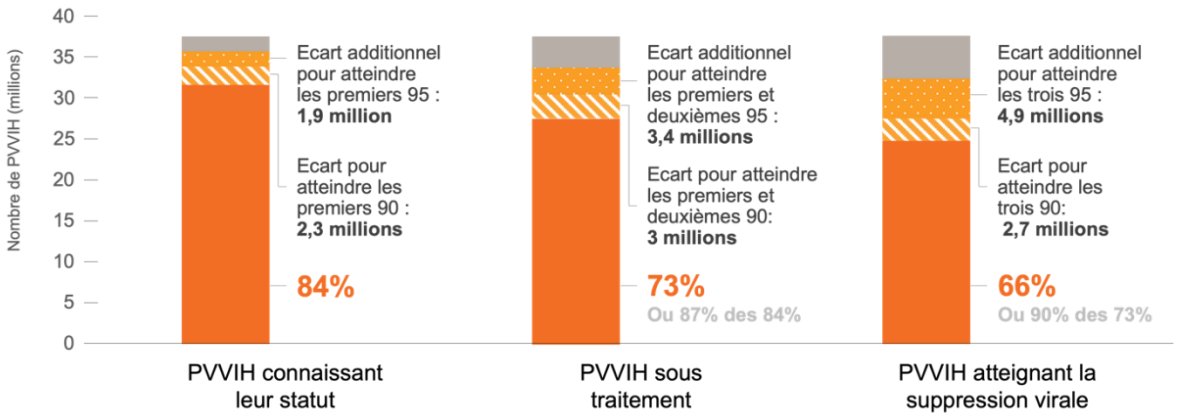


Figure 2 : Cascade du dépistage et du traitement du VIH au niveau mondial en 2020. Les pourcentages globaux de PVVIH connaissant leur statut, sous traitement ou en état de suppression virale sont indiqués en orange. Les pourcentages indiqués en gris réfèrent à la cascade du 95-95-95. Figure adaptée de « Analyse spéciale de l'ONUSIDA, 2021 ».

Il est cependant à noter que le plan 90-90-90 s'accompagne d'un objectif de 500 000 nouvelles infections annuelles ou moins (et <200 000 pour le plan 95-95-95), objectif qui est encore loin d'être atteint. L'ONUSIDA regrette de plus l'augmentation du nombre d'infections annuelle depuis 2015 dans 38 pays. Diverses crises humanitaires et sociales, et notamment la pandémie de COVID-19, ont aussi défavorisé et défavorisent encore la lutte contre le VIH/sida en entravant l'accès aux préventions, dépistages, accompagnements ainsi qu'aux cART (ONUSIDA, 2021).

2) Origine et répartition

Dès la découverte du VIH, une recherche importante a été menée sur plus d'une vingtaine d'années afin d'élucider précisément son origine. Il est vite devenu évident que le virus était le résultat d'une zoonose, soit la transmission d'un virus animal d'une autre espèce à l'espèce humaine. En l'occurrence, le VIH présentait beaucoup de proximité génétique avec certaines souches de *simian immunodeficiency virus* (SIV), des *lentivirus* présents au sein de plus de 40 espèces de singes africains. La récolte d'échantillons de singes sauvages permit l'isolement et le séquençage des SIV que portaient les singes séropositifs. L'analyse de ces génomes séquencés et la comparaison de leur diversité génétique avec les souches de VIH ont permis d'établir des classifications phylogénétiques, basées sur la similarité génétique, et ont aussi servi en tant qu'horloge moléculaire (Sharp and Hahn, 2011). Les plus proches parents phylogénétiques des diverses souches de VIH ont ainsi pu être identifiés sur base de ces comparaisons, et l'on considère que ce sont ces SIV qui ont franchi la barrière d'espèce et qui

sont les ancêtres des souches VIH associées. La transmission de l'animal à l'homme a eu lieu à cause de contacts avec du sang ou d'autres sécrétions de singes infectés par des SIV, par exemple au cours de découpes de viande de singe par des chasseurs de viande, ou en cas de morsures lors de la chasse. Les premières origines géographiques du VIH-1 ont été retracées à des singes infectés d'Afrique Centrale et d'Afrique de l'Ouest, notamment au Cameroun. Les premiers cas de contaminations humaines auraient eu lieu au début du 20ème siècle. Le berceau initial de l'épidémie est lui situé à Kinshasa (anciennement Léopoldville), où les premières souches de HIV-1 de sous-type M ont été identifiées et où la diversification initiale de ces souches a eu lieu (Sharp and Hahn, 2011). Les premiers cas à Kinshasa remonteraient aux années 1920, puis une croissance exponentielle des infections a eu lieu à partir des années 1960 (Faria et al., 2014).

Les souches de VIH sont classées en groupes, puis en sous-types et éventuellement en sous-sous types ; cette classification se base sur l'écart génétique entre chaque classe. Parmi les lentivirus, on recense deux espèces qui infectent l'homme, les VIH-1 et 2. Le VIH-1 et le VIH-2 partagent beaucoup de similarités, telles que leur arrangement génétique, leurs modes de transmission, les voies de réplication intracellulaires, et leurs conséquences cliniques. En effet, le VIH-2 entraine lui aussi le SIDA. Néanmoins le VIH-2 s'accompagne d'un pronostic plus favorable, le virus est moins transmissible et se caractérise par une progression plus lente vers le stade SIDA (≈ 15 ans en moyenne). La fréquence de l*ong-term non-progressor* (LNTP) est aussi plus importante en cas d'infection à VIH-2 qu'à VIH-1. Globalement, le temps de survie des PVVIH est donc plus long (Nyamweya et al., 2013). Le VIH-2 à une identité génétique avec le VIH-1 d'environ 55 %. L'origine du VIH-2 sera présenté ci-dessous, la suite de cette introduction et de ce manuscrit ne s'articuleront néanmoins qu'autour du VIH-1.

On recense 9 groupes de VIH-2, provenant de 9 évènements indépendants de franchissement de la barrière d'espèce (**Figure 3**). La filiation de ces virus avec les SIVsmm du *Cercocebus atys* (sooty mangabey) a permis de définir ce singe comme l'hôte à l'origine du VIH-2. On compte environ 1 million d'infections à VIH-2, par les groupes A et B du virus, avec une épidémie principalement localisée en Afrique de l'Ouest. Les autres groupes (C-H) n'ont été identifiés que dans des individus uniques, suggérant qu'ils représentaient une infection avec une transmission secondaire très limitée ou nulle. De plus, en Guinée-Bissau, épicentre de l'infection à VIH-2, la prévalence de ce dernier a diminué, tandis que celle à VIH-1 a

augmenté, suggérant un remplacement progressif des souches VIH-2 par les souches VIH-1 (Sharp and Hahn, 2011; Tebit and Arts, 2011).

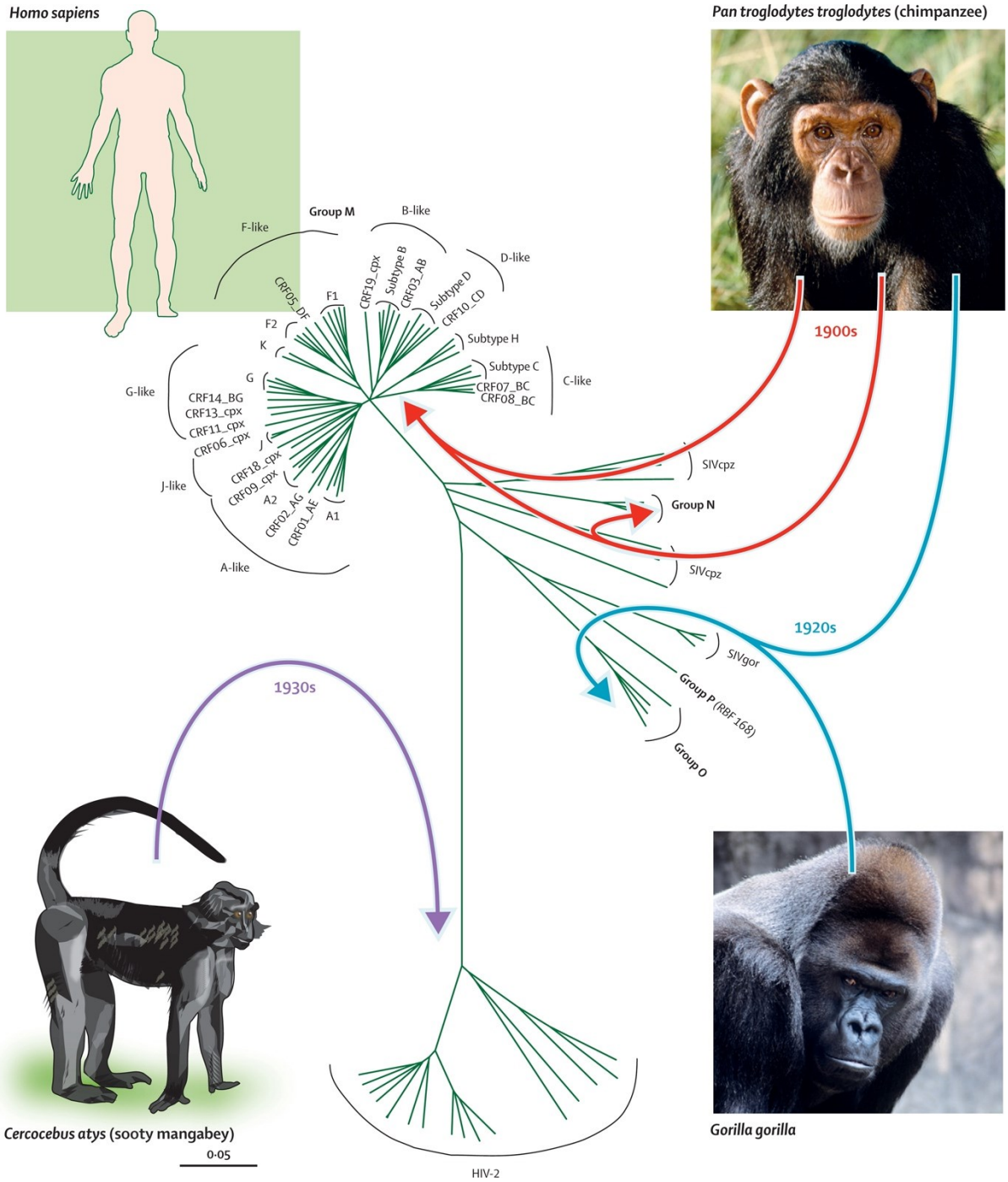


Figure 3 : Relation et diversité des souches de VIH et SIV. L'arbre phylogénétique montre les relations et la diversité entre les souches de différents groupes et sous-types de VIH et SIV ; les espèces infectées des souches de SIV ayant franchi la barrière d'espèce pour donner les virus humains sont représentées, ainsi que les dates estimées des premières transmissions. La barrière d'espèce représente les obstacles (récepteur inadapté, facteurs de restriction…) empêchant un virus d'infecter un organisme, et qu'il doit donc contourner ou surmonter pour réussir à se répliquer chez cet hôte. cpz : chimpanzé ; gor : gorille ; CRF : forme circulante recombinante. Figure adaptée de Tebit and Arts, 2011.

Dans le cas du VIH-1, on recense 4 groupes : les groupes M (*Major*), O (*Outlier*), N (*Non-M Non-O*) et P. Ces quatre groupes de VIH-1 correspondent eux aussi à quatre évènements indépendants de transmission du singe à l'Homme (**Figure 3**). Le chimpanzé central (*Pan troglodytes troglodytes*) est l'hôte des SIVcpz ayant donné les VIH-1 M et N après transmission et adaptation du virus à l'Homme. Pour le groupe P, les données existantes suggèrent une origine par le gorille (*Gorilla gorilla*). L'origine précise du groupe O reste inconnue, par manque de SIV suffisamment proches génétiquement de ce groupe ; le SIV ancêtre pourrait être du gorille ou du chimpanzé. Le VIH-1 de groupe P est responsable de 2 infections, celui de groupe N de moins de 20 infections, et le O d'environ 1 % des infections à VIH-1, localisées majoritairement au Cameroun. Les souches de groupe M quant à elles sont celles responsables de l'épidémie mondiale, représentant plus de 35 millions d'infections, soit >98 % des infections à VIH-1 (Sharp and Hahn, 2011; Tebit and Arts, 2011). Les souches de groupe M sont de fait elles-mêmes classifiées en sous-types (>9) qui ont des répartitions géographiques variables, les souches du sous-type C étant majoritaires dans les pays d'Afrique du sud et celles du sous-type B en Amérique du nord et Europe de l'est par exemple. En cas de surinfection d'un individu par deux souches virales différentes circulant dans une même zone, des recombinaisons peuvent aussi avoir lieu entre les souches parentales. Les souches issues de recombinaisons de sous-types différents sont nommées formes recombinantes circulantes (CRF) lorsqu'elles sont identifiées chez plus de 3 individus, ou formes recombinantes uniques lorsqu'elles sont identifiées chez un individu unique, sans preuve de transmission associée. Plus de 100 CRF ont été identifiées, et elles représentent environ 17 % des infections mondiales. Elles ajoutent en diversité aux sous-types déjà présents, et donc en difficulté pour établir des thérapies vaccinales ou de *HIV cure* (détaillés dans la partie 4 de ce chapitre) (Elangovan et al., 2021). Des différences dans les voies principales de transmissions, la *fitness* réplicative ou encore la pathogenèse peuvent être corrélées avec les différents sous-types des (Hemelaar, 2013).

3) Transmission et physiopathologie de la maladie

Si tout le monde est vulnérable au VIH, certaines populations sont plus à risque et montrent une prévalence plus élevée. Ces populations dites clés sont les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes, les utilisateurs de drogue injectable, les populations

carcérales, les personnes transgenres et les travailleurs du sexe. Différentes considérations sociales, légales et comportementales augmentent la vulnérabilité de ces groupes au virus, et peuvent aussi interférer dans leur prise en charge et leur accès aux services de prévention ou traitements.

1. Transmission et tropisme du VIH

Le virus, présent dans des fluides corporels infectés soit sous forme de particules virales libres, soit dans des cellules elles-mêmes porteuses du virus, est transmis au cours de rapports sexuels *via* des muqueuse intactes, des lésions (peau, muqueuses, etc), ou de manière parentérale (piqures pour les usages de drogue injectable, transfusion, transplantation…). La transmission verticale, de la mère à l'enfant, est aussi observée (jusqu'à 40 % de transmission sans traitement) et survient au cours du dernier trimestre de grossesse, à l'accouchement ou lors de l'allaitement. Les fluides vecteurs du virus sont principalement le sang, le plasma ou sérum, le lait maternel et les sécrétions génitales. L'efficacité de transmission du virus varie en fonction de la voie, la transmission par transfusion étant par exemple quasi inévitable, tandis que la transmission par voie sexuelle est faiblement efficace (estimée à environ 1-3 % pour le sexe anal réceptif, et moins de 0,1 % pour le sexe vaginal). La transmission sexuelle représente cependant la majorité des infections à VIH (et on estime notamment que 70 % des infections sont liées à des rapports hétérosexuels) ; l'efficacité de celle-ci est aussi corrélée avec la charge virale plasmatique du porteur (Deeks et al., 2015; Moir et al., 2011).

Le récepteur principal du VIH est le *cluster of differentiation 4* (CD4), toutes les cellules qui l'expriment à leur surface sont ainsi susceptibles à l'infection, ce qui comprend les lymphocytes T (LT), les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les astrocytes. Les cibles principales du virus sont les LT CD4+ et notamment ceux activés, qui sont plus permissifs que ceux non activés. Les cellules T CD4+, aussi appelés LT helper, représentent un groupe de cellules elles-mêmes classées en de multiples sous-groupes, selon leur voie de différenciation et leurs actions. Les LT CD4+ sont des acteurs majeurs dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Les LT CD4+ activés se multiplient après la reconnaissance d'un antigène par les CMH-II des cellules présentatrices d'antigène. Ils produisent aussi des cytokines, comme l'interleukine IL-2, indispensables à la prolifération et différenciation des LT CD8 en LT mémoire ou cytotoxiques ainsi que des LB. Le virus utilise aussi un corécepteur pour entrer dans les cellules hôtes, principalement les récepteurs de chemokine CCR5 ou CXCR4.

On définit le tropisme des souches en fonction du corécepteur qu'elle utilise, et sont dites R5, X4, ou R5X4 si elles peuvent utiliser les deux corécepteurs indifféremment. Ces corécepteurs sont exprimés différentiellement en fonction du type cellulaire ; les LT mémoires, macrophages et cellules dendritiques expriment notamment CCR5. Selon la voie de transmission, le tropisme préférentiel des souches virales initiant l'infection peut varier. En cas d'infection par voie sanguine, les LT helper peuvent être infectés directement et les souches transmises peuvent alors être de tropisme R5 ou X4. Néanmoins on observe que, peu importe la voie de transmission, les souches fondatrices sont quasi invariablement de tropisme R5. C'est pourquoi les personnes portant la mutation Δ32 du gène CCR5 sont protégées face au risque de contracter l'infection. Diverses études de génétique ont démontré que l'infection n'était initiée que par un seul variant viral (Shaw and Hunter, 2012). Les virus de tropisme R5 prédominent durant l'infection primaire, tandis que dans les étapes tardives, au fil de l'évolution du virus, des souches de tropisme X4 ou R5X4 émergent. Les mécanismes de ce *shift* tropique ne sont pas bien caractérisés. L'apparition des souches à tropisme X4 est un marqueur fort de la déplétion des LT CD4+ et de la progression vers le stade SIDA (détaillés dans la partie suivante) (Deeks et al., 2015; Moir et al., 2011).

D'un point de vue cellulaire, l'infection peut se faire par des virions libres, en suspension dans l'organisme (*cell-free transmission*), ou bien les cellules cibles peuvent être infectées *via* une transmission directe des virus par une cellule déjà infectée (*cell-to-cell transmission*). La transmission de cellule à cellule est notamment courante avec les cellules dendritiques. Ces dernières sont peu permissives à l'infection, mais peuvent capturer et transmettre des virus à des LT CD4+. La transmission entre cellules représenterait la voie majeure d'infection cellulaire, avec 60 % des infections (Iwami et al., 2015). Ce mode de transmission englobe divers mécanismes qui sont détaillés dans l'article de revue suivant (Bracq et al., 2018). La concentration plus forte de virus aux points de contact intracellulaires que dans les compartiments extracellulaires, et les points de contact directs par des organelles spécialisées peuvent expliquer l'efficacité supérieure de ces modes d'infection que par des virus libres. Les virions transmis directement pourraient aussi être moins vulnérables à des facteurs de restriction des cellules hôtes ainsi qu'à l'environnement (cART, anticorps, etc) ; la compréhension de ces modes de transmission reste donc importante dans l'optique des traitements antiviraux et de la vaccination.

2. Physiopathologie de la maladie

Lors d'une transmission sexuelle, le virus s'attache aux cellules dendritiques (cellules de Langerhans, etc) ou aux macrophages présents dans les muqueuses sexuelles et y établit son premier site de réplication. La progression globale de la maladie (**Figure 4**) est la même indépendamment du site d'infection primaire. Le virus se répand ensuite dans les ganglions lymphatiques proximaux en 5 à 6 jours, puis dans les ganglions distaux, grâce aux cellules infectées circulantes. Le virus est détecté dans tout le corps 10 à 14 jours après le début de l'infection, y compris dans le système nerveux. Les niveaux viraux culminent environ 30 jours après l'infection. Cette phase de réplication dite aiguë s'accompagne généralement de symptômes pseudo-grippaux pendant quelques semaines, tels que de la fièvre, de la fatigue, des diarrhées… Le système immunitaire atteint ensuite un certain degré de contrôle de l'infection et les niveaux de réplication virale diminuent progressivement d'environ 100 fois par rapport au pic virémique, jusqu'à un « point de consigne » où la réplication virale reste stable pour des années. Le niveau de réplication, selon son intensité, va déterminer la vitesse de progression en phase SIDA. Cette phrase dite chronique est asymptomatique, et dure classiquement environ 10 ans, sauf chez des patients « *rapid progressors* » chez qui la maladie peut atteindre le stade SIDA en 2 à 4 ans, et les « *long-term non-progressors* » chez qui la phase SIDA n'est jamais atteinte ou bien l'est très lentement. Ces phénotypes sont associés au niveau du point de consigne de la virémie (Deeks et al., 2015; Moir et al., 2011).

Lors de la phase aiguë, le pool de LT CD4+ diminue temporairement, avant d'être reconstitué à des niveaux initiaux. Néanmoins au cours de la phase chronique, ce pool va diminuer progressivement. Différents mécanismes jouent dans cette déplétion. Le virus, cytopathique, induit la mort de ses cellules hôtes par sa réplication, et par la formation de *syncytia*. Les cellules infectées peuvent aussi être la cible de LT cytotoxiques, de cellules NK, ou de réponses ADCC qui induisent leur apoptose. De plus, le virus entraine l'activation continue du système immunitaire, notamment *via* des provirus défectueux, ce qui cause une fatigue de ce dernier, et participe à la déplétion progressive des cellules cibles du virus. En cas de réponses inflammatoires locales dues au virus, les cellules saines locales peuvent aussi mourir. Finalement, le virus diminue la capacité du système immunitaire à régénérer de

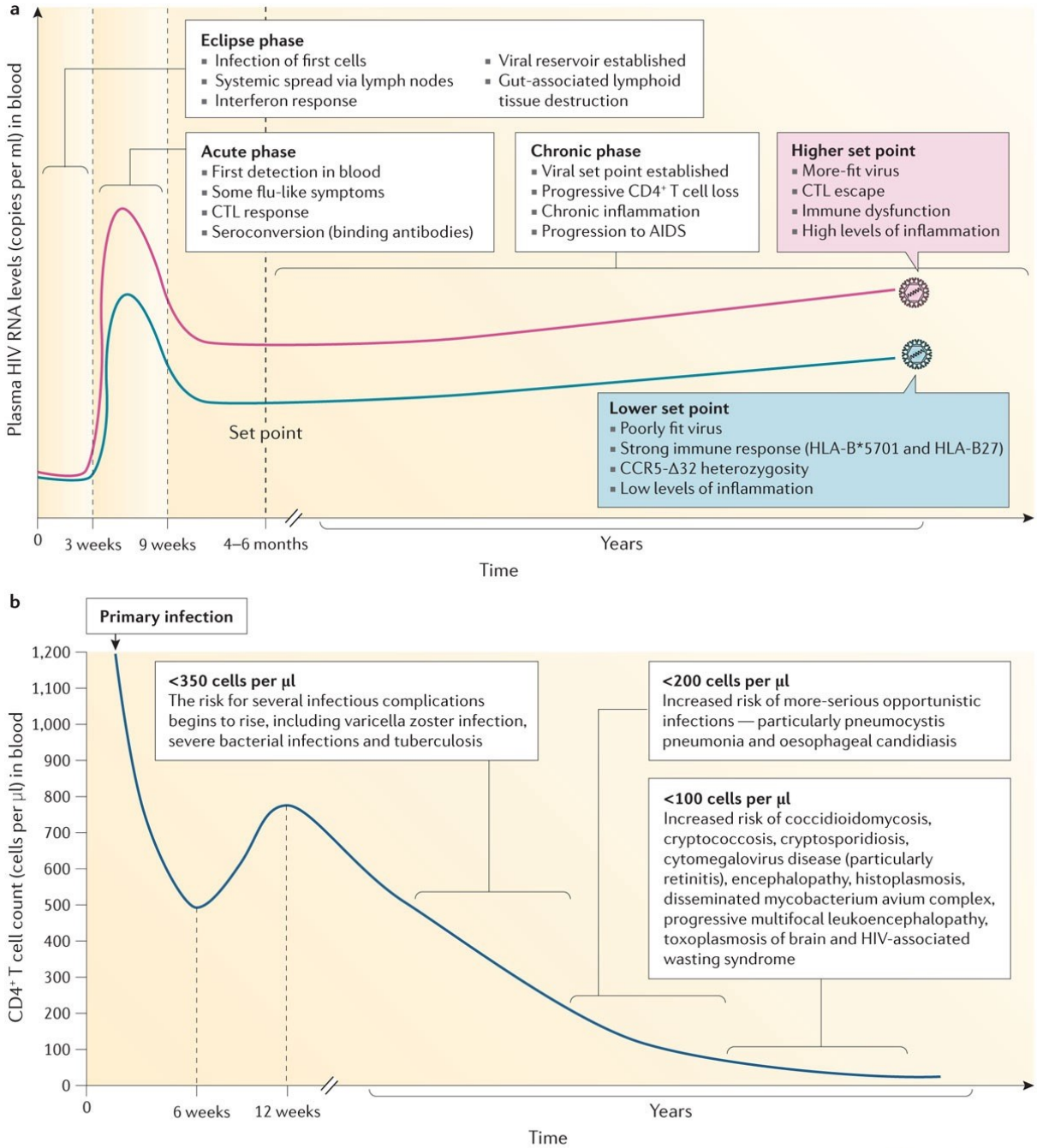


Figure 4 : Progression de l'infection à VIH. La virémie (**A**) et le taux de CD4+ (**B**) sont représentés au cours du temps. L'infection débute par une phase d'éclipse asymptomatique, avec une virémie faible durant 1-2 semaines ; le virus établit son premier foyer infectieux. Les premiers réservoirs viraux sont créés à cette phase. Une phase aigüe de 2-4 semaines suit, où la virémie augmente jusqu'à son pic. Elle s'accompagne de symptômes pseudo-grippaux et de la mise en place de la réponse immunitaire. Le contrôle immunitaire du virus fait entrer l'infection dans sa phase chronique, avec une réplication virale plus faible mais stable à un « point de consigne », allant de quelques copies à 10^6 copies d'ARN par ml de sang en fonction des individus. Cette phase est asymptomatique mais s'accompagne d'une inflammation chronique et d'une baisse progressive du taux de LT CD4+, jusqu'à l'atteinte de la phase SIDA. Le premier déclin de LT CD4+ et la reconstitution qui s'ensuit jusqu'à la semaine 12 correspondent à la phase aiguë de l'infection, où beaucoup de lymphocytes des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT) sont détruits. La reconstitution lymphocytaire suivant ce premier déclin peut être totale ou partielle. Le taux de LT CD4+ décline progressivement au cours du temps, et des cancers ou des maladies causées par des pathogènes opportunistes apparaissent. Celles-ci sont fatales à terme. CTL : LT cytotoxiques ; HLA : *Human leukocyte antigen*. Figure adaptée de Deeks et al., 2015.

nouvelles cellules T CD4+ en affectant les cellules souches et le thymus. Au fur et à mesure que l'immunodéficience progresse, à partir de taux de T CD4+ inférieurs à 350 cellules par µl de sang, des infections opportunistes commencent à apparaitre. Une caractéristique courante de la maladie est l'alternance de périodes en bonne santé et les périodes de maladies, ces dernières devenant plus fréquentes et longues au fur et à mesure de l'affaiblissement du système immunitaire. La phase SIDA est atteinte à un taux de 200 LT CD4+ par µl de sang. Les infections opportunistes entrainent finalement la mort du patient (Deeks et al., 2015; Moir et al., 2011).

4) Traitements

1. Historique des antirétroviraux

Depuis 40 ans, la recherche mondiale a fourni des efforts globaux, afin de mieux comprendre et déchiffrer le virus, en étudiant par exemple sa pathogenèse et ses interactions avec l'hôte, et en parallèle pour développer des approches de dépistages, prévention, et traitement du virus ainsi qu'un focus important sur la mise au point d'un vaccin (Barré-Sinoussi et al., 2013). Si ce dernier point n'est toujours pas atteint aujourd'hui, toutes ces recherches ont permis d'énormes améliorations pour la prise en charge, l'espérance de vie et le niveau de vie des PVVIH. La première lueur d'espoir était l'approbation du premier inhibiteur nucléosidique de transcriptase inverse (INTI), la zidovudine ou AZT, en 1987 qui arrivait à juguler temporairement la réplication virale. Cependant cette molécule s'est vite démontrée imparfaite, dû aux forts effets secondaires qu'elle entrainait, et surtout face à son incapacité à supprimer entièrement la réplication virale, et sa perte d'efficacité au cours du temps (Richman, 1990). En effet, l'usage de cette molécule unique a conduit à la sélection de virus mutants résistants, aptes à se répliquer même en présence de la drogue, empêchant un contrôle durable de la virémie. Plusieurs moments et actions clés de lutte contre le VIH/SIDA peuvent ensuite être considérés comme des révolutions. La première, d'ordre thérapeutique, fût la mise au point et la distribution de la première cART en 1996. Le second fût celle de l'accès, à partir de 2003, où une accumulation de preuves scientifiques, d'activisme, et d'une volonté politique commune de lutter contre la pandémie ont permis la mise en place d'une réponse mondiale, associée à un déploiement de moyens par les états et les organismes supra-étatiques, dans l'objectif de fournir un traitement de masse au plus de PVVIH possible. La

proportion de personnes sous cART est ainsi passée de 5% en 2004 à 73% en 2021, s'accompagnant d'une diminution des décès de 64% en 2021 par rapport à 2004. La galénique joue aussi un rôle important dans l'efficacité de la cART, avec par exemple l'introduction en 2006 de la première cART formulée en tant que gélule unique quotidienne, une avancée thérapeutique majeure ayant considérablement augmenté l'efficacité des traitements grâce à une observance renforcée. La troisième révolution est celle de la prévention, au début-milieu des années 2010, avec la démonstration de la puissance du « traitement comme prévention » (TasP), ainsi que celle de la prophylaxie pré-exposition (PreP), premièrement avec les résultats de l'essai iPrex en 2010 (Grant et al., 2010) puis la distribution large de celle-ci. La prochaine révolution pourrait être celle de traitements cART à action longue, aussi bien pour un usage thérapeutique que prophylactique.

2. Cibles de la thérapie antirétrovirale combinée (cART)

Plus de 30 médicaments antirétroviraux (ARV) sont actuellement approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement de l'infection à VIH. Ils sont répartis en plusieurs classes mécanistiques présentées ci-dessous (**Figure 5**). Ces molécules empêchent la production de nouveaux virus, donc la diffusion de l'infection, mais n'ont pas d'effet sur les virus déjà intégrés. En fin d'année 2022 le Lenacapavir, une molécule d'une nouvelle classe

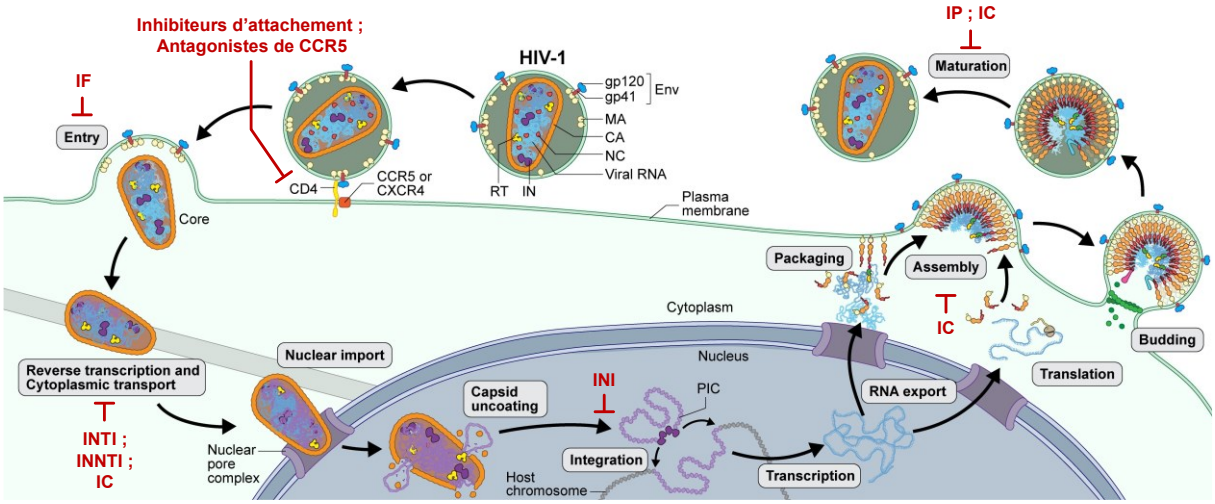


Figure 5 : Classes d'inhibiteurs antirétroviraux et modes d'action. Le cycle réplicatif du VIH-1 est représenté (celui-ci est détaillé dans la partie 6 de ce premier chapitre), ainsi que les étapes ciblées par les ARV. Ils peuvent agir virtuellement à toutes les étapes du cycle et ciblent généralement les protéines du virus, notamment ses enzymes. Parmi les ARV utilisés chez l'Homme, on recense les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de protéase (IP), les inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (INI), les inhibiteurs de fusion (IF) aussi appelés inhibiteurs d'entrée, les inhibiteurs d'attachement aux LT (ciblant la gp120 du VIH, le récepteur CD4 ou le corécepteur CCR5) et les inhibiteurs de capside (IC). Ces derniers, récemment approuvés, interfèrent avec la

décapsidation du virus en phase précoce, et aux étapes d'assemblage et de maturation en phase tardive. Figure adaptée de scienceofhiv.org.

mécanistique, inhibiteur de capside, a été approuvé par la FDA sur la base d'essais cliniques prometteurs (Segal-Maurer et al., 2022). Deux molécules, le ritonavir et le cobicistat, sont utilisés comme potentialisateurs pharmacocinétiques (ou *boosters*) avec les inhibiteurs de protéase (IP). Un schéma de cART classique comprend deux INTI ainsi qu'une troisième molécule antivirale d'une des classes suivantes : un INI, un INNTI, ou un IP avec *booster*. Des études récentes supportent désormais un schéma thérapeutique efficace reposant sur seulement deux molécules, le dolutegravir et la lamivudine, respectivement un INI et un INTI (Osiyemi et al., 2022). La cART permet d'atteindre en 6 mois un stade de suppression virale, ou l'état « indétectable », défini par une quantité d'ARN du VIH (charge virale) inférieure au seuil de 200 copies/mL de plasma. Associé à cette suppression virale, la cART permet aussi la reconstitution immune, traduit par l'augmentation des niveaux de LT CD4 des PVVIH (Bartlett et al., 2001; Kelley et al., 2009). Grâce aux cART, l'infection à VIH est devenue une « maladie chronique », permettant aux PVVIH de vivre sous contrôle viral et d'avoir une qualité de vie et espérance de vie proches de celles de la population générale. En plus d'améliorer les conditions de vies des PVVIH, les ARV sont aussi des outils de prévention de la transmission du VIH essentiels, qui s'ajoutent à l'usage de préservatifs.

3. *Treatment as prevention* (TasP) et dépistage

L'utilisation du traitement comme prévention, TasP, se base sur des résultats d'études observationnelles des années 2010 qui ont montré une réduction drastique du risque de transmission du VIH entre des partenaires sérodiscordants lorsque le partenaire séropositif avait une charge virale indétectable. Dans une l'étude HPTN 052, aucune transmission n'a été détectée lorsque les partenaires séropositifs étaient effectivement en suppression virale (Cohen et al., 2016, 2011). Dès lors, le contrôle de la réplication virale par la cART a été reconnu comme une des méthodes de prévention de la maladie les plus efficaces, et est la base des politiques de I=I, pour Indétectable = Intransmissible (ou U = U, pour *Undetectable = Untransmittable*) et du 95-95-95 (Ghosn et al., 2018). Face à ces observations, ainsi que des études supportant les bénéfices cliniques de l'initiation d'une cART le plus précocement possible après une infection, les directives mondiales et étatiques recommandent l'initiation d'une cART chez tous les PVVIH dès la connaissance de leur séropositivité. Le traitement, non

curatif, ne permet qu'un maintien du virus à niveau indétectable plutôt que l'éradication de ce dernier. Le traitement doit être pris à vie afin d'éviter un rebond viral, soit la reprise de la réplication du virus dans l'organisme à des niveaux détectables, qui est quasi inévitablement observé après quelques mois en cas d'interruption de traitement.

La TasP comme stratégie de prévention vise donc à limiter la circulation virale dans la population *via* une mise sous traitement rapide. Elle repose alors sur l'observance des PVVIH à leur traitement, associé de fait à un accès garanti à vie aux traitements, et à un accès du traitement à un niveau mondial. Cette stratégie repose encore plus principalement sur l'étape préalable de test, qui est donc primordiale à la lutte contre l'épidémie. Afin d'atteindre un panel de personne toujours plus large, l'accès aux tests promu par des stratégies innovantes (dépistage en porte à porte, pairs conseillers, dépistages en centres communautaires…) et l'usage des nouvelles technologies (promotion sur appli et sites de rencontres, etc). L'accès aux autotests livrés à domicile est aussi un point important pour atteindre les personnes réticentes à aller en centres médicaux ou communautaires. Néanmoins, beaucoup de déterminants psychosociaux de la santé sont intimement liés à l'épidémie de VIH et au fait de se faire tester ou d'adhérer efficacement à son traitement. Parmi les déterminants négatifs qui viennent à l'encontre du dépistage ou de l'observance, on peut recenser la pauvreté, l'insécurité alimentaire, la discrimination et stigmatisation, l'abandon social, les violences de genre et les problèmes de santé mentale. De plus, on recensait encore aujourd'hui 69 pays (dont 32 sur le continent africain) où les relations homosexuelles sont encore criminalisées, dont 11 à 17 pays où elles sont passibles de peine de mort. Ainsi, une lutte efficace contre le VIH s'articule non seulement autour d'un accès garanti à la cART, mais aussi à des actions politiques pour entrainer des changements sociétaux, lutter contre la stigmatisation et le discrimination, et améliorer les accompagnements psychosociaux, tant au niveau de leurs infrastructures (accueil, hébergement…) que des services proposés (suivi mental, social…) (Ghosn et al., 2018).

En plus de la TasP, il convient également de mentionner la prophylaxie post-exposition (PEP), qui repose sur la prise d'une cART durant 1 mois après une exposition à une situation de risque de transmission du VIH. À l'inverse de la TasP qui réprime uniquement l'infection, cet usage très précoce de la cART permet d'empêcher de contracter l'infection. Son efficacité

n'est pas de 100 % mais reste significative (environ 80 %), la PEP complète le panel d'outil anti-VIH disponible.

4. Prophylaxie préexposition (PreP)

La PreP correspond à la prise d'un traitement cART par une personne saine, pour réduire ses risques de contracter une infection à VIH. Ces traitements correspondent classiquement à l'utilisation d'un ou deux ARV combinés ; par exemple deux INTI dans le cas du Truvada généralement prescrit en France. La PreP est un outil de prévention important, avec une efficacité de réduction du risque d'infection de plus de 85-90 % (Murchu et al., 2022). L'efficacité de cet outil prophylactique dépend néanmoins fortement de l'adhérence des personnes aux schémas de la prise médicamenteuse, et peut s'avérer moins efficace qu'attendu « dans la vie réelle », à cause de différents facteurs socio-économiques, éducatifs (Jourdain et al., 2022; Murchu et al., 2022). La PreP est autorisée en 2016 en France ; puis « la PreP à la demande » y est introduite en 2019. Ce schéma de prise à la demande adaptatif vise à donner aux hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) une plus grande flexibilité sur l'usage des traitements, et donc faciliter et renfoncer son utilisation. La force de cet outil, et son absence d'alternatives hors préservatif, rendent nécessaires la poursuite de son amélioration et le renforcement de l'éducation des populations cibles à son usage. Dans ce sens, la FDA a approuvé en décembre 2021 l'usage du *long-acting injectable cabotegravir* (CAB-LA) parmi l'arsenal de solution de PreP, correspondant à l'injection bimestrielle d'un unique INI comme stratégie de prévention. L'utilisation de molécules à action durable, ainsi associée à une prise espacée de ces dernières, est un objectif majeur à atteindre pour favoriser l'utilisation de cette solution de prévention, et neutraliser les défauts d'observance.

5. Résistance aux ARV et variabilité génétique

Les premiers traitements ARV développés s'accompagnaient d'effets secondaires lourds dus à leur toxicité ; cela et leurs schémas de prise complexes réduisaient l'adhérence des patients aux traitements. Si les schémas de prises sont aujourd'hui grandement simplifiés, et les effets secondaires fortement réduits, d'autres paramètres socio-économiques jouent néanmoins dans l'observance des traitements et notamment l'accès ou les stocks aux cART dans certains pays à revenus moyens ou limités. Les défauts d'observance résultent en des niveaux sous-optimaux d'ARV dans l'organisme et peuvent encore mener à l'échec virologique

et à une reprise de la progression de la maladie. Chez les PVVIH, l'échec virologique correspond au fait que le VIH se réplique, malgré la présence d'ARV habituellement aptes à empêcher cette réplication. Cet échec survient suite à la sélection d'un variant viral résistant préexistant, ou à la sélection d'une souche ayant accumulé les mutations lui conférant une résistance face à la molécule thérapeutique. En plus des défauts d'observance, l'usage d'une cART inadaptée (cART initiée sans criblage préalable des variants résistants, usage d'ARV naturellement inefficaces contre le VIH-2, etc) conduit aussi à la sélection de souches résistantes.

Ces souches résistantes émergent grâce à la variabilité génétique du VIH qui est liée à 3 facteurs principaux. Premièrement, le taux d'erreur communément acceptée de la transcriptase inverse (RT), dépourvue d'activité correctrice, est autour de 10^{-4}, soit un taux de mutation un million de fois plus important que celui des ADN polymérases humaines. Pour son génome de 9,2 kb, cela correspond à environ un nucléotide muté par cycle. Deuxièmement grâce à l'homodimère d'ARN encapsidé dans sa particule virale, le virus peut recombiner, et le fait à un taux élevé. En effet, les deux molécules sont utilisées comme matrice lors de la transcription inverse, et la polymérase peut effectuer des échanges de matrice (*template switching*) en utilisant alternativement une molécule ou l'autre comme matrice. Lorsque deux ARN génomiques (ARNg) viraux différents sont encapsidés (suite à une co-infection d'une cellule), un virion hétérozygote en résulte. Lorsque ce type de virion initie une nouvelle infection, les *template switching* de la RT donnent lieu à un provirus chimérique, contenant des informations génétiques provenant de chaque brin parent (Delviks-Frankenberry et al., 2011). Le dernier paramètre est l'importante production virale, atteignant 10^9 à 10^{10} particules par jour au plus haut de la virémie. Couplé au taux d'erreur de la RT, cela représente virtuellement une mutation sur chaque nucléotide du génome. Par ailleurs, d'autres facteurs cellulaires peuvent contribuer à la variabilité, tels que les désaminases de la famille APOBEC intervenant lors de la transcription inverse. Cette variabilité entraine l'émergence de quasi-espèces virales chez les PVVIH non traités, qui sont en évolution constante ; et donne à terme la diversification observée avec souches circulantes (évoquée dans la partie 2 de ce chapitre I). La majorité des mutations sont délétères pour la *fitness* virale, signifiant que les mutants sont moins efficaces pour produire une progénie viable par rapport à des souches sauvages. Certaines mutations peuvent néanmoins être positives et conférer des avantages, telle que des résistances aux ARV, et seront sélectionnées en cas de pression associée. La variabilité du

virus le rend ainsi hautement adaptable aux pressions de sélections, qu'elles soient chimiques ou biologiques (Wargo and Kurath, 2012). De manière intéressante, lorsqu'un mutant résistant mais moins apte est sélectionné par des pressions de sélection, des mutations compensatoires surviennent régulièrement par la suite et sont sélectionnées, permettant un regain partiel voir total de la *fitness* du mutant.

Les souches résistantes représentent une problématique non négligeable en cas de transmission en population. En effet, leur accumulation impacte la stratégie de « tester & traiter », en diminuant les options de traitements et augmentant le cout de ces derniers, surtout dans les pays à revenus moyens ou limités. La sélection de résistances étant liée à une pression exercée par les traitements, la prévalence de la transmission de souches résistantes à des ARV (TDR) a effectivement augmenté suite à l'expansion de l'usage de cART (Gupta et al., 2012). Dans les pays à hauts revenus, la TDR est moins problématique, la détection des souches résistantes étant effectuée avant d'initier une cART chez un PVVIH. Ces tests ne sont néanmoins pas routiniers dans les pays à faibles et moyens revenus.

Dans le cas d'une résistance à des ARV, on évoque aussi la notion de barrière génétique à la résistance (BG) d'un ARV, qui réfère à un nombre seuil de mutations critiques que le virus doit accumuler pour atteindre une perte de susceptibilité significative face à la molécule thérapeutique en question. Cette notion est corrélée à un facteur temps, celui nécessaire à l'acquisition des mutations de résistance. Plus le nombre de mutations requises pour se soustraite de l'action d'une molécule thérapeutique est élevée, plus le franchissement de celle-ci par le virus est difficile et donc plus la barrière génétique est élevée. L'usage d'ARV combinés en cART vise ainsi à atteindre une BG infranchissable pour le virus ; les ARV, individuels ou en combinés, ont néanmoins des BG plus ou moins élevées. Les traitements avec des BG faibles, comme les traitements basés sur des combinaisons de INNTI/INTI, peuvent être associés à des échecs virologiques rapides et la sélection de souches résistantes (Rhee et al., 2020). La BG d'une cART sera aussi plus faible pour un variant déjà résistant à l'un des ARV de la combinaison, pouvant éventuellement favoriser la sélection ou l'émergence de mutations procurant une seconde résistance du virus face à un des autres ARV de la combinaison utilisée. Les INI ont des BG élevées, et très peu d'apparition de résistances est observé chez les PVVIH en échec virologique après une cART contenant un INI, faisant alors de la transmission de souches résistantes aux INI un évènement rare (Guo et al., 2021). L'usage

d'INI en cART de première ligne, selon les recommandations officielles des dernières années et en cours d'adoption dans les pays d'Afrique subsaharienne, permettra alors de diminuer le problème de la TDR et de préserver les options thérapeutiques des PVVIH en échec virologique ; cette problématique de santé reste cependant à monitorer.

6. Futurs challenge des cART

Aujourd'hui les recherches dans le domaine des thérapies anti-VIH déjà existantes s'articulent autour de différents objectifs. Les PVVIH vivent plus longtemps et la moitié des PVVIH des pays à hauts revenus sont âgées de 50 ans ou plus. Les recherches visent ainsi à réduire la toxicité des molécules utilisées, ou à alléger le nombre de molécules utilisées dans les traitements de longue durée, *via* l'usage de bithérapies optimisées, afin de diminuer les effets secondaires et les potentielles interactions médicamenteuses des traitements avec d'autres molécules thérapeutiques. Le second objectif majeur est le développement de traitement à longue durée d'action, avec les inhibiteurs actuels ou de nouvelles molécules telles que le lenacapavir (Inhibiteur de capside) ou l'islatavir (INTI). Ces traitements reposent sur l'utilisation d'implants qui relarguent et diffusent les molécules sur la durée, ou bien sur l'utilisation en injections de molécules actives avec des caractéristiques pharmacocinétiques appropriées (stabilité, efficacité, etc). En effet, la prise de traitement cART sous forme de pilules par les PVVIH est compliquée par un stress et une fatigue de la prise quotidienne de gélules, les conditions d'accès ou de vie inadéquates, un stress de la révélation du statut et des stigmates associés… Les défauts d'observances en découlent ainsi et sont problématiques. Comme pour la PreP, l'usage d'agent à action longue permettra de balayer ces barrières, et ce d'autant plus que l'espacement des injections augmentera. Ces stratégies de traitements injectables répondent en effet à un besoin et un intérêt manifeste (Slama et al., 2023). Récemment dans les pays à hauts revenus, dont la France en 2022, l'usage d'une cART en bithérapie (INTI+INI) en injection a été approuvé en tant que thérapie de maintenance, pour les PVVIH déjà au stade de suppression virale. Le traitement est injecté en voie intramusculaire tous les deux mois. Les recherches actuelles visent à atteindre des traitements avec des interventions encore plus espacées (3 mois, 6 mois, 1 an…), comme avec le lenacapavir (Segal-Maurer et al., 2022) ou le cabotegravir. La revue de Thoueille et collègues traite des avancées actuelles, enjeux et futurs challenges du développement des stratégies à longues durées

(Thoueille et al., 2022). En parallèle, la galénique des traitements doit aussi être optimisée et adaptée pour faciliter l'adhérence des enfants PVVIH à leurs traitements.

Le besoin de développer de nouvelles thérapies, plus efficaces ou sur de nouvelles cibles, subsiste encore, afin d'avoir un large arsenal thérapeutique à disposition et pouvoir réagir efficacement aux virus résistants, qui apparaissent inexorablement. De nouvelles molécules se devront néanmoins d'avoir des fortes caractéristiques : une toxicité faible ; une efficacité élevée y compris contre les souches virales résistantes ; une BG élevée et une action durable compatible avec les stratégies d'administration en cours de développement (Menéndez-Arias and Delgado, 2022). Par ailleurs, malgré les avancées dans les cART, la mortalité reste supérieure pour les PVVIH qu'en population générale. Si la toxicité des cART peut être un facteur dans le développement des comorbidités associées aux PVVIH, d'autres paramètres immuns jouent un rôle, tels qu'une récupération faible des LT CD4, et une activation et inflammation persistante du système immunitaire. De nouvelles stratégies thérapeutiques seront aussi nécessaires pour contrer ces anormalités.

7. Latence virale et autres perspectives de traitements : le HIV cure

J'ai choisi dans ce manuscrit de ne développer que les traitements antirétroviraux utilisés classiquement et les perspectives associées. Néanmoins, en dehors du champ des ARV, de nombreux domaines de recherches se regroupent dans le cadre du « *HIV cure* » et sont en effervescence depuis plusieurs années. Les recherches du domaine HIV cure s'articulent autour de deux objectifs : l'atteinte pour les PVVIH de la guérison (*sterilizing cure*), correspondant à une éradication totale du virus de l'organisme, ou de la rémission (*functional cure*), un état de contrôle efficace et durable du virus par l'organisme en absence de traitements antirétroviraux. Ce second représente un challenge technique plus facilement relevable que le premier. Le cas du patient de Berlin, Thimoty Brown, a donné de l'espoir à la communauté scientifique et est en partie responsable de l'élan du *HIV cure*. Thimoty Brown fut la première personne à avoir été totalement guérie du VIH en 2007, suite à une lourde procédure d'irradiation de moelle osseuse et de transplantation de moelle osseuse d'un donneur CCR5Δ32, dans le cas d'un cancer de la moelle (Hütter et al., 2009). Le gène mutant CCR5 Δ32 conférant une résistance naturelle des cellules exprimant le corécepteur face aux souches R5 du virus (McLaren and Fellay, 2021). D'autres cas de patients guéris de la même manière ont été rapportés ces dernières années : le patient de Londres (Adam Castillejo) rapporté en 2019

(Gupta et al., 2019), le patient de Düsseldorf rapporté cette année (Jensen et al., 2023) et les patients de New York et Hope encore en cours d'étude. Deux autres cas sont associés à des guérisons spontanées du virus, la patiente de San Francisco (Loreen Willenberg) rapporté en 2020 (Jiang et al., 2020) et celle d'Esperanza rapportée l'an dernier (Turk et al., 2022). Il existe de plus des patients dits « *elite controllers* » chez qui la réplication du VIH est contrôlée naturellement et efficacement (sous les seuils de détections officiels) sans traitement, ainsi que des patients dits « *post-treatment controllers* », chez qui le contrôle viral est maintenu après une période de traitement par cART (Li and Blankson, 2021; Sáez-Cirión et al., 2013; Woldemeskel et al., 2020). Les deux types de patients sont activement étudiés afin de comprendre par quels mécanismes leurs organismes répriment le virus. Les contrôleurs élites représentent 0,5 % des PVVIH et les contrôleurs post-traitement 5 à 10 %. Les exemples de guérisons ou rémissions, et des diverses classes de patients contrôleurs constituent donc des encouragements supplémentaires envers le *HIV cure*.

Les notions de latence et de réservoirs sont essentielles dans le cadre du *HIV cure*. Le génome du virus s'intègre dans le génome de la cellule hôte, et persiste toute la durée de vie de la cellule infectée. Le génome du virus sera aussi dupliqué en cas d'expansion clonale de la cellule le contenant, prolongeant la durée de vie des réservoirs. Les cellules infectées peuvent contenir un génome viral compétant à la réplication mais transcriptionnellement silencieux, ce que l'on nomme latence. Dès lors, les cellules restent invisibles aux yeux du système immunitaire et ne sont pas ciblées par ce dernier. Elles peuvent néanmoins conduire à la résurgence de la réplication virale et donc de l'infection, notamment en cas d'arrêt de cART. La latence est un processus complexe impliquant de nombreux acteurs dans la régulation transcriptionnelle (Dutilleul et al., 2020; Van Lint et al., 2013), et pouvant s'effectuer par différents mécanismes en fonction du type cellulaire. Le virus peut persister sous de multiples formes, défectueuses ou non, dans différents types cellulaires, et à différents endroits de l'organisme. Les réservoirs viraux représentent ainsi les cellules contenant du génome viral intègre pouvant mener à une réplication fonctionnelle, ainsi que tous les sites anatomiques contenant ces cellules (**Figure 6**). En d'autres mots, les réservoirs sont toutes les sources potentielles de rebond viral en cas d'interruption de traitement (Deeks et al., 2021).

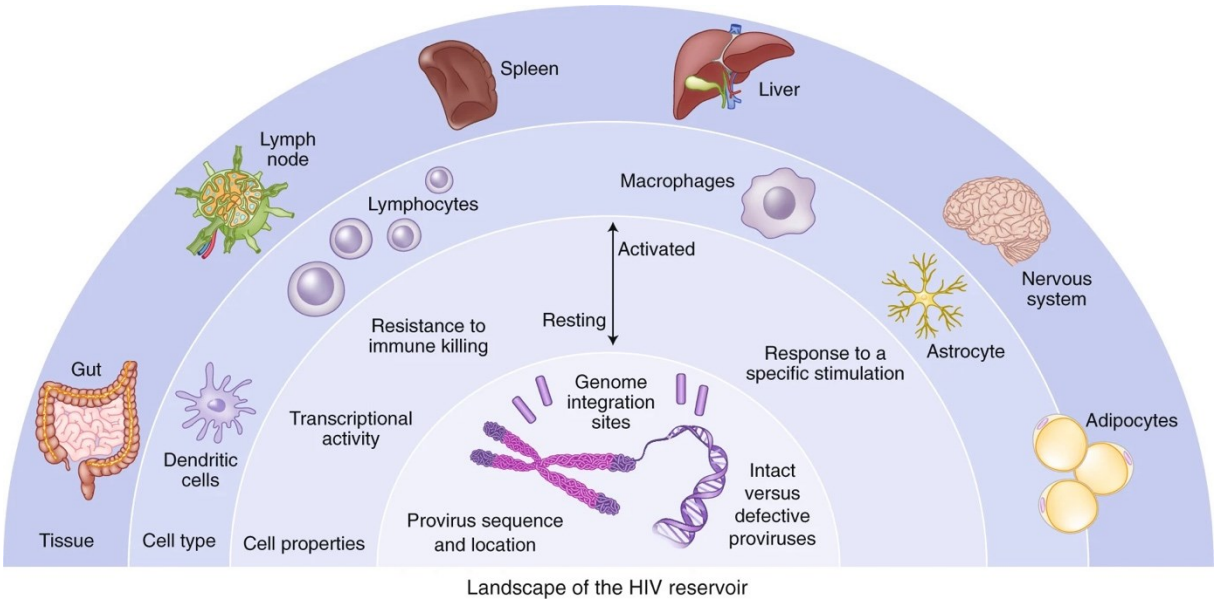


Figure 6 : Réservoirs viraux et latence : localisations anatomiques, types cellulaires cibles et déterminants moléculaires. Les réservoirs du VIH-1 sont multidimensionnels, ils peuvent être définis en termes de (1) localisation anatomique ; (2) type cellulaire ; (3) profil cellulaire fonctionnel (activé ou latent, etc) ; (4) profil viral fonctionnel (intact ou défectueux, etc) ; (5) réponse à des stimuli ; (6) site d'intégration dans le génome hôte. Figure adaptée de Deeks et al., 2021.

La demi-vie des LT infectés est de 2-4 jours dans le sang. Certaines cellules cibles du VIH, telles que les macrophages, astrocytes ou T mémoires peuvent persister plusieurs années en état de latence, avec une demi-vie jusqu'à 7 ans pour certains types cellulaires. De par ces propriétés du virus à se camoufler, persister et se réactiver, les réservoirs sont l'obstacle premier face à son éradication de l'organisme (guérison). Ils sont en effet difficiles à cibler efficacement, notamment par le manque d'un biomarqueur qui serait spécifique et commun à tous les réservoirs. De plus, en absence de marqueur caractérisant précisément ces réservoirs, il est difficile de quantifier leur disparition, et donc de suivre l'efficacité d'un traitement.

On peut répartir les stratégies antivirales actuellement en étude selon 2 angles d'approches : celui de (1) cibler le provirus ou de (2) renforcer le système immunitaire. La première approche regroupe par exemple le *shock and kill* visant à réactiver les cellules infectées en latence pour les cibler et les éliminer ou le *block and lock* visant à inhiber de manière permanente la transcription du virus. Dans la seconde approche, de nombreux outils sont disponibles ou en cours de développement, tels que des agents immunomodulateurs (cytokines, agonistes/antagonistes de checkpoint immuns, DART, adjuvants vaccinaux…), des vaccins thérapeutiques ou encore les anticorps neutralisants à large spectre (bNAb). Ces derniers suscitent l'intérêt depuis plusieurs années. Les bNAb sont des anticorps neutralisants

développés par 20 % des PVVIH généralement au bout de plusieurs années d'infection. Ces anticorps ciblent des sites fonctionnels des protéines d'enveloppes (gp120, gp41) du virus, dits sites de vulnérabilités, qui sont hautement conservés au sein des différentes espèces ou quasi-espèces virales et qui permettent à l'anticorps cross-réactif d'agir contre de nombreuses souches virales différentes. Les bNAb permettent la neutralisation du virus par leur action de capture, empêchent sa diffusion aux cellules voisines, et peuvent induire des réponses effectrices immunes grâce à leur fragment conservé Fc (ADCC, ADCP, etc). Ces anticorps ont ainsi des perspectives d'utilisations pour prévenir l'infection en les injectant chez des sujets sains ou pour traiter les personnes infectées en ciblant leurs cellules réservoirs. Ils sont aussi activement étudiés dans le cadre des stratégies vaccinales avec l'objectif d'induire leur production chez les patients sains. Au sein des deux angles d'approches antivirales présentés, les stratégies de thérapie génique et d'édition de gène sont aussi activement étudiées. Elles visent par exemple à supprimer le virus du génome hôte grâce à l'outil CRISPR-Cas9, à modifier les cellules des PVVIH pour reproduire la mutation Δ32 du gène CCR5 et son phénotype de résistance associé, ou encore à reprogrammer des LT du patient pour qu'ils reconnaissent et éliminent ses cellules infectées (CAR-T). Finalement, chaque stratégie apporte ses propres avantages mais aussi inconvénients ; et leurs usages individuels dans divers essais n'ont jusqu'ici pas été satisfaisants, montrant une efficacité limitée. Néanmoins l'abondance de ces stratégies et la multiplicité de leurs angles d'attaque constituent un atout de taille. Leur usage combiné, déjà en cours d'étude, est porteur de promesses optimistes et font de la rémission, voire de la guérison, des objectifs de plus en plus réalistes. Les éléments de ce paragraphe sont approfondis dans l'article de revue suivant et les références qu'il contient (Deeks et al., 2021).

8. Vaccins anti-VIH

Divers outils de prévention efficaces sont actuellement accessibles et notamment la PrEP. Pour cette dernière par exemple divers facteurs diminuent sa puissance à échelle mondiale, tels que sa répartition inégale, le fardeau que sa prise représente ou sa pardonnance (maintien de la protection en cas de l'oubli d'une prise) limitée. Face aux limites des différents outils, l'obtention d'un vaccin reste un objectif essentiel dans le champ de recherche et lutte contre le VIH/SIDA. Depuis les années 2000, plusieurs essais vaccinaux se sont succédé. Malheureusement, jusqu'à présent, ces derniers se sont largement montrés décevants, n'apportant aucun effet positif, voir aggravant les risques de contracter l'infection. Seul l'essai

RV144 a montré une efficacité modeste, jugée insuffisante, de 30 % de protection face à l'infection après 3 ans et demi (Rerks-Ngarm et al., 2009). De multiples difficultés sont rencontrées dans la mise au point d'un vaccin anti-VIH efficace. La plus importante est surement la grande variabilité du virus (causes expliquées dans la partie 4.5 de ce chapitre), avec des souches circulantes différentes à hauteur de 20 % dans les protéines conservées et jusqu'à 35 % au niveau des glycoprotéines d'enveloppe entre différents sous-types. La variabilité importante de ces protéines de surface permet l'échappement du virus à la reconnaissance par les cellules effectrices de l'immunité et par les anticorps neutralisants ; provoquer une réponse immunitaire capable de contrer efficacement toutes les souches virales possibles est alors un challenge important. Ensuite d'autres obstacles s'ajoutent aux recherches vaccinales, à savoir : la latence virale et la durée de vie de certaines cellules cibles ; l'étude en modèles animaux appropriés ; et la difficulté à établir le corrélat de protection (efficacité dans la protection des réponses par LT ou LB, des anticorps neutralisants…). Les recherches vaccinales se poursuivent néanmoins, et différents essais ont été menés ces dernières années, certains étant encore en cours. Les résultats des essais vaccinaux achevés ainsi que les stratégies vaccinales utilisées par les essais passés et présents sont approfondis dans les revues suivantes (Kim et al., 2021; Ng'uni et al., 2020). Les vaccins à ARNm présentent divers avantages, tels que leurs coûts réduits et leur adaptabilité pour des productions de masse, et ont démontré leur efficacité dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2. Le champ de recherche des vaccins à base d'ARNm est en plein essor, et concerne aussi le VIH. Des essais de vaccins anti-VIH à base d'ARNm aux résultats encourageants ont été menés chez la souris (Pardi et al., 2018) ; et un essai clinique de phase 1 (HVTN 302) a été lancé l'an dernier pour étudier la sûreté d'un vaccin candidat chez l'Homme, et l'efficacité de la réponse immune qu'il provoque.

Les essais de *HIV cure* et de vaccins se confrontent néanmoins aux difficultés posées par la cART (Janes et al., 2019). Celle-ci permettant une répression efficace de la réplication du virus et de sa contraction (PrEP), il faut des volontaires souhaitant participer à ces études malgré la présence et l'efficacité prouvée de ces outils, et il faut adresser la dimension éthique du fait de faire courir des risques d'infection ou de rebond viral à des personnes pouvant bénéficier de ces outils. Des challenges financiers, techniques et logistiques sont aussi à relever dans le défi de la vaccination (Bekker et al., 2020).

5) Organisation génomique du VIH-1

Le VIH appartient à la famille des *retroviridae*, la sous-famille des *orthoretrovirinae* et au genre des *lentivirus*. Le virus enveloppé de forme sphérique ou pléomorphe, à une taille d'environ 100 nm de diamètre (**Figure 7B**). La particule contient le génome viral, un homodimère d'ARN monopartite linéaire de polarité positive, coiffé et polyadénylé d'environ 9,2 kb. Ce dernier code pour quinze protéines *via* 9 ORF (**Figure 7A**). Leurs fonctions sont présentées (**Table 1**). Les rôles des protéines structurales, enzymatiques et régulatrices sont évoqués dans le cycle réplicatif décrit dans les sous-parties suivantes. Les 4 protéines dites accessoires ou auxiliaires (Vif, Vpu, Vpr, Nef) ne sont pas indispensables au déroulement du cycle viral *in vitro*. En revanche, elles jouent chacune un rôle important dans l'infectiosité virale et impactent la pathogenèse virale. Ces protéines, *via* leurs activités, promeuvent la réplication, la survie des cellules infectées et la diffusion du virus ainsi que l'échappement immunitaire des cellules infectées. Leurs fonctions peuvent aussi être dépendantes du type cellulaire. Il est à noter que plusieurs d'entre elles régulent l'expression ou l'exposition du CD4, pouvant empêcher des surinfections par d'autres virions, et promouvoir le relargage des nouveaux virus en prévenant l'interaction à CD4 des gp120 des virions néoformés. Les fonctions accomplies par les protéines virales au cours du cycle viral, notamment par les protéines auxiliaires, sont très variées et parfois redondantes. Chaque protéine a suscité de nombreuses études, et toutes les connaissances acquises sur ces dernières ne sont pas restituées ici de manière exhaustive. Il existe divers articles de revue spécifiquement dédiés à chacune d'elles. Pour conclure, la protéine Asp (*Antisense protein*) à un rôle encore très peu caractérisé, des analyses phylogénétiques démontrent néanmoins que son encodage dans le génome viral est une caractéristique quasi exclusive des souches de groupe M, suggérant un rôle d'Asp dans le potentiel pandémique de ces virus (Gholizadeh et al., 2021). En plus de ses ORF, le génome viral comporte des séquences régulatrices essentielles à sa réplication. Le provirus, génome viral sous forme ADN après intégration, est bordé de deux longues extrémités terminales répétées (LTR), d'environ 600 nt et divisées en régions U3, R et U5. La région 5' non traduite (UTR) des ARNv contient les régions R, U5 et la région *leader*. U3 est l'élément *cis* régulateur de la transcription, contenant une région dite *super enhancer*, recrutant de multiples facteurs de transcriptions tels que NF-κB *via* divers motifs *enhancer*, ainsi que les séquences promotrices classiques de la transcription (TATA box, CAAT box…). La

transcription des ARNv débute à la jonction entre U3 et R. La région R contient la région TAR (voir partie 6.3 de ce chapitre I) et le signal de polyadénylation (polyA). En aval, la région *leader* s'étend jusqu'à l'AUG de *gag*, elle contient : le *primer binding site* (PBS) auquel s'hybride l'ARNt^{Lys,3} servant d'amorce lors de la transcription inverse ; le signal d'initiation de la dimérisation de l'ARNg (DIS) dans SL1 ; le site donneur majeur de l'épissage (SD1) dans SL2 ; et SL3, une tige-boucle historiquement impliquée dans l'encapsidation de l'ARNg. Le signal

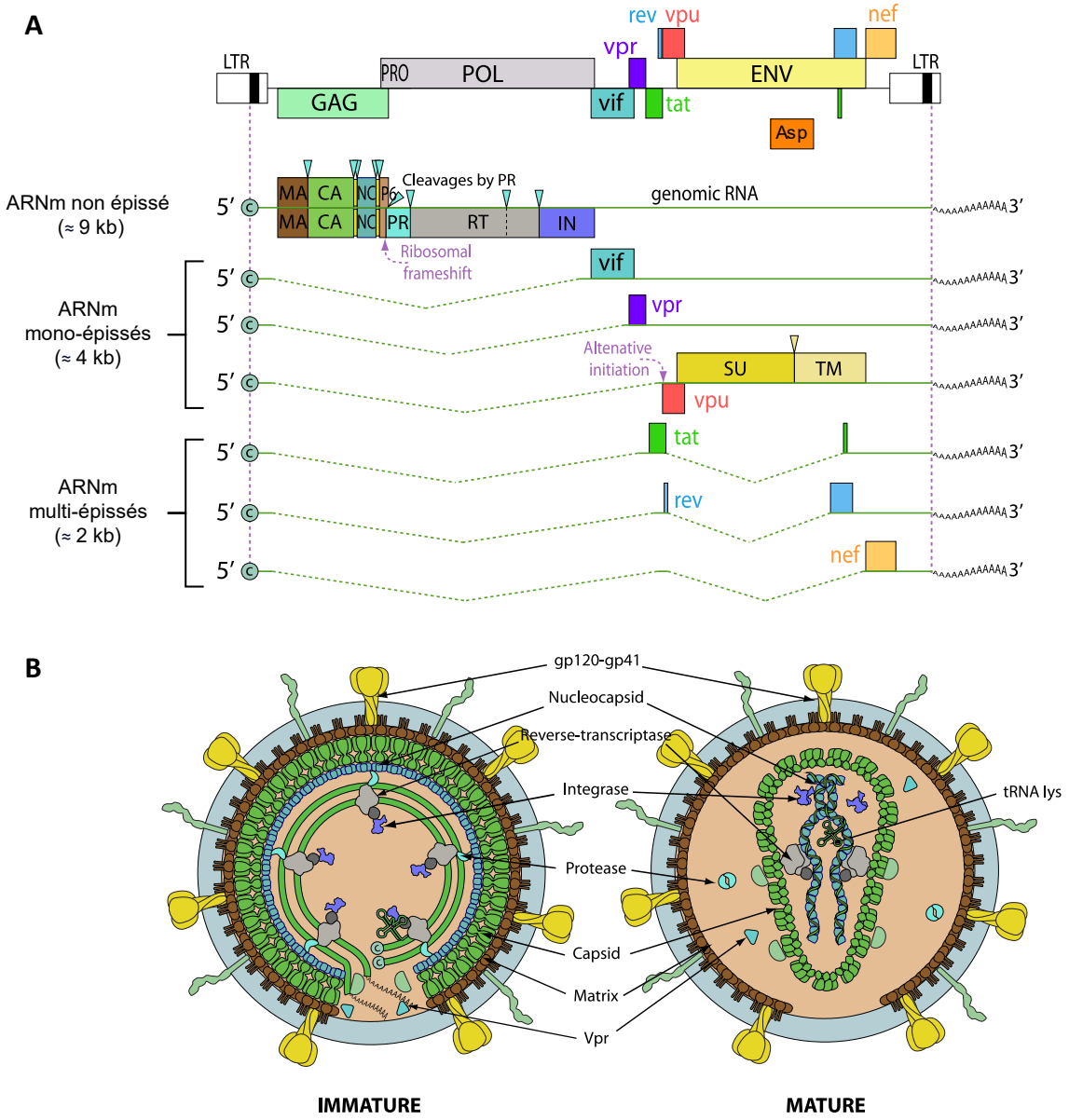


Figure 7 : Représentation de l'organisation génomique du VIH-1 et de sa particule virale. (**A**) L'ARNg du VIH-1 contient 10 gènes sur son génome d'environ 9,2 kb. Le 10ème gène *asp* (*antisense protein*), est exprimé en antisens, chevauchant le gène *env*. Les protéines sont exprimées *via* des mécanismes d'épissage alternatif : les protéines structurales et enzymatiques à partir d'un ARNm non épissé, et les protéines régulatrices (Tat, Rev), auxiliaires (Vif, Vpu, Vpr, Nef), et d'enveloppe à partir d'ARN mono- ou multi-épissés. (**B**) Le virion est représenté sous sa forme immature et mature. La capside virale adapte sa forme caractéristique de cône après l'étape de maturation protéolytique. Les protéines virales encapsidées sont indiquées. D'autres protéines cellulaires, telles que la cyclophiline A ou APOBEC3G peuvent aussi être co-encapsidées. Figures adaptées de Viralezone.

Gene	Taille	Nom de la protéine (a)	Fonctions principales
gag		Pr55Gag	Précurseur des protéines structurales.
	p17	Protéine de matrice (MA)	**Maturée :** décore la face interne de la membrane virale. **Dans les Pr :** essentielle à l'ancrage dans la membrane plasmique par son N-myristyl et assiste l'incorporation d'Env dans les virions
	p24	Protéine de capside (CA)	**Maturée :** forme le core viral conique. Essentielle pour le transport au noyau et l'import dans ce dernier. Protège l'ARNg d'être reconnu par les senseurs cellulaires. Fourni un environnement clos et concentré pour la RT. **Dans les Pr** : acteur majeur de la multimérisation de Gag.
	p7	Nucléocapside (NC)	**Maturée :** protège l'ARNg et est un chaperon d'ARN (promeut la RT, stabilise l'ARNg,…). **Dans les Pr :** recrute l'ARNg pour l'encapsidation, initie la multimérisation de Gag
	p6		**Dans les Pr :** essentielle au bourgeonnement des virions, interagit avec les complexes ESCRT. Encapside Vpr.
pol		Pr160GagPol	Précurseur des protéines enzymatiques.
	p10	Protéase (PR)	**Dans les Pr :** effectue la maturation protéolytique des Pr55Gag et Pr160GagPol, libérant les protéines structurales et enzymatiques. **Maturée :** hydrolise diverses protéines cellulaires, contribuant à la cytotoxicité induite par le VIH
	p51/p66	Rétrotranscriptase (RT)	**Maturée :** rétrotranscrit l'ARNg en ADNdb. Son domaine RNaseH dégrade l'ARN.
	p32	Intégrase (IN)	**Maturée :** intègre l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.
env		gp160	Précurseur des protéines d'enveloppe.
	gp120	Glycoprotéine de surface (SU)	Permet l'attachement et entrée du virus *via* son interaction avec les récepteurs cellulaires. Cible fréquente des Ab/bNab.
	gp41	Glycoprotéine transmembranaire (TM)	Ancre gp120 à la membrane virale. Permet la fusion des membranes et l'entrée du core viral dans la cellule.
tat	p14	*Transactivator protein* ; Tat	Activateur fort de l'élongation de la transcription des ARNv *via* ses interactions avec TAR et P-TEFb.
rev	p19	*Regulator of expression of virion proteins ;* Rev	Permet l'export des ARN viraux non épissés et mono-épissés en interagissant avec RRE et CRM1.
nef	p27	*Negative regulating factor* ; Nef	Inhibe l'expression de CD4, CMH et SERINC3/5.
vif	p23	*Viral infectivity factor* ; Vif	Inhibe les A3 par divers mécanismes, notamment protéasomiques et traductionnels. Arrête le cycle cellulaire en phase G2/M. Chaperon d'ARN *in vitro* .
vpr	p15	*Viral protein R* ; Vpr	Arrête le cycle cellulaire en phase G2/M. Joue des rôles variés dans : la transcription inverse, l'import nucléaire du PIC, la régulation de la transcription virale…, inhibe des facteurs de restriction.
vpu	p16	*Viral protein U* ; Vpu	Induit la dégradation de CD4 et de BST2/Tetherin. Diminue la présentation des CMH.
asp	p19	*antisense protein* ; Asp	Rôles précis encore inconnus. Pourrait influencer l'entrée en étant ancrée dans la membrane virale ; pourrait moduler l'autophagie.

Table 1 : Description des protéines du VIH-1 et de leurs fonctions. Les descriptions des fonctions protéiques ne sont pas exhaustives, seuls les rôles majeurs ou les plus caractérisés des protéines sont indiqués. (a) Les tailles des protéines (p) ou glycoprotéines (gp) sont indiquées en kDa. Les protéines ou précurseurs sont parfois désignés par leur taille.

d'encapsidation (Psi) correspond aux SL1 à 4, SL4 étant la structure contenant l'AUG de Gag (Houzet et al., 2007). Au sein de la 5'UTR on retrouve aussi deux sites d'entrée interne du ribosome (IRES) permettant une initiation de la traduction coiffe-indépendante (Daudé et al.,

2016; De Breyne and Ohlmann, 2019; Deforges et al., 2017; Guerrero et al., 2015). Le signal polyA contenu dans R est présent aussi bien en 5' qu'en 3' de l'ARNg ; de multiples mécanismes permettent néanmoins de favoriser l'utilisation du signal en 3' afin d'éviter l'accumulation de transcrits abortifs non codants.

6) Cycle réplicatif du VIH-1

Une vision globale du cycle viral est représentée dans la **figure 5** (Partie 4.2., chapitre I). Le cycle replicatif du VIH-1 est complété en 24 à 48 h. Les étapes clés du cycle seront présentées dans les parties suivantes, plus de détails sur ces étapes et les mécanismes impliqués peuvent être trouvés dans les références citées.

1. Reconnaissance et fusion

La glycoprotéine virale enchâssée dans la bicouche lipidique (dérivée des membranes de l'hôte) est un trimère de deux sous-unités : le fragment de liaison au récepteur, gp120 aussi appelé protéine de surface (SU), et le fragment de fusion, gp41, aussi appelée protéine transmembranaire (TM). Il y a 7 à 35 spikes présentes sur l'enveloppe virale. Pour initier son cycle réplicatif, le virus reconnait le récepteur CD4 et corécepteur CCR5 ou CXCR4 sur la cellule cible à l'aide de la gp120. Cette liaison séquentielle de gp120 au récepteur et corécepteur induit une cascade de réarrangements structuraux sur gp41. En effet, au cours du repliement du précurseur gp160Env, gp41 adopte une conformation dite de pré-fusion, où son peptide de fusion situé à son extrémité N-terminale est enfoui au sein du trimère. Cette conformation est préservée lors du clivage de gp160 mais devient métastable. Le peptide de fusion est ainsi transloqué suite à la restructuration de gp41 induite par l'interaction de gp120 avec les récepteurs, et celui-ci s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible. Des réarrangements tridimensionnels subséquents font adopter à gp41 une conformation d'épingle à cheveux, donnant la conformation post-fusion de paquet à six hélices. Ces réarrangements, avec la partie transmembranaire de gp41 ancrée dans l'enveloppe virale et son peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible, induisent un rapprochement des deux bicouches lipidiques, qui fusionnent finalement (Chen, 2019). Une fois le pore de fusion ouvert, l'intérieur du virus est relargué dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Étant exposées, les protéines d'enveloppe sont des cibles importantes pour la reconnaissance du virus par l'organisme, aussi bien pour les anticorps que pour les LT cytotoxiques. De nombreux épitopes neutralisants (rendant le virus non infectieux lorsque ciblé par des anticorps) sont notamment situés sur la gp120. Néanmoins, la protéine est très flexible en taille, lui laissant une grande marge évolutive pour échapper à ces réponses par des mutations. Ces protéines sont aussi recouvertes de sites de glycosylations afin de masquer les épitopes clés, permettant aux virions de passer inaperçus vis-à-vis du système immunitaire.

2. Entrée nucléaire, décapsidation, transcription inverse et intégration

Contrairement aux autres *retrovirus*, les *lentivirus* infectent des cellules quiescentes ; les virus doivent alors accéder à l'intérieur du noyau de la cellule cible pour y intégrer leurs génomes. Le *timing* du démantèlement de la capside viral est un aspect crucial de l'infection : une décapsidation prématurée diluerait les composants viraux nécessaires à la transcription inverse et exposerait l'intérieur de la capside, notamment l'acide nucléique, aux mécanismes cellulaires de détection des composants étrangers et aux mécanismes intrinsèques de défenses antivirales. Pendant de nombreuses années, il était admis que la décapsidation survenait rapidement après l'entrée de la capside dans la cellule, et qu'un complexe de pré-intégration composé du matériel génétique, de la RT et de l'intégrase était transporté au noyau (**Figure 8, (1)**). De par les propriétés intrinsèques de la protéine de capside (CA), les cores capsidiques formés sont pléomorphes, et de nombreux assemblages sont instables. Cela rend les particules virales non-infectieuses, et en réalité seule une minorité de virions pénétrant la cellule produisent une infection fructueuse. Le dogme de la décapsidation précoce provient alors sûrement de cette caractéristique des virions et d'observations effectuées à l'échelle de la population globale des virions, ainsi ignorant ou lissant le destin de la minorité de capsides stables. Grâce aux avancées technologiques des dernières années, l'étude de particules individuelles est désormais réalisable, notamment à l'aide de méthodes de microscopie et de CA fluorescentes ou de cryo-microscopie. Les résultats alors obtenus viennent à l'encontre du modèle de décapsidation précoce et proposent deux autres modèles pour le destin des particules internalisées (**Figure 8, (2) & (3)**). Dans les deux modèles, le core viral subit un transport rétrograde en direction du noyau le long des microtubules à l'aide des moteurs moléculaires dynéines et kinesin-1. Dans le premier modèle (**Figure 8, (2)**) la décapsidation a lieu à l'entrée des pores nucléaires (NPC), et un le complexe de pré-intégration est importé au

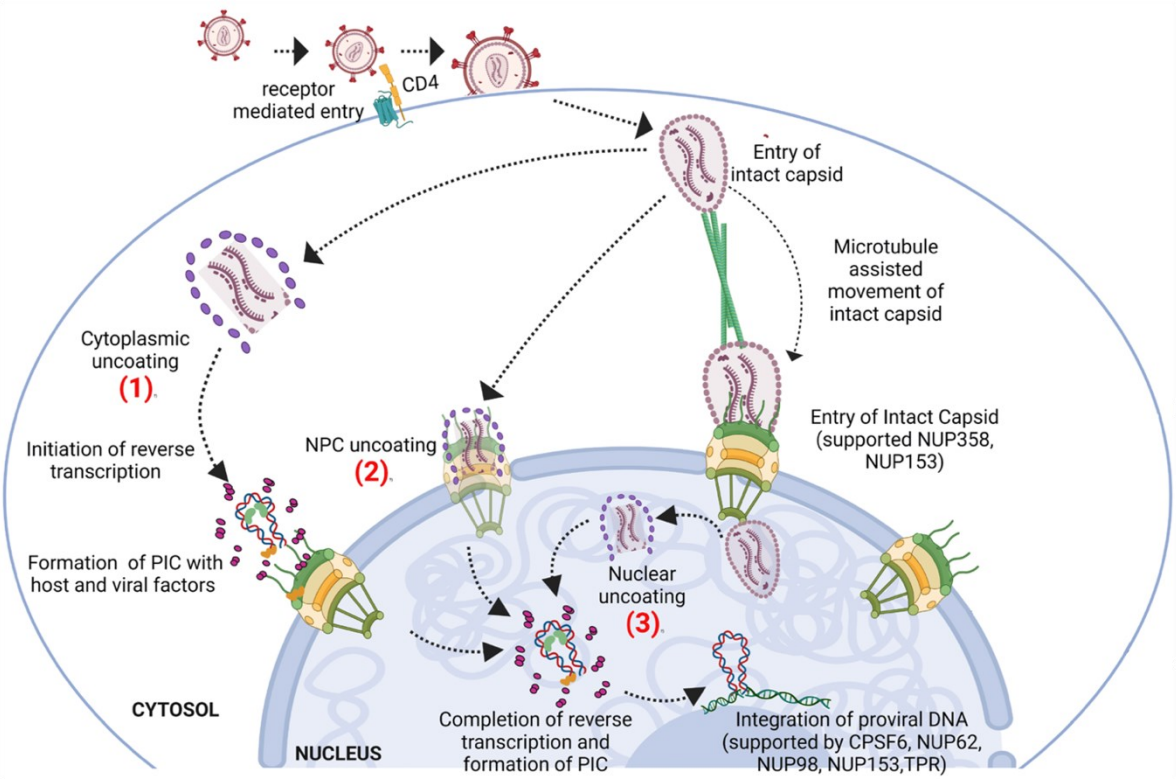


Figure 8 : Import du matériel génétique viral au noyau. Le schéma présente les différentes voies de transit du core viral et de ses composants jusqu'au noyau de la cellule hôte. La capside est transportée des microtubules jusqu'au bord du noyau. La décapsidation à lieu soit : (**1**) dans le cytoplasme, rapidement après l'entrée du core dans la cellule ; (**2**) au niveau du NPC ; (**3**) directement dans le noyau. Ce dernier modèle est supporté par les interactions de CA avec les NUP mentionnées. D'autres facteurs nucléaires impliqués dans l'intégration du provirus sont aussi listés. NPC : *nuclear pore complex* ; NUP : *nucleoporin*. Figure adaptée de Sarkar et al., 2022.

travers de ces derniers ; ce qui est par exemple supporté par l'observation de particules virales stagnant plus de 30 min au niveau des NPC. Dans le second modèle (**Figure 8, (3)**), tout le core virale et son contenu passeraient au travers des NPC, impliquant une décapsidation à l'intérieur même du noyau cellulaire, ceci est supporté par l'observation de core intacts dans le noyau (Burdick et al., 2020; Li et al., 2021; Schifferdecker et al., 2022; Zila et al., 2021a). Cette hypothèse a longtemps été écartée à cause de la largeur des cores viraux (environ 60 nm) trop importante pour la taille admise des NPC (environ 40 nm). Une étude suggère néanmoins que les NPC sont flexibles et peuvent se dilater pour atteindre une taille de 64 nm, alors suffisante pour permettre le passage d'un core viral. Un réarrangement structural des CA pourrait aussi conférer une morphologie plus appropriée au core pour réaliser un passage au travers des NPC. Ces différents modèles ne sont pas exclusifs et pourraient être dépendants de facteurs cellulaires propres à chaque type cellulaire. Il est néanmoins avancé que le premier modèle (**Figure 8, (2)**) est basé sur les limites techniques des méthodologies employées, et

que ces méthodes n'auraient pas réussi à visualiser les CA nucléaires, suggérant le modèle (**Figure 8, (3)**) comme le plus probable (Müller et al., 2022). Un nombre croissant de travaux démontre des interactions de la CA avec CPSF6, des nucléoporines et des transportines, contenues dans le noyau ou les NPC, et le rôle que ces interactions pourraient jouer dans l'import nucléaire des composants viraux, supportant ainsi ce dernier modèle (Shen et al., 2023). Ces modèles et les facteurs cellulaires associés sont développés dans les revues suivantes et les références qu'elles contiennent (Müller et al., 2022; Sarkar et al., 2022; Toccafondi et al., 2021; Zila et al., 2021b).

La transcription inverse, étape permettant la synthèse de l'ADN proviral double brin à intégrer à partir de l'ARN contenu dans la capside, se déroule de manière concomitante au transport du core et à sa décapsidation. Le lien précis entre décapsidation et transcription inverse est encore débattu ; certains travaux suggèrent que la transcription inverse serait la cause du désassemblage du maillage de CA, par des forces physiques que l'ADN double brin, plus rigide et encombrant que l'ARN, exercerait, tandis que d'autres ne soutiennent pas de causalité entre les deux. Il est désormais admis que la transcription inverse se termine dans le noyau (Müller et al., 2022). La transcription inverse est schématisée ci-dessous (**Figure 9**). Elle est effectuée par l'ADN polymérase ADN et ARN-dépendante du virus, appelée rétrotranscriptase (RT). Celle-ci est un hétérodimère composé de deux sous-unités : le domaine polymérase (p51) et ce même domaine couplé au domaine RNAse H (p66). La RNase H dégrade l'ARN sous forme de duplex ADN-ARN. La sous-unité p66 porte l'activité catalytique tandis que p51 joue un rôle structural. Il est à noter que la fixation de la RT à sa matrice ARN est labile, propriété intrinsèque des RT de rétrovirus. Cela permet les sauts de brins et suggère aussi le besoin d'un espace confiné (le core viral) pour éviter une dilution de l'enzyme dans le milieu intracellulaire. Le complexe de rétrotranscription (RTC) correspond à l'ensemble des protéines intervenant dans la transcription inverse. En plus de la RT, ce dernier comprend les protéines virales MA, CA, NC, IN, et Vpr. CA est le constituant du core viral qui entoure le RTC comme indiqué précédemment. La NC assiste la RT grâce à ses activités chaperon d'ARN. Des protéines cellulaires peuvent aussi composer le RTC, et notamment les désaminases APOBEC3, qui agissent au cours de la transcription inverse (Hu and Hughes, 2012).

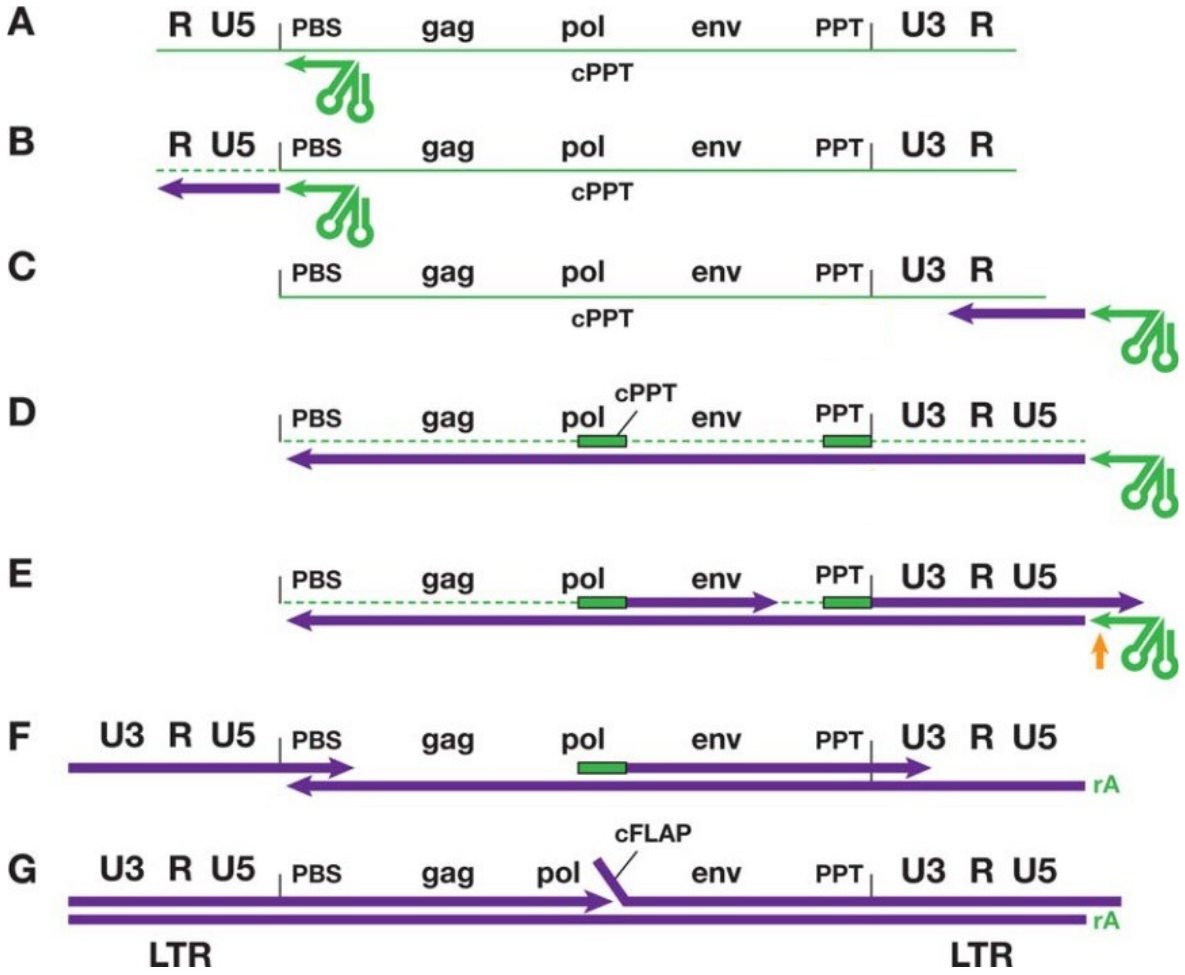


Figure 9 : Schéma de la transcription inverse. (**A**) L'ARNg est représenté (vert), avec l'ARNt^{Lys,3} apparié au PBS servant d'amorce à la RT. (**B**) La RT initie la rétrotranscription, synthétisant l'ADNsb de polarité négative (violet), et dégradant la matrice ARN *via* son activité RNAse H (ligne en pointillé). (**C**) Le premier transfert de brin survient, où l'ADNsb s'hybride à l'extrémité 3' de l'ARN par complémentarité avec la région R, et (**D**) la synthèse de l'ADNsb (-) se poursuit. Les séquences riches en purines centrale (cPPT) ou proche de la région U3 (PPT) résistent à l'activité de la RNase H et (**E**) servent d'amorce pour la synthèse du brin de polarité positive. La synthèse se poursuit jusqu'à l'ARNt, incluant 18 nucléotides de ce dernier dans la séquence du provirus, complémentaires au PBS. L'ARNt est clivé par la RNase H (flèche jaune), ce qui permet (**F**) le second transfert de brin. Finalement (**G**), l'extension des deux brins par les RT donne l'ADN viral double brin linéaire. L'ADN (+) synthétisé à partir du PPT déplace une partie de l'ADN (+) synthétisé à partir du cPPT, créant une extrémité flottante (cFLAP). Figure adaptée de (Hughes, 2015).

Indépendamment de la voie mécanistique utilisée pour l'import du matériel génétique, celui-ci doit être transloqué au noyau pour être intégré de manière permanente dans le génome de la cellule hôte. Une fois le virus intégré, celui-ci pourra être répliqué en même temps que le génome de la cellule hôte, notamment lors des expansions clonales des lymphocytes. L'intégration de l'ADN viral est médiée par l'intégrase (IN), de concert avec la RT. L'IN interagit avec différents facteurs cellulaires afin de cibler les régions transcriptionnellement actives de la cellule comme site d'intégration, situées dans l'euchromatine et caractérisée par une activité transcriptionnelle élevée. L'IN réalise deux

actions enzymatiques qui définissent les deux étapes de l'intégration : elle hydrolyse d'abord un dinucléotide (dCdA) situé à l'extrémité 3'OH de chacun des brin d'ADNv, afin de libérer ces derniers ; puis dans l'étape de transfert de brin, l'IN utilise les extrémités 3'OH libre de l'ADNv pour cliver les deux brins d'ADN chromosomique et lie les extrémités 3' de l'ADN viral aux extrémités 5' de l'ADN ciblé. Les extrémités 5' de l'ADNv sont liguées par des enzymes cellulaires. L'IN interagit avec des facteurs cellulaires tels que LEDGF/p75 pour réaliser ses fonctions (Maertens et al., 2022).

3. Transcription, épissage et expression protéique

Après intégration du provirus, celui-ci peut être transcriptionnellement inactif et entrer en phase de latence jusqu'à réactivation (voir partie 4.7., chapitre I) ou peut être actif et initier la production de nouveaux virions. De nombreux niveaux de régulation interviennent dans l'expression des protéines virales, au niveau épigénétique, transcriptionnel, post transcriptionnel… Pour les cellules latentes, celles-ci peuvent correspondre à des marques de répression épigénétiques, à un site d'intégration inactif, ou encore à la différentiation de cellules infectées en cellules mémoires. Des *bursts* stochastiques de transcription peuvent néanmoins être observés dans ces cellules latentes (Tantale et al., 2021).

Les ARNm du VIH sont produits par la machinerie cellulaire, et plus spécifiquement l'ARN polymérase II (ARN pol II). Divers facteurs de transcription régulent l'initiation de la transcription des ARN viraux, tels que AP-1, Sp1 ou encore NF-κB. Les facteurs de transcriptions et l'ARN pol II s'assemblent sur le promoteur du 5'LTR pour initier la transcription au niveau de la jonction U3/R. De manière intéressante, le LTR contient trois sites d'initiation de la transcription (TSS) contigus, différencié par trois guanosines consécutives. La région 5'UTR de l'ARN peut alors commencer avec un, deux ou trois G. Dans le cadre de l'ARNg, le nombre de G présent influence la structure du messager et module son destin : l'ARNg 1G (ne commençant que par une guanosine) a une conformation où la coiffe est cachée et les sites de fixation de Gag exposés, et est préférentiellement encapsidé par rapport aux autres transcrits d'ARNg, qui eux exhibent la coiffe et sont utilisés pour la traduction (Nikolaitchik et al., 2023). L'élongation est l'étape la plus régulée de la transcription virale. En absence de Tat, celle-ci n'est pas efficace : dans la majorité des évènements, le complexe d'élongation stagne environ 60 nucléotides en aval du TSS à cause du *trans-activation response element* (TAR), une structure secondaire d'ARN en tige-boucle, où se fixent plusieurs inhibiteurs de la transcription,

entrainant l'avortement de cette dernière. Tat est l'activateur le plus fort de la transcription virale, il permet à l'ARN pol II de surpasser ce blocage transcriptionnel afin d'effectuer une élongation efficace. En présence de Tat, la protéine lie l'ARN viral naissant sur le motif TAR, et recrute P-TEFb. La cycline CDK9, sous unité de P-TEFb, phosphoryle alors l'ARN pol II stagnante pour la faire passer de son état de pause à celui d'élongation de la transcription. Tat influence aussi l'état chromatinien de l'ADN (Dutilleul et al., 2020). En cas de réactivation de la transcription, ou d'état actif de cette dernière, quelques ARNm entiers sont d'abord synthétisés et épissés afin de permettre la synthèse de Tat ; une fois cette dernière produite, elle entraine une boucle de rétroaction positive, activant fortement la transcription d'ARNv entiers qui serviront à la synthèse des constituants viraux (ARNm), ou à l'encapsidation (ARNg).

Les ORF viraux étant pour certains chevauchants, les ARNm subissent une maturation, l'épissage alternatif, afin d'exprimer toutes les protéines. Ce mécanisme complexe est finement régulé (Sertznig et al., 2018). Il donne naissance à plus de 100 espèces d'ARN différentes (Nguyen Quang et al., 2020; Ocwieja et al., 2012). Ils sont regroupés en trois catégories (**Figure 7A**). Il est à noter que tous les ARNm du VIH-1 contiennent certaines séquences communes à tous les ARN, même après l'épissage (région 5'UTR jusqu'au SD1 ; et région en aval du A7). À l'inverse, les ARNm subissant l'épissage se voient délétés de régions impliquées dans l'encapsidation, favorisant la sélection des ARNg non épissés. Cet ARNm entier, en plus d'être l'ARNg encapsidé, sert aussi de matrice pour la production des précurseurs des protéines structurales Pr55Gag et enzymatiques Pr160GagPol. Le second précurseur protéique est obtenu dans 5 à 10 % des évènements de traduction à partir de cet ARNm par un mécanisme de *frameshift* -1. Ces précurseurs sont clivés lors de l'étape de maturation protéolytique par la protéase virale PR et relarguent les protéines structurales pour le premier : la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC) ainsi que p6 ; et les protéines enzymatiques en plus pour le second : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Un ARNm mono-épissé code pour le précurseur protéique gp160Env, qui une fois clivé donne les protéines d'enveloppe SUgp120 (*surface glycoprotein*) et TMgp41 (*transmembrane glycoprotein*). Les autres protéines dites régulatrices (Tat, Rev) ou auxiliaires (Vif, Vpu, Vpr, Nef) sont codées par des ARNm mono- ou multi-épissés (**Figure 7A**). La protéine Asp (*antisense protein*) est codée par un transcrit produit à partir du « *negative sense*

promotor » localisé dans le 3'LTR, faiblement efficace dû à son manque de TATA box et de TAR (Gholizadeh et al., 2021)

Avant leur traduction, les différentes espèces d'ARNm virales doivent être exportées hors du noyau. Les ARNm multi-épissés le seront par la voie canonique NXF1, à l'instar des ARNm cellulaires. Les ARN mono-épissés ou non épissés, étant considérés comme immatures, sont eux retenus dans le noyau et dégradés par la machinerie cellulaire. Pour outrepasser cette rétention, la protéine Rev, contenant un NLS et un NES, est exprimée à partir d'ARNm multi-épissés. Rev interagit avec des importines et transportines *via* son NLS afin d'être importée dans le noyau. Une fois dans le noyau, Rev reconnait un motif structuré de 350 nucléotides présent dans le second intron des ARNm incomplètement épissés, appelé *Rev response element* (RRE). Rev lie cet élément, oligomérise, puis interagit avec l'exportine CRM1 *via* son NES afin d'être exportée hors du noyau avec son ARNm viral associé. Ce rôle d'adaptatrice de Rev est central, le virus étant incapable de former une progénie en absence de cette protéine. D'autres études rapportent des rôles supplémentaires de Rev dans l'épissage, la stabilité et la traduction des ARN viraux (Truman et al., 2020).

4. Assemblage, bourgeonnement et maturation

Ces étapes tardives du cycle sont présentées ci-dessous (**Figure 10**). Le précurseur gp160Env est traduit dans le réticulum endoplasmique. Celui-ci trimérise, est transporté à l'appareil de Golgi et est maturé par un clivage *via* une protéase de type furine de la cellule hôte, donnant l'enveloppe constituée de trimères de deux fragments associés de manière non covalente. Env et Vpu (codées par le même ARNm) sont transportées à la membrane plasmique *via* la voie de sécrétion où elles seront incorporées pour l'assemblage viral. Le précurseur Pr55Gag contient tous les domaines structuraux préalablement mentionnés : le domaine N-terminal MA, CA, NC bordé de deux peptides *spacers* (SP1, SP2) ainsi que le domaine C-terminal p6. Ces différents domaines, en interagissant avec des composants viraux ou cellulaires, jouent différentes fonctions dans l'assemblage et le bourgeonnement viral. L'ARNg forme un dimère qui est sélectionné spécifiquement par des interactions inter- et intramoléculaires avec des domaines de Gag et est recruté spécifiquement pour l'empaquetage. La 5'UTR de l'ARNg est repliée en plusieurs tige-boucles contenant des signaux fonctionnels qui peuvent être plus ou moins exposés. L'ARNg dimérise grâce à l'autocomplémentarité du DIS contenu sur les deux molécules. Le DIS est plus exposé sur

l'ARNg 1G que sur les ARNg 2G ou 3G, expliquant l'encapsidation préférentielle de ce transcrit (Nikolaitchik et al., 2023). NC se lie à l'ARNg *via* ses deux domaines à doigt de zinc, notamment au niveau de la région Psi en 5'UTR, un élément majeur de l'encapsidation. NC fonctionne comme un chaperon d'ARN, contribuant à l'encapsidation de l'ARNg, à l'hybridation de l'ARNt sur le PBS et à la transcription inverse (Freed, 2015; Lerner et al., 2022). NC favorise aussi les interactions entre Gag. L'ARNg dimérise dans le cytoplasme, interagit avec quelques molécules de Gag qui oligomérisent, puis que le complexe est transporté jusqu'à la membrane plasmique où Gag multimérise (Bernacchi et al., 2017; Boutant et al., 2020; Kutluay et al., 2014).

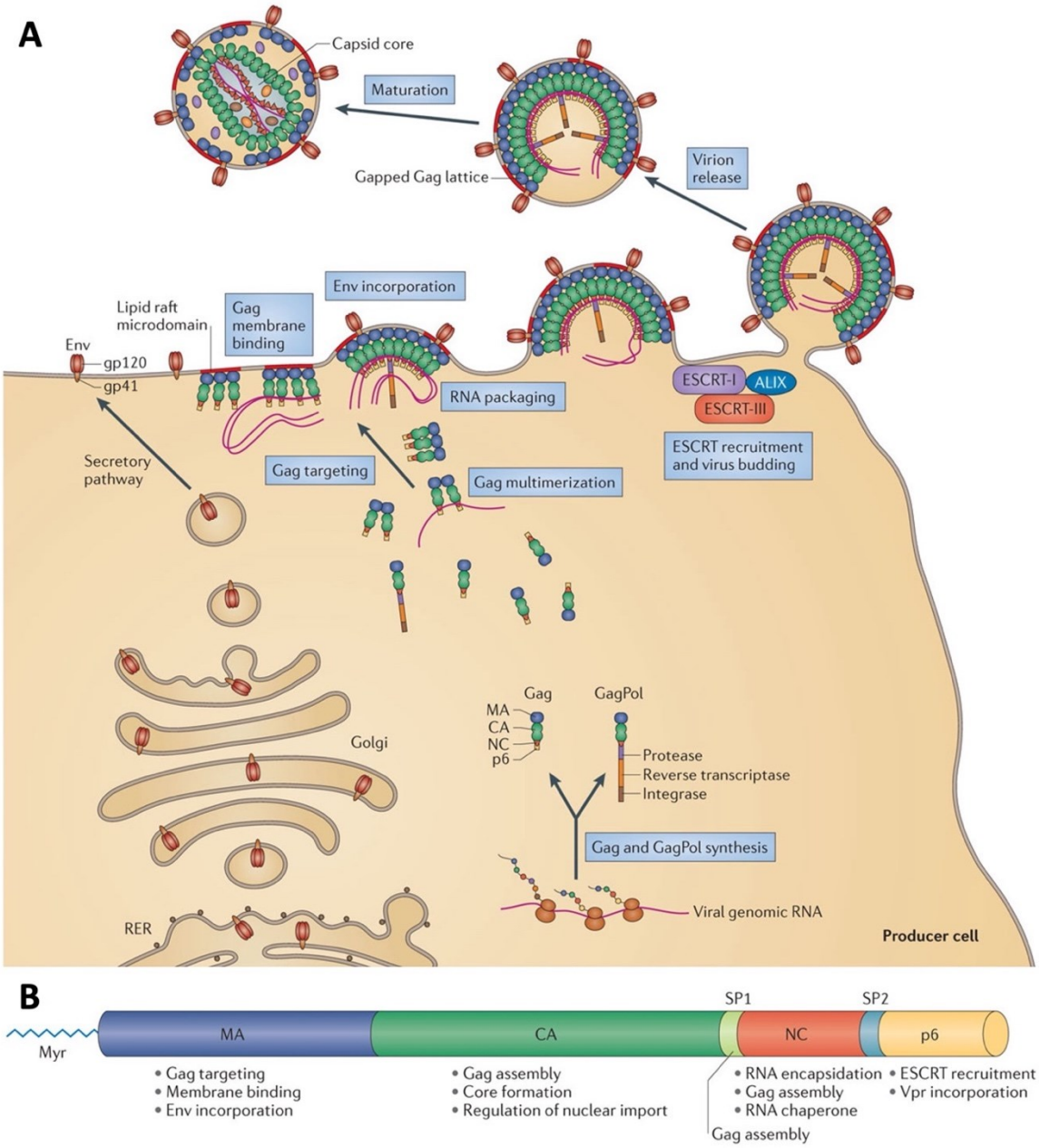


Figure 10 : Assemblage, bourgeonnement et maturation des particules virales du VIH-1. (**A**) Les sous-étapes de ces phases tardives du cycle viral sont illustrées sur ce schéma. Elles sont détaillées dans le texte. (**B**) Structure du précurseur structural Pr55Gag. Ses sous-domaines et leurs rôles principaux respectifs sont représentés. Figure adaptée de Freed, 2015.

L'assemblage du virus se déroule à des sites spécifiques de la membrane, les radeaux lipidiques, qui contiennent notamment des cholestérols spécifiques et du PIP_2. Ce ciblage est médié par des interactions électrostatiques avec des régions hautement basiques de MA avec le PIP_2. Cette région de MA est fixée par de l'ARN au cours du transport de Gag afin d'empêcher une interaction du précurseur avec des membranes vésiculaires. Le PIP_2 entre néanmoins en compétition avec l'ARN et le déplace pour interagir avec MA. La fixation du PIP_2 à Gag permet un réarrangement structural de la protéine ce qui permet au myristyl présent en N-terminal de MA d'ancrer Gag à la membrane et d'induire la multimérisation des Gag formant les virions. Les petits oligomères de Gag sur l'ARNg sont le site de nucléation de cette multimérisation qui est ensuite majoritairement conduite par CA *via* des interactions CA-CA et CA-SP1 entre les monomères de Gag. Une interaction s'établit aussi entre MA et TMgp41, ce qui permet de retenir les trimères d'Env aux sites d'assemblage. Le domaine p6 lui fixe Vpr. Le multimère grandissant de Gag courbe la membrane et forme une particule sphérique naissante. La machinerie ESCRT permet alors de libérer les particules. Gag recrute les complexes ESCRT *via* des protéines adaptatrice et son domaine p6. Succinctement, p6 interagit avec Tsg101, du complexe ESCRT-1, et forme un supercomplexe avec ESCRT-II. p6 interagit aussi avec Alix, qui interagit elle-même avec le complexe ESCRT-III. Ce dernier ressert la membrane et catalyse finalement le relargage des particules immatures (Freed, 2015).

Les particules libérées deviennent infectieuses suite à une étape de maturation qui induit un réarrangement de ses protéines structurales, enzymatiques et de l'ARNg. Au cours de cette étape, des changements importants surviennent, tels que la stabilisation du dimère d'ARNg, ou le réarrangement du complexe ARNg-$ARNt^{Lys3}$. D'un point de vue protéique, des réarrangements structuraux interviennent. Ce processus ordonné et séquentiel est notamment régulé par les vitesses de clivage des sous-domaines de Gag par PR. Initialement les précurseurs Pr55Gag et Pr160GagPol sont organisés de manière radiale, et sont juxtaposés. La maturation protéique est initiée par l'auto-activation et excision de PR. Celle-ci clive Pr55Gag et Pr160GagPol de manière séquentielle pour séparer les différentes protéines contenues dans les précurseurs. La NC libérée se fixe fortement à l'ARNg et stabilise l'interaction des deux molécules. La CA forme le core en s'assemblant en fullerène autour de l'ARNg recouvert de NC et des enzymes virales RT et IN. De plus, les trimères d'Env des virions

immatures sont non-fusogènes à cause de leur interaction avec MA ; leur fusogenicité est acquise par la maturation de Gag (Freed, 2015; Lerner et al., 2022).

Le rôle de l'inositol hexakisphosphate (IP6) n'a pas été discuté ici ; il faut cependant noter que cette petite molécule cellulaire chargée négativement est sujette à de nombreuses études qui ont récemment montré le rôle majeur qu'elle jouait dans les étapes tardives ainsi que précoces du cycle viral. IP6 stabilise le maillage de Gag et promeut la formation de la CA mature, en augmentant la stabilité du core viral, jouant ainsi un rôle clé dans la maturation. La stabilité ainsi augmentée du core a des répercussions sur l'étape de décapsidation (discutée en partie 6.2 de ce chapitre). Son incorporation dans les cores viraux argumente à l'encontre du modèle de décapsidation rapide évoqué dans la partie associée. Son rôle et ses implications sont discutés en détail dans les références suivantes (Dick et al., 2018; Obr et al., 2021).

Chapitre II : Immunité innée et facteurs de restriction

1) L'immunité intrinsèque

1. Le continuum de l'immunité

Les défenses des organismes vivants face aux infections virales sont multiples et variées. La variété des défenses qu'un corps humain met en place pour se prémunir au mieux de ces infections est représentée (**Figure 11**). Cet ensemble de défense peut être vu comme un spectre continu, qu'un virus doit au moins partiellement franchir afin d'initier une infection. Ils se heurtent premièrement à des barrières physiques et chimiques, présentes constamment, telles que la barrière épithéliale, les mucus produits par le corps, ou encore la salive et les molécules antivirales qu'elle contient. Une fois ces barrières franchies, le virus fait face à des défenses cellulaires, menées par les cellules non spécifiques du système immunitaire telles que les cellules dendritiques, les *natural killer*, les macrophages… ; ainsi qu'à des mécanismes de défense à l'échelle des cellules elles-mêmes. Ces deux types de défenses sont souvent regroupés sous le terme de « défenses innées », car elles se mettent en place rapidement ou

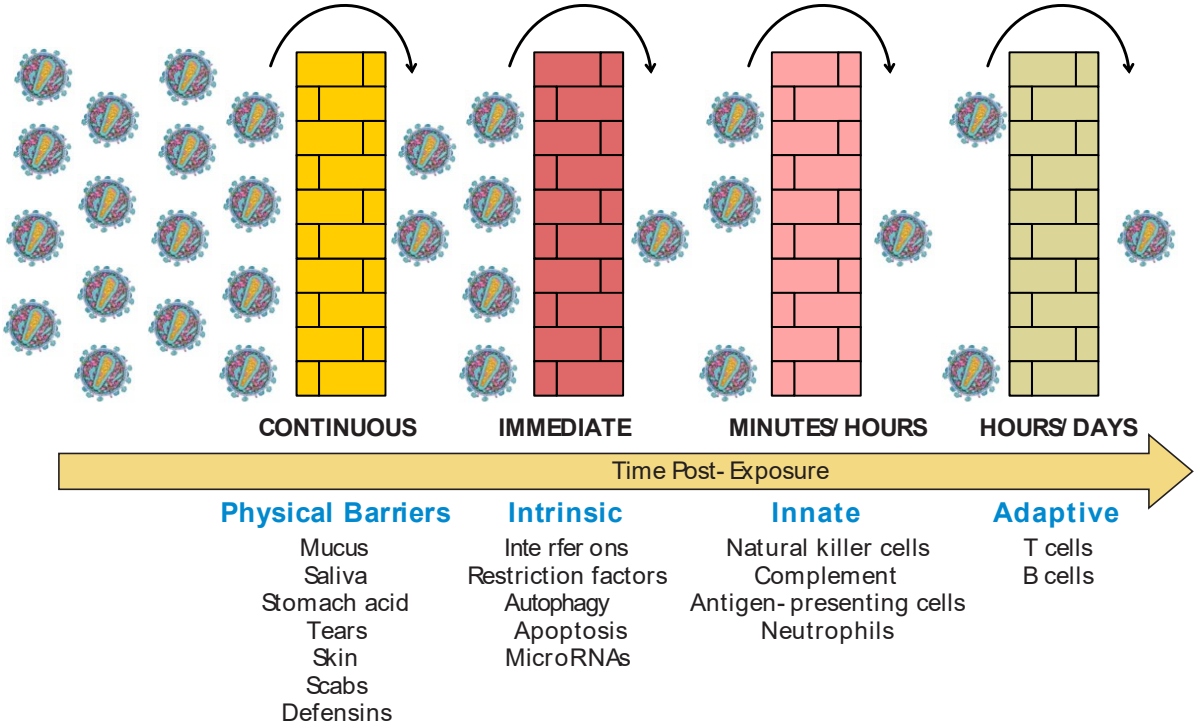


Figure 11 : Le spectre de défenses antivirales chez l'Homme. Un virus doit franchir de nombreuses barrières (physiques, chimiques et cellulaires) avant d'initier une infection chez un humain. Ces barrières peuvent être vues comme un sceptre continu mais de plus en plus spécifique du pathogène, aux moyens d'actions complexes requérant un temps de mise en place croissant. Ce spectre de défense est généralement suffisant pour prévenir ou contrôler les infections ; dans certains cas néanmoins ces défenses sont insuffisantes, et des dommages tissulaires sévères allant jusqu'au décès de l'hôte peuvent survenir. Figures adaptées de Flint et al., 2015 et David S. Goodsell, 2011.

sont constitutives, et sont peu spécifiques ou aspécifiques. La défense intracellulaire peut être nommée intrinsèque, et englobe ainsi les mécanismes moléculaires mis en place au sein d'une cellule (ou excrétés par une cellule) qui viennent neutraliser les virus en ciblant leurs virions directement, leurs cycles réplicatifs, ou encore en induisant la mort les cellules infectées ou infectables. Parmi ce set de défenses cellulaires autonomes, on peut noter l'autophagie, l'ARN interférence, l'apoptose, ou encore les voies de l'interféron (IFN) et les gènes sous leur régulation ; ces derniers sont des acteurs majeurs de ces défenses dans les cellules humaines. Les défenses exprimées par les cellules sont parfois classifiées en « intrinsèques » ou « innées » selon si elles sont constitutives ou induites ; dans ce manuscrit je considérerais les défenses intrinsèques comme celles retrouvées à l'intérieur de la cellule, qu'elles soient activées par l'IFN ou déjà présentes. Finalement, les dernières entraves à la réplication virale sont les défenses adaptatives. Celles-ci prennent place pour éliminer les virus ayant réussi des premiers cycles réplicatifs, et ayant donc outrepassé les autres niveaux de défense. Cette réponse va se spécifier contre un pathogène précis, *via* la reconnaissance de ses épitopes par des anticorps ou des cellules effectrices telles que les LT cytotoxiques, et entrainera la création d'une mémoire immune afin de contrecarrer le pathogène plus efficacement et rapidement en cas de nouvelle rencontre. Sa mise en place et son effectivité se déroulent alors sur plusieurs jours (Flint et al., 2020). Ces trois types de défenses (intrinsèque, innée et adaptative) constituent ce qu'on désigne comme le système immunitaire. Les immunités adaptatives et innées médiées par des cellules effectrices sont des domaines de recherche à part entière et extrêmement vastes, ils ne seront pas développés dans ce manuscrit (pour plus d'informations sur ces bras de l'immunité voir Flint et al., 2020). Le fonctionnement global de l'immunité intrinsèque et certaines protéines effectrices de cette immunité seront présentés dans ce chapitre, avec un focus sur le déclenchement des voies de l'interféron et de certains *IFN-stimulated genes* (ISG) : les facteurs de restriction.

La réponse immunitaire intrinsèque est retrouvée chez de nombreuses espèces et constitue alors la (ou une des) première(s) ligne(s) de défense face aux infections virales. Lorsqu'une cellule susceptible (présente les récepteurs du virus) et permissive (permet la réplication du virus) subit une infection virale, celle-ci va se mettre en place.

2. Détecter et alarmer : les PRR et la transduction du signal

Diverses protéines ou voies cellulaires sont présentes en tout temps, préalablement à des infections virales, et peuvent jouer un rôle direct contre les virus. Des exemples de ces mécanismes sont donnés en début de partie suivante. Néanmoins, l'essentiel de la défense intracellulaire antivirale se base sur la détection de pathogène, suivie d'une signalisation induisant ladite réponse antivirale. Cette signalisation peut de plus réguler les mécanismes non-induits pour les axer dans une défense antivirale, ou augmenter l'expression de certaines protéines déjà présentes. Pour être enclenchée, la réponse immunitaire intrinsèque doit premièrement détecter les pathogènes à un niveau moléculaire, par leurs composants qui peuvent être de même nature que ceux de la cellule elle-même. Cette détection est alors taillée de manière à distinguer le soi et le non-soi. Les pathogènes ont des motifs moléculaires spécifiques, qu'ils soient de nature nucléique, protéique, des carbohydrates… que l'on nomme *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), et qui sont reconnus par des senseurs moléculaires, les *pattern recognition receptors* (PRR). Toutes les cellules humaines expriment ces senseurs et peuvent grâce à eux initier une réponse défensive. Ces récepteurs sont transmembranaires, alors présentés à la surface cellulaire externe ou présentés à l'intérieur des endosomes, ou bien sont cytoplasmiques. Grâce à leurs localisations et leurs spécificités pour des motifs précis, les PRR permettent de détecter (et différencier) efficacement les pathogènes. En réaction à la détection, la cellule induit des cascades de signalisation, qui activent elles-mêmes l'expression de gènes impliqués dans la réponse défensive cellulaire. Par simplicité, l'action des PRR est décrite ci-dessous pour les virus plutôt que pour tous les pathogènes.

Parmi la myriade de PRR, plusieurs familles se distinguent, notamment par leurs localisations cellulaires, leurs substrats, ou les cascades de signalisation qu'elles induisent (**Figure 12**). Six grandes familles peuvent être définies. Celles des *NOD-like receptors* (NLR), c-*type lectin receptors* (CLR) sont moins spécialisées dans la détection de PAMP d'origine virale que dans la détection de PAMP d'autres pathogènes. Les PRR les plus pertinents pour détecter les infections virales sont les *Toll-like receptors* (TLR) (**Figure 12 (1A) ; (1B)**) ; les *RIG-I-like receptors* (RLR) (**Figure 12 (2)**) et l'axe cGAS-STING **(Figure 12 (3)**). La famille des *AIM2-like receptor* (ALR) joue aussi un rôle dans la détection de PAMP viraux. Certains PRR sont en dehors de ces familles mais sont tout de même essentiels, tels que la protéine kinase R (PKR),

la *2'-5' oligoadenylate synthetase-like* (OASL) et les désaminases d'adénosines ADAR. Ces protéines ne sont pas toujours considérées comme des PRR au même titre que les grandes familles citées ici : elles reconnaissent les signatures virales mais leurs fonctions principales sont d'attaquer directement l'ARN viral détecté, en le dégradant ou en inhibant leur traduction, tandis que les autres PRR ont pour rôle majeur d'induire une signalisation et une réponse transcriptionnelle.

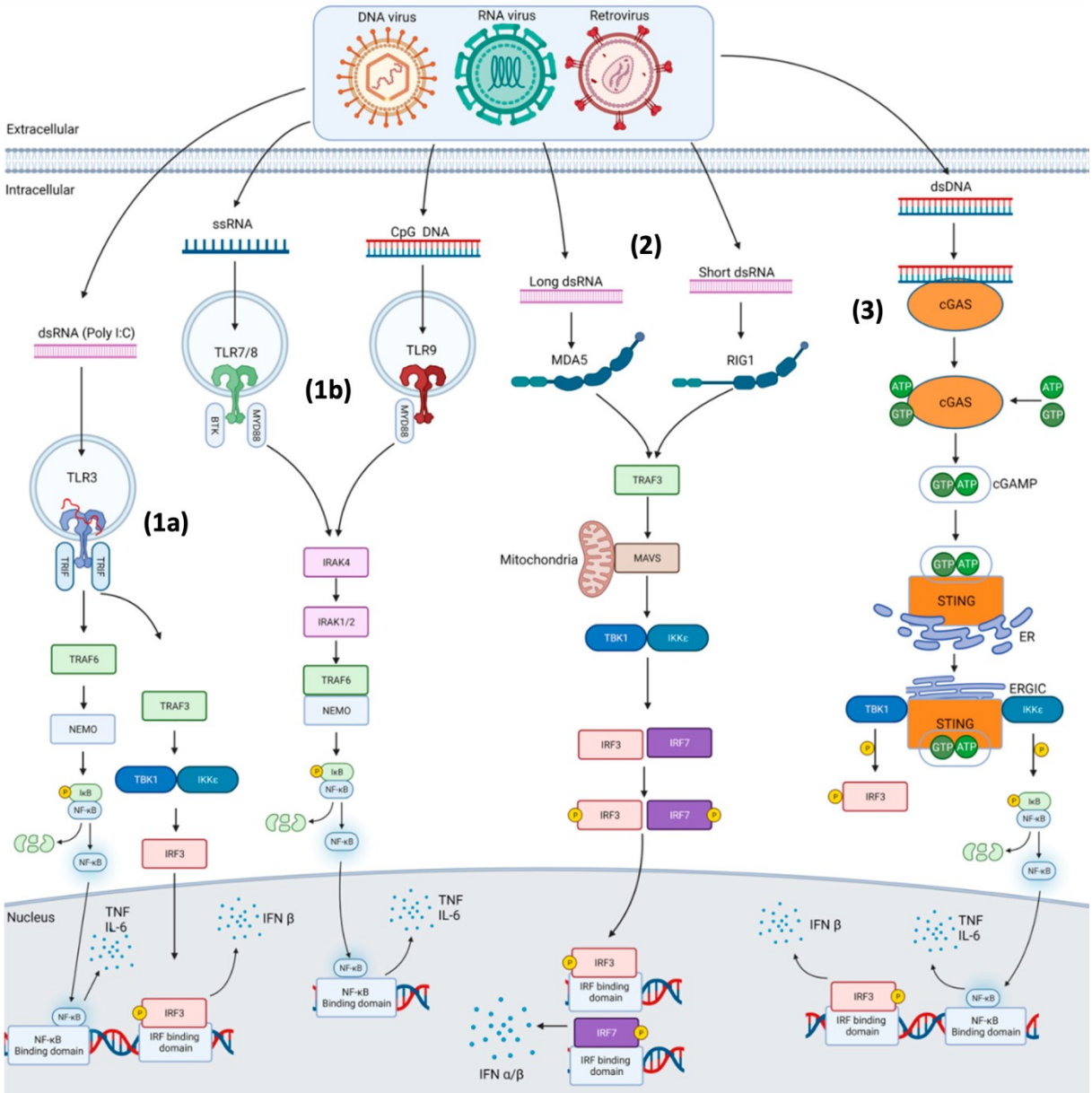


Figure 12 : Voies de détection et de signalisation des acides nucléiques viraux. Le schéma représente les senseurs majeurs des PAMP acides nucléiques viraux, tels que les TLR (**1A, 1B**), les RLR (**2**) et cGAS (**3**). Ces PRR signalent la détection de PAMP par des voies de transduction du signal différentes. Ces voies mènent toutes à l'induction de l'expression des interférons et d'autres cytokines (TNF, IL6, etc.) puis d'ISG, soit grâce à la phosphorylation et dimérisation d'IRF3 ou 7, soit par la levée d'inhibition de NF-κB médiée par IκB. Ces protéines une fois activées migrent dans le noyau afin d'activer la transcription de leurs cibles. Figure adaptée de Hennessy and McKernan, 2021.

Les TLR sont des protéines transmembranaires contenant 10 membres chez les humains. Les TLR 1 à 6, hormis TLR3, sont exposés sur la membrane plasmique tandis que les TLR 3 et 7 à 9 sont eux présents dans des endosomes, tels que des lysosomes. Les RLR et cGAS sont des senseurs localisés dans le cytoplasme. Si les TLR exposés à la membrane cellulaire peuvent reconnaitre les protéines d'enveloppe de certains virus ou d'autres PAMP viraux, les TLR endosomiques et les RLR et cGAS-STING sont des senseurs spécialisés dans la détection d'acides nucléiques. TLR9 reconnait les motifs d'ADN CpG non méthylés, TLR3 reconnait l'ARNdb et TLR7 et 8 reconnaissent l'ARNsb. Les senseurs de la famille des RLR, RIG-I et MDA-5, détectent eux les ARN viraux dans le cytoplasme par des caractéristiques chimiques présentes sur les ARN viraux mais absentes des ARN cellulaires. RIG-I reconnait les ARN munis d'extrémités 5' di- ou tri-phosphates (éléments viraux distincts de la coiffe des ARNm cellulaires) et MDA5 les régions étendues d'ARNdb, pouvant être des génomes de virus à ARNdb ou bien des intermédiaires provoqués par la réplication des virus à ARNsb. Ces protéines transduisent leur signal *via* l'intermédiaire de la protéine transmembranaire MAVS, localisée à la surface des mitochondries. cGAS reconnait les ADN viraux, au même titre que les ALR. D'autres protéines telles que l'ARN polymérase III ou DDX41 jouent un rôle dans la détection d'ADN viraux, cependant cGAS est le senseur majeur de ce type de PAMP. cGAS médie sa signalisation *via* la protéine STING présente à la surface du réticulum endoplasmique. Il est à noter que l'expression ou l'activité de ces senseurs peut varier en fonction du type cellulaire ; les TLR sont par exemple essentiellement produits par des cellules effectuant la phagocytose (macrophages et cellules dendritiques), tandis que les RLR sont produits dans la majorité des types cellulaires (Hennessy and McKernan, 2021; Majzoub et al., 2019).

Les voies de transduction débutent avec la reconnaissance des PAMP par les PRR, qui dimérisent ou oligomérisent alors et induisent leurs cascades de signalisation qui se divisent en deux axes majeurs : celui des facteurs de transcription IRF3 et/ou 7 et la voie NF-κB (**Figure 12**). Dans le premier cas, la transduction induit la phosphorylation d'IRF3 et/ou 7. Les facteurs de transcription dimérisent à leur tour et son transloqués au noyau. Ils se fixent à la région ISRE des promoteurs des gènes de cytokines, dont les IFN, et activent leur transcription. Dans le second cas, la cascade de signalisation induit à la phosphorylation du complexe IKK (qui contient IKKα, IKKβ et la sous-unité régulatrice « maitresse » NEMO, ou IKKγ), ce qui décroche la sous-unité inhibitrice IκB du facteur de transcription NF-κB. Là aussi, le facteur est

transloqué au noyau et induit la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF…) et de l'IFN (Hennessy and McKernan, 2021). Plus de 100 cytokines sont actuellement répertoriées et effectuent une pléiade de fonctions. Certaines agissent sur le système nerveux et le foie, produisant de la fièvre, des douleurs musculaires, des nausées… ; d'autres sont impliquées dans la réparation des dommages tissulaires, la maturation et prolifération des lymphocytes ou encore dans l'inflammation et l'infiltration des cellules immunitaires. Les interleukines et interférons de type II et III sont produits principalement par des cellules de la réponse immunitaire adaptative.

Dans le cas du VIH-1, le virus présente plusieurs PAMP qui seront reconnus : sa SUgp120 par les TLR de surface 2 et 4 ; son ARNg riche en G et U par les TLR7/8 endosomaux ; les régions structurées de son ARNg par les RIG-I ; et l'ADN viral produit au cours de la transcription inverse peut être détecté par cGAS même si cette reconnaissance est sous optimale due à la protection de l'acide nucléique par la capside. La protéine nucléaire NONO peut néanmoins à reconnaitre la capside (surtout du VIH-2) dans le noyau et activer la voie cGAS. L'infection par le VIH induit aussi des inflammasomes (Bergantz et al., 2019; Chintala et al., 2021a).

3. Les voies de l'interféron

Les défenses cellulaires antivirales contiennent de nombreux effecteurs et certaines voies cellulaires ont aussi un impact indirect sur la réplication virale. Ces effecteurs peuvent être constitutifs, soit déjà présents et actifs dès le début de l'infection virale ; ou être induits par les voies de l'interféron, dénotant une fois de plus des interconnexions entre les différents mécanismes cellulaires. Une fois l'alarme donnée et la production de cytokines et IFN activées, ces molécules vont avoir divers effets ; certains des mécanismes constitutifs de défenses et régulés par des cytokines sont les suivants. (1) En réponse à une infection virale, les cytokines pro-inflammatoires de la famille TNF (TNF-α, FASL…) ou l'IFN peuvent entrainer des mécanismes de mort cellulaires tels que l'apoptose ou la nécroptose (Flint et al., 2020). Ces mécanismes permettent d'empêcher la synthèse de nouveaux virions, soit en prévenant l'infection d'une cellule saine, soit en prévenant l'achèvement de cycles viraux dans des cellules infectées ; et maintiennent l'infection localisée à un site restreint. (2) L'IFN peut de plus réguler des marques épigénétiques, ce qui peut inhiber la réplication des virus à ADN (Yuan et al., 2020). (3) En addition, l'autophagie est une voie cellulaire importante, jouant aussi

des rôles inhibiteurs dans la réplication virale, et il existe un *crosstalk* entre autophagie et voies de l'interféron, les deux types de voies se régulant mutuellement (Tian et al., 2019). L'interféron de type I va jouer un rôle majeur d'inducteur de l'expression de gènes codant pour des protéines aux propriétés antivirales. Ces protéines agissent soit en intervenant dans les processus susmentionnés, soit en ayant une action inhibitrice directe sur des composants du virus ou sur des étapes clés de sa réplication. Ces dernières sont les facteurs de restriction.

Les IFN, nommés ainsi pour leur capacité à « interférer » avec la réplication virale, sont une famille de cytokines classées en 3 types : les IFN de type I, II et III. L'IFN II joue principalement un rôle de communication entre les cellules spécialisées de l'immunité tandis que les IFN I et III sont majoritairement impliqués dans l'immunité antivirale et sont présents dans la plupart des cellules de l'organisme. Comme les autres cytokines, ces molécules ont des fonctions de signalisation, et agissent de manière autocrine ou paracrine. Les molécules excrétées se lient à leurs récepteurs et initie une transduction du signal par la voie JAK-STAT, menant à la transcription de plusieurs centaines d'ISG (voir milliers). Les gènes ainsi induits par les IFN, dont ceux des effecteurs de la défense virale autonome, confèrent un « état » antiviral aux cellules infectées ainsi qu'aux cellules adjacentes. Chaque IFN induit l'expression d'ISG par la voie de signalisation JAK-STAT ; ils sont catégorisés selon le récepteur par lequel ils l'induisent (**Figure 13**). Chez l'Homme, on recense parmi les IFN de type I : 13 sous-types d'IFN-α, l'IFN-β, l'IFN-ε ainsi que l'IFN-ω. Presque toutes les cellules peuvent produire l'IFN-α/β, néanmoins certaines cellules immunitaires produisent la majorité de l'IFN-α en cas d'infection. Les IFN de type I sont exprimés différentiellement en fonction des tissus, et leurs affinités pour leur récepteur varient ; ces facteurs définissent en partie les réponses antivirales et immunomodulatrices résultantes. L'IFN de type II n'est constitué que de l'IFN-γ. Son expression est surtout restreinte aux cellules de l'immunité, mais ces récepteurs sont largement exprimés, permettant l'induction d'une réponse dans quasi tous types cellulaires. L'IFN de type III est constitué de 4 IFN-λ différents (λ1-4). L'expression de son récepteur est restreinte aux cellules épithéliales. La réponse à l'IFN de type I et III est faite par une voie de signalisation JAK-STAT similaire, et beaucoup d'ISG sont des cibles communes de ces deux IFN (Schneider et al., 2014).

Les étapes clés simplifiées de la signalisation par les IFN sont les suivantes (**Figure 13).**

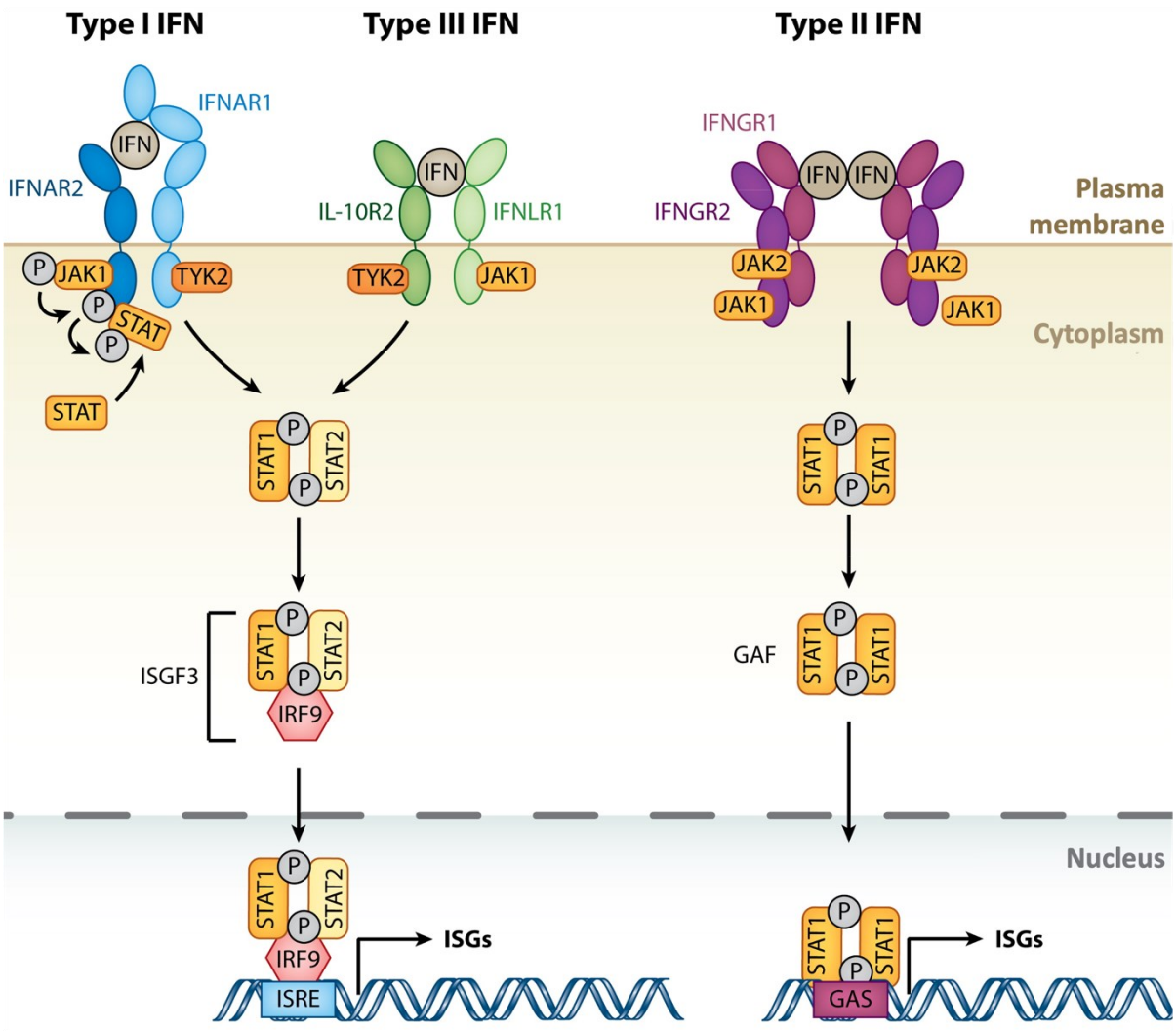


Figure 13 : Transduction du signal par les voies interféron. Le schéma représente les cascades de signalisation induites par les 3 types d'interféron différents. Les détails de ces cascades sont expliqués dans le texte. Figure adaptée de Schneider et al., 2014.

Les IFN lient leurs récepteurs : les hétérodimères IFNAR1/IFNAR2 pour ceux de type I et IFNLR1/IL10R2 pour ceux de type III. Les IFN de type II lient un homodimère d'IFNGR1 ce qui conduit à la fixation additionnelle de deux unités d'IFNGR2 au complexe. En absence de stimulus, les domaines cytoplasmiques des récepteurs aux IFN sont liés à des kinases janus (JAK) inactives. JAK1, JAK2 et TYK2 sont des kinases exprimées de manière ubiquitaire impliquées dans la signalisation des IFN. En cas de fixation d'IFN à leurs récepteurs, ces derniers dimérisent et rapprochent les JAK qui se trans-phosphorylent (JAK1-TYK2 dans le cas des IFN de type I et III, JAK1-JAK2 dans le cas de l'IFN de type II). Une fois activés, les JAK phosphorylent les récepteurs des IFN, conduisant à la fixation de protéines STAT1 et/ou STAT2. Celles-ci sont ensuite phosphorylées et libérées du récepteur, changent de conformation et dimérisent à leur tour. Leurs NLS alors exposés permettent la translocation des protéines au

noyau. Dans le cas de l'IFN de type II, les STAT1 phosphorylées homodimérisent et, après leur translocation, fixent l'ADN sur les éléments GAS retrouvés en amont des ISG régulés par IFN-γ pour induire leur transcription. Pour les IFN de type I et III, STAT1 et STAT2 sont phosphorylées, hétérodimérisent et interagissent avec IRF9. Ce complexe, nommé ISGF3, est transloqué au noyau, et fixe les promoteurs au niveau des éléments ISRE, conduisant à la transcription de centaines d'ISG régulés par les IFN de type I et III (Schneider et al., 2014).

Les ISG alors induits ont plusieurs rôles (Schneider et al., 2014). Premièrement les IFN amplifient la cascade de signalisation pour accroitre la réponse défensive de l'hôte. En effet, les senseurs RIG-I et MDA5 sont sous la régulation des voies de l'IFN, entrainant un rétrocontrôle positif de leur expression en cas de signalisation par IFN ; JAK1, STAT1, NFκB et les IRF3/7 sont d'autres exemples de gènes impliqués dans ces cascades dont l'expression est accrue par l'IFN. La réponse IFN doit par ailleurs être contrôlée une fois la répression du virus atteinte car plusieurs produits de la réponse antivirale sont cytotoxiques ou induisent des symptômes associés aux infections. Des protéines telles que les SOCS ou USP18 sont alors eux-mêmes sous le contrôle de l'IFN et effectuent une boucle de rétrocontrôle négatif pour atténuer la transduction du signal. Les SOCS empêchent par exemple l'activation des STAT, et USP18 séquestre IFNAR2, récepteur de l'IFN de type I. L'IFN joue aussi un rôle important dans la mise en place de l'immunité cellulaire en recrutant des cellules effectrices et en induisant la communication entre elles par exemple (González-Navajas et al., 2012). Finalement, les ISG comprennent de multiples effecteurs antiviraux directs : les facteurs de restrictions.

2) Les facteurs de restriction

Les premiers ISG découverts étaient des protéines exerçant à elles seules des effets antiviraux puissants. On peut citer la PKR, une kinase reconnaissant les ARNdb qui phosphoryle eIF2α, une protéine impliquée dans l'initiation de la traduction. Cela résulte en un arrêt de l'initiation de la traduction et à terme l'apoptose de la cellule. L'OAS est un autre exemple : en présence d'ARNdb cette enzyme induit des modifications des nucléotides, qui sont reconnus par la ribonucléase RNase L, induisant à son tour la dégradation des ARNv. Par ailleurs les produits de dégradation de la RNAse L peuvent activer les senseurs RLR et faire une boucle de signalisation positive de la voie IFN.

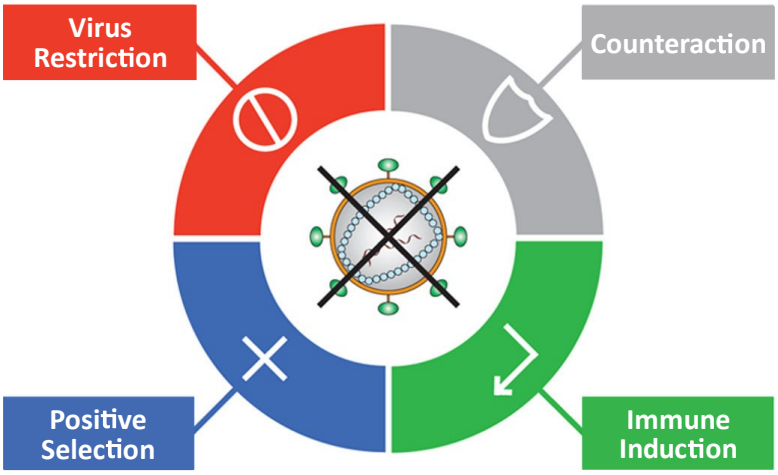


Figure 14 : Caractéristiques courantes des facteurs de restriction. Les RF sont des protéines ayant une action antivirale, inhibant l'infectiosité des virus. Ces gènes sont souvent induits grâce aux voies de *sensing* intracellulaires et voies IFN. Les virus pathogènes et ces protéines antivirales s'exercent mutuellement des pressions de sélection, conduisant à (1) l'émergence de contre-mesures virales, par des protéines dédiées ou par échappement (mutation) aux RF et (2) des marques génétiques d'évolution rapide des gènes en opposition. Figure adaptée de Harris et al., 2012.

Les facteurs de restriction (RF) (**Figure 14**) sont donc des protéines dominantes et autonomes (agissant seules sans complexes), qui vont opérer rapidement et inhiber des étapes spécifiques du cycle réplicatif d'un virus pour limiter leur multiplication (« *virus restriction* »). Ils peuvent cibler les composants viraux eux-mêmes, ou des mécanismes particuliers de son cycle, de manière directe ou indirecte. Ils ont des spécificités variables : certains vont cibler des mécanismes conservés afin d'inhiber une grande gamme de virus, d'autres vont être plus spécifiques à certaines familles virales. Ils sont des acteurs critiques de la réponse intrinsèque et permettent souvent de ralentir la réplication virale le temps que la réponse immunitaire adaptative puisse être engagée. Si une grande partie des RF sont des ISG, certaines de ces protéines sont déjà exprimées à des niveaux basaux dans la cellule, avant d'être surexprimées en cas de réponse IFN (« *Immune induction* ») (Duggal and Emerman, 2012; Harris et al., 2012). De plus, les gènes des RF peuvent souvent être induits par d'autres voies de signalisation que celle de l'IFN (Hotter and Kirchhoff, 2018). Le fait que de nombreux RF soient des ISG permet à ces protéines d'être exprimées de manière coordonnée pour contrer efficacement la réplication virale. Il est à noter que ces protéines peuvent être multifonctionnelles et redondantes avec d'autres protéines de la réponse antivirale, en étant par exemple impliquées dans les voies de détection de PAMP viraux ou de signalisation par l'IFN, en plus d'exercer une action de restriction directe (Bergantz et al., 2019). Les RF ont aussi des conditions d'expression variable en fonction des types cellulaires ou des stimuli, ils peuvent alors jouer un rôle dans le

tropisme des virus, certains types cellulaires pouvant être non permissifs pour la réplication virale grâce aux RF.

La multiplicité des RF, leurs redondances partielles et leurs spectres d'action parfois larges sont une nécessité face à la variabilité génétique des virus et leurs stratégies d'évasion. En effet, de nombreux virus sont capables d'établir une infection productive chez l'Homme, malgré l'existence de nos défenses immunitaires et notamment des RF, démontrant que l'inhibition virale n'est que partielle. De fait, l'inhibition médiée par les RF est partielle à cause de forces évolutives dirigées par les RF eux-mêmes : les pressions de sélection qu'ils exercent conduisent les virus à évoluer. Les stratégies d'évasion aux mécanismes de restriction apparaissent notamment grâce à des mutations aléatoires, puis sont sélectionnées et conservées au cours du temps à cause des pressions imposées par les RF. Cette réalité conduit aux caractéristiques « *counteraction* » et « *positive selection* » associées aux RF (**Figure 14**). En effet, les RF sont majoritairement sujets à des contre-mesures virales (ou le virus peut être résilient face à l'action du RF). Sans cela, les virus ne pourraient plus être aptes à infecter de manière productive nos cellules exprimant les RF. Les pressions évolutives entrainent d'une part l'adaptation de divers composants viraux (génome, protéines), permettant aux virus d'échapper à ces effecteurs cellulaires. D'autre part, beaucoup de virus codent dans leurs génomes, pourtant parfois très petits et restreints en capacité codante, des protéines ayant pour fonction majeure de contrer ces RF. Dans ce cas, les protéines cellulaires et virales étant des antagonistes, elles s'exercent des pressions réciproques (souvent liées à des interactions protéine-protéine directes), forçant une fixation rapide des mutations non-synonymes apparaissant sur les gènes concernés par rapport à des mutations synonymes ou silencieuses ; cette fixation des mutations non-synonymes est nommée sélection positive. Ces mutations non-synonymes ont en effet le potentiel d'être bénéfiques aussi bien dans les gènes des RF que dans les gènes viraux : un RF verrait par exemple son activité antivirale s'accroitre, tandis qu'un gène viral de contre-défense verrait sa capacité à neutraliser le RF s'accroître. Dans cette course à l'armement évolutive continue (aussi nommée *Red Queen hypothesis (Van Valen, 1973)*), chaque partie présente des avantages évolutifs respectifs. Ces mécanismes se déroulent sur des temps longs et à l'échelle des populations. Ainsi, les virus sembleraient avantagés par leurs cinétiques de réplication à l'échelle du jour et la quantité de virus produit par cycle, face à la trentaine d'années que l'Homme met à établir une nouvelle génération qui

contient bien moins d'individus. De plus les virus à ARN sont sujets à des mutations très rapides grâce à leurs polymérases peu fidèles. Il apparait néanmoins que ces avantages sont contrecarrés par l'organisme humain qui met en place des méthodes de défenses variées, parfois redondantes, codées par des gènes qui peuvent facilement évoluer et se dupliquer. La variété quasi illimitée d'anticorps grâce aux hypermutations et réarrangements des gènes les codant est un des éléments majeurs mitigeant l'évolution virale. De plus les virus à ARN, souvent munis de petits génomes, doivent coder des protéines aux rôles multiples et ayant des interfaces d'interaction parfois chevauchantes pour plusieurs facteurs cellulaires. Cette caractéristique limite fortement la latitude des protéines virales à muter pour échapper aux RF, les protéines virales devant muter tout en conservant leurs autres fonctions et interactions essentielles. De nombreux travaux couvrent ces thématiques (Daugherty and Malik, 2012; Duggal and Emerman, 2012; Etienne et al., 2015; Picard et al., 2020), et j'invite les lecteurs intéressés par les thématiques d'évolution et d'interactions entre RF et protéines virales à lire la revue passionnante de Tenthorey et collègues (Tenthorey et al., 2022). Cette dernière aborde notamment les avantages des études et comparaisons génomiques (paléogénomique, phylogénétiques), ainsi que leurs limites sur le savoir qu'elles procurent, et approfondit la notion de « paysages évolutionnaires », ainsi que les preuves et promesses de la récente et très puissante méthodologie de « *deep mutational scanning* » afin d'étudier ces questions. Tous les RF ne sont pas contrés par des protéines virales, soit car leur action est trop légère pour conduire à la sélection de mécanismes de défenses virales dédiées, soit car l'évolution de ces défenses est encore en cours. Il est aussi probable que les protéines de contremesure virale ne soient pas encore identifiées, ou que l'échappement viral soit médié autrement que par une protéine. De manière attendue, en plus de contrer les RF directement ou d'échapper à leurs actions, les virus ont aussi évolué de manière à échapper ou contourner les voies de détection et signalisation, et les voies de l'interféron, qui conduisent habituellement à l'expression des protéines effectrices antivirales (Ezeonwumelu et al., 2021; García-Sastre, 2017; Majzoub et al., 2019; Mesev et al., 2019).

La coévolution conduit donc à l'adaptation d'un virus à un hôte, lui permettant de contrer efficacement les RF de l'hôte en question, et de se répliquer. Néanmoins, à l'échelle des espèces, l'évolution accélérée des RF et des contremesures virales conduit à des divergences rapides des virus et des gènes défensifs de l'hôte associés. Cela rend un virus

d'une espèce donnée incompatible à une autre espèce pourtant proche mais exprimant un RF encore (ou de nouveau) apte à inhiber ce virus efficacement. De la même manière que le tropisme cellulaire d'un virus peut être régi par la présence de RF, la spécificité d'hôte des virus peut donc être conditionnée par les RF et la capacité des virus à s'en extraire. Certains virus adaptés à l'Homme ne peuvent ainsi pas se répliquer efficacement dans d'autres mammifères, les protéines de contre défenses virales étant inadaptées aux RF de ces hôtes, et vice-versa. Ainsi, en plus d'atténuer la réplication des virus adaptés à l'Homme, les RF constituent une barrière non négligeable empêchant l'infection de l'Homme par des virus d'autres espèces animales, protégeant la population de nouvelles maladies ou nouveaux pathogènes ; bien qu'une « absence » d'infection soit un paramètre difficile à mesurer (Tenthorey et al., 2022).

Les RF étant des protéines antivirales potentiellement très efficaces, ils constituent aussi un axe d'étude pour la mise au point de solutions thérapeutiques antivirales, en visant par exemple à : les surexprimer pour augmenter leurs effets ; rompre leurs interactions avec les protéines virales les neutralisant afin de rétablir leurs fonctions ; ou encore exprimer des variants de RF par thérapie génique (Bao and Zhou, 2023; Bennett et al., 2018; Sloan and Wainberg, 2013). Certaines de ces perspectives sont succinctement présentées pour les protéines Vif-APOBEC3G à la fin de notre revue de littérature (Verriez et al., 2020). Malgré un enthousiasme initial, ces recherches peinent encore à se montrer concluantes, aucun composé n'ayant atteint les phases d'essais cliniques.

Une autre démonstration de l'adaptabilité continue et sans faille des virus est le fait qu'en plus et/ou à la place de contourner les RF, certains virus les détournent à leurs avantages. En effet, si ces effecteurs sont initialement antiviraux, les exemples contraires ou les RF jouent des fonctions provirales s'accumulent. Certains RF en promeuvent par exemple : l'évolution génétique des virus (les désaminases ADAR et APOBEC3) ; leur diffusion de cellule à cellule (tétherine, un RF séquestrant les virions à la surface cellulaire) ; ou encore l'entrée virale (IFITM2/3, des RF inhibant classiquement la fusion des virus enveloppés). Le VIH détourne aussi les mécanismes d'expression de ces facteurs : on peut en effet noter la présence d'une région ISRE-like et d'autres motifs de reconnaissance de facteurs de transcription dans le LTR du VIH (King and Mehle, 2022; Prelli Bozzo et al., 2022).

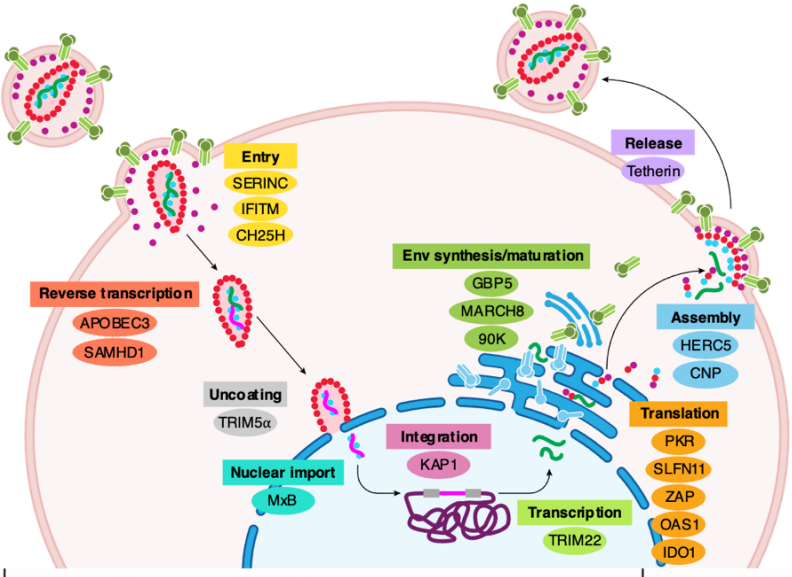
Au-delà de ces descriptions des rôles et principes globaux des RF, il existe une abondante littérature concernant les protéines effectrices en elles-mêmes, évoquant : leur

multiplicité, les nombreux virus qu'elles ciblent, leurs modes d'action détaillés… et ne feront pas ici l'objet de développement (Chemudupati et al., 2019; Sauter and Kirchhoff, 2021; Schneider et al., 2014; Schoggins, 2019; Schoggins and Rice, 2011). Finalement, les RF connus ne sont peut-être encore qu'une fraction des RF exprimés. Les premières expériences avaient pour biais d'identifier majoritairement des protéines démontrant de fortes capacités antivirales ; il apparait néanmoins que de nombreux RF n'exhibent que des capacités modérées ou faibles et que leur efficacité réelle se situe dans une action globale concertée de ces protéines. L'apparition des cribles et notamment ceux basés sur les outils CRISPR/Cas sont des avancées technologiques pour identifier de nouveaux RF : ils permettent d'identifier des ensembles de RF agissant en simultané plutôt que des gènes individuels ; ils sont moins biaisés et permettent d'identifier les RF ayant des activités antivirales modérées ou faibles ; et ils permettent d'étudier le réseau de RF impliqué dans les défenses de manière virus dépendant et/ou type cellulaire dépendant. Ce dernier point est essentiel pour la pertinence physiologique des RF identifiés. Finalement, ces cribles permettent aussi d'identifier les *host dependency factors*, qui, à l'inverse des RF inhibant la réplication virale, sont des protéines cellulaires essentielles à la bonne réplication du virus (Jones et al., 2021).

3) Facteurs de restriction : le cas du VIH-1

Si les facteurs de restriction sont variés et non spécifiques du VIH-1, pouvant cibler d'autres virus, cet organisme est un modèle majeur de ce champ de recherche. En effet, de nombreuses études ont été menées sur ce virus et les protéines cellulaires régulant sa réplication depuis les années 2000 (Sheehy et al., 2002), et plusieurs RF ont premièrement été identifiés dans ce contexte. Un éventail de RF ciblant les diverses étapes du cycle réplicatif du VIH-1 est présenté **Figure 15**, avec leurs modes d'action principaux. Là aussi, de multiples travaux de revue récents présentent ces facteurs plus en détail, ainsi que les contremesures mises en place par le virus face à ces RF (Bergantz et al., 2019; Boso and Kozak, 2020; Ghimire et al., 2018; Hotter and Kirchhoff, 2018; Seissler et al., 2017).

Parmi ces RF, on peut par exemple citer SAMHD1 ou HUSH. SAMHD1 est une dNTPase connue pour inhiber indirectement le VIH dans les cellules non cyclantes en hydrolysant les nucléotides présents dans le milieu cellulaire, ce qui inhibe la transcription inverse. Les modifications post-traductionnelles (PTM) jouent des rôles essentiels sur la fonction de



Restriction factor	Proposed mechanism of restriction	Reported inducers
SERINC3/5	Incorporates into progeny virions and inhibits fusion with target cells	None[1]
IFITM1/2/3	Inhibits membrane fusion and/or Env incorporation	IFNα, IFNε, PHA/IL-2
CH25H	Inhibits membrane fusion by generating 25-hydroxycholesterol	IFNα, IFNγ, TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
APOBEC3	Interferes with processivity of reverse transcription and induces lethal hypermutations during cDNA synthesis through cytidine deamination	A3D: PHA A3F: IFNα A3G: IFNα, IFNβ, IFNγ, PHA, IL-27, IL-2 IL-15, IL-7 A3H: IFNα, LPS, PHA
SAMHD1	Hydrolyzes cellular deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	IFNα, IFNβ, IFNγ, IL-12, IL-18, TLR9
TRIM5α	Binds to and accelerates fragmentation of the capsid, thereby interfering with cDNA synthesis	IFNα, IFNβ, IFNε, PHA
MxB	Reduces nuclear abundance of viral cDNA by inhibiting uncoating, nuclear import and/or integrity of the PIC	IFNα, IFNε
KAP1 (TRIM28)	Induces deacetylation of integrase	
TRIM22	Interferes with Sp1-driven transcriptional activation of the LTR	IFNα, IFNβ, IFNγ
PKR	Blocks translation by phosphorylating eIF2α	IFNα, IFNβ, IL-27
SLFN11	Inhibits viral protein synthesis in a condon-usage-specific manner	IFNα, IFNβ
ZAP	Degrades multiply spliced viral mRNAs	IFNα[2]
OAS1 + RNaseL	OAS1 generates 2', 5'-oligoadenylates that activate RNaseL to degrade viral (m)RNA	IFNα, IFNβ, IFNε, IFNω, IFNλ
IDO1	Inhibits viral protein production through depletion of L-Tryptophan	IFNα, IFNγ
HERC5 + ISG15	Inhibits assembly by ISGylation of Gag	HERC5: IFNβ, IFNε, TNFα, LPS, IL-1β ISG15: IFNα, IFNβ, IFNω, IFNλ
CNP	Binds Gag and inhibits particle assembly	
GBP5	Reduces infectivity of progeny virions through inhibition of Env maturation and incorporation	IFNα, IFNγ, IL-2, IL-27
MARCH8	Reduces Env incorporation into viral particles by downregulating it from the cell surface	IFNα
90K	Reduces incorporation of mature gp120 and gp41 into progeny virions	IFNα, IFNγ
Tetherin	Tethers budding virions to the plasma membrane	IFNα, IFNβ, IFNε, IFNγ,PHA, IL-27

Figure 15 : Facteurs de restriction anti-VIH-1. Tous les RF indiqués ciblent le VIH-1, les étapes du cycle viral sur lesquelles ils agissent sont aussi indiquées. Ces étapes sont catégorisées (couleurs) et le code couleur est repris dans le tableau. Ce dernier décrit les modes d'action principaux des RF ainsi que les molécules induisant leur expression. Ce tableau n'est pas exhaustif, il peut manquer d'autres RF ou certains des modes d'action des RF présentés, mais il donne un aperçu de la diversité des protéines antirétrovirales exprimées par les cellules humaines. Figure adaptée de Hotter and Kirchhoff, 2018.

nombreuses protéines. De manière intéressante, une phosphorylation de SAMHD1 en T592 inhibe son activité antivirale sans affecter sa fonction dNTPase. De la même manière, il a été montré récemment que sans l'ajout d'une SUMO sur le résidu K595 de SAMHD1 la protéine perdait son activité antivirale, sans que son activité dNTPase ne soit influencée (Martinat et al., 2021). Ces observations suggèrent que l'activité catalytique dNTPase à elle seule n'est pas suffisante pour que SAMHD1 remplisse son rôle de RF, soulignant les voies complexes de régulation et d'action de cette protéine. Ce RF n'est pas contrecarré par le VIH-1, mais les protéines Vpx du VIH-2 ou Vpr de certains SIV tiennent ce rôle, et dirigent la protéine vers le protéasome pour induire sa dégradation. À l'image de SAMHD1, HUSH est aussi dégradé par Vpx (dans ce cas à l'aide de DCAF1). Cette observation a suggéré un rôle antiviral de ce complexe régulateur de marques épigénétiques sur l'ADN : en effet, celui-ci, impliqué dans la répression transcriptionnelle, maintien le VIH dans un état de latence (Chougui et al., 2018; Martin et al., 2021). De manière intéressante, TASOR, un composant de HUSH, induit de surcroit la dégradation des transcrits du VIH en association avec CNOT1, renforçant l'action antivirale du complexe HUSH (Matkovic et al., 2022). Le couple APOBEC3G-Vif est un autre tandem iconique de ces interactions entre le VIH et ses hôtes ; il sera développé dans le chapitre suivant. L'identification de nouveaux RF ciblant le VIH-1 ou de facteurs de dépendance se poursuit aussi grâce à des cribles à haut débit (Cisneros et al., 2022; OhAinle et al., 2018). En plus de contrecarrer directement les facteurs de restriction, le VIH n'est pas différent d'autres virus, et inhibe aussi les voies de détection et de l'IFN qui interviennent en amont de l'expression de ces facteurs (Chintala et al., 2021b; Guha and Ayyavoo, 2013; He et al., 2019). Finalement, comme évoqué dans la partie précédente, les RF constituent des freins à l'infection par des virus d'espèces proches de l'hôte ciblé, et le cas des évolutions des SIV et du VIH démontrent aussi bien cette propriété (Gaba et al., 2021; Sauter and Kirchhoff, 2019; Sharp and Hahn, 2011). Un exemple intéressant est le cas de la tétherine, dont le gène humain comporte une délétion par rapport aux gènes simiens, rendant la protéine résistante à la protéine de contremesure virale Nef exprimée par les SIVcpz et SIVgor. Les diverses souches de VIH-1 ont toutes évolué des moyens différents de contrer ce RF (par la protéine Vpu) afin de redevenir adaptées pour une réplication chez l'Homme.

Chapitre III – APOBEC3G et Vif

1) Article de revue « Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein »

Mon sujet de thèse s'articule essentiellement autour de deux acteurs :

- La protéine humaine APOBEC3G (A3G), une désaminase de cytidine qui a pour fonction principale d'être un facteur de restriction. Une de ses cibles majeures est le VIH sur lequel elle exerce un effet antiviral puissant ;
- La protéine virale Vif, une protéine auxiliaire du VIH qui a pour fonction principale d'être la contremesure du virus face aux APOBEC3 et plus particulièrement A3G.

J'ai participé au cours de ma thèse à deux travaux de revue de littérature concernant la famille des APOBEC3, leurs fonctions et cibles, ainsi que l'action de Vif vis-à-vis de ces protéines. Une revue en anglais est présentée ci-dessous et constitue la première partie de ce chapitre III ; elle présente de manière ciblée et succincte la famille des A3 puis les mécanismes de régulation de Vif sur ces protéines et les mécanismes de contournement employés par d'autres protéines virales (Stupfler et al., 2021). Cette revue présente les deux acteurs en question et leurs interactions. La seconde revue, en français, est jointe en annexe et fournit plus de détails quant au fonctionnement et aux modes d'action des A3, leurs effets sur d'autres virus que le VIH-1, les autres partenaires du tandem Vif-A3G, et explique finalement le rôle physiologique des A3 et leur impact dans la cancérogenèse (Verriez et al., 2020). Cette dernière thématique a beaucoup gagné en intérêt depuis les années 2010, mettant en cause l'activité désaminase de certaines A3 sur le génome humain dans le développement de cancers. Les travaux de recherche se poursuivent activement dans cette thématique mais ne seront pas abordés dans ce manuscrit. Une deuxième partie de ce chapitre présentera diverses connaissances importantes acquises sur ces partenaires depuis la publication de ces revues, ou appuiera des points pertinents dans le cadre de ce manuscrit.

viruses

MDPI

Review

Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein

Benjamin Stupfler [1], Cédric Verriez [1], Sarah Gallois-Montbrun [2], Roland Marquet [1] and Jean-Christophe Paillart [1,*]

[1] CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002, IBMC-2 Allée Konrad Roentgen, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; b.stupfler@ibmc-cnrs.unistra.fr (B.S.); c.verriez@ibmc-cnrs.unistra.fr (C.V.); r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr (R.M.)

[2] Sorbonne Paris Cité, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Institut Cochin-27 rue du Faubourg Saint-Jacques, Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France; sarah.gallois-montbrun@inserm.fr

* Correspondence: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr; Tel.: +33-388-41-71-35

Abstract: The ubiquitin–proteasome system plays an important role in the cell under normal physiological conditions but also during viral infections. Indeed, many auxiliary proteins from the (HIV-1) divert this system to its own advantage, notably to induce the degradation of cellular restriction factors. For instance, the HIV-1 viral infectivity factor (Vif) has been shown to specifically counteract several cellular deaminases belonging to the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like (APOBEC3 or A3) family (A3A to A3H) by recruiting an E3-ubiquitin ligase complex and inducing their polyubiquitination and degradation through the proteasome. Although this pathway has been extensively characterized so far, Vif has also been shown to impede A3s through degradation-independent processes, but research on this matter remains limited. In this review, we describe our current knowledge regarding the degradation-independent inhibition of A3s, and A3G in particular, by the HIV-1 Vif protein, the molecular mechanisms involved, and highlight important properties of this small viral protein.

Keywords: HIV; Vif; APOBEC3G; ubiquitin; proteasome; translation; encapsidation; deamination; RNP granules

check for updates

Citation: Stupfler, B.; Verriez, C.; Gallois-Montbrun, S.; Marquet, R.; Paillart, J.-C. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein. *Viruses* **2021**, *13*, 617. https://doi.org/10.3390/v13040617

Academic Editor: Linda Chelico

Received: 4 March 2021
Accepted: 1 April 2021
Published: 3 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Once the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has entered the cell, it must overcome, or disarm, a network of restriction factors (including A3 enzymes) that block specific steps of the replication cycle [1], and hijack the intracellular machinery to its own benefit. Restriction factors play an important role in innate immune responses and protect the host from viral pathogens [1–3]. Members of the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like (APOBEC3 or A3) family are innate immune effectors restricting many exogenous viruses, such as HIV-1, endogenous retroelements [4–7], and several non-retroviral viruses [8]. The human genome encodes seven A3 genes (A3A, B, C, D, F, G, and H) resulting from gene duplications and rearrangements during mammalian evolution [9–11]. A3G was the first to be discovered and is the most functionally characterized enzyme. A3G was demonstrated to inhibit HIV-1 replication in the absence of the viral infectivity factor (Vif) [12] thanks to its cytidine deaminase activity that converts cytidine (C) to uridine (U) present in single-stranded DNA generated during reverse transcription of the viral genome. Completion of proviral DNA synthesis results in guanine (G) to adenine (A) mutations in the plus strand DNA, eventually leading to disruption of protein synthesis (through nonsense and/or missense mutations) and interruption of HIV-1 replication [13–16]. Amongst the seven A3 proteins expressed in human cells, A3D, F, and H have also been identified as anti-HIV-1 factors [17]. While the deaminase activity is essential for the A3 antiviral function, it has been reported that A3s could repress HIV-1

replication in a deaminase-independent manner at different stages of the replication cycle (reverse transcription, integration, and maturation) [8,18–21].

To counteract restriction factors' antiviral activities, HIV-1 expresses several accessory proteins, and Vif was shown to efficiently degrade A3G in virus-producing cells and inhibit its incorporation into nascent viral particles [12,14,15,22,23]. This process requires the recruitment of an E3-ubiquitin ligase complex by Vif, leading to the proteasomal degradation of A3G [12,24–26]. Interestingly, the Vif–A3 interplay is the consequence of an evolutionary arms race between lentiviruses and their hosts [27,28], i.e., interactions involving Vif and A3 proteins are species-specific and not all A3s are submitted to proteasomal degradation and are capable of inhibiting viral replication. For instance, A3B does not restrict HIV-1 and is not degraded by the HIV-1 Vif protein [29,30], at least for some HIV-1 Vif isolates (IIIB, JR-CSF, 89.6), while Vif from HIV-1 HXB2, ELI-1, and YU-2 shows some degradative effects [31]. SIV Vif proteins behave similarly [29], SIVmac239 Vif being the most potent at inhibiting A3B through the canonical polyubiquitination mechanism [29]. Although the degradation-dependent mechanism has been extensively studied and documented in the literature for the last twenty years [12,14,24–26,32], degradation-independent mechanisms mediated by Vif could also account for the reduced levels of A3 proteins in cells and in viral particles. Our review mainly focuses on the latter mechanism, highlighting their importance to overcome the potent antiviral activity of A3s in general, and of A3G in particular. We will also describe processes developed by other viruses which do not encode a functional Vif protein to overcome A3 enzymatic activity.

2. Degradation-Dependent Inhibition of APOBEC3G by Vif: A Brief Overview

2.1. The Players: APOBEC3G and Vif

The seven members of the A3 family of proteins contain one (A3A, A3C, and A3H) or two (A3B, A3D, A3F, and A3G) copies of a catalytic deaminase (CD) domain that is distinguished by the presence of a signature motif, His-X-Glu-$X_{23\text{-}28}$-Pro-Cys-$X_{2\text{-}4}$-Cys (Figure 1A). When the enzyme contains two CDs, CD2 is catalytically active [33] while CD1 is involved in nucleic acids binding [34–36], its oligomerization and movements along the substrate to increase the deamination efficiency [37–39]. CDs and adjacent domains are organized into three phylogenetically distinct groups, named zinc-coordinating domains, Z1, Z2, and Z3 [11,40]. The mechanism of catalysis involves the histidine and the two cysteine residues that coordinate a zinc ion that enables the glutamic acid to deprotonate a water molecule, and generates the zinc hydroxide ion that will react with the carbon C4 of the cytosine (Figure 1B). The CDs' tridimensional structure is conserved between A3s and is composed of five β strands and six α helices organized around the deaminase domain (Figure 1C) (for more details regarding the structure of A3 proteins, please refer to these recent reviews [33,41,42]).

Amongst A3 proteins, human A3G was the first to be identified and is the most potent inhibitor of HIV-1 replication in the absence of Vif protein [12], whereas A3D, A3F, and A3H (haplotype II, V, VII) have been shown to exhibit various degrees of antiviral activities [17,43]. A3D, A3F, A3G, and A3H are localized in the cytoplasm, A3A and A3C are distributed throughout the cell, while A3B is mainly nuclear [17,44]. When non-permissive cells are infected with HIV-1 ΔVif viruses, A3G is efficiently incorporated into budding virions, a fundamental aspect of its antiviral function. A3G packaging is determined by specific interactions between its N-terminal CD domain and the nucleocapsid region of the HIV-1 $Pr55^{Gag}$ precursor [45–50], but also depends on its association to RNAs, mainly the HIV-1 genomic and 7SL RNAs [35,36,49–53]. Following its packaging, A3G induces dC-to-dU deamination in the (−) strand DNA of HIV-1 during reverse transcription, resulting in G-to-A substitutions in the (+) strand DNA and eventually blocking viral replication due to the incorporation of missense or stop-codons [14,15,54].

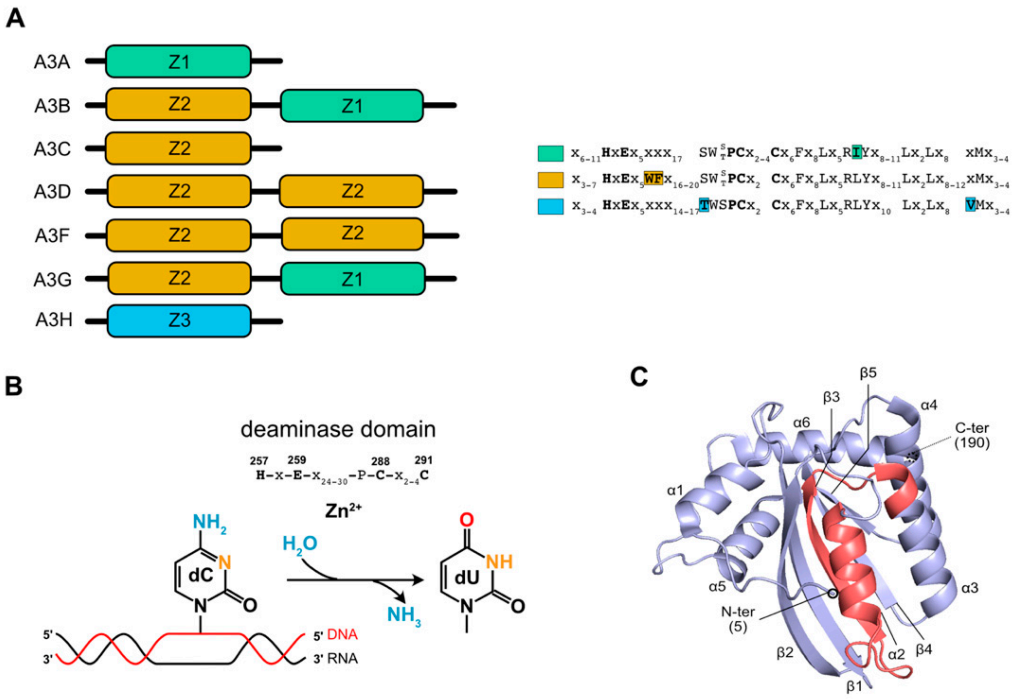


Figure 1. APOBEC3 structural and catalytic features. (**A**) Schematic structural domains of A3 proteins are represented. Characteristic phylogenetic ZDD domains are represented in color, with their amino acid sequences on the side. (**B**) A3G catalytic mechanism allowing cytidine deamination on a single-stranded DNA target (red strand) is represented. Amino acids constituting the catalytic site are mentioned above. These amino acids accommodate a zinc ion and the use of a water molecule leading to the deamination of the cytidine. (**C**) A3C crystal structure (hA3C) (PDB: 3VOW) represented in ribbons. Catalytic (CD) and ZDD domains are represented in purple and pink, respectively. Secondary structure motifs are annotated.

The local nucleotide sequence preference for deamination is 5′-CC-3′ (the substrate C is underlined) for A3G and 5′-TC-3′ for other A3s [13,17,55,56]. In addition to G-to-A hypermutation, deaminase-independent activities could also contribute to the overall antiviral activity of A3G [18,21]. Indeed, A3G may bind to viral RNA and sterically interfere with the progression of reverse transcription [19,57–59] or bind the reverse transcriptase itself [60].

HIV-1 overcomes A3G restriction by expressing Vif, which targets A3G for polyubiquitination and proteasomal degradation (see below) [12,24–26]. Initially considered as an accessory protein, Vif is in fact an important virulence factor whose absence considerably reduces viral infectivity [28,61]. Vif is a small, unstructured, and multimeric protein of 23 kDa expressed from singly-spliced viral mRNAs during the last stages of HIV-1 infection [62–65]. Notably, an intronic G run ($G_{I3\text{-}2}$) has been shown to be critical for the splicing regulation of Vif mRNA in non-permissive cells in order to maintain an appropriate ratio of Vif to A3G protein levels [66–68], but this ratio is highly dependent on the physiological environment. Vif is mainly localized in the cytoplasm of infected cells but is also found in viral particles [69–73]. It possesses various properties linked to its functional domains and RNA chaperone activities (Figure 2): for instance, Vif was shown to influence HIV-1 particle morphology, maturation of $Pr55^{Gag}$, reverse transcription, and HIV-1 genomic RNA dimerization [68,74–78]. However, one of the principal functions of Vif is to induce the polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation of A3G, thereby reducing the pool of cytosolic A3G available for incorporation into viral particles [25,79,80].

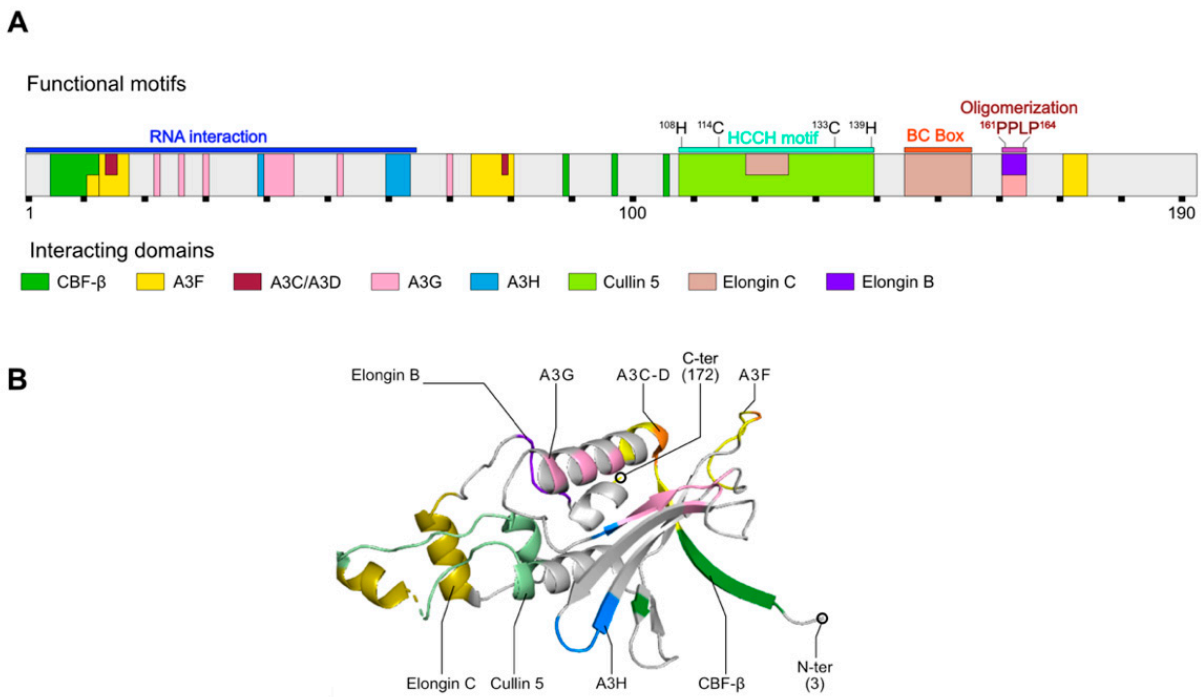


Figure 2. HIV-1 Vif protein structure and interactions with E3-ubiquitin ligase complex members. (**A**) Vif mono-dimensional structure (Genbank M19921; UniProtKB—P12504 (Vif_HV1N5)) is represented using 10 amino acids per scaling unit (black squares under the structure). Functional motifs are represented with colored rectangles above the structure. Interaction regions with A3 proteins or members of the E3-ubiquitin ligase are represented in color inside the structure. (**B**) Vif 3D structure (PDB: 4N9F; positions 3-172) is represented in ribbons. N- and C- terminal extremities (N-ter and C-ter, respectively) as well as interaction regions with several partners are colored and annotated on the structure. Adapted from [81].

2.2. Recruitment of an Ubiquitin Ligase Complex by Vif

The most studied mechanism allowing the restriction of A3G is the recruitment by Vif of an E3-ubiquitin ligase complex [25,26,82], which is composed of the scaffold protein Cullin 5, Elongin B/C adaptor proteins, RBX2 catalytic units (RING-box protein 2), transcription factor CBF-β (Core-Binding Factor β), which plays a critical role in stabilizing Vif and its assembly with the ligase, and ARIH2 (Ariadne homolog 2) [24–26,32,83,84] (Figure 3). This last partner has been recently identified to act in an E1-E2-E3/E3 cascade to target A3G for degradation and has been shown to be essential for efficient HIV-1 infection in primary CD4+ T cells [83]. This allows the ^{48}K poly-ubiquitinylation of A3G and its redirection towards the proteasome, which ensures its degradation. Many studies have mapped the domains and peptide sequences involved in the interaction between Vif, A3G, and the ligase complex (Figure 2, and for recent reviews on these different domains see [33,41,81]). The crystal structure of the human Vif-EloB/C-Cul5-CBF-β (PDB: 4N9F) [85] and simian Vif-EloB/C-CBF-β (PDB: 6P59) [86] have been solved and allowed to validate most of the protein–protein interactions previously determined by mutagenesis and biochemical assays. Very recently, a complex structure of the CBF-β-fused A3F$_{CTD}$ with HIV-1 Vif has been obtained by cryo-EM and this structure may provide a structural insight into A3-Vif interaction [87], although further investigations are required to understand their interaction.

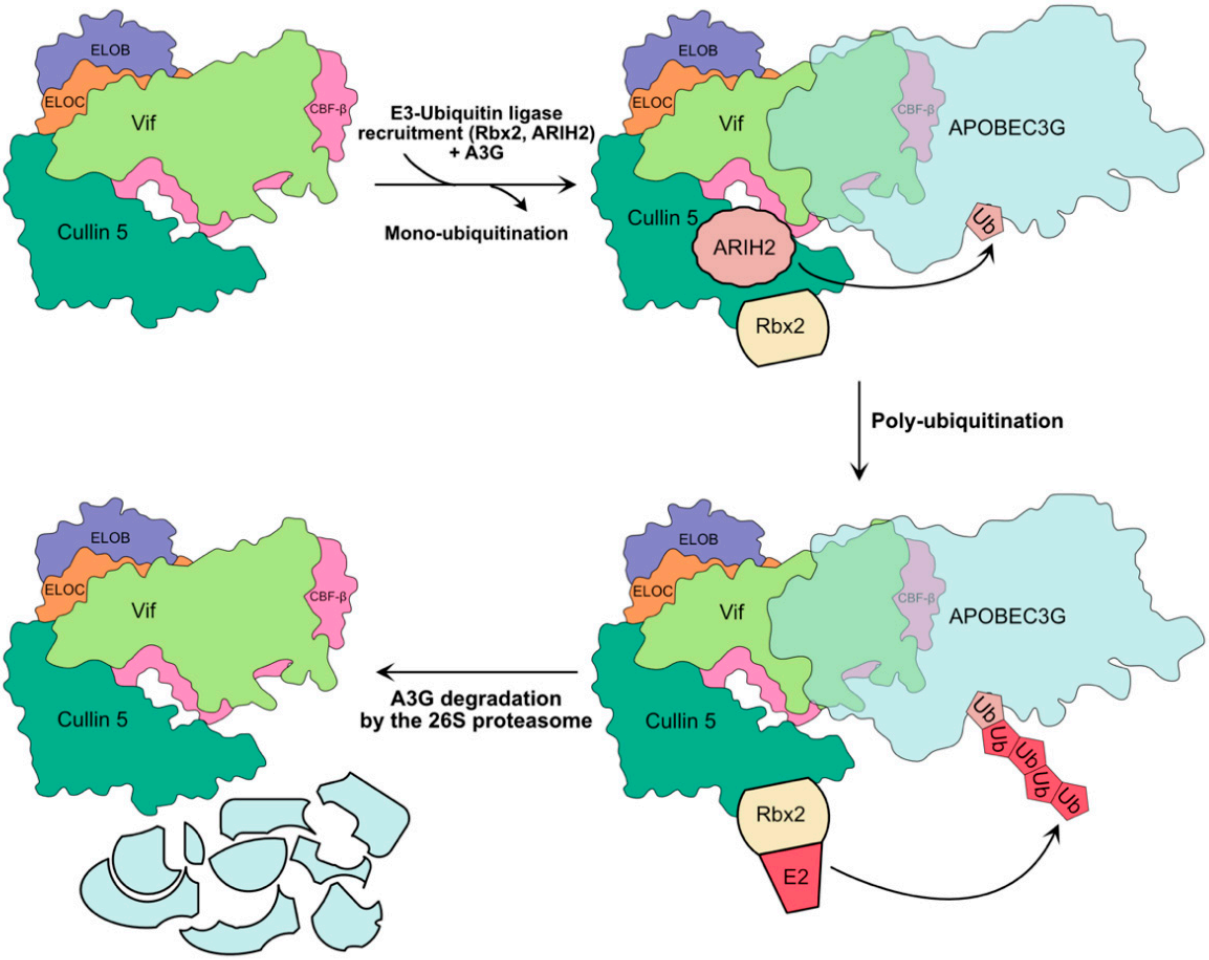


Figure 3. Hijacking of ubiquitin–proteasome pathway by Vif. HIV-1 first recruits the core components of the E3-ubiquitin ligase complex, namely Elongin B (ELOB) and ELOC, CBF-β, and Cullin 5. This complex is represented in accordance with its known 3D structure (PDB: 4N9F). The recruitment of A3G and catalytic subunits Rbx2 and ARIH2 leads to ARIH-2 mediated mono-ubiquitination of A3G. Subsequent recruitment of an E2 ubiquitin-conjugating enzyme by RBX2 leads to the poly-ubiquitination of A3G and its degradation by the 26S proteasome.

3. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by Vif

Although the primary mechanism of A3G neutralization in HIV-1 infected cells involves its ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome, other mechanisms have been shown to reduce A3G packaging into viral particles (through a direct or an indirect effect of Vif) or to interfere with the deaminase activity of encapsidated A3G. The following section will focus on these different mechanisms.

3.1. Transcriptional Inhibition of APOBEC3G, Hijacking of CBF-β by Vif

The recruitment by Vif of the E3-ubiquitin ligase complex mediating the degradation of A3G may have an additional indirect effect on A3G expression. Indeed, the recruitment of CBF-β is mandatory for Vif stability and for the assembly of the E3-ubiquitin ligase complex responsible for A3G and other A3 proteins' degradation [32,84]. The interaction was detected by mass spectrometry after the co-immunoprecipitation of tagged Vif construct in HEK 293 and Jurkat cells [32]. CBF-β is a non-DNA binding subunit that heterodimerizes with Runt-related transcription factor (RUNX) proteins to form the CBF family of transcription factors, which are important for cell differentiation and proliferation, hematopoiesis, and bone development [88]. Interestingly, the binding of Vif to CBF-β is mutually exclusive with RUNX heterodimerization and has been shown to impact the expression of genes whose regulatory domains are associated with RUNX1, which includes

A3 genes, suggesting that Vif inhibits transcription by competing with RUNX for CBF-β binding [89,90] (Figure 4). Mutational analysis [91–94] and structural study of the pentameric E3-ubiquitin ligase complex (Vif-EloB/C-Cul5-CBF-β) [85] identified several Vif residues important for its binding to CBF-β. For instance, the N-terminal $_5$WQVMIVW$_{11}$, present in an anti-parallel β-strand of Vif, is a major interaction domain (Figure 2), along with residues W_{89}, T_{96}, and L_{106}. Thus, the sequestration of CBF-β by Vif in the cytoplasm provides a dual hijacking mechanism by reducing A3G expression at both transcriptional and post-translational (degradation of A3G through the proteasome) levels.

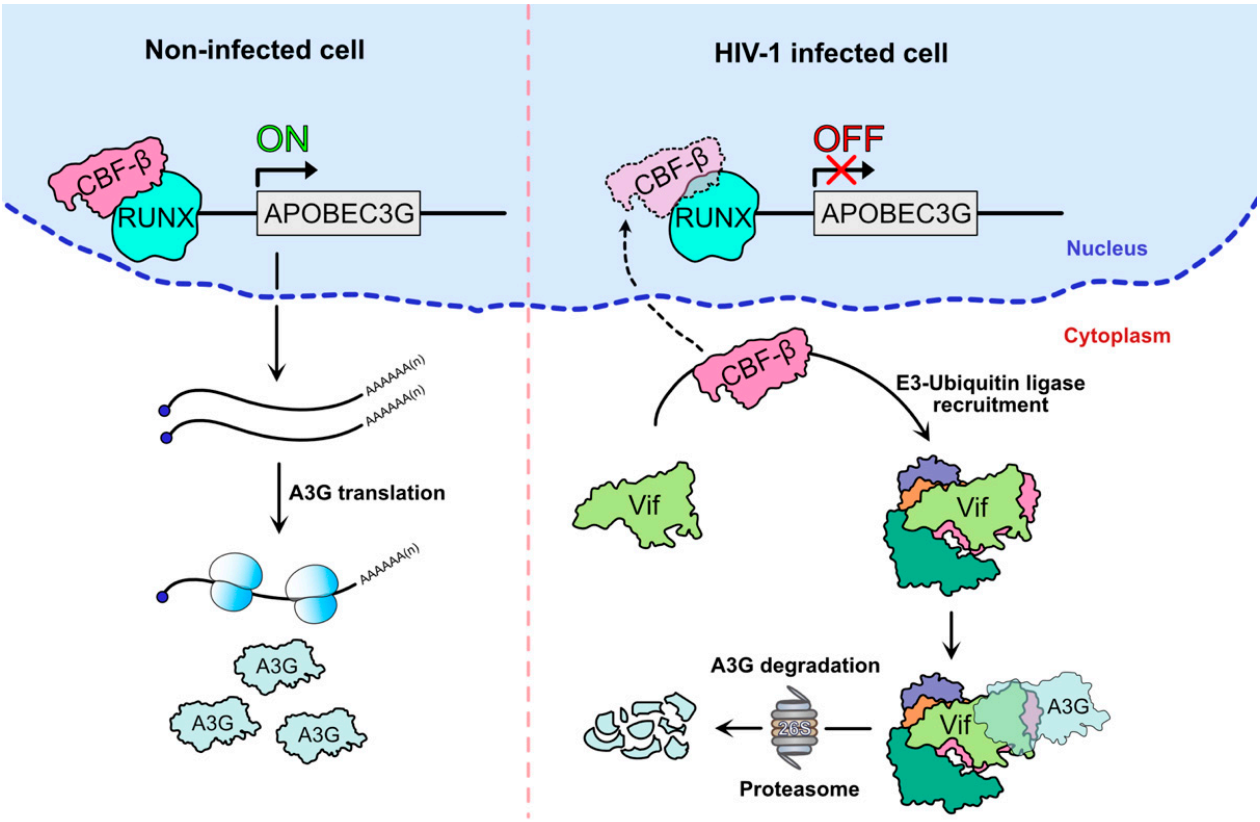


Figure 4. APOBEC3G mRNA transcriptional inhibition after CBF-β recruitment by HIV-1 Vif. The binding of CBF-β to the RUNX complex drives the transcription of the A3G gene and maintains a robust antiviral state in the absence of HIV-1 infection (**left**). In the presence of Vif (**right**), Vif hijacks CBF-β and prevents its binding to RUNX, thus simultaneously repressing A3G transcription and promoting its ubiquitination and proteasomal degradation.

3.2. Translational Inhibition of APOBEC3G mRNA by Vif

A second mechanism suggesting that Vif could reduce the intracellular level of A3G by affecting its translation was proposed shortly after the discovery of A3G [79,95]. First, the use of proteasome inhibitors on H9 infected cells or HEK 293 cells transiently co-transfected with Vif and A3G-HA expression vectors rescued only partial A3G expression, without altering the A3G mRNA levels. Second, ex-vivo pulse-chase experiments showed that Vif impaired the radiolabeling of the A3G-HA protein in a dose-dependent manner, reducing A3G translation by 30–40% [79,95]. Third, in vitro-coupled transcription/translation assays in rabbit reticulocyte lysates confirmed that Vif impaired A3G translation by approximatively 70–75% [79]. However, these first studies were performed using expression vectors lacking the authentic 5′ and 3′ untranslated regions (UTRs) of A3G mRNA, which could play a key role in A3G translation [96,97]. Thus, they may not faithfully recapitulate events occurring with endogenous A3G mRNA. Interestingly, we showed that Vif could bind A3G mRNA, and more specifically its UTRs [98]. Within the 5′UTR, two stem-loop structures (SL2–SL3) (Figure 5) were required for Vif to inhibit A3G translation [98,99] and viruses

produced after transfection with expression vectors of A3G mRNAs lacking this motif showed reduced infectivity, which was mainly due to an increase in A3G encapsidation into viral particles [99]. Moreover, our results show that translational inhibition of A3G by Vif is independent of the proteasomal degradation pathway as some mutations in the N-terminus of Vif impede translation inhibition without affecting A3G degradation (K26R, this mutant still binds A3G [100]), while others present a complete inhibition of A3G degradation and translational reduction (H42/43N, this mutant is defective in A3G binding [101]), raising the possibility that Vif/A3G interaction might be required for translational regulation [99].

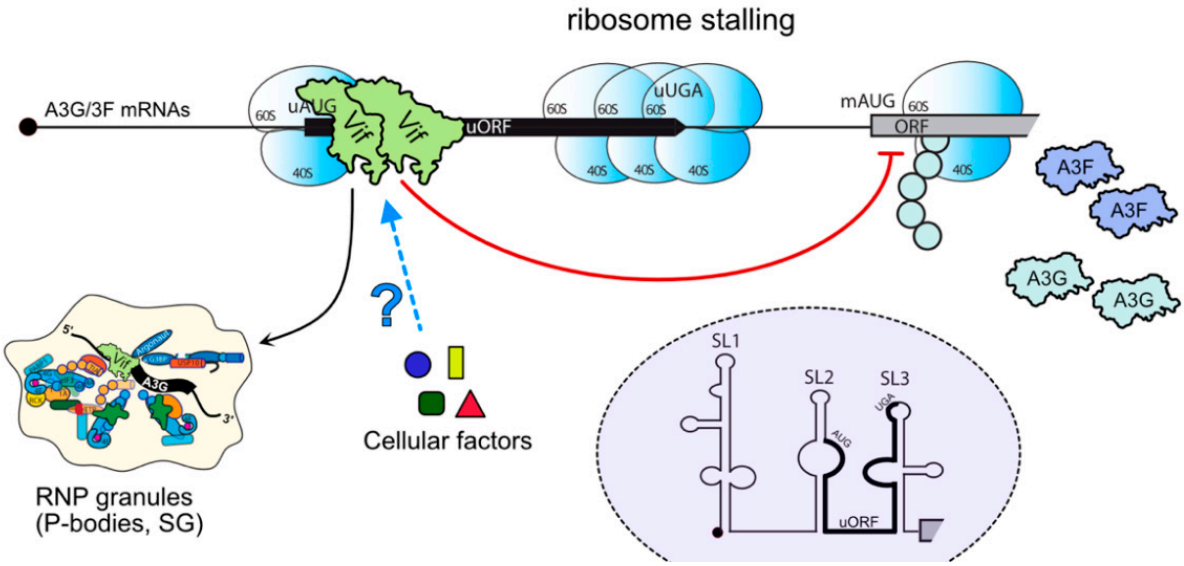


Figure 5. APOBEC3G mRNA translation inhibition mediated by HIV-1 Vif. Vif associates with the 5′UTR of A3G mRNAs, in the vicinity of A3G mRNA uORF. This association leads to A3G mRNA translation inhibition, possibly by ribosome stalling, and its relocation to RNP granules (P-bodies, stress granules, etc.). A3F mRNA could be regulated similarly as their 5′UTRs are phylogenetically conserved [102]. The involvement of other cellular factors in this process is still unknown but it could favor, or inhibit, A3G translation. The secondary structure of the 5′UTR of A3G mRNA as well as the position of the uORF (within SL2–SL3) are highlighted (purple dashed circle).

While mechanisms leading to A3G translation inhibition still remain unclear, we recently uncovered the importance of a short and conserved upstream ORF (uORF) located within SL2–SL3 of the 5′UTR of A3G and A3F mRNAs (Figure 5) [102]. Interestingly, the uORF represses A3G translation itself (40%), as do many uORF located in 5′UTR of mRNAs [103–105], but it is also mandatory for the Vif-mediated repression of A3G translation and for the redirection of A3G mRNA into stress granules in the presence of Vif [102]. The fact that Vif was previously shown in vitro to interact with the lower and upper stems of SL3 [98] suggests that Vif may block ribosome scanning (stalling). Given the proportion of genes that have one or more uORFs in their 5′UTR [103–105], one cannot rule out the possibility that Vif might be able to regulate the translation or the trafficking of such mRNAs in the cell. Notably, A3G was shown by immunofluorescence studies to localize to P-bodies and stress granules [31,106–110]; on the contrary, Vif was observed in P-bodies only in the presence of A3G, suggesting that Vif could selectively remove A3G from and/or restrict its localization to P-bodies to induce its degradation [107].

Taken together, translational inhibition of A3G by Vif seems to be a multi-layer process, involving direct (ribosome stalling at the 5′UTR) and indirect (shuttling of A3G mRNA to ribonucleoprotein granules) blockages to delay or prevent mRNA translation. Whereas additional experiments will be needed to clearly decipher this mechanism, one can imagine that Vif interacts with components of the eukaryotic translation initiation machinery to reduce the translation rate of A3G and/or recruit cellular factors involved in the negative regulation of the translation (Figure 5).

3.3. Packaging Inhibition of APOBEC3G by Vif

Packaging of A3G/3F proteins into HIV-1 particles depends on the nucleocapsid (NC) domain of $Pr55^{Gag}$, and the current view is that its packaging is also reliant upon its capacity to bind RNA [35,45–48,50,53,111]. A3C has evolved to use distinct mechanisms for retrovirus targeting by interacting with the matrix (MA) domain of $Pr55^{Gag}$ for its encapsidation [112]. A3D–H have been shown to be efficiently packaged into viral particles [17] and a correlation exists between the multimerization state of these A3s and their packaging (and restrictive) capacities [113,114]. Several studies have suggested that Vif prevents A3G packaging into HIV-1 particles independently of the reduction in its intracellular concentration [22,25,95,115]. Indeed, comparison of wild-type and Δvif HIV-1 virions produced from transfected cells expressing a similar level of A3G showed that wild-type virions incorporated less A3G than Δvif virions, suggesting that Vif can directly exclude A3G from progeny virions [25,95]. Moreover, A3G exclusion requires biologically active Vif. Indeed, the Vif C_{114} and C_{133} are critical residues for Cullin 5 interaction, as the HCCH motif and for Vif-mediated A3G degradation. Interestingly, the mutation of these residues (C_{114}/S and C_{133}/S) impaired Vif's ability to inhibit A3G packaging [95]. Additional experiments further highlighted that A3G packaging inhibition was not linked to its Vif-induced intracellular degradation. In fact, an A3G C_{97}/A mutant, which was defective for multimerization but resistant to Vif-mediated degradation, showed a decreased packaging yield in the presence of Vif [113,116]. Likewise, a recent study using antibody antigen-binding fragments (Fabs) directed against the ubiquitin transfer reaction and Vif-E3 assembly showed that the ubiquitination of A3C, A3F, and A3G was inhibited, although not sufficiently to restore their packaging into viral particles and antiviral activity [117]. These studies suggest that the inhibition of A3G packaging and A3G degradation are two distinct properties of Vif. Although a clear mechanism has not been described yet, it has been proposed that the RNA-binding capacities of A3G and Vif could account for this packaging restriction. Indeed, A3G and Vif share similar RNA-binding domains on HIV-1 genomic RNA, such as stem-loops in the 5′UTR packaging signal [51,71,118], and one can imagine that at early stages of assembly, Vif and A3G compete for their own packaging through HIV-1 RNA-binding, or that Vif prevents A3G encapsidation by masking a domain on A3G that mediates the interaction with the assembling virion [63]. As previously mentioned, it is well-established that Vif and A3G could be encapsidated through their capacity to bind the nucleocapsid (NC) domain of $Pr55^{Gag}$ [45–47,111,119–121]. It is therefore conceivable that Vif may interfere with these A3G–Gag interactions. Notably, this inhibition may also favor reverse transcription as A3G was reported to reduce tRNA annealing to the primer binding site (PBS), which is required for the initiation of reverse transcription [122,123]. Interestingly, A3 (F/G/H) evolved to partially mimic the RNA-binding specificity of the HIV-1 NC (by targeting G-rich and A-rich sequences) in order to ensure their concomitant packaging with RNA into nascent virions [53]. Similar to a potential competition between Vif and A3G, it is conceivable that Gag may compete with A3 proteins for their encapsidation; thus, Gag–RNA occlusion could be seen as a countermeasure against A3s by retroviruses lacking a Vif protein. Alternatively, Vif could direct A3G away from sites of virus assembly by inducing the formation of the high molecular weight form of A3G [124,125], thus sequestering A3G in packaging-incompetent complexes.

3.4. Inhibition of Intravirion Deaminase Activity by Vif

While downregulation of A3G by Vif within the cell is very efficient (see above), A3G can still be found in viral particles during wild-type HIV-1 infection, even though to a lesser extent than in Δvif viruses (4-11 A3G/Δvif(−) virion versus < 1 A3G/wild-type virion) [115,126–129]; thus, only a few A3G molecules are sufficient to potently inhibit HIV-1 replication. However, the efficiency of packaged A3G enzymes into wild-type particles indicated lower deaminase activity compared to those from Δvif virions (65% reduction) [130], suggesting that virion-associated Vif molecules inhibit the intrinsic deaminase activity of A3G [131]. Indeed, earlier work performed in *Escherichia coli* showed that

A3G-mediated hypermutation was inhibited by Vif [132], and this was correlated to a direct binding of Vif to A3G, as the use of a degradation-resistant A3G mutant (D128K, a species-specific determinant of Vif sensitivity) rendered A3G resistant to Vif inhibition [132,133]. In addition, enzymatic studies showed that Vif can attenuate the processivity of A3G by disrupting its scanning on viral ssDNA [133]. Taken together, these studies strongly argue in favor of a direct effect of Vif on A3G enzymatic activity, either through Vif–A3G binding (thus disrupting the binding of A3G to its substrate or A3G movements such as sliding or jumping), or by competing for its binding to the ssDNA substrate. Indeed, Vif is a well-known nucleic acids-binding protein [70,75–77,98,118,134–136]. Vif-binding sites that were identified in the 5′-end region of HIV-1 genomic RNA correspond to hypermutated sites in Δvif virions [118], and Vif also binds with a significant affinity (Kd < 40 nM) to the consensus A3G ssDNA target sites [134]. Thus, Vif could interfere with A3G by masking its access to the neosynthesized viral DNA. Alternatively, in the target cell, it might locally limit the RNase H activity of HIV-1 reverse transcriptase that is necessary to allow the deaminase activity of A3G, which is otherwise inhibited upon binding to HIV-1 genomic RNA [125].

4. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3 Proteins by Other Viruses

The tumultuous relationship between A3s and viral proteins is also witnessed in other animal species and for various viruses. Indeed, viral proteins other than Vif have been shown to counteract A3 proteins in lentiviruses: this is the case for feline immunodeficiency virus (FIV) protease [137], HIV-1 protease (against A3H variant SV200) [138], and reverse transcriptase for A3G [139]. In other retroviruses, mechanisms developed to counteract A3 proteins have been adapted to compensate for the absence of a functional Vif-like gene. Foamy or spumaretroviruses are also restricted by A3 proteins, and these viruses use the accessory Bet protein, an equivalent of Vif, to inhibit A3 antiviral activity [140–142]. The interaction of feline foamy virus (FFV) and prototype/human foamy virus (PFV) Bet protein with feline A3 and A3F/3G proteins, respectively, reduces their packaging into viral particles without impacting their expression level [140,141]. Instead, Bet prevents A3G dimerization [143,144] and traps A3 (A3G/3C) in insoluble complexes, rendering them unavailable for virion packaging. Murine leukemia virus (MLV) possesses two mechanisms to overcome the restriction by mouse A3. On the one hand, its P50 protein, produced from an alternatively spliced *gag* RNA [145,146], prevents mouse A3 packaging by interacting with its C-terminus CD2 domain, but impacts neither its degradation nor its deaminase activity [147]. Considering that the C-terminus of mouse A3 is necessary for its incorporation into viruses, it is not surprising that P50 binding to this domain affects A3 packaging. On the other hand, glyco-Gag is known to be important for MLV-induced pathogenesis, and its abrogation leads to decreased virus replication and pathogenesis [148–150]. Glyco-Gag uses a unique mechanism to counteract the antiviral action of A3 by affecting the capsid stability and by protecting the reverse transcription complex in the viral cores from A3 proteins [151,152]. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is also sensitive to human A3G, even though its cytidine deaminase activity is inoperant [153,154]. This virus has evolved a *cis*-acting mechanism to prevent A3G restriction. A peptide motif in the C-terminus of the NC domain inhibits A3G packaging into nascent virions [155]. In this case, the physical interaction between HTLV-1 NC and RNA would occlude A3G packaging. In addition, A3 proteins have been reported to inhibit several human pathogenic viruses other than retroviruses, such as the hepatitis B virus (HBV) [156], papillomavirus [157], and herpesvirus [158]. These viruses have evolved new strategies to antagonize the antiviral activities of A3s, either by enhancing the externalization of A3G by HBx (HBV), or by sequestering A3A/3B away from their site of activity thanks to the viral proteins BORF2 (Epstein–Barr virus, EBV), ICP6 (herpes simplex virus 1, HSV), and ORF6 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) [159]. Notably, these viral proteins do not induce the degradation of A3 proteins.

5. Conclusions

The Vif protein is of major importance for an efficient viral infection in non-permissive cells by antagonizing A3 proteins antiviral activity. While mechanisms leading to A3G degradation through the recruitment of an E3-ubiquitin ligase complex by Vif are well understood, little is known concerning other degradation-independent routes used by Vif to inhibit A3G and other A3 proteins. These mechanisms are diverse, and aim to inhibit or reduce A3G transcription, translation, virion encapsidation, and enzymatic activity (Figure 6). Interestingly, Vif-proteins and Vif-RNA interactions are common characteristics between all these important steps, thus targeting them through their interacting interfaces may constitute promising antiviral strategies. A better knowledge of how the virus hijacks different cellular processes and which components are involved in viral replication is crucial in this attempt.

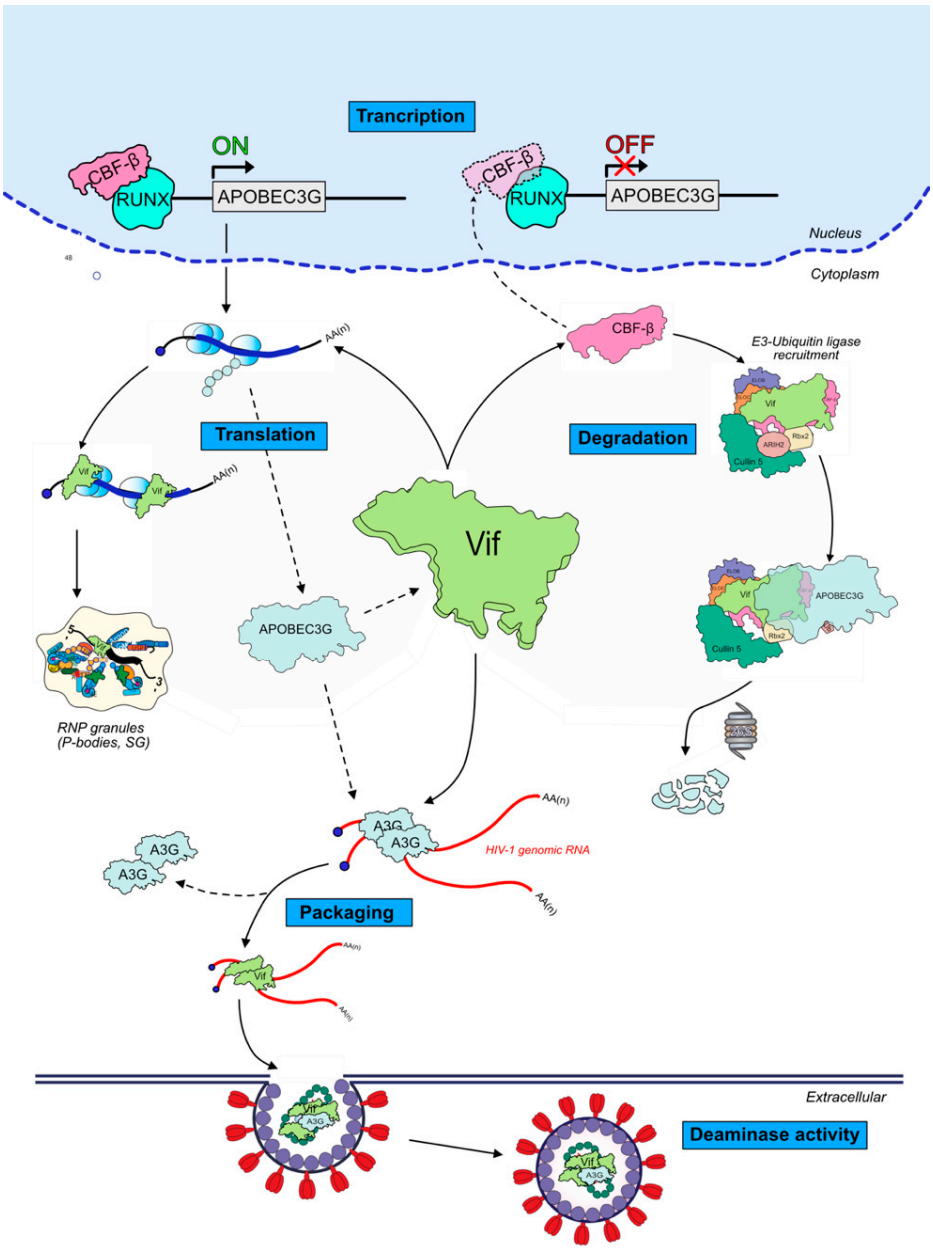


Figure 6. Summary of the different modes of inhibition of APOBEC3G by HIV-1 Vif protein. Other A3 proteins have also been shown to be regulated at different levels (see text for details): transcription (potentially all A3s); translation (A3G and A3F); degradation (all A3s, depending on considered HIV isolates and hosts); and packaging (A3D, A3F, A3G, and A3H).

Author Contributions: J.-C.P. and B.S. conceived the review topic; J.-C.P. drafted the manuscript and B.S. generated the figures. All authors corrected, edited, and approved the final version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (#ECTZ134179) and SIDACTION (#20-1-AEQ-12613-1) to JCP and SGM (grants) and BS (post-doctoral fellowships), and by a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education (CV). The APC was funded by the CNRS.

Acknowledgments: This work was supported by the CNRS and grants and fellowships from SIDACTION and the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) to JCP and BS, respectively, and by a doctoral fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research to CV.

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

References

1. Seissler, T.; Marquet, R.; Paillart, J.C. Hijacking of the ubiquitin/proteasome pathway by the hiv auxiliary proteins. *Viruses* **2017**, *9*, 322. [CrossRef]
2. 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] [PubMed]
3. D'Urbano, V.; De Crignis, E.; Re, M.C. Host Restriction Factors and Human Immunodeficiency Virus (HIV-1): A Dynamic Interplay Involving All Phases of the Viral Life Cycle. *Curr. HIV Res.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
4. Harris, R.S.; Dudley, J.P. APOBECs and virus restriction. *Virology* **2015**, *479–480*, 131–145. [CrossRef] [PubMed]
5. Salter, J.D.; Bennett, R.P.; Smith, H.C. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 578–594. [CrossRef]
6. Hulme, A.E.; Bogerd, H.P.; Cullen, B.R.; Moran, J.V. Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene* **2007**, *390*, 199–205. [CrossRef] [PubMed]
7. Chiu, Y.L.; Witkowska, H.E.; Hall, S.C.; Santiago, M.; Soros, V.B.; Esnault, C.; Heidmann, T.; Greene, W.C. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15588–15593. [CrossRef] [PubMed]
8. Xu, W.K.; Byun, H.; Dudley, J.P. The role of APOBECs in viral replication. *Microorganisms* **2020**.
9. Münk, C.; Willemsen, A.; Bravo, I.G. An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. *BMC Evol. Biol.* **2012**. [CrossRef] [PubMed]
10. Harris, R.S.; Liddament, M.T. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 868–877. [CrossRef]
11. Langlois, M.A.; Beale, R.C.L.; Conticello, S.G.; Neuberger, M.S. Mutational comparison of the single-domained APOBEC3C and double-domained APOBEC3F/G anti-retroviral cytidine deaminases provides insight into their DNA target site specificities. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1913–1923. [CrossRef] [PubMed]
12. 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]
13. Yu, Q.; König, R.; Pillai, S.; Chiles, K.; Kearney, M.; Palmer, S.; Richman, D.; Coffin, J.M.; Landau, N.R. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 435–442. [CrossRef] [PubMed]
14. 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]
15. Mangeat, B.; Turelli, P.; Caron, G.; Friedli, M.; Perrin, L.; Trono, D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **2003**, *424*, 99–103. [CrossRef]
16. Zhang, H.; Yang, B.; Pomerantz, R.J.; Zhang, C.; Arunachalam, S.C.; Gao, L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **2003**, *424*, 94–98. [CrossRef]
17. Hultquist, J.F.; Lengyel, J.A.; Refsland, E.W.; LaRue, R.S.; Lackey, L.; Brown, W.L.; Harris, R.S. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11220–11234. [CrossRef]
18. Newman, E.N.C.; Holmes, R.K.; Craig, H.M.; Klein, K.C.; Lingappa, J.R.; Malim, M.H.; Sheehy, A.M. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 166–170. [CrossRef]
19. Bishop, K.N.; Verma, M.; Kim, E.Y.; Wolinsky, S.M.; Malim, M.H. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*. [CrossRef]
20. Li, X.Y.; Guo, F.; Zhang, L.; Kleiman, L.; Cen, S. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32065–32074. [CrossRef]
21. Hakata, Y.; Miyazawa, M. Deaminase-independent mode of antiretroviral action in human and mouse APOBEC3 proteins. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1–23. [CrossRef]

22. Mariani, R.; Chen, D.; Schröfelbauer, B.; Navarro, F.; König, R.; Bollman, B.; Münk, C.; Nymark-McMahon, H.; Landau, N.R. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **2003**, *114*, 21–31. [CrossRef]
23. Conticello, S.G.; Harris, R.S.; Neuberger, M.S. The Vif Protein of HIV Triggers Degradation of the Human Antiretroviral DNA Deaminase APOBEC3G. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 2009–2013. [CrossRef]
24. Marin, M.; Rose, K.M.; Kozak, S.L.; Kabat, D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1398–1403. [CrossRef] [PubMed]
25. Sheehy, A.M.; Gaddis, N.C.; Malim, M.H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1404–1407. [CrossRef] [PubMed]
26. Yu, X.; Yu, Y.; Liu, B.; Luo, K.; Kong, W.; Mao, P.; Yu, X.F. Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science* **2003**, *302*, 1056–1060. [CrossRef] [PubMed]
27. Uriu, K.; Kosugi, Y.; Ito, J.; Sato, K. The Battle between Retroviruses and APOBEC3 Genes: Its Past and Present. *Viruses* **2021**, *13*.
28. Nakano, Y.; Aso, H.; Soper, A.; Yamada, E.; Moriwaki, M.; Juarez-Fernandez, G.; Koyanagi, Y.; Sato, K. A conflict of interest: The evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology* **2017**. [CrossRef]
29. Land, A.M.; Wang, J.; Law, E.K.; Aberle, R.; Kirmaier, A.; Krupp, A.; Johnson, W.E.; Harris, R.S. Degradation of the cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B by SIV Vif. *Oncotarget* **2015**, *6*, 39969–39979. [CrossRef]
30. Wang, J.; Shaban, N.M.; Land, A.M.; Brown, W.L.; Harris, R.S. Simian Immunodeficiency Virus Vif and Human APOBEC3B Interactions Resemble Those between HIV-1 Vif and Human APOBEC3G. *J. Virol.* **2018**, *92*. [CrossRef]
31. Marin, M.; Golem, S.; Rose, K.M.; Kozak, S.L.; Kabat, D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Functionally Interacts with Diverse APOBEC3 Cytidine Deaminases and Moves with Them between Cytoplasmic Sites of mRNA Metabolism. *J. Virol.* **2008**, *82*, 987–998. [CrossRef]
32. Jäger, S.; Kim, D.Y.; Hultquist, J.F.; Shindo, K.; Larue, R.S.; Kwon, E.; Li, M.; Anderson, B.D.; Yen, L.; Stanley, D.; et al. Vif hijacks CBF-β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **2012**, *481*, 371–375. [CrossRef]
33. Delviks-Frankenberry, K.A.; Desimmie, B.A.; Pathak, V.K. Structural insights into APOBEC3-mediated lentiviral restriction. *Viruses* **2020**, *12*, 587. [CrossRef]
34. Navarro, F.; Bollman, B.; Chen, H.; König, R.; Yu, Q.; Chiles, K.; Landau, N.R. Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* **2005**, *333*, 374–386. [CrossRef] [PubMed]
35. Svarovskaia, E.S.; Xu, H.; Mbisa, J.L.; Barr, R.; Gorelick, R.J.; Ono, A.; Freed, E.O.; Hu, W.S.; Pathak, V.K. Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35822–35828. [CrossRef] [PubMed]
36. Wang, T.; Tian, C.; Zhang, W.; Luo, K.; Sarkis, P.T.N.; Yu, L.; Liu, B.; Yu, Y.; Yu, X.-F. 7SL RNA Mediates Virion Packaging of the Antiviral Cytidine Deaminase APOBEC3G. *J. Virol.* **2007**. [CrossRef] [PubMed]
37. Chelico, L.; Prochnow, C.; Erie, D.A.; Chen, X.S.; Goodman, M.F. Structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16195–16205. [CrossRef] [PubMed]
38. Feng, Y.; Chelico, L. Intensity of deoxycytidine deamination of HIV-1 proviral DNA by the retroviral restriction factor APOBEC3G is mediated by the noncatalytic domain. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11415–11426. [CrossRef] [PubMed]
39. Holden, L.G.; Prochnow, C.; Chang, Y.P.; Bransteitter, R.; Chelico, L.; Sen, U.; Stevens, R.C.; Goodman, M.F.; Chen, X.S. Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* **2008**, *456*, 121–124. [CrossRef]
40. LaRue, R.S.; Andrésdóttir, V.; Blanchard, Y.; Conticello, S.G.; Derse, D.; Emerman, M.; Greene, W.C.; Jónsson, S.R.; Landau, N.R.; Löchelt, M.; et al. Guidelines for Naming Nonprimate APOBEC3 Genes and Proteins. *J. Virol.* **2009**, *83*, 494–497. [CrossRef] [PubMed]
41. Azimi, F.C.; Lee, J.E. Structural perspectives on HIV-1 Vif and APOBEC3 restriction factor interactions. *Protein Sci.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
42. Hu, Y.; Knecht, K.M.; Shen, Q.; Xiong, Y. Multifaceted HIV-1 Vif interactions with human E3 ubiquitin ligase and APOBEC3s. *FEBS J.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
43. Wang, X.; Abudu, A.; Son, S.; Dang, Y.; Venta, P.J.; Zheng, Y.-H. Analysis of Human APOBEC3H Haplotypes and Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *J. Virol.* **2011**, *85*, 3142–3152. [CrossRef] [PubMed]
44. Muckenfuss, H.; Hamdorf, M.; Held, U.; Perkovic, M.; Löwer, J.; Cichutek, K.; Flory, E.; Schumann, G.G.; Münk, C. APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22161–22172. [CrossRef] [PubMed]
45. Alce, T.M.; Popik, W. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 gag nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34083–34086. [CrossRef] [PubMed]
46. Schäfer, A.; Bogerd, H.P.; Cullen, B.R. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* **2004**, *328*, 163–168. [CrossRef] [PubMed]
47. Luo, K.; Liu, B.; Xiao, Z.; Yu, Y.; Yu, X.; Gorelick, R.; Yu, X.-F. Amino-Terminal Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Is Required for Human APOBEC3G Packaging. *J. Virol.* **2004**, *78*, 11841–11852. [CrossRef]
48. Zennou, V.; Perez-Caballero, D.; Göttlinger, H.; Bieniasz, P.D. APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12058–12061. [CrossRef] [PubMed]
49. Burnett, A.; Spearman, P. APOBEC3G Multimers Are Recruited to the Plasma Membrane for Packaging into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virus-Like Particles in an RNA-Dependent Process Requiring the NC Basic Linker. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5000–5013. [CrossRef]

50. Apolonia, L.; Schulz, R.; Curk, T.; Rocha, P.; Swanson, C.M.; Schaller, T.; Ule, J.; Malim, M.H. Promiscuous RNA Binding Ensures Effective Encapsidation of APOBEC3 Proteins by HIV-1. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, 1–22. [CrossRef]
51. Khan, M.A.; Kao, S.; Miyagi, E.; Takeuchi, H.; Goila-Gaur, R.; Opi, S.; Gipson, C.L.; Parslow, T.G.; Ly, H.; Strebel, K. Viral RNA Is Required for the Association of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleoprotein Complexes. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5870–5874. [CrossRef]
52. Strebel, K.; Khan, M.A. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: Which RNA is it? *Retrovirology* **2008**, *5*. [CrossRef]
53. York, A.; Kutluay, S.B.; Errando, M.; Bieniasz, P.D. The RNA Binding Specificity of Human APOBEC3 Proteins Resembles That of HIV-1 Nucleocapsid. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, 1–24. [CrossRef]
54. Lecossier, D.; Bouchonnet, F.; Clavel, F.; Hance, A.J. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **2003**, *300*, 1112. [CrossRef] [PubMed]
55. Suspène, R.; Sommer, P.; Henry, M.; Ferris, S.; Guétard, D.; Pochet, S.; Chester, A.; Navaratnam, N.; Wain-Hobson, S.; Vartanian, J.P. APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2421–2429. [CrossRef]
56. Bishop, K.N.; Holmes, R.K.; Sheehy, A.M.; Davidson, N.O.; Cho, S.J.; Malim, M.H. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 1392–1396. [CrossRef] [PubMed]
57. Chaurasiya, K.R.; McCauley, M.J.; Wang, W.; Qualley, D.F.; Wu, T.; Kitamura, S.; Geertsema, H.; Chan, D.S.B.; Hertz, A.; Iwatani, Y.; et al. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid-binding protein. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 28–33. [CrossRef]
58. Gillick, K.; Pollpeter, D.; Phalora, P.; Kim, E.-Y.; Wolinsky, S.M.; Malim, M.H. Suppression of HIV-1 Infection by APOBEC3 Proteins in Primary Human CD4 + T Cells Is Associated with Inhibition of Processive Reverse Transcription as Well as Excessive Cytidine Deamination. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1508–1517. [CrossRef]
59. Iwatani, Y.; Chan, D.S.B.; Wang, F.; Maynard, K.S.; Sugiura, W.; Gronenborn, A.M.; Rouzina, I.; Williams, M.C.; Musier-Forsyth, K.; Levin, J.G. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7096–7108. [CrossRef] [PubMed]
60. Pollpeter, D.; Parsons, M.; Sobala, A.E.; Coxhead, S.; Lang, R.D.; Bruns, A.M.; Papaioannou, S.; McDonnell, J.M.; Apolonia, L.; Chowdhury, J.A.; et al. Deep sequencing of HIV-1 reverse transcripts reveals the multifaceted antiviral functions of APOBEC3G. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 220–233. [CrossRef]
61. Strebel, K.; Daugherty, D.; Clouse, K.; Cohen, D.; Folks, T.; Martin, M.A. The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **1988**, *328*, 728–730. [CrossRef]
62. Yang, S.; Sun, Y.; Zhang, H. The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: A requirement for Vif function in the viral life cycle. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4889–4893. [CrossRef]
63. Batisse, J.; Guerrero, S.X.; Bernacchi, S.; Richert, L.; Godet, J.; Goldschmidt, V.; Mely, Y.; Marquet, R.; de Rocquigny, H.; Paillart, J.-C. APOBEC3G Impairs the Multimerization of the HIV-1 Vif Protein in Living Cells. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6492–6506. [CrossRef]
64. Yang, B.; Gao, L.; Li, L.; Lu, Z.; Fan, X.; Patel, C.A.; Pomerantz, R.J.; DuBois, G.C.; Zhang, H. Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6596–6602. [CrossRef] [PubMed]
65. Barraud, P.; Paillart, J.-C.; Marquet, R.; Tisne, C. Advances in the Structural Understanding of Vif Proteins. *Curr. HIV Res.* **2008**, *6*, 91–99. [CrossRef]
66. Widera, M.; Hillebrand, F.; Erkelenz, S.; Vasudevan, A.A.J.; Münk, C.; Schaal, H. A functional conserved intronic G run in HIV-1 intron 3 is critical to counteract APOBEC3G-mediated host restriction. *Retrovirology* **2014**, *11*. [CrossRef]
67. Widera, M.; Erkelenz, S.; Hillebrand, F.; Krikoni, A.; Widera, D.; Kaisers, W.; Deenen, R.; Gombert, M.; Dellen, R.; Pfeiffer, T.; et al. An Intronic G Run within HIV-1 Intron 2 Is Critical for Splicing Regulation of vif mRNA. *J. Virol.* **2013**, *87*, 2707–2720. [CrossRef] [PubMed]
68. Akari, H.; Fujita, M.; Kao, S.; Khan, M.A.; Shehu-Xhilaga, M.; Adachi, A.; Strebel, K. High Level Expression of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vif Inhibits Viral Infectivity by Modulating Proteolytic Processing of the Gag Precursor at the p2/Nucleocapsid Processing Site. *J. Biol. Chem.* **2004**. [CrossRef] [PubMed]
69. Simon, J.H.; Carpenter, E.A.; Fouchier, R.A.; Malim, M.H. Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. *J. Virol.* **1999**. [CrossRef]
70. Zhang, H.; Pomerantz, R.J.; Dornadula, G.; Sun, Y. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is an Integral Component of an mRNP Complex of Viral RNA and Could Be Involved in the Viral RNA Folding and Packaging Process. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8252–8261. [CrossRef]
71. Khan, M.A.; Aberham, C.; Kao, S.; Akari, H.; Gorelick, R.; Bour, S.; Strebel, K. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is Packaged into the Nucleoprotein Complex through an Interaction with Viral Genomic RNA. *J. Virol.* **2001**, *75*, 7252–7265. [CrossRef] [PubMed]
72. Liu, H.; Wu, X.; Newman, M.; Shaw, G.M.; Hahn, B.H.; Kappes, J.C. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J. Virol.* **1995**, *69*, 7630–7638. [CrossRef] [PubMed]
73. Camaur, D.; Trono, D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **1996**, *70*, 6106–6111. [CrossRef]

74. Höglund, S.; öhagen, Å.; Lawrence, K.; Gabuzda, D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **1994**, *201*, 349–355. [CrossRef] [PubMed]
75. Henriet, S.; Sinck, L.; Bec, G.; Gorelick, R.J.; Marquet, R.; Paillart, J.C. Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5141–5153. [CrossRef]
76. Sleiman, D.; Bernacchi, S.; Guerrero, S.X.; Brachet, F.; Larue, V.; Paillart, J.C.; Tisné, C. Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA Biol.* **2014**, *11*, 906–920. [CrossRef]
77. Batisse, J.; Guerrero, S.; Bernacchi, S.; Sleiman, D.; Gabus, C.; Darlix, J.L.; Marquet, R.; Tisné, C.; Paillart, J.C. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res.* **2012**, *169*, 361–376. [CrossRef]
78. von Schwedler, U.; Song, J.; Aiken, C.; Trono, D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **1993**. [CrossRef]
79. Stopak, K.; De Noronha, C.; Yonemoto, W.; Greene, W.C. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 591–601. [CrossRef]
80. Mehle, A.; Strack, B.; Ancuta, P.; Zhang, C.; McPike, M.; Gabuzda, D. Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7792–7798. [CrossRef] [PubMed]
81. Verriez, C.; Marquet, R.; Paillart, J.C.; Stupfler, B. Les APOBEC3: Histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes. *Virol. Montrouge Fr.* **2020**, *24*, 381–418. [CrossRef]
82. Mehle, A.; Goncalves, J.; Santa-Marta, M.; McPike, M.; Gabuzda, D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2861–2866. [CrossRef] [PubMed]
83. Hüttenhain, R.; Xu, J.; Burton, L.A.; Gordon, D.E.; Hultquist, J.F.; Johnson, J.R.; Satkamp, L.; Hiatt, J.; Rhee, D.Y.; Baek, K.; et al. ARIH2 Is a Vif-Dependent Regulator of CUL5-Mediated APOBEC3G Degradation in HIV Infection. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 86–99.e7. [CrossRef]
84. Zhang, W.; Du, J.; Evans, S.L.; Yu, Y.; Yu, X.F. T-cell differentiation factor CBF-β regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* **2012**, *481*, 376–379. [CrossRef]
85. Guo, Y.; Dong, L.; Qiu, X.; Wang, Y.; Zhang, B.; Liu, H.; Yu, Y.; Zang, Y.; Yang, M.; Huang, Z. Structural basis for hijacking CBF-β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature* **2014**, *505*, 229–233. [CrossRef]
86. Binning, J.M.; Chesarino, N.M.; Emerman, M.; Gross, J.D. Structural Basis for a Species-Specific Determinant of an SIV Vif Protein toward Hominid APOBEC3G Antagonism. *Cell Host Microbe* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
87. Hu, Y.; Desimmie, B.A.; Nguyen, H.C.; Ziegler, S.J.; Cheng, T.C.; Chen, J.; Wang, J.; Wang, H.; Zhang, K.; Pathak, V.K.; et al. Structural basis of antagonism of human APOBEC3F by HIV-1 Vif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**. [CrossRef]
88. De Bruijn, M.F.T.R.; Speck, N.A. Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene* **2004**. [CrossRef]
89. Kim, D.Y.; Kwon, E.; Hartley, P.D.; Crosby, D.C.; Mann, S.; Krogan, N.J.; Gross, J.D. CBFβ Stabilizes HIV Vif to Counteract APOBEC3 at the Expense of RUNX1 Target Gene Expression. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 632–644. [CrossRef]
90. Anderson, B.D.; Harris, R.S. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-b/RUNX axis. *Sci. Adv.* **2015**, *1*. [CrossRef]
91. Fribourgh, J.L.; Nguyen, H.C.; Wolfe, L.S.; DeWitt, D.C.; Zhang, W.; Yu, X.-F.; Rhoades, E.; Xiong, Y. Core Binding Factor Beta Plays a Critical Role by Facilitating the Assembly of the Vif-Cullin 5 E3 Ubiquitin Ligase. *J. Virol.* **2014**, *88*, 3309–3319. [CrossRef]
92. Matsui, Y.; Shindo, K.; Nagata, K.; Io, K.; Tada, K.; Iwai, F.; Kobayashi, M.; Kadowaki, N.; Harris, R.S.; Takaori-Kondo, A. Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBFβ by site-directed mutagenesis. *Virology* **2014**, *449*, 82–87. [CrossRef] [PubMed]
93. Zhou, X.; Han, X.; Zhao, K.; Du, J.; Evans, S.L.; Wang, H.; Li, P.; Zheng, W.; Rui, Y.; Kang, J.; et al. Dispersed and Conserved Hydrophobic Residues of HIV-1 Vif Are Essential for CBF Recruitment and A3G Suppression. *J. Virol.* **2014**, *88*, 2555–2563. [CrossRef] [PubMed]
94. Desimmie, B.A.; Smith, J.L.; Matsuo, H.; Hu, W.S.; Pathak, V.K. Identification of a tripartite interaction between the N-terminus of HIV-1 Vif and CBFβ that is critical for Vif function. *Retrovirology* **2017**, *14*. [CrossRef] [PubMed]
95. Kao, S.; Khan, M.A.; Miyagi, E.; Plishka, R.; Buckler-White, A.; Strebel, K. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity. *J. Virol.* **2003**, *77*, 11398–11407. [CrossRef] [PubMed]
96. Jackson, R.J.; Hellen, C.U.T.; Pestova, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 113–127. [CrossRef] [PubMed]
97. Wilkie, G.S.; Dickson, K.S.; Gray, N.K. Regulation of mRNA translation by 5′- and 3′-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 182–188. [CrossRef]
98. Mercenne, G.; Bernacchi, S.; Richer, D.; Bec, G.; Henriet, S.; Paillart, J.C.; Marquet, R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, 633–646. [CrossRef]
99. Guerrero, S.; Libre, C.; Batisse, J.; Mercenne, G.; Richer, D.; Laumond, G.; Decoville, T.; Moog, C.; Marquet, R.; Paillart, J.C. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5′UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
100. Russell, R.A.; Pathak, V.K. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J. Virol.* **2007**. [CrossRef]

101. Mehle, A.; Wilson, H.; Zhang, C.; Brazier, A.J.; McPike, M.; Pery, E.; Gabuzda, D. Identification of an APOBEC3G Binding Site in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif and Inhibitors of Vif-APOBEC3G Binding. *J. Virol.* **2007**, *81*, 13235–13241. [CrossRef] [PubMed]
102. Libre, C.; Seissler, T.; Guerrero, S.; Batisse, J.; Verriez, C.; Stupfler, B.; Gilmer, O.; Weber, M.; Cimarelli, A.; Etienne, L.; et al. A conserved uORF impacts APOBEC3G translation and is essential for translational inhibition by the HIV-1 Vif protein. *BioRivx* **2021**. [CrossRef]
103. Calvo, S.E.; Pagliarini, D.J.; Mootha, V.K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7507–7512. [CrossRef] [PubMed]
104. Renz, P.F.; Valdivia Francia, F.; Sendoel, A. Some like it translated: Small ORFs in the 5′UTR. *Exp. Cell Res.* **2020**, *396*. [CrossRef] [PubMed]
105. Johnstone, T.G.; Bazzini, A.A.; Giraldez, A.J. Upstream ORF s are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* **2016**, *35*, 706–723. [CrossRef]
106. Gallois-Montbrun, S.; Kramer, B.; Swanson, C.M.; Byers, H.; Lynham, S.; Ward, M.; Malim, M.H. Antiviral Protein APOBEC3G Localizes to Ribonucleoprotein Complexes Found in P Bodies and Stress Granules. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2165–2178. [CrossRef]
107. Wichroski, M.J.; Robb, G.B.; Rana, T.M. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, 374–383. [CrossRef]
108. Martin, K.L.; Johnson, M.; D'Aquila, R.T. APOBEC3G Complexes Decrease Human Immunodeficiency Virus Type 1 Production. *J. Virol.* **2012**, *86*, 8916. [CrossRef]
109. Gallois-Montbrun, S.; Holmes, R.K.; Swanson, C.M.; Fernández-Ocaña, M.; Byers, H.L.; Ward, M.A.; Malim, M.H. Comparison of Cellular Ribonucleoprotein Complexes Associated with the APOBEC3F and APOBEC3G Antiviral Proteins. *J. Virol.* **2008**, *82*, 5636–5642. [CrossRef] [PubMed]
110. Kozak, S.L.; Marin, M.; Rose, K.M.; Bystrom, C.; Kabat, D. The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29105–29119. [CrossRef]
111. Cen, S.; Guo, F.; Niu, M.; Saadatmand, J.; Deflassieux, J.; Kleiman, L. The interaction between HIV-1 gag and APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33177–33184. [CrossRef] [PubMed]
112. Wang, T.; Zhang, W.; Tian, C.; Liu, B.; Yu, Y.; Ding, L.; Spearman, P.; Yu, X.F. Distinct viral determinants for the packaging of human cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3C. *Virology* **2008**, *377*, 71–79. [CrossRef] [PubMed]
113. Li, J.; Chen, Y.; Li, M.; Carpenter, M.A.; McDougle, R.M.; Luengas, E.M.; Macdonald, P.J.; Harris, R.S.; Mueller, J.D. APOBEC3 multimerization correlates with HIV-1 packaging and restriction activity in living cells. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1296–1307. [CrossRef] [PubMed]
114. Adolph, M.B.; Ara, A.; Feng, Y.; Wittkopp, C.J.; Emerman, M.; Fraser, J.S.; Chelico, L. Cytidine deaminase efficiency of the lentiviral viral restriction factor APOBEC3C correlates with dimerization. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 3378–3394. [CrossRef] [PubMed]
115. Kao, S.; Miyagi, E.; Khan, M.A.; Takeuchi, H.; Opi, S.; Goila-Gaur, R.; Strebel, K. Production of infectious human immunodeficiency virus type 1 does not require depletion of APOBEC3G from virus-producing cells. *Retrovirology* **2004**, *1*. [CrossRef] [PubMed]
116. Opi, S.; Kao, S.; Goila-Gaur, R.; Khan, M.A.; Miyagi, E.; Takeuchi, H.; Strebel, K. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Inhibits Packaging and Antiviral Activity of a Degradation-Resistant APOBEC3G Variant. *J. Virol.* **2007**, *81*, 8236–8246. [CrossRef]
117. Binning, J.M.; Smith, A.M.; Hultquist, J.F.; Craik, C.S.; Caretta Cartozo, N.; Campbell, M.G.; Burton, L.; La Greca, F.; McGregor, M.J.; Ta, H.M.; et al. Fab-based inhibitors reveal ubiquitin independent functions for HIV Vif neutralization of APOBEC3 restriction factors. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*. [CrossRef]
118. Henriet, S.; Richer, D.; Bernacchi, S.; Decroly, E.; Vigne, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Paillart, J.C.; Marquet, R. Cooperative and specific binding of Vif to the 5′ region of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354*, 55–72. [CrossRef]
119. Douaisi, M.; Dussart, S.; Courcoul, M.; Bessou, G.; Vigne, R.; Decroly, E. HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *321*, 566–573. [CrossRef]
120. Bardy, M.; Gay, B.; Pébernard, S.; Chazal, N.; Courcoul, M.; Vigne, R.; Decroly, E.; Boulanger, P. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol Precursors: Co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 2719–2733. [CrossRef] [PubMed]
121. Syed, F.; McCrae, M.A. Interactions in vivo between the Vif Protein of HIV-1 and the precursor (Pr55GAG) of the virion nucleocapsid proteins. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 1797–1805. [CrossRef]
122. Guo, F.; Cen, S.; Niu, M.; Yang, Y.; Gorelick, R.J.; Kleiman, L. The Interaction of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Inhibits tRNA3Lys Annealing to Viral RNA. *J. Virol.* **2007**, *81*, 11322–11331. [CrossRef]
123. Guo, F.; Cen, S.; Niu, M.; Saadatmand, J.; Kleiman, L. Inhibition of tRNA(Lys)-Primed Reverse Transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11710–11722. [CrossRef]
124. Goila-Gaur, R.; Khan, M.A.; Miyagi, E.; Kao, S.; Opi, S.; Takeuchi, H.; Strebel, K. HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology* **2008**, *372*, 136–146. [CrossRef]
125. Soros, V.B.; Yonemoto, W.; Greene, W.C. Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 0152–0167. [CrossRef]
126. Nowarski, R.; Britan-Rosich, E.; Shiloach, T.; Kotler, M. Hypermutation by intersegmental transfer of APOBEC3G cytidine deaminase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1059–1066. [CrossRef] [PubMed]

127. Xu, H.; Chertova, E.; Chen, J.; Ott, D.E.; Roser, J.D.; Hu, W.S.; Pathak, V.K. Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* **2007**, *360*, 247–256. [CrossRef]
128. Kao, S.; Goila-Gaur, R.; Miyagi, E.; Khan, M.A.; Opi, S.; Takeuchi, H.; Strebel, K. Production of infectious virus and degradation of APOBEC3G are separable functional properties of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Virology* **2007**, *369*, 329–339. [CrossRef] [PubMed]
129. Sadler, H.A.; Stenglein, M.D.; Harris, R.S.; Mansky, L.M. APOBEC3G Contributes to HIV-1 Variation through Sublethal Mutagenesis. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7396–7404. [CrossRef] [PubMed]
130. Britan-Rosich, E.; Nowarski, R.; Kotler, M. Multifaceted counter-APOBEC3G mechanisms employed by HIV-1 Vif. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 1065–1076. [CrossRef] [PubMed]
131. Wang, Y.; Kinlock, B.L.; Shao, Q.; Turner, T.M.; Liu, B. HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology* **2014**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
132. Santa-Marta, M.; Da Silva, F.A.; Fonseca, A.M.; Goncalves, J. HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8765–8775. [CrossRef]
133. Feng, Y.; Love, R.P.; Chelico, L. HIV-1 viral infectivity factor (Vif) alters processive single-stranded DNA scanning of the retroviral restriction factor APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6083–6094. [CrossRef] [PubMed]
134. Bernacchi, S.; Henriet, S.; Dumas, P.; Paillart, J.C.; Marquet, R. RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: A fluorescence study. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26361–26368. [CrossRef]
135. Bernacchi, S.; Mercenne, G.; Tournaire, C.; Marquet, R.; Paillart, J.C. Importance of the proline-rich multimerization domain on the oligomerization and nucleic acid binding properties of HIV-1 Vif. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 2404–2415. [CrossRef] [PubMed]
136. Dettenhofer, M.; Cen, S.; Carlson, B.A.; Kleiman, L.; Yu, X.-F. Association of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif with RNA and Its Role in Reverse Transcription. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8938–8945. [CrossRef] [PubMed]
137. Yoshikawa, R.; Takeuchi, J.S.; Yamada, E.; Nakano, Y.; Misawa, N.; Kimura, Y.; Ren, F.; Miyazawa, T.; Koyanagi, Y.; Sato, K. Feline Immunodeficiency Virus Evolutionarily Acquires Two Proteins, Vif and Protease, Capable of Antagonizing Feline APOBEC3. *J. Virol.* **2017**, *91*. [CrossRef] [PubMed]
138. Ebrahimi, D.; Richards, C.M.; Carpenter, M.A.; Wang, J.; Ikeda, T.; Becker, J.T.; Cheng, A.Z.; McCann, J.L.; Shaban, N.M.; Salamango, D.J.; et al. Genetic and mechanistic basis for APOBEC3H alternative splicing, retrovirus restriction, and counteraction by HIV-1 protease. *Nat. Commun.* **2018**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
139. Ikeda, T.; Symeonides, M.; Albin, J.S.; Li, M.; Thali, M.; Harris, R.S. HIV-1 adaptation studies reveal a novel Env-mediated homeostasis mechanism for evading lethal hypermutation by APOBEC3G. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*. [CrossRef] [PubMed]
140. Löchelt, M.; Romen, F.; Bastone, P.; Muckenfuss, H.; Kirchner, N.; Kim, Y.B.; Truyen, U.; Rösler, U.; Battenberg, M.; Saib, A.; et al. The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7982–7987. [CrossRef] [PubMed]
141. Russell, R.A.; Wiegand, H.L.; Moore, M.D.; Schäfer, A.; McClure, M.O.; Cullen, B.R. Foamy Virus Bet Proteins Function as Novel Inhibitors of the APOBEC3 Family of Innate Antiretroviral Defense Factors. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8724–8731. [CrossRef]
142. Chareza, S.; Slavkovic Lukic, D.; Liu, Y.; Räthe, A.M.; Münk, C.; Zabogli, E.; Pistello, M.; Löchelt, M. Molecular and functional interactions of cat APOBEC3 and feline foamy and immunodeficiency virus proteins: Different ways to counteract host-encoded restriction. *Virology* **2012**, *424*, 138–146. [CrossRef]
143. Jaguva Vasudevan, A.A.; Perkovic, M.; Bulliard, Y.; Cichutek, K.; Trono, D.; Haussinger, D.; Munk, C. Prototype Foamy Virus Bet Impairs the Dimerization and Cytosolic Solubility of Human APOBEC3G. *J. Virol.* **2013**, *87*, 9030–9040. [CrossRef]
144. Perković, M.; Schmidt, S.; Marino, D.; Russell, R.A.; Stauch, B.; Hofmann, H.; Kopletz, F.; Kloke, B.P.; Zielonka, J.; Ströver, H.; et al. Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 5819–5826. [CrossRef]
145. Déjardin, J.; Bompard-Maréchal, G.; Audit, M.; Hope, T.J.; Sitbon, M.; Mougel, M. A Novel Subgenomic Murine Leukemia Virus RNA Transcript Results from Alternative Splicing. *J. Virol.* **2000**, *74*, 3709–3714. [CrossRef]
146. Houzet, L.; Battini, J.L.; Bernard, E.; Thibert, V.; Mougel, M. A new retroelement constituted by a natural alternatively spliced RNA of murine replication-competent retroviruses. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4866–4875. [CrossRef]
147. Zhao, W.; Akkawi, C.; Mougel, M.; Ross, S.R. Murine Leukemia Virus P50 Protein Counteracts APOBEC3 by Blocking Its Packaging. *J. Virol.* **2020**, *94*. [CrossRef] [PubMed]
148. Fujisawa, R.; McAtee, F.J.; Zirbel, J.H.; Portis, J.L. Characterization of glycosylated Gag expressed by a neurovirulent murine leukemia virus: Identification of differences in processing in vitro and in vivo. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5355–5360. [CrossRef] [PubMed]
149. Corbin, A.; Prats, A.C.; Darlix, J.L.; Sitbon, M. A nonstructural gag-encoded glycoprotein precursor is necessary for efficient spreading and pathogenesis of murine leukemia viruses. *J. Virol.* **1994**, *68*, 3857–3867. [CrossRef] [PubMed]
150. Schwartzberg, P.; Colicelli, J.; Goff, S.P. Deletion mutants of Moloney murine leukemia virus which lack glycosylated gag protein are replication competent. *J. Virol.* **1983**, *46*, 538–546. [CrossRef]
151. Stavrou, S.; Nitta, T.; Kotla, S.; Ha, D.; Nagashima, K.; Rein, A.R.; Fan, H.; Ross, S.R. Murine leukemia virus glycosylated Gag blocks apolipoprotein B editing complex 3 and cytosolic sensor access to the reverse transcription complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9078–9083. [CrossRef] [PubMed]

152. Jaguva Vasudevan, A.A.; Balakrishnan, K.; Franken, A.; Krikoni, A.; Häussinger, D.; Luedde, T.; Münk, C. Murine leukemia virus resists producer cell APOBEC3A by its Glycosylated Gag but not target cell APOBEC3A. *Virology* **2021**, *557*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
153. Strebel, K. APOBEC3G & HTLV-I: Inhibition without deamination. *Retrovirology* **2005**, *2*.
154. Sasada, A.; Takaori-Kondo, A.; Shirakawa, K.; Kobayashi, M.; Abudu, A.; Hishizawa, M.; Imada, K.; Tanaka, Y.; Uchiyama, T. APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2005**, *2*. [CrossRef]
155. Derse, D.; Hill, S.A.; Princler, G.; Lloyd, P.; Heidecker, G. Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2915–2920. [CrossRef] [PubMed]
156. Turelli, P.; Mangeat, B.; Jost, S.; Vianin, S.; Trono, D. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G. *Science* **2004**, *303*, 1829. [CrossRef]
157. Warren, C.J.; Westrich, J.A.; Van Doorslaer, K.; Pyeon, D. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in human papillomavirus infection and disease progression. *Viruses* **2017**, *9*, 233. [CrossRef]
158. Cheng, A.Z.; Yockteng-Melgar, J.; Jarvis, M.C.; Malik-Soni, N.; Borozan, I.; Carpenter, M.A.; McCann, J.L.; Ebrahimi, D.; Shaban, N.M.; Marcon, E.; et al. Epstein–Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 78–88. [CrossRef] [PubMed]
159. Cheng, A.Z.; Moraes, S.N.; Shaban, N.M.; Fanunza, E.; Bierle, C.J.; Southern, P.J.; Bresnahan, W.A.; Rice, S.A.; Harris, R.S. APOBECs and Herpesviruses. *Viruses* **2021**, *13*, 390. [CrossRef] [PubMed]

2) De nouveaux régulateurs et partenaires du tandem A3G-Vif

Un nouveau mode d'action anti-VIH d'A3G et d'A3F a été rapporté par une étude parue en début d'année : les RF inhibent l'efficacité d'intégration de l'ADN viral (variation des zones d'intégration), ce qui favorise un état latent du provirus (Ajoge et al., 2023).

Le rôle canonique de Vif, le plus étudié et caractérisé, est celui de dégrader les A3 par l'intermédiaire du protéasome. Le complexe Vif/CBF-β/EloB/EloC/CUL5/Rbx2 (VCBCCR) que Vif induit pour ubiquitiner A3G est étudié avec intérêt depuis une vingtaine d'années, notamment d'un point de vue structural, afin de déchiffrer précisément le mécanisme de reconnaissance, recrutement, et ubiquitination d'A3G par Vif en collaboration avec ces différents partenaires cellulaires (Azimi and Lee, 2020; Delviks-Frankenberry et al., 2020). De nombreuses études ont cherché à résoudre la structure de Vif, du complexe VCBCCR partiel ou complet, et des APOBEC3 seules ou au sein de ce complexe. Les A3 à double domaine posent un challenge supplémentaire du fait de leur difficulté de production (homogénéité et solubilité). Diverses mutations (usage de domaines d'A3 simiennes, remplacement des boucles…) ont permis l'obtention de protéines stables, mimant les A3 humaines. Les interactions entre Vif et A3G dans le complexe VCBCCR étaient classiquement considérées comme des interactions protéine-protéines directes. Trois études structurales récentes viennent néanmoins redéfinir cette vision : elles démontrent que l'interaction entre Vif et A3G est médiée par une molécule d'ARN, avec laquelle Vif et A3G interagissent respectivement, en plus d'interagir directement entre elles (**Figure 16**) (Ito et al., 2023; Kouno et al., 2023; Li et al., 2023). Ces études indépendantes basées sur des méthodes de cryo-EM aboutissent à des résultats et conclusions similaires quant aux liaisons A3G-ARN, Vif-ARN et A3G-Vif. La présence d'ARN est donc requise pour l'interaction Vif-A3G, l'ubiquitination efficace d'A3G (Kouno et al., 2023), et sa fixation par A3G pourrait orienter le domaine catalytique (CD2) de façon à ce que les lysines cibles de l'ubiquitination soient exposées face à la protéine de conjugaison E2 et ARIH2 (Ito et al., 2023; Li et al., 2023). De plus, les acides aminés des protéines identifiées en interaction avec l'ARN et/ou la protéine partenaire sont des résidus ayant déjà été identifiés comme importants pour l'interaction Vif-A3G et/ou pour l'encapsidation d'A3G dans les particules virales. Ces études suggèrent des raisons évolutives à cette interaction : (1) Vif pourrait être apte à ne reconnaitre et agir que sur les formes les plus « dangereuses » d'A3G, i.e. celles étant liées à l'ARN, et allant potentiellement être encapsidées dans les particules

néoformées ; (2) Vif reconnaitrait une surface essentielle à l'action antivirale d'A3G afin d'exercer une pression sur la protéine humaine et de limiter son échappement par mutation.

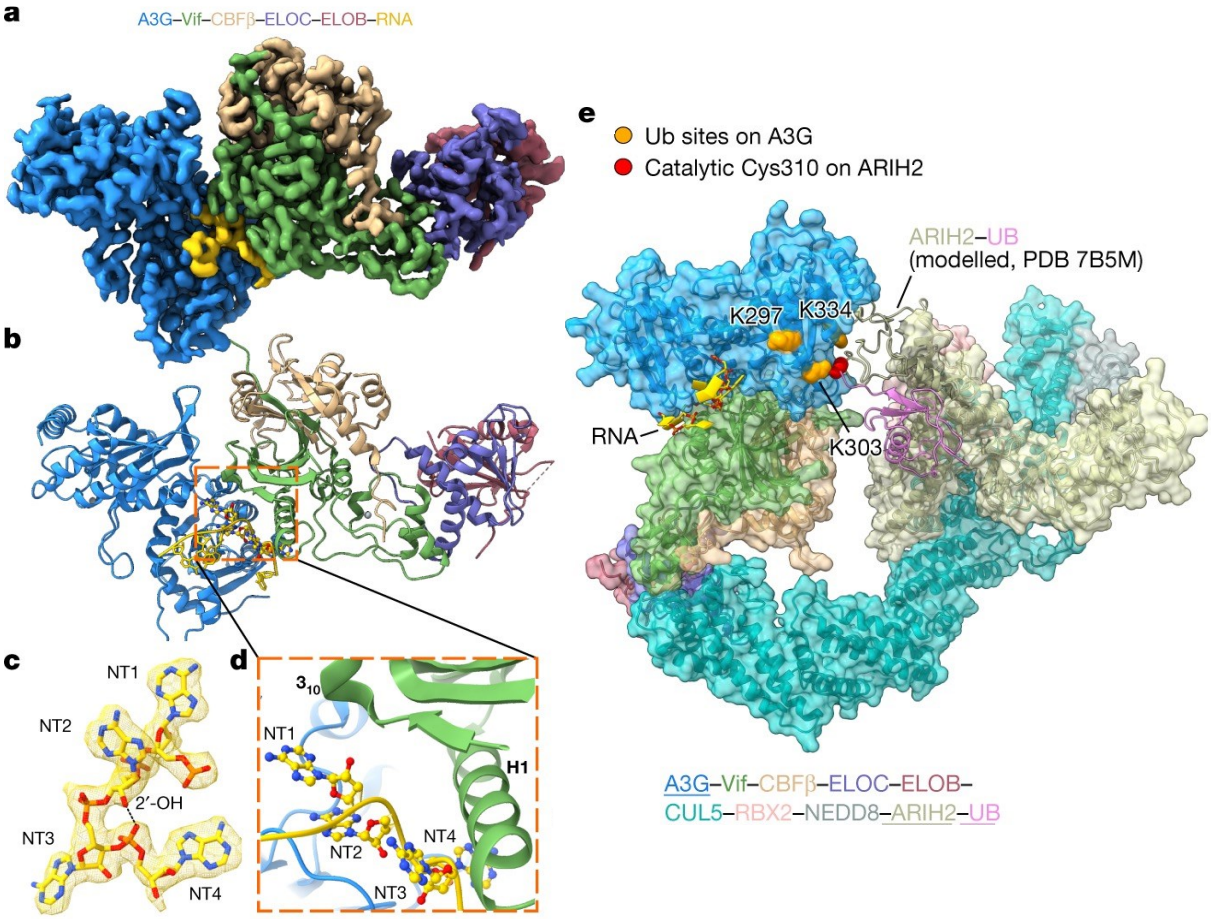


Figure 16 : Structure du complexe VCBC avec hA3G et de l'ARN. (**A, B**) Une structure résolue par Cryo-EM d'un complexe VCBC-ARN-A3G est représentée. Le code couleur est indiqué au-dessus de la structure ; on visualise l'ARN en jaune, entre A3G (bleu) et Vif (Vert). (**C**) Le motif de 4 nucléotides faisant la jonction entre Vif et A3G est représenté. Il est encadré au sein du complexe sur (**B**) et agrandi en (**D**). (**D**) La représentation en ruban montre les NT1-4 de l'ARN joignant l'hélice 1 (H1) et le tour d'hélice 3_{10} de Vif avec A3G. (**E**) Un modèle étendu du complexe d'ubiquitination d'A3G est représenté, notamment avec l'enzyme ARIH2 qui transfère la première ubiquitine sur A3G, au niveau des sites représentés en orange. D'autres composants de l'E3 ligase (Cul5, Rbx2, Nedd8) sont représentés. Figure adaptée de (Li et al., 2023).

Outre la régulation d'A3G par Vif, une étude a également suggéré une inhibition d'A3G (mais modeste) par la protéine Vpr du VIH-1 qui recrute elle aussi un complexe E3 ligase pour induire sa dégradation (Zhou et al., 2015). À noter que les études interactomiques menées sur Vpr n'ont jamais identifié A3G comme partenaire (Barbosa et al., 2021; Jäger et al., 2012a).

Le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie sont donc des voies centrales dans les interactions entre protéines virales et RF, des protéines virales induisant notamment la dégradation de RF *via* ces voies à l'image de Vif sur A3G (Colomer-Lluch et al., 2020; Proulx et al., 2020; Seissler et al., 2017). Il n'est alors pas surprenant de voir émerger le rôle régulateur

des protéases d'ubiquitine, les *Ubiquitin-specific proteases* (USP), dans ces interactions. En effet, ces protéines peuvent stabiliser les protéines marquées pour leur dégradation en retirant les ubiquitines présentes sur ces dernières. Dans le cas d'A3G, qui est dégradée suite à sa poly-ubiquitinylation médiée par Vif, plusieurs études ont montré des rôles pro-A3G de diverses USP : en effet, ces protéases viennent stabiliser A3G en retirant les chaines d'ubiquitines présentes sur cette dernière et participent alors à sa fonction antivirale. Parmi les USP contrant l'ubiquitination Vif-dépendante d'A3G, on recense USP8, USP41, USP18, USP49 et USP3 (Gao et al., 2021b; Pan et al., 2019; Zhao et al., 2022). Surprenamment, USP3 apparait aussi comme un activateur de la transcription et/ou un stabilisateur des ARNm d'A3G et A3F, boostant ainsi l'expression des protéines y compris en absence de Vif ou d'infection (Zhao et al., 2022). Il apparait au fil des études que ces USP peuvent avoir des rôles opposés, et/ou avoir un effet dépendant du type cellulaire (Lata et al., 2018).

D'autres rôles de Vif émergent aussi et/ou continuent de voir leur compréhension s'améliorer. Vif régule le cycle cellulaire en induisant la dégradation de protéines PPP2R5 par le protéasome (Verriez et al., 2020) ; cet effet est développé dans la revue suivante (Salamango and Harris, 2021). Cette observation venait initialement de cribles à haut débit ayant identifié Vif comme un modulateur du phosphoprotéome cellulaire (Greenwood et al., 2016). De plus, il a récemment été montré que Vif pouvait recruter la phosphatase SHP-1 pour inhiber la réponse IFN-1 en induisant la déphosphorylation de STING, empêchant alors son activation et la cascade de signalisation associée (Wang et al., 2022). Un effet immunomodulateur supplémentaire de Vif est sa capacité à induire la dégradation protéasomique des STAT 1 et 3 de la voie JAK/STAT (voir partie 1.3 du chapitre II) (Gargan et al., 2018). D'autre part, Vif augmente la phosphorylation d'AKT, et une des cibles en aval de la voie de signalisation d'AKT, l'E3 ligase MDM2, augmente la stabilité d'USP17 qui stabilise elle-même Tat en diminuant le niveau d'ubiquitination de cette dernière. Cette régulation résulte donc en une hausse des niveaux de la transcription virale grâce à Vif (Lata et al., 2022). À noter que d'autres USP influencent Tat de manières contraires (Ali et al., 2017; Gao et al., 2021a). Il semble aussi que Vif et MDM2 induisent la dégradation protéasomique l'une de l'autre (Izumi et al., 2009; Lata et al., 2022), et qu'AKT inhibe la dégradation protéasomique de Vif en la phosphorylant (Raja et al., 2022).

Les niveaux de régulation de l'expression des protéines forment un maillage complexe, interconnecté et parfois contraire, à l'image des interactions des USP ou des E3 ligases sur A3G et/ou les protéines virales comme Vif et Tat. Plusieurs protéines cellulaires ont des rôles inhibiteurs de Vif ce qui participe indirectement à la régulation des niveaux d'A3G, et donc à l'infectivité des particules virales (voir revue Verriez et al., 2020). Deux exemples récents de ces protéines régulatrices de Vif peuvent être notés. Premièrement, la protéine DNAJB8, une chaperonne de la famille des Hsp40/DNAJB induit la dégradation de Vif par la voie de l'autophagie (Chand et al., 2023). Deuxièmement, la protéine CHIP (ou STUB1), une E3 ligase et co-chaperonne induirait la dégradation de Vif par la voie du protéasome (Ali et al., 2021). De plus, CHIP jouerait aussi un second rôle antiviral en dégradant la protéine Tat, résultant en une diminution de la transcription virale (Ali et al., 2019).

Finalement, A3G, parmi ses diverses cibles, inhibe aussi la réplication de virus à ARN comme les entérovirus (EV71, CA16, EVD68) en se fixant à la 5'UTR de leur ARNv. A3G réduit ainsi la traduction des ARNm viraux par compétition avec PCBP1, un ITAF stimulant normalement la traduction de ces ARN (Li et al., 2022, 2018). Comme contre-mesure, ces virus expriment la protéine 2C qui induit la dégradation d'A3G par la voie autophagique. Ces interactions montrent un autre exemple de régulation traductionnelle et appuient l'importance de la seconde voie majeure de dégradation des protéines qu'est l'autophagie dans les interactions hôtes-virus.

Chapitre IV : La protéostase et la co-chaperonne E3 ligase CHIP

1) Protéostase : repliement, stabilité, et dégradation des protéines

Dans le précédent chapitre, j'ai évoqué plusieurs liens entre les mécanismes de défense cellulaires et de contre-défenses virales avec les voies de dégradation des protéines et composants cellulaires que sont les voies de l'autophagie et du protéasome. Je vais maintenant présenter ces voies de manière succincte au sein du contexte plus global de la protéostase et introduire la protéine CHIP/STUB1 qui fonctionne comme une co-chaperonne et une E3-ligase.

Les protéomes humains sont complexes, comportant plus de 10 000 protéines, avec des compositions variables entre types cellulaires et tissus. La majorité des protéines doivent adopter une structure 3D précise et conserver ce repliement durant leur durée de vie afin d'exercer correctement leurs fonctions biologiques. D'autre part, le *timing* de production, l'abondance relative et la localisation cellulaire de chacune des protéines, parmi les milliers présentes au sein de nos cellules, doivent être contrôlés avec soin. Cet équilibre du protéome, tant au niveau structural que quantitatif, est définie comme l'homéostasie protéique, ou la protéostase (**Figure 17**). Celle-ci dépend d'un réseau extensif de protéines chaperonnes, de

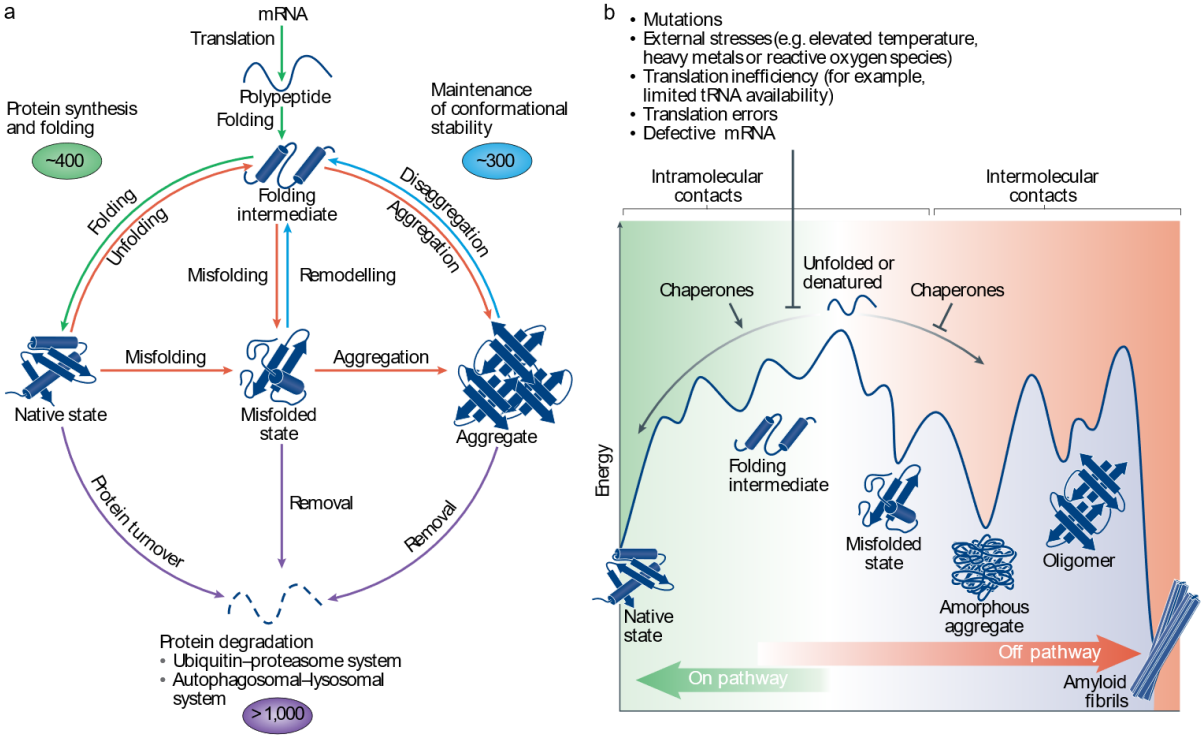


Figure 17 : Le réseau de la protéostase. (**A**) Les différents destins d'une protéine après sa synthèse sont représentés, ainsi que les acteurs impliqués. Le réseau protéostasique comporte les facteurs essentiels au contrôle de l'état des protéines et de leurs niveaux, pour éviter au mieux la présence de protéines mal repliées ou agrégées. Plus de 300 protéines chaperonnes interviennent dans le repliement, la restructuration, ou la désagrégation des protéines ; et collaborent avec les voies de dégradation. (**B**) Les états de repliement d'une

protéine sont représentés, de natif à agrégé, et leurs stabilités thermodynamiques respectives sont indiquées ; montrant les barrières d'énergie à franchir pour qu'une protéine passe d'une conformation à une autre. Les états agrégés d'une protéine peuvent être plus stable thermodynamiquement que son état natif. Divers facteurs (stress, mutations, etc) favorisent le mauvais repliement et l'agrégation protéique. Figure adaptée de Hipp et al., 2019.

systèmes protéolytiques et de leurs régulateurs ; un réseau d'acteurs interconnectés et communicants qui implique au moins 2 000 protéines dans les cellules humaines (**Figure 17A**). De nombreuses recherches se focalisent à comprendre ces réseaux et leurs réactions à des stress endogènes ou exogènes, dont font partie les infections virales. Ce réseau accompagne le repliement correct des protéines et intervient sur les protéines mal repliées et agrégées, pour leur rendre une conformation adéquate ou pour directement les dégrader par les voies du protéasome et/ou de l'autophagie, afin de prévenir tout dégât que ces protéines aberrantes pourraient entrainer. Ces deux mécanismes de dégradation sont ainsi des voies majeures de contrôle qualité.

La protéostase est donc un équilibre entre le repliement des protéines ou leur dégradation. Les chaperonnes assurent le repliement des protéines, la maintenance de leur conformation, et coopèrent avec les machineries de dégradation. Les chaperonnes, principalement des *heat-shock protein* (Hsp), reconnaissent des caractéristiques communes des protéines en conformation non natives, telles que des résidus hydrophobes exposés, ou des chaines polypeptidiques non structurées. Les protéines complexes à multidomaines requièrent par exemple souvent l'aide de chaperonnes pour être efficacement repliées durant leur synthèse et éviter d'atteindre une conformation potentiellement stable mais inadéquate (**Figure 17B**). Les protéines mal repliées tendent à former des interactions intermoléculaires, résultant en des agrégats stables mais non fonctionnels. La mutation des gènes les codant ainsi que des stress peuvent favoriser les mauvais repliements. Deux familles majeures de chaperonnes, les Hsp70 et Hsp90, régulent le repliement et la stabilité de protéines, dites clients, aussi bien en condition physiologique qu'en condition de stress, à l'aide de complexes multiprotéiques. Les partenaires des Hsp sont des co-chaperonnes, des protéines non-clients des Hsp qui n'ont pas d'activité chaperonne intrinsèque mais qui modulent l'activité des chaperonnes. Les chaperonnes facilitent généralement le repliement des protéines, à l'aide de co-chaperonnes pro-repliement, mais ils régulent aussi l'équilibre global en étant impliqués dans la dégradation de clients mal repliés, là aussi à l'aide de co-chaperonnes dédiées. Les chaperonnes coopérant avec les voies protéolytiques servent alors à la reconnaissance des

protéines mal repliées et à les maintenir dans un état pro-dégradation. Parmi les co-chaperonnes pro-dégradation on retrouve entre-autre la protéine CHIP (*carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*) aussi appelé STUB1 (*STIP1 homology and U-box containing protein 1*) selon le nom de son gène (Hipp et al., 2019).

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un mécanisme hautement conservé chez les eucaryotes qui orchestre la dégradation contrôlée de protéines « indésirées », agissant aussi bien sur des protéines natives dont les niveaux doivent être régulés temporellement que sur des protéines mal repliées. Ce système est composé de trois acteurs principaux : l'holoenzyme protéasome, les enzymes E1-E2-E3 impliquées dans l'ajout des ubiquitine (Ub), et une variété de désubiquitinases (DUB). Le protéasome actif 26S est composé du core 20S en forme de tonneau, et de deux unités régulatrices 19S dites « couvercles ». Le site actif protéolytique du protéasome est contenu au sein du core 20S ; les protéines ciblées pour leur dégradation doivent y être dirigées pour être clivées. La dégradation des protéines cibles est induite par l'ajout d'une PTM sur leurs aminoacides, l'ubiquitine, *via* des réactions enzymatiques séquentielles (**Figure 18**). L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés (≈ 8,5 kDa), hautement conservé chez les eucaryotes, et exprimé de manière ubiquitaire. Elles sont généralement ajoutées sur les lysines des protéines auxquels elles sont conjuguées. Cet ajout

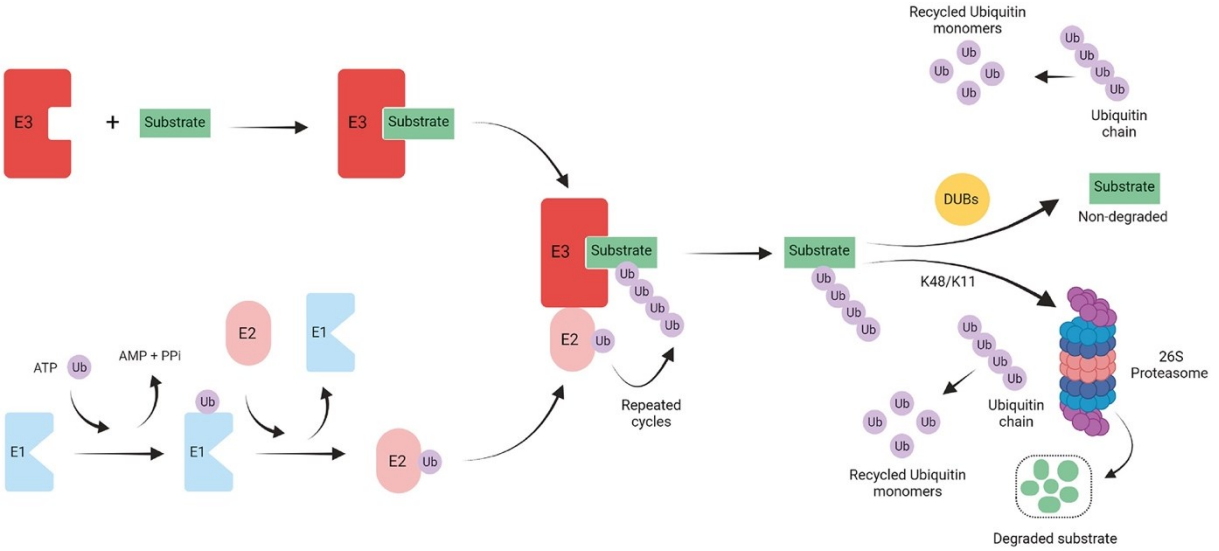


Figure 18 : Dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome. L'Ub est activée de manière ATP dépendante par une enzyme d'activation de l'ubiquitine E1, puis est transférée sur une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2. En parallèle, une ubiquitine ligase E3 recrute la protéine à dégrader, puis catalyse le transfert de l'Ub de l'E2 à la protéine cible. L'Ub est fixée au groupement NH2 d'une lysine de la protéine cible par un de ses résidus présents dans son extrémité C-terminale. Une chaine homotypique de type K48 contenant 4 Ub ou plus est le signal canonique de dégradation par le protéasome 26S. En plus d'assurer la reconnaissance et dégradation des protéines, cette holoenzyme déstructure les protéines cibles, et assure le recyclage des ubiquitines par désubiquitination grâce aux DUB. Les DUB régulent aussi le destin des protéines ubiquitinées. Figure adaptée de Bhat et al., 2022.

d'ubiquitine prend différentes formes : les protéines peuvent être mono-ubiquitinées ou poly-ubiquitinées. Les mono-ubiquitinations sont des marques qui régulent les protéines ciblées à l'image d'autres PTM, en modulant par exemple leurs activités enzymatiques, leurs localisations cellulaires… en fonction des protéines et des résidus sur lesquelles elles sont ajoutées. Dans le cas des poly-ubiquitinations une Ub sera rajoutée directement sur une autre Ub, formant ainsi une chaine de plusieurs Ub liées entre elles. Les Ub contiennent elles-mêmes 7 lysines ; l'ajout d'autres Ub se fait généralement sur ces résidus. Les chaines d'Ub peuvent être hétérotypiques (mixées, branchées, ou contenant des molécules similaires à l'Ub), auquel cas les Ub liées sont fixées sur des lysines différentes entre les maillons de la chaine, ou bien les chaines peuvent être homotypiques, où une Ub suivante sera toujours liée sur la lysine de la même position de l'Ub précédente. Ainsi, dans le cas des poly-ubiquitinations dites K48, la quatrième Ub est ajoutée sur le K48 de la troisième, et ainsi de suite. Cette chaine K48, lorsqu'elle contient au moins 4 Ub, est le signal canonique du ciblage au protéasome, donc de dégradation. À l'image des mono-ubiquitination, le type de chaine influence l'effet obtenu sur la protéine. Parmi les protéines impliquées dans la liaison des Ub et l'extension de ces chaines, on recense les E1, E2 et E3. Chez l'homme on compte moins d'une dizaine d'E1, pour une quarantaine d'E2 et finalement plus de 700 E3. Les E2 déterminent principalement le type de chaine polymérisée (les E2 Ubc4, 5 et 7, pour u*biquitin conjugating enzyme*, sont principalement impliquées pour les chaines K48), tandis que les E3 permettent une reconnaissance sélective des substrats (Bhat et al., 2022; Seissler et al., 2017). Les E3 peuvent être classées dans les familles HECT, RING, ou RBR3. Ces ligases sont classes selon leurs domaines et mode d'action. Les E3 HECT contiennent un domaine éponyme. Dans le cas des RBR, les E3 sont composées de deux domaines RING séparés par un domaine IBR. Pour ces deux familles, les ligases réalisent une ubiquitination en deux étapes : un E2 se lie à leur domaine E3, l'ubiquitine portée par l'E2 est transférée dans le domaine catalytique des ligases, puis des ligases aux substrats. La famille RING comporte des protéines qui ont un domaine RING ou U-box (structuralement proches) agissant alors par elles-mêmes en monomère ou dimère, et des E3 ligase Cullin-RING agissant en complexes protéiques (Yang et al., 2021). Dans le cas des protéines mal repliées, des E3 s'intègrent à des complexes de chaperonnes reconnaissant ces dernières afin d'induire leur dégradation. Une fois reconnue par le protéasome, la protéine cible est désubiquitinée, dépliée, et transloquée dans le core 20S. La désubiquitination, induite par les DUB, permet le clivage des polymères d'Ub nouvellement

synthétisés, ainsi que le recyclage des Ub présentes sur des protéines modifiées. En désubiquitinant des protéines modifiées, les DUB régulent celles-ci, abrogeant la fonction préalablement conférée par l'ajout des Ub. Certaines DUB sont associées au protéasome, mais la variété de ces enzymes, de leurs localisations et des voies dans lesquelles elles interviennent leur donne un rôle de régulateur important (Snyder and Silva, 2021). Les virus détournent ce système UPS et ses acteurs de différentes manières, codant par exemple leurs propres E3 ou DUB, ou détournant à leur avantage ces dernières (Seissler et al., 2017). L'ubiquitine est une PTM qui sert de signal de dégradation principalement pour le protéasome, mais peut aussi induire la dégradation des protéines par la voie autophagique, notamment avec des chaines de type K63. Ces deux systèmes s'entrecroisent et communiquent pour se coordonner dans leurs actions (Dikic, 2017). A noter que d'autres chaines d'Ub K-XX peuvent servir de signal de dégradation pour l'une ou l'autre des voies (Tracz and Bialek, 2021).

L'autophagie est donc une deuxième voie majeure de recyclage et de dégradation. Elle cible les protéines ainsi que d'autres composants cytosoliques tels que des agrégats protéiques ou des organelles entières pour induire leur dégradation par le lysosome. L'autophagie peut être classée en trois types majeurs : la macro-autophagie, la micro-autophagie, et l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA) (**Figure 19**). Elles diffèrent par leurs manières d'amener le cargo (élément à dégrader) au compartiment lytique. Le premier type est le plus caractérisé et requiert la formation d'autophagosomes, des vésicules membranaires capturant les cargos à dégrader. Les deux types de vésicules fusionnent en autolysosomes où le contenu se retrouve dégradé par hydrolyse et recyclé. Dans la micro-autophagie le cargo est capturé dans une petite invagination de la membrane lysosomique qui se détache ensuite dans la lumière du compartiment. Un deuxième mécanisme de micro-autophagie, dite endosomale, est induite par la chaperonne Hsc70/Hsp8A. Cette protéine est exprimée constitutivement, sans nécessiter de stress, et est le membre le plus exprimé de la famille des Hsp70. Pour la dernière voie, la CMA, les seuls cargos pris en charge sont des protéines. Elles sont ciblées à cette voie par Hsc70 et des co-chaperonnes tels que CHIP. Les protéines dégradées par les voies impliquant Hsc70 (micro-autophagie endosomale et CMA) doivent contenir un motif aminé spécifique, dit KFERQ-like, reconnu par Hsc70 qui apporte alors ces protéines aux lysosomes. Les protéines cibles se voient dépliées et transloquées dans la lumière du lysosome puis dégradées. Le motif KFERQ-like est retrouvé dans environ 40 % des protéines humaines et

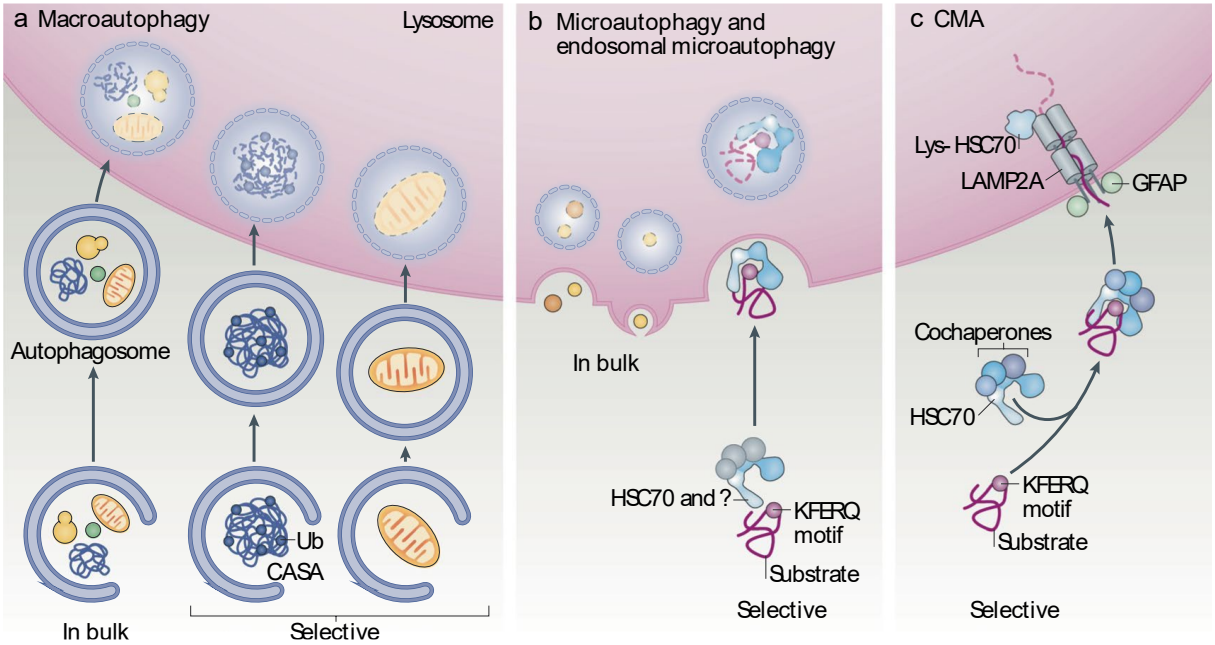


Figure 19 : Voies de l'autophagie. Les trois voies autophagiques principales sont représentées. La macro- et micro-autophagie sont des processus qui peuvent être sélectifs ou bien capturer et dégrader des substrats de manière non spécifique (« *in bulk* »). (**A**) La macro-autophagie séquestre les cargos cytosoliques en formant une membrane autour, par l'action concertée de plusieurs protéines et de lipides au sein d'un processus complexe et multi-étapes. Après fermeture, la vésicule est transportée le long de microtubules et fusionne avec le lysosome pour dégrader le cargo piégé. La *chaperone-assisted selective autophagy* (CASA) est une voie de dégradation autophagique où les cargos ciblés sont des protéines mal repliées et ubiquitinées par des complexes de chaperonnes/co-chaperonnes. CHIP est un de ces co-chaperonnes ayant une activité E3 ligase déclenchant cette voie. (**B**) la micro-autophagie piège les cargos cytosoliques par une invagination de la membrane lysosomique. Hsc70 et des co-chaperonnes encore inconnus induisent une voie micro-autophagique endosomale spécifique. (**C**) La CMA dégrade les protéines contenant des motifs KFERQ-like, qui sont conduites aux lysosomes par Hsc70 et des co-chaperonnes tels que CHIP, HSP40/DNAJB1 et HOP. Les protéines sont transloquées dans le lysosome grâce à LAMP2A. Figure adaptée de Kaushik and Cuervo, 2018.

certaines PTM peuvent permettre la reconnaissance d'un motif incomplet, augmentant le nombre de protéines cibles potentielles de ces voies autophagiques. La macro-autophagie comporte aussi la voie CASA pour *chaperone-assisted selective autophagy*, qui demande là aussi l'intervention d'Hsc70. Dans cette voie, Hsc70 s'aide des co-chaperonnes de la famille BAG (BAG1/3) et de l'E3-ligase CHIP pour induire l'ubiquitination d'agrégats protéiques qui seront ensuite dirigés au lysosome. Dans la voie CMA, Hsc70 requiert LAMP2A pour s'associer au lysosome, alors que la chaperonne effectue une interaction directe avec les lipides de la membrane lysosomale dans les autres voies. Une fois envoyés au lysosome, les cargos sont dégradés par toute une gamme d'enzymes, et notamment des protéases telles que des cathepsines ou des métalloprotéases pour les cargos protéiques. À l'image de l'UPS et de nombreuses voies cellulaires, les voies de l'autophagie sont finement régulées par des cascades de signalisation et impliquent de nombreux partenaires, néanmoins une explication détaillée de ces voies est au-delà des objectifs de ce manuscrit. Pour plus de détails le lecteur

est invité à se référer aux nombreuses revues de littérature existantes (Aman et al., 2021; Dikic, 2017; Galluzzi et al., 2017; Kaushik and Cuervo, 2018; Khandia et al., 2019).

2) La co-chaperonne et E3 ligase CHIP/STUB1

Comme la partie précédente l'illustre, les chaperonnes sont au cœur de la protéostase, qu'elles soient impliquées dans le repliement correct des protéines ou bien dans l'élimination des protéines aberrantes. Les Hsp70 et Hsp90 sont des protéines qui sont impliquées dans ces différentes actions et sont ainsi à l'interface des voies présentées. De fait, leur rôle est primordial et est impliqué dans de nombreux processus. La protéine CHIP/STUB1 est un partenaire essentiel de ces chaperonnes ; elle se retrouve dès lors elle aussi à l'interface de mécanismes cellulaires essentiels, et va réguler la protéostase. CHIP a pour rôle principal d'induire la dégradation de protéines, généralement mal repliées ou agrégées, grâce à son activité E3 ligase (Chakraborty and Edkins, 2023). CHIP est notamment capable de réaliser des chaines d'Ub de type K48 et K63, des signaux de dégradation pour le protéasome et l'autophagie respectivement. Il a effectivement été démontré que CHIP induit la dégradation de ses substrats par le protéasome, ou *via* diverses voies de l'autophagie, comme la CASA et la CMA (Ferreira et al., 2015, 2013; Maan and Pati, 2018; Shin et al., 2005; Zhang et al., 2005).

CHIP est une protéine de 303 acides aminés (35 kDa) (**Figure 20A**), exprimée à partir d'un unique isoforme. Elle fait partie de la dizaine d'E3 à domaine U-box identifiées chez l'homme. Le domaine U-box est fonctionnellement et structuralement similaire au domaine RING, à la différence qu'il ne coordonne pas d'ion zinc pour recruter l'E2 porteuse d'Ub. Ce domaine sert à la fois à recruter l'E2 et à transférer l'Ub sur le substrat cible. CHIP interagit notamment avec l'E2 UbcH5, principalement impliquée dans la formation de chaines K48, et Ubc13-Uev1a, impliquée dans la formation de chaines K63. Afin d'ubiquitiner ses cibles, CHIP homodimérise grâce à une région centrale, un domaine *coiled-coil*. Finalement, la protéine doit interagir avec ses substrats, ce qu'elle fait principalement par son domaine N-terminal. Il a été montré que l'E3 pouvait lier directement des substrats (Demand et al., 2001; Kopp et al., 2017; Rosser et al., 2007; Xin et al., 2005), notamment ceux en forme non native pour empêcher leur agrégation en les maintenant dans un état soluble et en induisant leur dégradation, fonctionnant alors comme une chaperonne moléculaire autonome (Rosser et al., 2007). Néanmoins cette action Hsp-indépendante n'est pas le mode d'action le plus observé

de l'E3 : CHIP fait habituellement le lien entre l'UPS et les Hsp en interagissant avec les chaperonnes Hsc70, Hsp70 et Hsp90 pour induire la dégradation de leurs protéines clients. CHIP lie les Hsp sur leurs motif C-terminal EEVD par l'intermédiaire de son domaine N-terminal *tetratricopeptide repeat* (TPR). Le domaine TPR contient trois répétitions d'un motif de 34 résidus et est retrouvé chez plusieurs cofacteurs des Hsp70 et Hsp90. Le résidu K30A au sein de ce domaine est particulièrement important à cette interaction. Dans le cas où le substrat de CHIP est un client de chaperonne, les Hsp servent à la reconnaissance et sélection du substrat à dégrader ; les domaines TPR et U-box de CHIP sont alors tous les deux essentiels pour induire l'ubiquitination et la dégradation de la protéine cible (Connell et al., 2001; Jiang et al., 2001; Meacham et al., 2001; Xu et al., 2002). De plus l'efficacité de l'ubiquitination du substrat semble plus forte lorsque CHIP est en complexe ternaire avec le substrat et une Hsp que si le substrat est seul (Quintana-Gallardo et al., 2019). Il a également été montré que CHIP cible la dégradation de certaines protéines uniquement en présence d'Hsp, et lorsqu'elles sont dépliées (Murata et al., 2001). CHIP pourrait aussi induire la dégradation de protéine interagissant avec les Hsp indépendamment de son activité E3 ligase (Jiang et al., 2015). Le domaine U-box de CHIP pourrait aussi être essentiel pour des interactions protéine-protéine (Ronnebaum et al., 2013). Des PTM, telle que la phosphorylation, régulent aussi l'activité E3-ligase de CHIP. En plus de son activité E3, CHIP régule négativement les activités de ses chaperonnes partenaires : CHIP peut bloquer le cycle de liaison d'Hsp70 à son substrat, inhibant alors le repliement du substrat normalement induit par Hsp70 (Chakraborty and Edkins, 2023) ; et CHIP remodèle les complexes formés par les Hsp70/90, pouvant ainsi inhiber leurs fonctions uniquement en liant de manière compétitive des régions d'Hsp communes à d'autres cofacteurs (Connell et al., 2001). Plusieurs études suggèrent que la liaison de CHIP aux Hsp fait passer leurs activités de pro-repliement à pro-dégradation. Les voies de surveillance/contrôle-qualité du repliement des protéines dans lesquelles CHIP intervient sont représentées (**Figure 20B**). Il a aussi été observé un effet pro-transcriptionnel de CHIP indépendamment de son activité E3 : la protéine interagit avec HSF1, promoteur de la transcription des Hsp, et augmente sa translocation nucléaire en cas de stress. CHIP semble aussi augmenter la fixation d'HSF1 à l'ADN (Dai et al., 2003).

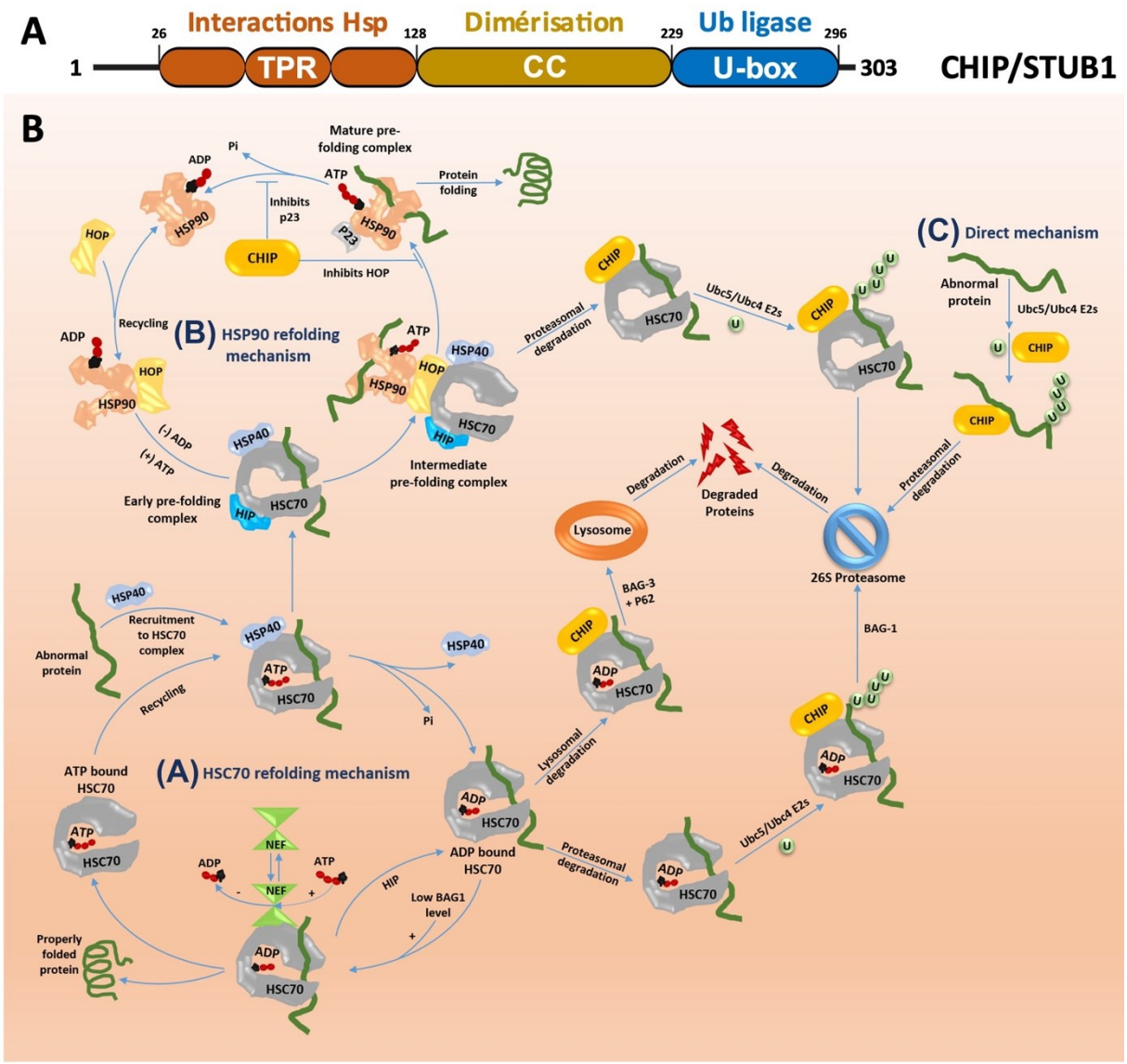


Figure 20 : CHIP et ses interactions avec les *Heat shock protein*. (**A**) La structure primaire de CHIP et ses domaines, ainsi que leurs fonctions, sont représentés. (**B**) Les différentes voies de la protéostase dans lesquelles CHIP intervient sont résumées. CHIP inhibe directement le repliement des protéines assisté par Hsp90 (**b**) et Hsp70 (**a**), et conduit à la dégradation des clients des chaperonnes, par les voies protéasomiques ou autophagiques. CHIP peut aussi induire la dégradation directe de certaines cibles (**c**). Figure adaptée de Kumar et al., 2022.

À l'instar des Hsp et CHIP, d'autres complexes protéiques reconnaissent des protéines agrégées et induisent leur dégradation, tel HDAC6 ou BAG6 (Mock et al., 2015). Les Hsp ont aussi d'autres partenaires de type E3-ligase, comme Hsp70 et Parkin ou Hsp90 et Mdm2 (Morishima et al., 2008). Ainsi une certaine redondance semble exister entre les acteurs de la protéostase pour dégrader certaines cibles. CHIP reste cependant la principale E3-ligase partenaire de chaperonne et est la mieux caractérisée avec le plus de cibles identifiées.

CHIP est donc une E3- ubiquitine ligase, à activité de chaperonne parfois directe, mais est surtout une co-chaperonne des Hsp. Elle est impliquée dans la dégradation d'une large

gamme de clients des protéines chaperonnes, auquel les Hsc/Hsp s'associent pour réguler leur conformation. Parmi ces protéines on retrouve des régulateurs de l'apoptose, des protéines de signalisation, des protéines agrégées. CHIP joue un rôle essentiel dans la protection face au stress cellulaire, et est impliquée dans la régulation de protéines liées à de nombreuses voies cellulaires. CHIP est impliquée dans l'immunité et l'inflammation, et module notamment la voie NF-κB, cible des TLR et RIG-I, des IRF, des récepteurs d'interleukines ou du TNF, des kinases de voies de signalisation immunitaires, des facteurs de transcription… ; et est impliqué dans plusieurs processus complexes tels que le vieillissement, les fonctions neurologiques, le métabolisme osseux. De manière cohérente, des défauts de la protéine sont largement associés à de nombreuses pathologies : des dérèglements immunitaires, des maladies neurodégénératives ou cardiaques, des cancers… Dans ce dernier cas, l'action de CHIP est complexe, la protéine pouvant être oncogène ou un suppresseur de tumeur. Il est à noter que l'étude de CHIP et de ses cibles a reçu beaucoup d'attention dans le contexte de maladies neurodégénératives (Chakraborty and Edkins, 2023; Kumar et al., 2022; Mylvaganam et al., 2021; Wang et al., 2020). En accord avec ces nombreuses observations, une délétion de CHIP chez la souris n'est pas directement létale, mais provoque une espérance de vie fortement réduite : l'absence de la protéine est associée à un phénotype pathophysiologique lié à l'âge, montrant un vieillissement accéléré. Au niveau cellulaire, la sénescence est aussi accélérée, et les niveaux de stress oxydatifs sont plus élevés. Les cellules montrent des niveaux élevés d'agrégats toxiques et une activité protéasomique réduite. Ces observations montrent le rôle essentiel de la protéine dans la protéostase et les défauts résultant à l'échelle de la cellule et de l'organisme en son absence soulignent son rôle essentiel ainsi que les mécanismes liés à une bonne protéostase (Min et al., 2008).

3) Protéostase, CHIP, et VIH

La protéostase est donc un ensemble large et complexe de diverses voies et nombreux acteurs. Les virus étant ciblés par les voies cellulaires de défenses, et ceux-ci détournant largement les mécanismes cellulaires à leur avantage pour se répliquer, il est évident que les infections virales soient aussi liées aux acteurs de la protéostase. Plusieurs revues de littérature concernant le protéasome et le VIH ont été citées auparavant (Colomer-Lluch et al., 2020; Proulx et al., 2020; Seissler et al., 2017). L'autophagie est une voie (ou un ensemble de voies)

plus complexe que le système ubiquitine-protéasome, c'est donc logiquement que plusieurs relations existent entre elle et le VIH, qui ne seront néanmoins pas approfondies ici (Cabrera-Rodríguez et al., 2021; Nardacci et al., 2017). Un exemple spécifique est l'implication de l'autophagie dans les interactions du tandem Vif-A3G : la protéine HDAC6 interagit avec A3G sur une interface commune à Vif et la stabilise en entrant en compétition avec la protéine virale. De plus, HDAC6 induit la dégradation de Vif *via* l'autophagie (Valera et al., 2015). Vif inhibe néanmoins cette voie cellulaire (Borel et al., 2015). HDAC6 joue aussi un rôle de co-chaperonne dans la dégradation d'agrégats par des voies autophagiques en reconnaissant des protéines mal repliées et ubiquitinées (Kawaguchi et al., 2003; Ouyang et al., 2012).

Concernant les chaperonnes, plusieurs liens sont établis avec le VIH, les études ne définissent néanmoins pas clairement si leur effet est principalement pro ou antiviral. L'expression d'Hsp70 est rapidement induite en cas d'infection par le VIH (Rasheed et al., 2008; Wainberg et al., 1997). Hsp70 est encapsidée dans les particules virales (Brenner and Wainberg, 1999). D'autres études confirment que Hsc70, Hsp70 et Hsp90 sont encapsidées dans des virions VIH produits en lignées HEK-293T et lymphocytaires à partir de vecteurs pNL4-3 (Gurer et al., 2002; Santos et al., 2012a). La protéine Hsp70 apportée de manière extra-cellulaire inhibe l'infection de LT CD4+ par des souches R5 du VIH en se fixant aux récepteurs cellulaires CCR5 (Babaahmady et al., 2007) et induirait par la même occasion la surexpression d'A3G (Bergmeier et al., 2010; Pido-Lopez et al., 2007), renforçant l'état antiviral des cellules ciblées. La liaison d'Hsp70 sur des récepteurs de cellules immunitaires induit aussi l'expression de cytokines CC. Hsp70 a aussi été liée aux protéines auxiliaires du VIH dans le contexte du contrôle du cycle cellulaire. Plus de détails sur les interconnexions entre les protéines chaperonnes et le cycle du VIH sont approfondis ici (Iyer et al., 2021; Low and Fassati, 2014). De manière intéressante, Hsp70 interagit à la fois avec Vif et A3G et protège cette dernière en empêchant que Vif s'y fixe. Cela inhibe l'ubiquitination d'A3G induite par Vif et augmente en conséquence son encapsidation. L'infectivité des virions ΔVif diminue donc de manière proportionnellement inverse à la quantité d'Hsp70 (Sugiyama et al., 2013, 2011). De plus, Hsp70 a été co-purifiée en même temps qu'un complexe VCBC-A3G (Drillien et al., 2022). Il a aussi été observé que des Hsp (notamment Hsp90) pouvaient stimuler la désamination des génomes HBV en augmentant l'activité enzymatique d'A3G (Chen et al., 2017).

Il aussi est intéressant de noter quelques relations observées entre le VIH et des protéines co-chaperonnes. BAG3 est une autre co-chaperonne des Hsp70/90, largement impliquée dans les voies autophagiques, et partenaire de CHIP dans certains complexes de la CASA. Tat inhibe l'expression de BAG3 à un niveau post-transcriptionnel (Mohseni Ahooyi et al., 2019), co-chaperonne qui peut elle-même inhiber l'activité du LTR du VIH (Rosati et al., 2007). Tat inhibe aussi l'expression d'HspBP1, une co-chaperonne d'Hsp70, pour favoriser l'activité du LTR du provirus (Iyer et al., 2022). La protéine *Vpu–binding protein* (UBP) est aussi un partenaire d'Hsc70, Hsp70 et Hsp90, et régule négativement les activités chaperonnes des hsp70 comme CHIP (Angeletti et al., 2002). Les protéines virales Vpu et Gag interagissent avec cette co-chaperonne, et Vpu favoriserait le bourgeonnement des particules virales en empêchant une accumulation de Gag dans les endosomes induite par UBP (Callahan et al., 1998; Li and De Clercq, 2016).

Concernant la co-chaperonne CHIP, quelques travaux l'associent à des mécanismes viraux, mais ils sont globalement épars et menés sur diverses espèces eucaryotes. Dans le cadre de l'infection à VIH, il a été montré que CHIP joue un rôle antiviral car elle induit la dégradation de Tat ainsi que de Vif (Ali et al., 2021, 2019). Cette protéine a pour la première fois été reliée au VIH car identifiée comme partenaire de Vif dans une étude interactomique en cellule HEK-293T (Jäger et al., 2012a, 2012b).

Plusieurs éléments, indirects, peuvent laisser imaginer des effets supplémentaires de CHIP dans le contexte du VIH : il a été montré que Vif remodèle le phosphoprotéome des cellules hôtes en augmentant l'activité des kinases Aurora A et B (Greenwood et al., 2016). En parallèle, Aurora A a été montré comme un activateur de CHIP, sa phopsphorylation de CHIP induisant une hausse de la dégradation du récepteur des androgènes, un des substrats de l'E3-ligase (Sarkar et al., 2017). D'autre part, il a aussi été observé que CHIP induit la dégradation des facteurs de transcription RUNX1 et 2, induisant alors une baisse de la transcription des gènes sous leur dépendance (Li et al., 2008; Shang et al., 2009; Yonezawa et al., 2017). Les résultats de ces études suggèrent aussi que CHIP peut ubiquitiner RUNX1 directement sans partenaire Hsp, bien que cela soit moins efficace qu'avec (Shang et al., 2009; Yonezawa et al., 2017). De manière intéressante, la transcription des gènes d'A3 est régulée par les facteurs RUNX, et il est connu que Vif détourne CBF-β, un partenaire essentiel à leur activité, pour stabiliser le complexe E3-ligase induisant la dégradation d'A3G (Anderson and Harris, 2015).

Objectifs

Les APOBEC3 sont des désaminases de cytidine exprimées par de nombreuses espèces de mammifère. Ces protéines ont comme fonction essentielle d'inhiber la réplication des virus exogènes et endogènes en induisant des mutations dans leurs génomes (activité enzymatique) ou en inhibant leur transcription inverse, traduction… grâce à leurs propriétés de liaison aux acides nucléiques et/ou d'inhibiteurs non compétitifs (activité non-enzymatique) : ce sont ainsi des facteurs de restriction. La première A3 identifiée chez l'Homme a été APOBEC3G (A3G) contre le VIH-1 (Sheehy et al., 2002). A3G a depuis largement été étudiée car elle est un des premiers RF identifiés contre ce virus, et exerce un puissant effet anti-VIH-1. Néanmoins, le VIH-1 parvient à se répliquer chez son hôte malgré la présence des A3, grâce à l'expression de sa protéine Vif qui a co-évoluée avec les désaminases. Vif possède diverses fonctions au cours du cycle viral (modulateur du phosphoprotéome de l'hôte et du cycle cellulaire, chaperon d'ARN lors des phases précoces du cycle du VIH-1) mais sa fonction principale est de contrer les A3. Vif diminue l'expression des A3 par différents mécanismes dans le but ultime d'inhiber leur encapsidation dans les particules virales, prérequis à leur activité antivirale au cours de la transcription inverse. Le mode de régulation le plus caractérisé est le détournement d'un complexe Culline-RING E3-ubiquitine ligase par Vif pour induire l'ubiquitination et la dégradation des A3 par le protéasome. En parallèle de cette dégradation, Vif inhibe aussi leur transcription en séquestrant CBF-β (co-facteur de la transcription) et en réduisant la traduction des ARNm exprimant A3G (Kao et al., 2003; Mariani et al., 2003; Stopak et al., 2003).

Mon laboratoire a entrepris d'étudier ce troisième mode d'action. Il a démontré que Vif avait la propriété de fixer les ARNm d'A3G, avec une affinité plus importante pour les UTR, et a identifié des sites de fixation de Vif sur ces régions qui se structurent en une série de 3 tiges-boucles indépendantes (Mercenne et al., 2010). En analysant l'importance de la 5'UTR d'A3G pour sa régulation traductionnelle induite par Vif le laboratoire a ensuite montré que : (i) les tiges-boucles SL2 et SL3 de la 5'UTR constituent le motif minimum requis pour l'inhibition traductionnelle ; (ii) cette inhibition est indépendante de la dégradation *via* le protéasome, et (iii) la dégradation d'A3G et son inhibition traductionnelle contribuent au même titre à restaurer l'infectivité virale. Ces résultats indiquent que la fixation de Vif (ou d'un complexe Vif-A3G) à l'ARNm d'A3G, et particulièrement à sa 5'UTR, est cruciale pour l'inhibition traductionnelle (Guerrero et al., 2016). Enfin, très récemment, nous avons identifié un uORF dans la 5'UTR de l'ARNm d'A3G et d'A3F (Libre et al., 2022). De façon intéressante, cet uORF

est localisé au niveau du motif SL2-SL3 de la 5'UTR. Cette séquence code pour un peptide putatif de 23 acides aminés et est fortement conservée dans la population humaine. De nombreux travaux ont fait état d'une régulation traductionnelle fine opérée par la présence d'un ou plusieurs uORF dans la 5'UTR des ARNm, et il a été montré que ces uORF, présents sur environ 50% du transcriptome humain et murin, peuvent réduire l'expression protéique de 30 à 80% (Barbosa et al., 2013; Renz et al., 2020; Zhang et al., 2019). Nous avons montré que ce motif uORF régule négativement la traduction intrinsèque d'A3G. A3G serait traduit par un double mécanisme impliquant *leaky-scanning* et ré-initiation (**Figure 21**).

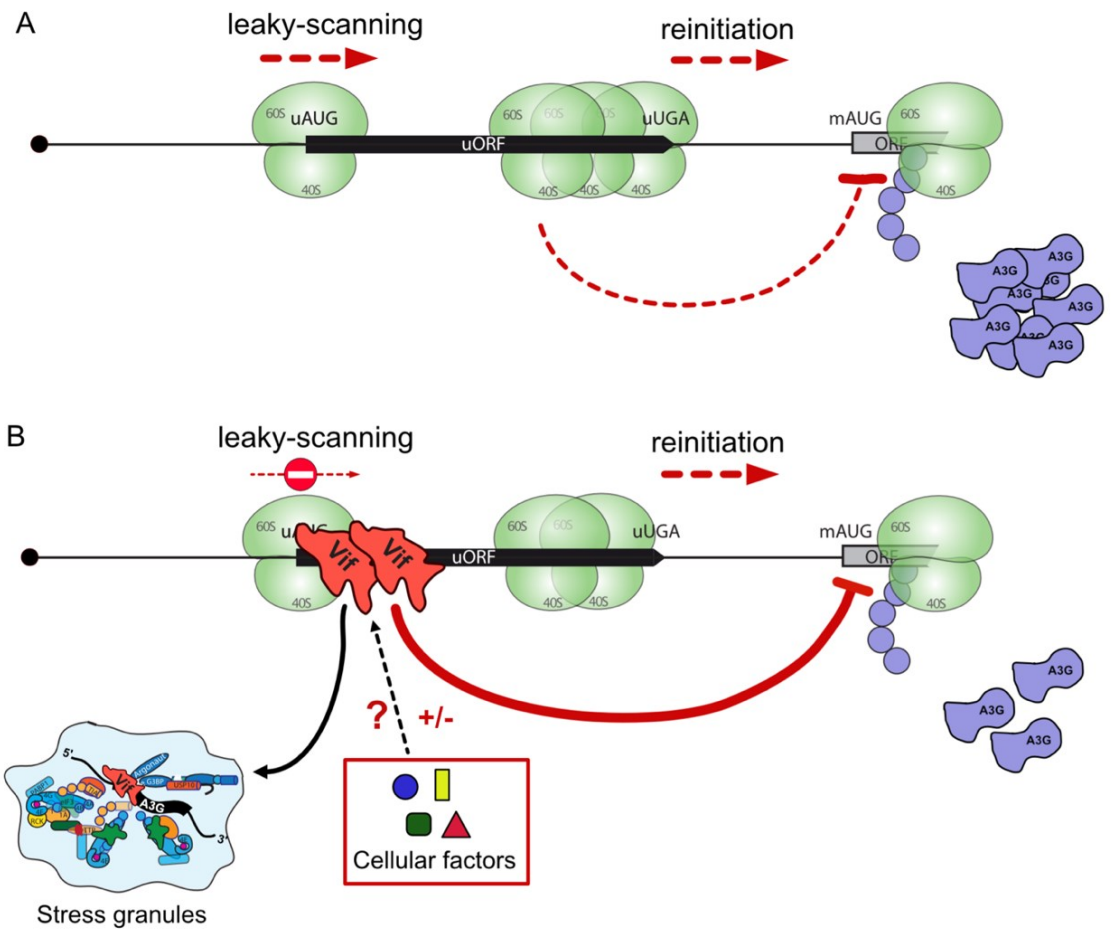


Figure 21 : Régulation de la traduction d'A3G. (**A**) Nos résultats suggèrent qu'en conditions physiologiques A3G est traduit par des ribosomes effectuant du *leaky-scanning*, en ignorant l'uAUG, et de la ré-initiation de traduction, après avoir traduit l'uORF ; ce mélange de mécanismes inhibe la traduction de l'ORF d'A3G. (**B**) En présence de Vif, la traduction d'A3G est plus fortement inhibée, d'une manière dépendante de l'uORF. Vif induit une relocalisation partielle de l'ARNm d'A3G. D'autres hypothèses de régulation traductionnelle peuvent néanmoins être suggérées : en effet, Vif pourrait inhiber le *scanning* des ribosomes, leur ré-initiation, ou moduler le recrutement de facteurs cellulaires anti- ou pro- traductionnels. Figure adaptée de (Libre et al., 2022).

D'autre part, nous avons montré que cet uORF est détourné par Vif pour diminuer la traduction d'A3G, participant ainsi à la réduction globale de l'expression d'A3G. De manière intéressante, lors d'un stress provoqué, nous avons observé une redirection induite par Vif et

dépendante de l'uORF de l'ARNm d'A3G dans des granules de stress (SG) (compartiments de stockages traductionnellement silencieux) (**Figure 21**). J'ai participé à l'obtention des résultats de cet article (Libre et al., 2022) au cours de ma thèse, notamment en analysant l'expression des différents membres de la famille APOBEC dans différentes conditions expérimentales (western-blot), les niveaux d'expression des ARNm d'A3G sauvage et mutants (RTqPCR)) et la structure secondaire des régions 5' terminales de ces ARNm (SHAPE). Cet article de recherche est joint en annexe de ce manuscrit.

L'objectif principal de ma thèse a été de comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires qui régissent la traduction d'A3G en présence Vif (**Figure 21B**). Le détournement de l'ARNm d'A3G par Vif dans les SG pourrait expliquer l'inhibition de la traduction d'A3G, de manière passive par sa séquestration. Néanmoins tous les ARNm ne sont pas redirigés et les SG ne semblent pas être induits par l'infection. Nous avons donc émis l'hypothèse que Vif régule la traduction d'A3G directement par l'intermédiaire de partenaires cellulaires. En effet, Vif pourrait exclure des facteurs essentiels à la traduction d'A3G, ou au contraire recruter de facteurs inhibiteurs de la traduction. Ces facteurs cellulaires peuvent éventuellement être impliqués dans la redirection de l'ARNm d'A3G dans d'autres compartiments cellulaires. Je me suis alors intéressé à caractériser les protéomes associés à l'ARNm d'A3G pour mieux déchiffrer le mécanisme d'action de Vif *via* des méthodologies de capture de l'ARNm d'A3G (*pull-down*) et d'identification des protéines co-capturées (spectrométrie de masse). Ces travaux avaient préalablement été initiés par le Dr Tanja SEISSLER-ROULIER, ancienne doctorante de l'équipe. Mon objectif a été d'obtenir et de comparer les protéomes en présence et absence de Vif afin de déterminer les cibles potentielles de Vif, et d'évaluer l'impact de l'uORF de l'ARNm d'A3G. L'avantage de ces méthodes dites « haut débit » est qu'elles permettent aussi d'identifier des partenaires potentiels impliqués dans des mécanismes connexes. Les candidats identifiés et validés sont ensuite caractérisés fonctionnellement (interaction avec Vif, A3G et/ou ARN, régulation de la traduction d'A3G) puis testés quant à leur importance dans la réplication virale. La protéine co-chaperonne et E3-ligase CHIP/STUB1 est le candidat le mieux caractérisé par mes travaux de thèse et le plus prometteur pour la suite de nos recherches.

Résultats

Chapitre I : draft de manuscript "CHIP/STUB1: a new regulator of the APOBEC3G antiviral factor expression involved in HIV-1 replication"

Comme présenté dans les objectifs, Vif inhibe la traduction d'A3G par le biais de l'uORF présente en région 5'UTR de l'ARNm d'A3G, *via* un mécanisme encore non élucidé. Notre hypothèse est que Vif interagit avec des facteurs cellulaires régulant la traduction d'A3G, possiblement par l'intermédiaire d'une interaction directe de la protéine virale avec l'ARNm d'A3G. Pour étudier l'impact de Vif sur les protéines associées à l'ARNm d'A3G, Tanja SEISSLER-ROULIER a développé et appliqué un protocole de capture de l'ARN (*pull-down*), basé sur l'utilisation d'un ARNm d'A3G transcrit *in vitro* et biotinylé et de lysat de cellules HEK-293T. Les protéines co-précipitées avec l'ARNm sont identifiées par spectrométrie de masse en tandem. Cette étude a permis la caractérisation du protéome d'un ARNm entier d'A3G, notamment en présence et absence des protéines Vif et ou A3G. Parmi les protéines identifiées, certaines ont vu leur présence à l'ARN régulée par la présence de Vif. Celles-ci pourraient donc être impliquées dans l'inhibition de la traduction d'A3G médiée par Vif, ou être des partenaires de Vif intervenant dans une autre étape du cycle réplicatif viral. L'étude de certains candidats a ensuite été poursuivie par : la validation de leur interaction avec les protéines A3G et/ou Vif, l'examen de leur rôle sur l'expression d'A3G et Vif puis de leur impact sur la réplication et infectiosité virale. Parmi ces candidats, le plus prometteur est l'E3-ubiquitine ligase et co-chaperonne CHIP, qui interagit avec Vif, A3G, régule la quantité de virus produits et leur infectiosité au cours du cycle infectieux, et de manière inattendue, apparait comme un régulateur négatif important d'APOBEC3G, y compris hors infection virale.

Les méthodologies et les résultats préliminaires sont présentés ci-après sous forme d'article. Avant de soumettre cet article à publication, certaines expériences devront être répétées et approfondies pour élucider le rôle précis des candidats sélectionnés.

CHIP/STUB1: a new regulator of the APOBEC3G antiviral factor expression involved in HIV-1 replication

Cédric Verriez[1#], Tanja Seissler[1#], Amélie Streicher[1], Anastasiya Petrova[1], Lauriane Kuhn[2], Johana Chicher[2], Philippe Hammann[2], Béatrice Chane-Woon-Ming[1], Roland Marquet[1], Sarah Gallois-Montbrun[3] & Jean-Christophe Paillart[1]*

[1]Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, Université de Strasbourg, 2 Allée Konrad Roentgen, F-67000 Strasbourg, France

[2]Plateforme protéomique Strasbourg Esplanade, CNRS, Université de Strasbourg, 2 Allée Konrad Roentgen, F-67000, France

[3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Institut Cochin -27 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014, Paris, France

*To whom correspondence should be addressed:

Tel: (+33) (0)3 88 41 70 35; Fax: (+33) (0)3 88 60 22 18

E-mail: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr

[#]These authors contributed equally to this work

Abstract

APOBEC3G (A3G) is one of the main restriction factors of HIV infection, which significantly reduces virions infectivity. HIV counteracts this restriction factor using different mechanisms. Vif-mediated ubiquitination and degradation of A3G has been well characterized over the years, whereas mechanisms aimed at reducing A3G transcription and translation of A3G mRNA are still poorly understood. While trying to gain better understanding of the translational inhibition by studying A3G mRNA-associated protein thanks to mass-spectrometry coupled pull-down analysis, we identified several proteins whose association with the A3G mRNA seems to be dependent on the presence of HIV-1 Vif and/or A3G proteins. Amongst these proteins, we showed that the co-chaperone E3-ubquitin ligase CHIP/STUB1 interacts with both Vif and A3G in an RNA-independent manner. Chaperone-interacting key residue K30 of CHIP appeared essential for interaction with either protein, suggesting the involvement of Hsp70/90 in CHIP-A3G and CHIP-Vif interactions. We further studied CHIP in respect to A3G expression and HIV replication. While CHIP did not regulate Vif expression, we observed that its overexpression strongly inhibited A3G in a proteasome-independent manner. This observation was corroborated by the fact that CHIP knockdown resulted in a 2-fold increase of A3G expression. We observed similar CHIP-mediated regulation of A3G during viral infection. Surprisingly, despite increased A3G-packaged levels upon CHIP silencing, virion infectivity was not reduced, suggesting an intricate role of the co-chaperone in HIV replication cycle.

Introduction

Restriction factors are IFN-responsive genes found amongst the first effectors of the intrinsic immune response against viral infections. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G or A3G) is one of the most studied restriction factors, with an inhibitory effect on different retroviruses, retrotransposons and other viruses replication. A3G restricts HIV-1 by C to U deamination during the reverse transcription of the viral genome, leading to hypermutation of the provirus, production of non-functional viral proteins as well as defects of the viral genomic RNA and ultimately arrest of the viral life cycle (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Sheehy et al., 2002; Zhang et al., 2003). Restriction factors are often counteracted by viral proteins to allow viral replication. HIV-1 expresses Vif, which counteracts A3G (Ikeda et al., 2023). Vif-induced ubiquitination and subsequent degradation of A3G by the proteasome has been extensively studied. Vif interacts with A3G and recruits an E3-ubiquitin ligase complex composed of Cul5, EloB, EloC, Rbx2 and CBF-β (Jäger et al., 2011; Mehle et al., 2004, 2006; Yu et al., 2003a). Recently, structural studies showed that an RNA molecule mediated A3G-Vif binding in this complex (Ito et al., 2023; Kouno et al., 2023; Li et al., 2023). Vif thereby replaces the substrate recognition component of the E3 ubiquitin ligase, leading to ubiquitination of A3G. Ubiquitinated A3G is then recognized and degraded by the 26S proteasome (Sheehy et al., 2003; Yu et al., 2003b). Indeed, the hijacking of the cellular ubiquitin-proteasome system is a common feature used by viruses and especially HIV to mediate counter-defense to cellular restriction mechanisms (Bergamaschi et al., 2009; Colomer-Lluch et al., 2020; Laguette et al., 2011; Seissler et al., 2017). It has been shown that recruitment of the transcriptional cofactor CBF-β in the E3-ubiquitin ligase complex by Vif sequesters it away from the RUNX transcription factor and leads to a decrease in A3G transcription (Anderson and Harris, 2015; Kim et al., 2013). Finally, A3G can be counteracted by Vif at its translational level (Guerrero et al., 2016; Libre et al., 2022; Mercenne et al., 2010; Stopak et al., 2003). It has been shown that Vif binds A3G mRNA (Mercenne et al., 2010), and the 5'-UTR has been shown to be necessary and sufficient to allow A3G translational inhibition by Vif (Guerrero et al., 2016). Interestingly, we recently identified a small uORF within the 5'-UTR of A3G mRNA and Vif-mediated translational inhibition has been shown to be dependent on this uORF. The uORF is well conserved in the human population (Libre et al., 2022). uORFs are present in almost 50 % of cellular mRNAs and constitute a negative regulatory element for the associated main ORFs (mORFs) which could be translated by leaky scanning, re-initiation after translation of the uORF or through recruitment of the ribosome by an internal ribosome entry site (IRES) (Barbosa et al., 2013; Calvo et al., 2009). In the case of A3G, translation occurs through a mix of leaky scanning and re-initiation (Libre et al., 2022). uORFs allow regulation of mORF expression in response to different stimuli (stress or starvation) and can notably be regulated by different RNA-binding proteins (RBPs) (Beckmann et al., 2005; Gebauer et al.,

2003; Lomakin et al., 2017; Medenbach et al., 2011; Nishimura et al., 2005; Park et al., 2001; Schleich et al., 2014).

The mechanism of Vif-mediated translation inhibition of A3G is not completely understood. As Vif binds to the 5'-UTR of A3G mRNA, it is possible that Vif binds this region and interacts with different RBPs and modulate their binding to A3G mRNA to regulate A3G translation. For instance, A3G translational inhibition by Vif could be explained by the drop-off of RBPs that stimulate translation or by the recruitment of translation inhibitory RBPs. In order to study the effect of Vif on A3G mRNA-associated protein complexes, we performed a pull-down of proteins from HEK-293T cell lysates on biotinylated A3G mRNA bound to magnetic beads, followed by their identification by mass spectrometry. We uncovered several A3G mRNA-associated proteins that appeared to be regulated positively or negatively by Vif and/or A3G protein. Amongst them, we identified CHIP, an E3 ubiquitin ligase and co-chaperone protein, and showed that CHIP interacts with Vif and A3G in an RNA-independent manner. Interestingly, CHIP reduces A3G expression by a proteasome-independent mechanism, probably at a transcriptional step. As expected, CHIP-knockdown increases the packaging of A3G into viral particles. In parallel, Vif-expressing VLP showed an increase infectivity in CHIP-knockdown conditions, independently of A3G expression. Overall, our results show that the co-chaperone E3-ligase CHIP is a new important regulator of A3G expression and that it plays an intricate role in HIV-1 replication.

Material and methods

Plasmids and viral DNA constructs. The pCMV-A3G-WT plasmid contains the full-length A3G cDNA (both UTRs and the CDS) under the control of the CMV. promoter while the pCMV-A3G-ΔUTR contains only the CDS of A3G without UTRs (Guerrero et al., 2016; Muckenfuss et al., 2007). pCMV-A3G-ΔUTR was used in RNA-pull down experiments to express protein while using an RNA less prone to compete for captured protein of interest, as it its devoid of UTR regions. pCMV-A3G-WT was used in other experiments where A3G protein is expressed. pCMV-T7-A3G-WT and pCMV-T7-A3G-ΔuORF contain the full-length A3G cDNA under the control of the phage T7 promoter for *in vitro* transcription, the ΔuORF construct is deleted for the uORF (region 177-248 in the 5'UTR). Vif was expressed from plasmid pcDNA-hVif encoding codon-optimized NL4.3 Vif (Nguyen et al., 2004) which is available through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (catalog #10077). The pcDNA-hVif-FLAG construct contains a FLAG-tag at the C-terminus of hVif. The infectious molecular clone pNL4-3ΔEnv has been previously described (Adachi et al., 1986) and is also available through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (catalog #114). The vif-defective pNL4-3 variant, pNL4-3Δvif, carrying a 178-bp out-of-frame deletion in the vif gene, has been previously reported (Karczewski and Strebel,

1996). pNL4.3Δenv and pNL4.3ΔenvΔvif were generously provided by Dr Klaus Strebel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A pHCMV-G, expressing VSV-G protein was used to pseudotype VLPs (Naldini et al., 1996) and was a kind gift of Dr Matteo Negroni (IBMC, CNRS, Strasbourg, France). pcDNA3.1-CHIP-WT, and mutants ΔTPR, ΔCC, ΔU-Box, K30A, and H260Q were described before (Hwang et al., 2005; Jiang et al., 2001; Xu et al., 2002). Residues 32-145 are deleted in CHIP ΔTPR, 142-197 in ΔCC and 149-303 in ΔU-Box. All CHIP proteins are C-terminally 6xHis-Myc-tagged. CHIP expression vectors were generously provided by Dr Jonathan C. Schisler (McAllister Heart Institute, Chapel Hill, NC, USA). All constructs were confirmed by DNA sequencing (Eurofins Genomics, France). An empty pcDNA3.1 vector was used as a negative control (pcDNA-Ø) and to complete transfection mix at equivalent quantities.

Cell culture, transfection and infection. HEK-293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Of note, HEK-293T cells don't express A3G. TZM-bl cells are a HeLa cell clone genetically engineered to express CD4, CXCR4, and CCR5 and containing the Tat-responsive reporter gene for firefly luciferase under the control of the HIV-1 LTR (Rosen et al., 1986). HEK-293T and TZM-bl cells were grown at 37°C and 5% CO_2 atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, EUROBIO) with antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies)) and passaged upon confluence. Cells were either seeded at 70% confluence in a 6-well plate (7.10^5 cells/well) or in 10-cm dishes (4.10^6 cells/dish) depending on experiments and transfected 24 h after splitting with constructs of interest. Cell lysates for co-immunoprecipitation experiments were produced from 10-cm dishes, other experiments were performed in 6-well plates. For 6-well plates transfection, A3G plasmids were used at 0.1 µg per well, other plasmids (Vif, NL4.3, CHIP) were used at 1 µg per well unless indicated otherwise. For 10-cm dishes transfection, A3G plasmids were used at 0.4 µg per dish, other plasmids (Vif, CHIP and its mutants) were used at 4 µg per well unless indicated otherwise. Unless stated otherwise plasmid transfection of HEK-293T cells was carried out using the X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) as recommended by the manufacturer, with 3 µl of reagent per µg of DNA. When needed, cells were also exposed to the chemical proteasome inhibitor ALLN (25 µM) for 14 h. ALLN (Z-Leu- Leu-Leu-aL) was purchased from Sigma-Aldrich (#208719).

***In vitro* transcription of biotinylated, capped, polyadenylated A3G mRNA.** For transcription of a capped, poly-adenylated and biotinylated transcript, 1 µg of pCMV-T7-A3G-WT or pCMV-T7-A3G-ΔuORF linearized by 10 U of XbaI for 2 h at 37°C was used with the HiScribe T7 ARCA mRNA kit with

tailing (NEB) according to manufacturer's instructions. The transcription mix was supplemented with 1.25 mM Bio-16-UTP (ThermoFisher) and incubated at 37°C overnight. The plasmid was digested with 4 U of DNase I (NEB) at 37°C for 15 min followed by a tailing reaction at 37°C for 30 min. The transcripts were precipitated by 2.5 M LiCl (NEB) according to manufacturer's instructions.

Preparation of cellular lysates using nitrogen cavitation. For pull-down experiments, $5.8.10^6$ HEK-293T cells were seeded into 15-cm dishes in a final volume of 20 ml DMEM medium. Cells were transfected with expression vectors 16-18 h after their seeding with 1 µg of pCMV-A3G-ΔUTR and 8 µg of pcDNA-hVif per dish. The total amount of plasmid was adjusted to 9 µg using empty pcDNA. 24 h after transfection, cells were detached with cold PBS (Life Technologies) using cell scrapers and centrifuged at 300 × g for 5 min. Cell pellet was weighed and resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES, 100 mM KAc, 2 mM MgAc, 1 mM DTT, 100 U/ml RNasin; 1 x Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoScientific)) at 2.5 ml/g of cells. Cells were then introduced into a nitrogen cell bomb (Parr) and incubated at 500 psi for 30 min at 4°C. The resulting cell lysate was spun down twice at 1,000 x g for 5 min at 4°C and the supernatant was recovered and stored at -80°C.

Pull-down of cellular proteins on biotinylated A3G mRNA. SpeedBeads Magnetic streptavidin coated particles (GE Healthcare) were washed with washing buffer (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.01% NP40) and 40 µg of beads were incubated with 1 pmol of biotinylated A3G mRNA in washing buffer for 1 h at room temperature under rotation. Beads were then washed once with washing buffer then resuspended in cellular lysate previously harvested by nitrogen cavitation. Cell lysates expressed either Vif and/or A3G (from a ΔUTR construct). Per condition, an equivalent of 1.5 15-cm dish (~0.1 g of dry cell pellet) resuspended in lysis buffer (v/v) was used was incubated for 3 h at 4°C under rotation. Beads were washed twice with washing buffer, once with washing buffer without detergent (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) and transferred into a new tube. Beads were then resuspended in 15 µl H_20 MilliQ (Millipore). Two µl were used for RT-qPCR and the rest was analyzed by mass spectrometry.

A3G mRNA binding monitored by RT-qPCR. The beads volume was adjusted to 16 µl with H_2O. Four µl of iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad) were added and the mixture was incubated at 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. The RT reaction was mixed with 0.2 µM of A3G sense (5'-TTC TCC AGA ATC AGG AAA AC-3') and antisense (5'-GTG TCT GTG ATC AGC TGG AG-3') primers, 1x Taq buffer, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 U of Taq polymerase (homemade) and 1.25 µl of EvaGreen Dye (Biotium). The mixture was incubated at 95°C for 3 min, then 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 61°C and 1 min at 72°C were performed and the amount of DNA was monitored at each

cycle using Evagreen fluorescence measurement. In parallel, a titration curve was generated using a range of 10^9 to 10^3 copies of the pCMV-A3G.

Mass Spectrometry. The beads suspension was mixed with 50 µl of elution buffer (Miltenyi) and incubated at 95°C for 10 min. The beads were then discarded. Each sample was precipitated with 0.1 M ammonium acetate in 100% methanol, and proteins were resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate. After a reduction-alkylation step (dithiothreitol 5 mM – iodoacetamide 10 mM), proteins were digested overnight with 1:25 (w/w) sequencing-grade porcine trypsin (Promega). One fifth of the peptide mixture was analyzed by nanoLC-MS/MS in an Easy-nanoLC-1000 system coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (ThermoFisher). Each sample was separated with an analytical C18 column (75 µm ID × 25 cm nanoViper, 3 µm Acclaim PepMap; ThermoFisher) with a 160 min 300 nL/min gradient of acetonitrile. The obtained data was searched against the Swissprot database with human taxonomy using the Mascot algorithm (version 2.5, Matrix Science). Mascot files were then imported into Proline v1.4 package (http://proline.profiproteomics.fr/) for post-processing. Proteins were validated with 1% FDR and the total number of MS/MS fragmentation spectra (Spectral Count) was used to quantify each protein in the different samples.

Bioinformatic analyses. Mass spectrometry data obtained for each sample, including the proteins identified and their associated spectral counts (SpC), were stored in a local MongoDB database and several pairwise comparisons were then performed through a Shiny Application built upon the msmsEDA (Gregori et al., 2014) and msmsTests (Gregori et al., 2013) R/Bioconductor packages. The latter were respectively used to conduct exploratory data analyses of LC-MS/MS data by spectral counts and differential expression tests using a negative-binomial regression model. The p-values were adjusted with false discovery rate (FDR) control by the Benjamini-Hochberg method and 3 parameters were used (adjusted p-value < 0.1 or 0.05, a minimum of 2 SpC in the most abundant condition, and a minimum fold change of 2) to define differentially expressed proteins. Proteins significantly enriched ($p < 0.1$) in samples compared to the corresponding negative controls were analyzed using functional annotation clustering with medium classification stringency against the background of the total human proteome on the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; https://david.ncifcrf.gov) (Huang et al., 2008). The Venn diagram was generated using Venny 2.1 (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny) (Oliveros, 2007). String diagrams were generated using STRING 11.0 (https://string-db.org/) (Szklarczyk et al., 2019).

Protein extraction and concentration measurement. Proteins were extracted for immunoblotting and co-immunoprecipitation experiments. Cells were resuspended in RIPA 1x (1x PBS (KH_2PO_4 1.06 mM,

Na_2HPO_4 3 mM, NaCl 0.15 M), 1% NP40, 0.5% NaDoc, 0.05% SDS, 1x Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoScientific)) for 10 min at 4°C. Cells were centrifuged at 20,817 × g for 20 min at 4°C, then the supernatant was recovered. The protein concentration was determined by a Bradford assay using Bradford Assay Dye (BioRad) according to manufacturer's instructions to prepare samples at fixed quantities.

Co-immunoprecipitation. HEK-293T cells were seeded in 10-cm dishes at 4.10^6 cells per dish. 24 h after seeding, cells were transfected with either 0.4 µg of pCMV-A3G-WT or pCDNA3.1-A3G-HA, 4 µg of pcDNA-hVif-FLAG, 4 µg of CHIP constructs, or various mixes of these plasmids. Plasmid amount was completed to 8.4 µg with pcDNA-Ø if needed. 10 h after transfection, cells were treated with 25 µM ALLN. 24 h after transfection, cells were washed once with PBS (Life Technologies), then 700 µl of RIPA 1x was used to lyse cells as indicated above. Per capture, 1.5 mg of protein G Dynabeads (Invitrogen) were used in 1 volume. They were washed twice with 4 volumes of PBST (PBS + 0.002 % Tween™ 20) buffer. 5 µg of capture antibody (M2 @FLAG antibody, or @myc antibody, see table 2) per capture were mixed with 4 volumes of PBST and washed beads. Tubes were incubated for 1 h at room temperature under rotation. Beads were then washed twice with 4 volumes. Beads were resuspended in 900 ul of RIPA 1x containing 1.5 mg of proteins and incubated at 4°C overnight under rotation. Beads were washed 4 times with 500 µl of TBST, then beads were transferred into a new tube to discard protein nonspecifically bound to the tube, and washing buffer was discarded. At this stage, when RNAse was used, 1 µl of RNase cocktail (Roche, #11119915001) was added and incubated at 37°C for 1 h. Beads were then transferred into a new tube, 3 additional washes were performed and beads were one more time transferred into a new tube. Bound proteins were eluted by heat denaturation, mixed with NuPAGE LDS Sample Buffer and Reducing Agent (Invitrogen) at 70°C for 10 min. The supernatant was recovered and analyzed by western blotting.

RNA silencing. On day 1, HEK-293T cells were seeded into 6-well plates at 4.10^5 cells per well. On day 2, DMEM was replaced with 1 ml of antibiotics-free DMEM (DMEM + FBS) at least 30 min before siRNA transfection. Cells were treated with a final concentration of 10 nM DsiRNAs with a TriFECTa RNAi Kit (Integrated DNA Technologies). The siRNA targeting CHIP has the following sequence: 5'-AGGUUAUUGACGCAUUCAUCUCUGA-3'. siRNAs were supplied as duplexes with a 2 nucleotides overhang at the 3' extremity of the complementary strand. TriFECTa RNAi Kit also contains a negative control siRNA, and two positive controls, an HPRT1-targeting siRNA to validate silencing efficiency, and a fluorescent dye-coupled siRNA to monitor transfection efficiency. Transfection efficacy was confirmed

for each experiment by observing cells at +24 h and +48 h post-transfection with a fluorescence microscope. siRNAs were transfected with Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent, as recommended by manufacturer instructions: they were first diluted in a final volume of 250 µl OptiMEM (Life Technologies), then mixed with 5 µl lipofectamine (Life Technologies) pre-diluted in a volume of 250 µl OptiMEM. This mix was incubated for 15 min at room temperature, then added to the cells. Cell morphology and survival were monitored by optical microscopy throughout the experiment. After 48 h (day 4), cells were transfected with 0.1 µg of pCMV-A3G-WT, 0.5 µg of pHCMV-G and/or 1 µg of pNL4.3ΔEnv or pNL4.3ΔEnvΔVif. The total amount of plasmid was adjusted to 2.1 µg using the pcDNA-Ø. On day 5, cells were washed with cold PBS and detached from the culture vessel with a rubber scrapper. Each well was divided in two to analyze RNA by RT-qPCR and proteins by western blot.

RNA extraction and real-time qPCR. Total RNA was isolated from HEK-293T cells using RNAzol®RT (Euromedex, Souffelweyersheim, France) following manufacturer instructions. RNA quantity and purity were measured before and after DNAse treatment with NanoDrop spectrophotometer. Extracted RNA was treated with 1 µl of RNase-free DNase per 50 µl of sample (TURBO DNA-free kit, Invitrogen, Waltham, MA, USA) as recommended by the manufacturer. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) as recommended by the manufacturer. Subsequent qPCR analysis was performed on 2% or 10% of the cDNA (RT or NoRT reactions) using the Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher) and was monitored on a CFX Real Time System (Bio-Rad). Gene-specific primers are detailed (**Table 1**). In parallel, titration curves were generated using known copy numbers of pCMV-A3G, pcDNA3.1-CHIP or pNL4.3ΔEnv. Target mRNA levels were normalized to those of actin mRNA and relative quantifications to the controls were determined using the standard curve-based method, or the Pfaffl method (Pfaffl, 2001), where qPCR efficiencies are taken into account in the ΔΔCt calculation.

Production of viral particles. Replication-deficient HIV-1 viral particles (or VLPs) were produced in HEK-293T cells cultured in 6-well plates by transfecting 4 or 7.10^5 cells with 1 µg of pNL4.3ΔEnv or pNL4.3ΔEnvΔVif constructs, along with 0.5 µg of VSV-G coding plasmid (pHCMV-G) if VLPs are used for infectivity assays. For assays where CHIP was co-transfected, VLPs were collected 48 h after transfection; for silencing assays, VLPs were collected 24 h after transfection. To collect VLPs, supernatant from virus-producing cells was centrifuged at 3,200 × g at 4°C for 5 min to pellet cell debris, then virions are filtered through 0.45-µm filters. The amount of p24 (CA) was quantified by ELISA

(Fujirebo Europe, Belgium). A 1.5 ml volume of viral supernatant was also centrifuged through 20% sucrose for at least 2 h at 20,000 × g and at 4°C to concentrate VLPs, and the virion pellet was lysed in RIPA 1X.

Name	Sequence (5'-3')	Target
Vif Fwd	GCGGCGACTGGGACAGCAGAG	HIV Vif
Vif Rev	GGCACTACTTTTATGTCACT	HIV Vif
US Fwd	TTCTTCAGAGCAGACCAGAGC	HIV US
Us Rev	GCTGCCAAAGAGTGATCTGA	HIV US
A3G Fwd	CGAAGTGAAAACAAAGGGTCC	A3G
A3G Rev	CTCATACTCCTGGTCACGATG	A3G
CHIP Fwd	CAATCTGCAGCGAGCTTACA	CHIP
CHIP Rev	CTGTTCCAGCGCTTCTTCTT	CHIP
HPRT1 Fwd	GCTGACCTGCTGGATTACAT	HPRT1
HPRT1 Rev	CCCTGTTGACTGGTCATTACA	HPRT1
Actin Fwd	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	Actin
Actin Rev	ACGACTGTGTTGGCGTACAG	Actin

Table 1: List of primers used in qPCR. Primer names, targets and sequences are indicated. HIV and actin targeting primers have been described previously in (Nguyen Quang et al., 2020) and (Guerrero et al., 2016), respectively. Other primers were designed through IDT tools. Amplification efficacy was verified on plasmids standard ranges so that an E of at least 85% was reached.

Luciferase infection assay. Cell-free released virions were used to infect TZM-bl cells after normalization of viral input at 200 ng of p24 content (as measured by ELISA). Technical triplicates were performed for each sample. VLPs were added to 10^4 cells, plated in 96-well plates in a final volume 200 µl of culture medium and incubated at 37°C. After 48 h, virus replication was detected by measuring Luc reporter gene expression: cells in 50 µl of supernatant are mixed with 50 µl of Bright Glo reagent (Promega). After 2 min at room temperature, 80 µl of mixture (containing lysed cells and luciferin) are transferred to 96-well white solid plates for measurements of luminescence at 560 nm (relative light units [RLU]) using a GloMax luminometer (Promega).

Western blotting. For siRNA+pNL4.3 experiments, 15 µg of total protein were used or 20 µl of concentrated VLPs. For other experiments (IP input, CHIP gradient experiments) 30-50 µg of total protein extract were used. Proteins were denatured using NuPAGE LDS Sample Buffer and Reducing Agent (Invitrogen) at 70°C for 10 min. For IP samples, total proteins were used. Samples were migrated on a 4-15% Criterion TGX Precast Midi Protein Gel (BioRad) in 1x TGS (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 1% SDS). Proteins were then transferred onto a 22 µm PVDF membrane using a Midi PVDF Transfer Pack (BioRad) at 25 V and 2.5 A for 10 min in a Trans-Blot Turbo™ Transfer System (BioRad). The membrane was then incubated in WB blocking solution (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton x100, 5% low fat milk) for 1 h. Primary and secondary antibodies were added as described (**Table 2**). After the primary antibody, the membrane was washed twice with TNT (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton x100). After the secondary antibody, the membrane was washed twice with TNT and once with TN (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl). Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using

the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Chemiluminescent signal was revealed using a ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad). For detection of multiple proteins on the same membrane, membranes were stripped for 25 min at room temperature under rotation with Antibody Stripping Buffer (Geba), then washed thoroughly 5 min with demineralized water. Bands were quantified using ImageJ. Student's t-test was used to determine statistical significance.

Target	Species and type	Reference	Company	Dilution	Incubation
A3G	Rabbit, Polyclonal	9968	NIH AIDS Reagent Program	1:10,000	ON
Actin	Mouse, Monoclonal	A5316	Sigma-Aldrich	1:1,000	ON
ARG1	Rabbit, Polyclonal	E-AB-30551	Elabscience	1:1,000	ON
CALL5	Rabbit, Polyclonal	GTX119159	GeneTex	1:2,000	ON
CHIP/STUB1	Rabbit, Polyclonal	GTX122827	GeneTex	1:10,000	ON
CLAP2	Rabbit, Polyclonal	A302-155A-T	Bethyl	1:1,000	ON
DSG1	Rabbit, Polyclonal	E-AB-31242	Elabscience	1:500	ON
FLAG	Mouse, Monoclonal	F3165	Sigma-Aldrich	5 µg/IP	ON
HA	Mouse, Monoclonal	sc-7392	Santa Cruz Biotechnology	5 µg/IP	ON
HPRT	Rabbit, Polyclonal	A305-305A	Bethyl Laboratories	1:2,000	ON
LRC40	Mouse, Monoclonal	sc-515101	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000	ON
Myc	Mouse, Monoclonal	sc-40	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000 or 5 µg/IP	ON
MYPT1	Rabbit, Polyclonal	E-AB-32148	Elabscience	1:2,000	ON
p24	Mouse, Monoclonal	3537	NIH AIDS Reagent Program	1:2,000	ON
UPF1/RENT1	Rabbit, Polyclonal	GTX112303	GeneTex	1:2,000	ON
UPF1/RENT1	Mouse, Monoclonal	sc-393594	Santa Cruz Biotechnology	1:500	ON
Vif	Mouse, Monoclonal	319	NIH AIDS Reagent Program	1:10,000	ON
Rabbit IgG	Goat , HRP-conjugate	1706515	BioRad	1:10,000	1-2 h
Mouse IgG	Goat , HRP-conjugate	1706516	BioRad	1:10,000	1-2 h

Table 2: List of antibodies. Antibody names, references and suppliers are indicated. Secondary antibodies are conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Primary antibodies are diluted in WB blocking solution and secondary antibodies in TNT at the indicated dilutions and time at 4°C. Note: p24 is also used to label Pr55Gag. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Anti-Human APOBEC3G Polyclonal from Dr Warner C. Greene (Stopak et al., 2003); HIV-1 Vif Monoclonal Antibody (#319) from Dr Michael H. Malim (Simon et al., 1997, 1995).

Results

Characterization of the A3G mRNA interactome. Cellular proteins from HEK-293T cells have been pulled down on an *in-vitro* transcribed, capped, poly-adenylated and biotinylated full-length A3G mRNA coupled to streptavidin-covered magnetic beads, followed by identification by mass spectrometry. Retention of A3G mRNA at the end of the pull-down procedure has been verified by RT-qPCR and showed a uniform retention in all samples (data not shown). Beads in the absence of A3G mRNA have been used as a negative control to evaluate non-specific binding of cellular proteins. Vif and A3G proteins have been expressed in cells in order to study their effect on protein complexes binding to A3G mRNA. This protocol allowed us to define the interactome of full-length A3G mRNA. 410 different proteins have been identified to significantly bind to A3G mRNA in the different conditions with a p-value under 5% and 447 with a p-value under 10% (**Figure 1A**). The approach used here to identify A3G mRNA-binding proteins was very stringent, and we thus decided to use a p-value of 10% as a threshold for further analyses in order to maximize our chances of identifying relevant cellular proteins. Between 200 and 241 proteins interact with A3G mRNA in any given condition (**Figure 1A**). 109 of these proteins (24.4% of the total interacting proteins) seem to constitute the core interactome of A3G mRNA, which is the same in all 4 conditions, and 158 (35.4%) of the proteins are common in at least 3 conditions (**Figure 1C**). The remaining 64.6% of proteins are modulated depending on the presence of Vif and A3G protein (**Figure 1C**). The cellular interactome of A3G mRNA seems to be composed of many proteins with known nucleic acid and RNA binding properties, as well as proteins containing domains that typically interact with RNAs, like zinc fingers (**Figure 1B**). Amongst these proteins, we have identified many splicing factors, RNA helicases as well as proteins involved in RNA degradation, 3'-end processing and mRNA translation. Surprisingly, in the presence of Vif, proteins involved in keratinization and cell-cell adhesion appeared amongst the most enriched clusters (**Figure 1B**). Amongst the 109 proteins that constitute the core interactome of A3G mRNA, we found proteins implicated in different post-transcriptional processes of gene regulation, including splicing factors, proteins involved in RNA degradation and transport, RNA helicases and translation initiation factors (**Figure 1D**). Effects of A3G alone on its own mRNA interactome are presented in **Figure S1**.

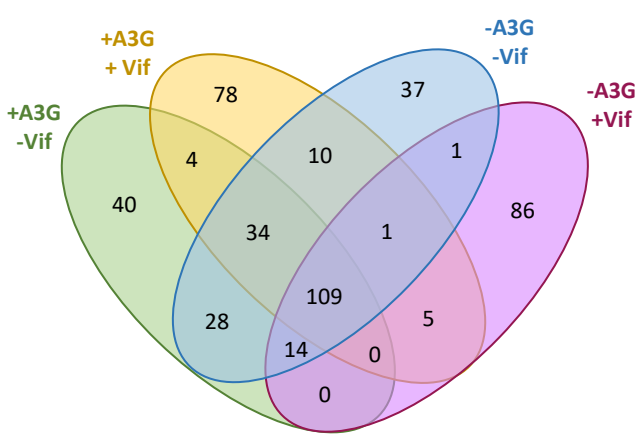
A

	+A3G -Vif		+A3G +Vif		-A3G -Vif		-A3G +Vif	
p <	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05
	229	215	241	218	234	217	216	200

B

+A3G -Vif		+A3G +Vif		-A3G -Vif		-A3G +Vif	
Cluster	Enrichment	Cluster	Enrichment	Cluster	Enrichment	Cluster	Enrichment
Nucleic Acid Binding	38.17	Nucleic Acid Binding	39.67	Nucleic Acid Binding	42.38	Nucleic Acid Binding	29.55
Splicing	28.51	Keratin	22.51	Splicing	31.21	Cell-Cell Adhesion	24.88
RNA degradation	18.28	Splicing	20.39	RNP	19.05	Splicing	13.67
RNP	14.67	RNP	16.36	RNA degradation	15.33	RNA degradation	9.82
Translation initiation	10.33	RNA degradation	11.71	Translation initiation	10.49	RNP	9.39
Double straded RNA binding	7.54	mRNA 3' processing	9.24	mRNA 3' processing	9.19	Translation initiation	6.04
RNA helicase	7.52	Translation initiation	9.18	Zinc finger	6.45	Actin	4.52

C



D

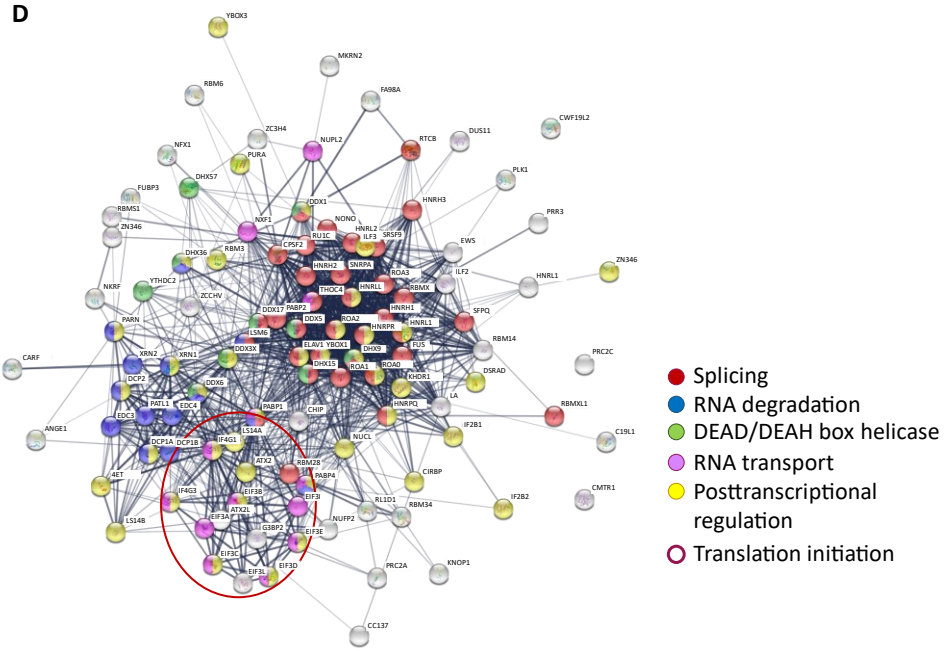


Figure 1: Proteins significantly associated with A3G mRNA in different conditions. Pull-down of proteins from HEK-293T cell lysates expressing Vif and/or A3G (A3G-ΔUTR construct) on an *in vitro*-transcribed, capped, poly-adenylated and biotinylated A3G mRNA. (**A**) Number of proteins significantly associated with A3G mRNA compared to the beads only control with a p-value < 0.1 or 0.05. (**B**) Functional annotation clustering of proteins associated with A3G mRNA in each condition at a p-value < 0.1 using the DAVID webservice. The 7 most enriched clusters are indicated for each condition. (**C**) Venn diagram of proteins identified with a p-value < 0.1 in the different conditions. (**D**) String diagram of the 109 proteins that represent the core interactome of A3G mRNA. The thickness of lines indicates the confidence of association of the linked proteins. Proteins involved in some of the most represented functional clusters are colored as indicated.

Effect of Vif on the A3G mRNA interactome. In the absence of A3G protein, Vif seems to recruit 63 proteins to A3G mRNA and exclude 6 proteins from A3G mRNA- associated protein complexes (**Figure 2A**; Supplementary table 2). Amongst the recruited proteins, a very large proportion is associated with the actin cytoskeleton and some proteins are implicated in tight junction formation or play a role in cell-cell communication (**Figure 2C**). Amongst the proteins downregulated by Vif, we mainly found proteins implicated in polyadenylation, as well as a couple of known RNA binding proteins (**Figure 2B**). In the presence of A3G protein, a total of 65 proteins are more represented on A3G mRNA in the presence of Vif, while 14 proteins are downregulated (**Figure 3A**; Supplementary table 3). Amongst the proteins upregulated in the presence of Vif, a very large proportion is associated with keratinization. Some of these proteins also play a role in amino acid biosynthesis and apoptosis. Some serpins have also been identified (**Figure 3C**). Interestingly, of the total 147 proteins that are regulated by Vif, 88 are phosphoproteins, which means that they can be regulated through phosphorylation.

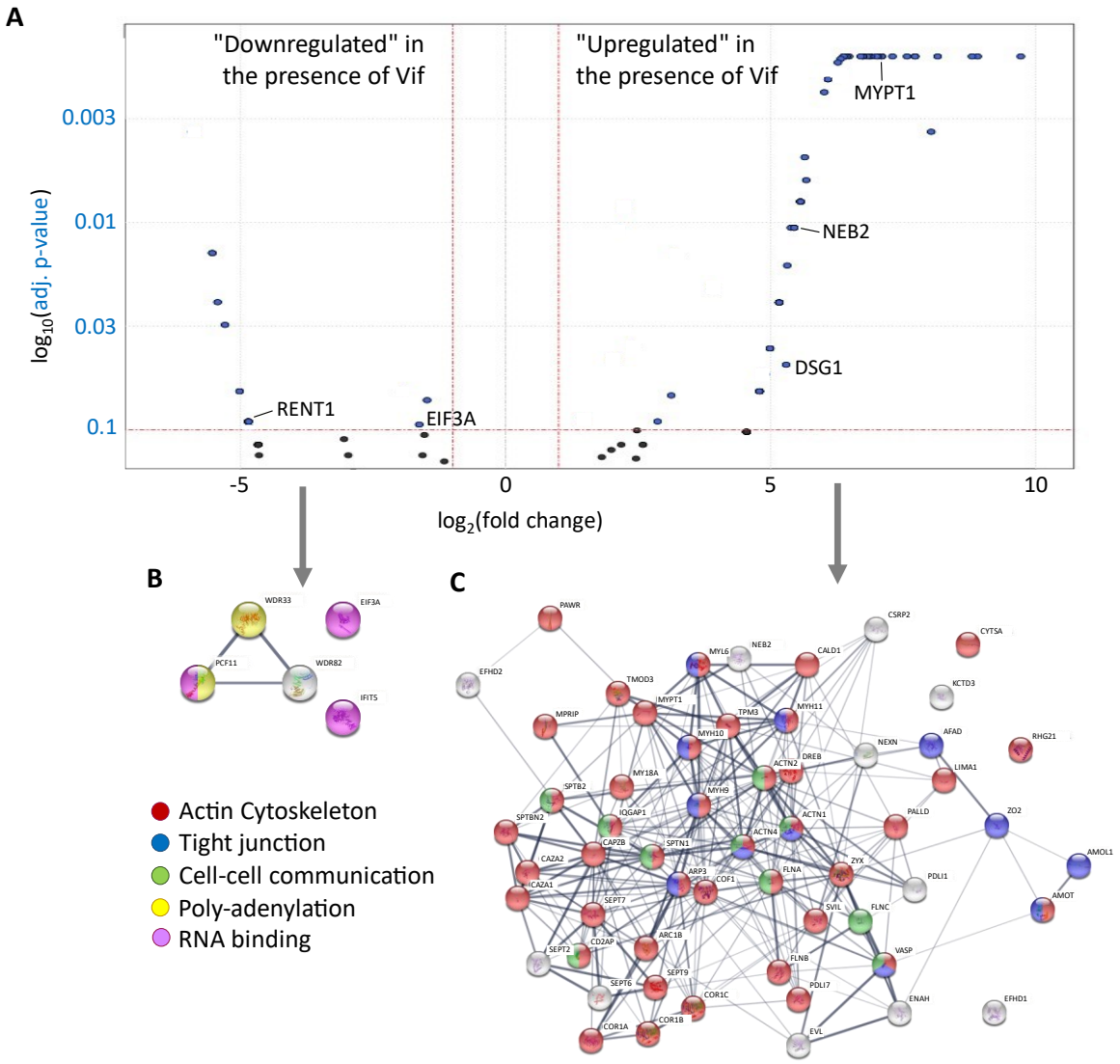


Figure 2: Effect of Vif on A3G mRNA-associated proteins in the absence of A3G protein. (**A**) Differential association of proteins with A3G mRNA in the presence and absence of Vif. Proteins with a positive log2(fold change) are upregulated in the presence of Vif, while a negative log2(fold change) indicates downregulation in

the presence of Vif. P-values are adjusted using the Bejamini-Hochberg method and the threshold of a p-value of 0.1 is indicated as a red line. Proteins (**B**) downregulated or (**C**) upregulated in the presence of Vif are represented as a string diagram. The thickness of lines indicates the confidence of association of the linked proteins. Proteins involved in some of the most represented functional clusters are colored as indicated.

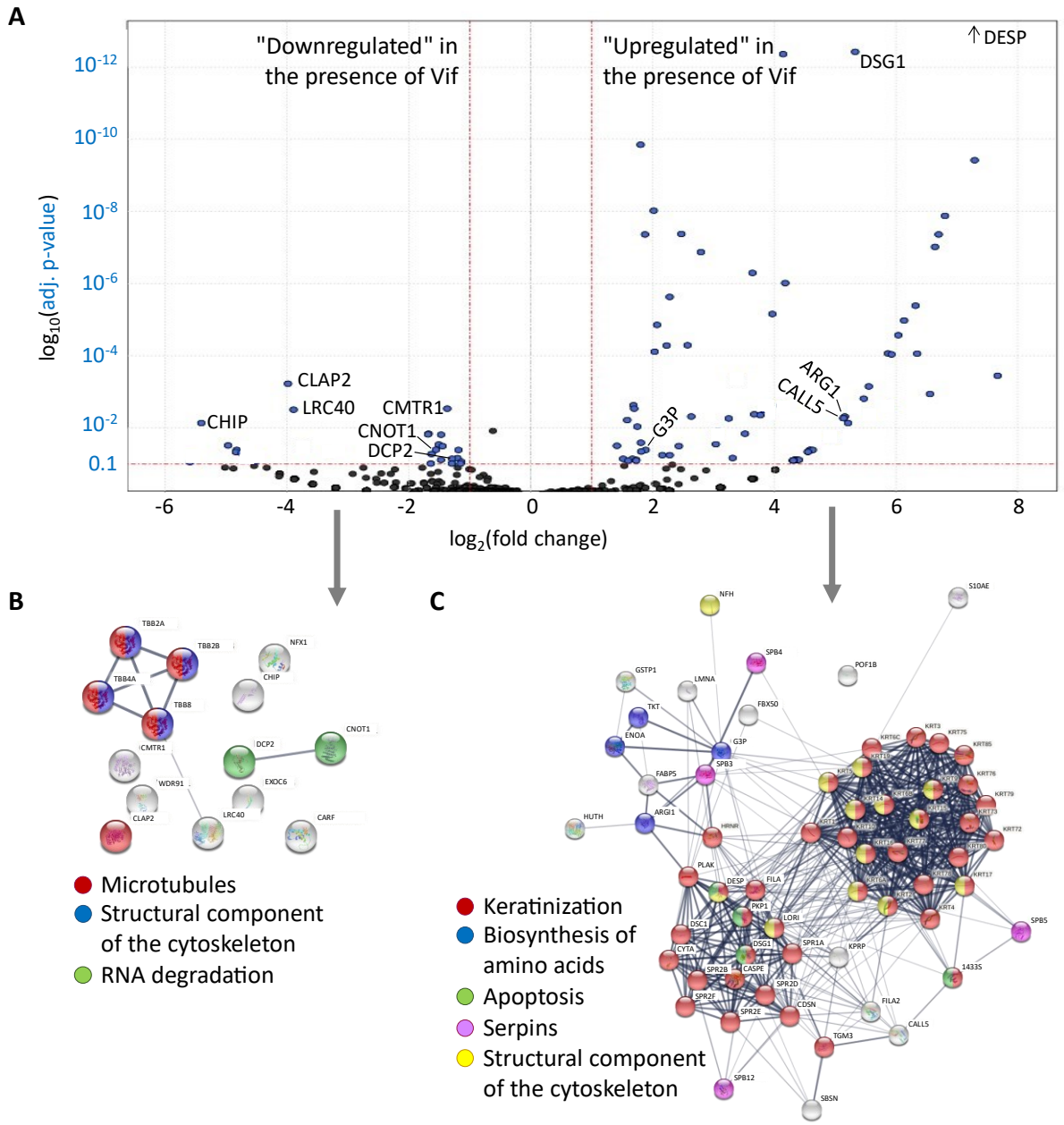


Figure 3: Effect of Vif on A3G mRNA-associated proteins in the presence of A3G protein. A3G protein was expressed in cells with a ΔUTR construct. (**A**) Differential association of proteins with A3G mRNA in the presence and absence of Vif. Proteins with a positive log2(fold change) are upregulated in the presence of Vif, while a negative log2(fold change) indicates downregulation in the presence of Vif. P-values are adjusted using the Bejamini-Hochberg method and the threshold of a p-value of 0.1 is indicated as a red line. Proteins (**B**) downregulated or (**C**) upregulated in the presence of Vif are represented as a string diagram. The thickness of lines indicates the confidence of association of the linked proteins. Proteins involved in some of the most represented functional clusters are colored as indicated.

The E3 ligase CHIP/STUB1 interacts with A3G and Vif independently of RNA. We recently uncovered a short upstream ORF (uORF) in A3G mRNA required by Vif to inhibit A3G translation (Libre et al., 2022), so we were interesting to studying uORF-associated proteins (**Figure S2**). In parallel, we focused on proteins identified with A3G WT mRNA. As a high-throughput method, our approach may give broader information: indeed, regulation of RNA-associated proteins upon experimental conditions could play important roles in other mechanisms. Hence, proteins identified as differentially associated to A3G mRNA upon Vif presence may well be true partners of Vif, and remain interesting to study, regardless of the precise mechanism in which they are involved.

Most of the proteins that have significantly changed in the presence and absence of Vif are involved in the organization of the cytoskeleton. The cytoskeleton is an important player in HIV infection and seems to be modulated during infection in order to favor viral replication (Karczewski and Strebel, 1996; Ospina Stella and Turville, 2018; Usmani et al., 2019). Therefore, it is possible that expression of Vif leads to a modulation of the cytoskeleton, which might explain the accumulation of this class of proteins in our samples. However, we concentrated our efforts on other identified proteins. We selected a total of 10 candidates, which are significantly up- or downregulated by Vif in one of the conditions and which might have an effect on A3G expression (**Table 3, Figure 2A, 3A**).

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function
ARGI1_HUMAN	P05089	Arginase-1	Converts L-arginine to urea and L-ornithine
CALL5_HUMAN	Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	Binds calcium
DSG1_HUMAN	Q02413	Desmoglein-1	component of desmosomes
G3P_HUMAN	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Role in glycolysis, component of the GAIT complex
CNOT1_HUMAN	A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	component of the CCR4-NOT complex which is one of the major cellular mRNA deadenylases
CLAP2_HUMAN	O75122	CLIP-associating protein 2	stabilization of microtubules
CHIP_HUMAN	Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	E3-ubiquitin ligase
DCP2_HUMAN	Q8IU60	m7GpppN-mRNA hydrolase	decapping of mRNAs for degradation
RENT1_HUMAN	Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1	Recruited to stalled ribosomes as part of the SURF complex to induce NMD
MYPT1_HUMAN	O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	Regulates PPP1C, binds to myosin, dephosphorylation of PLK1

Table 3: Selected candidates for a role in A3G regulation by Vif. The UniProtKB ID, Accession, full name and a summary of the function are indicated for each protein (Uniprot).

Interaction of selected proteins with Vif has first been studied by co-immunoprecipitation (co-IP) using a FLAG-tagged version of Vif. Amongst candidates, only the E3-Ubiquitine ligase CHIP and the RNA helicase UPF1 interacted with Vif (**Figure S3**). These interactions were detected after cross-linking of proteins in the cells, suggesting a weak or very dynamic interaction between Vif and these proteins,

contrary to the interaction with A3G, which can also be detected without cross-linking (**Figure S3,** left panels). Some candidates were further studied to confirm the interactions by co-IP but in overexpression context. From now, we will focus only on CHIP protein. The protein was 6x-His-Myc-tagged, allowing us to perform co-IP and reverse co-IP assays. Either type of co-IP allowed us to confirm Vif-CHIP interaction (**Figure 4**). We also studied CHIP interaction with Vif in presence of A3G protein.

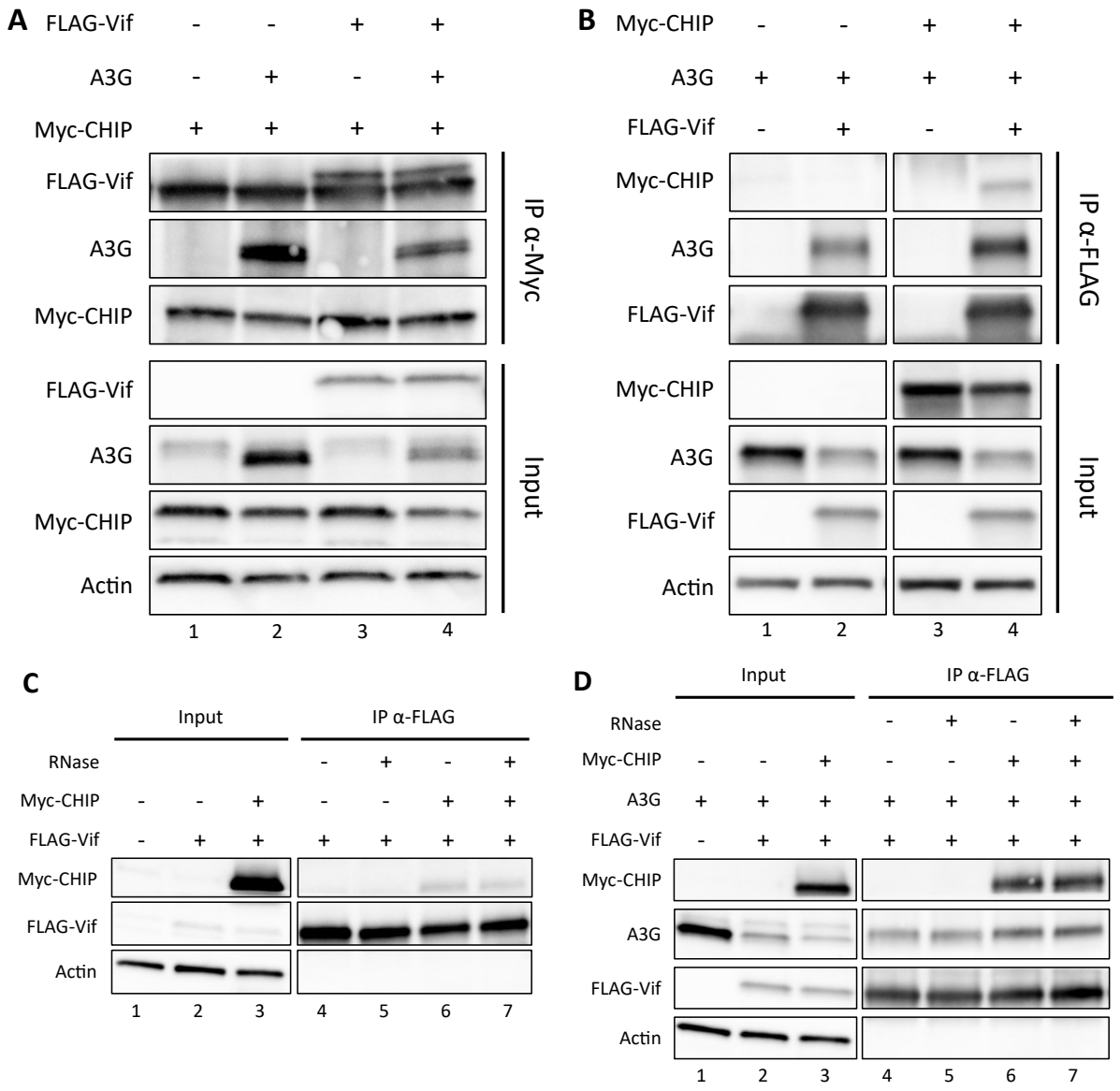


Figure 4: CHIP interacts with both Vif and A3G proteins in an RNA-independent manner. HEK-293T cells were transfected with indicated plasmids and CHIP-Vif interaction was investigated through immunoprecipitation (IP), either in absence (**A, C**) or presence (**A, B, D**) of A3G. Inputs as well as IP samples were analyzed by WB. Reciprocal IPs are shown, against CHIP-myc **(A**) or against FLAG-Vif (**B-D**). The strong signal under Vif on IP blot (**A**) corresponds to α-Myc-IgG light chains, also recognized by the secondary antibody used. For (**C, D**) beads after IP were treated with an RNase cocktail (RNAse activity was confirmed in parallel). No change of signal intensity is visible in IP blots upon RNase treatment. Representative images of at least three independent experiments are shown for (**A**, **B**). Co-IP + RNase experiments (**C, D**) were performed only once.

Interestingly, these interactions are conserved in the presence of A3G (**Figure 4A**, compare lanes 3-4). We also observed that A3G protein interacts with CHIP (**Figure 4A**, lane 2). As CHIP was identified through an RNA pull-down approach, we then analyzed whether the CHIP-Vif and CHIP-A3G interactions were promoted by RNA by treating co-IP samples with RNases. Surprisingly, none of them seemed to be RNA-dependent, as IP signal intensity remained similar whether RNAse was added or not (**Figure 4C, 4D**, compare lanes 6-7). Taken together, CHIP interacts with both A3G and Vif in an RNA-independent manner. Interestingly, interactions are conserved when A3G and Vif are co-expressed.

K30 residue is essential for CHIP interaction with A3G and Vif. CHIP is an E3-ubiquitine ligase protein of the U-box family, which play a key role in protein homeostasis. Indeed, CHIP is a co-chaperone that interacts with chaperone proteins such as Hsc70, Hsp70 or Hsp90, that serves as adaptors recruiting both CHIP and client protein so that CHIP induces the client degradation. Most CHIP targets are co-chaperone client proteins that are usually misfolded or aggregated. Then, CHIP-mediated ubiquitination targets proteins to proteasomal degradation or autophagic degradation pathways (Connell et al., 2001; Dai et al., 2003a; Jiang et al., 2001). To further characterize the CHIP-Vif and CHIP-A3G interactions, we used various CHIP mutants (**Figure 5A**): deletion of functional domains (CHIP ΔTPR, ΔCC, ΔU-Box) and punctual mutants (CHIP K30A, CHIP H260Q) (Hwang et al., 2005; Jiang et al., 2001; Xu et al., 2002). The TPR domain is involved in its interaction with chaperone partners such as Hsc70, Hsp70 or Hsp90, the coiled coil (CC) domain is a central charged domain involved in CHIP homodimerization, and finally the U-box domain is involved in the E2 ubiquitin-conjugating enzyme recruitment and ubiquitin conjugation to the substrate. Of note, CHIP homodimerization is also essential for its E3-ligase activity (Nikolay et al., 2004). The K30 and H260 residues are located in the TPR and U-box domain, respectively, and are both essential for chaperone (K30) and E2 enzyme (H260) binding. We performed co-IP experiments with these CHIP mutants and A3G and/or Vif (**Figure 5B-G**). All CHIP mutants are well expressed after HEK-293T transfection (**Figure S4**) and efficiently captured. For each deletion mutant, we observe a complete loss of Vif and A3G signals (**Figure 5C-E**) suggesting that all CHIP domains are important for CHIP interaction with A3G and/or Vif. However, it is still possible that the deletion of these domains impaired protein functions or folding. To circumvent these potential effects, we analyzed two punctual mutants in the TPR and U-box domains (**Figure 5F, 5G**). Although H260Q substitution behaves as WT CHIP regarding Vif or A3G binding (**Figure 5F**), the CHIP K30A mutant shows a severe decrease in Vif or A3G signal (**Figure 5G)**, equivalent to the one observed for deletion mutants. Taken together, these results indicate that K30 in the TPR domain appears to be key residue for CHIP to interact with Vif and/or A3G. On the contrary, H260 residue seems to be dispensable for this function.

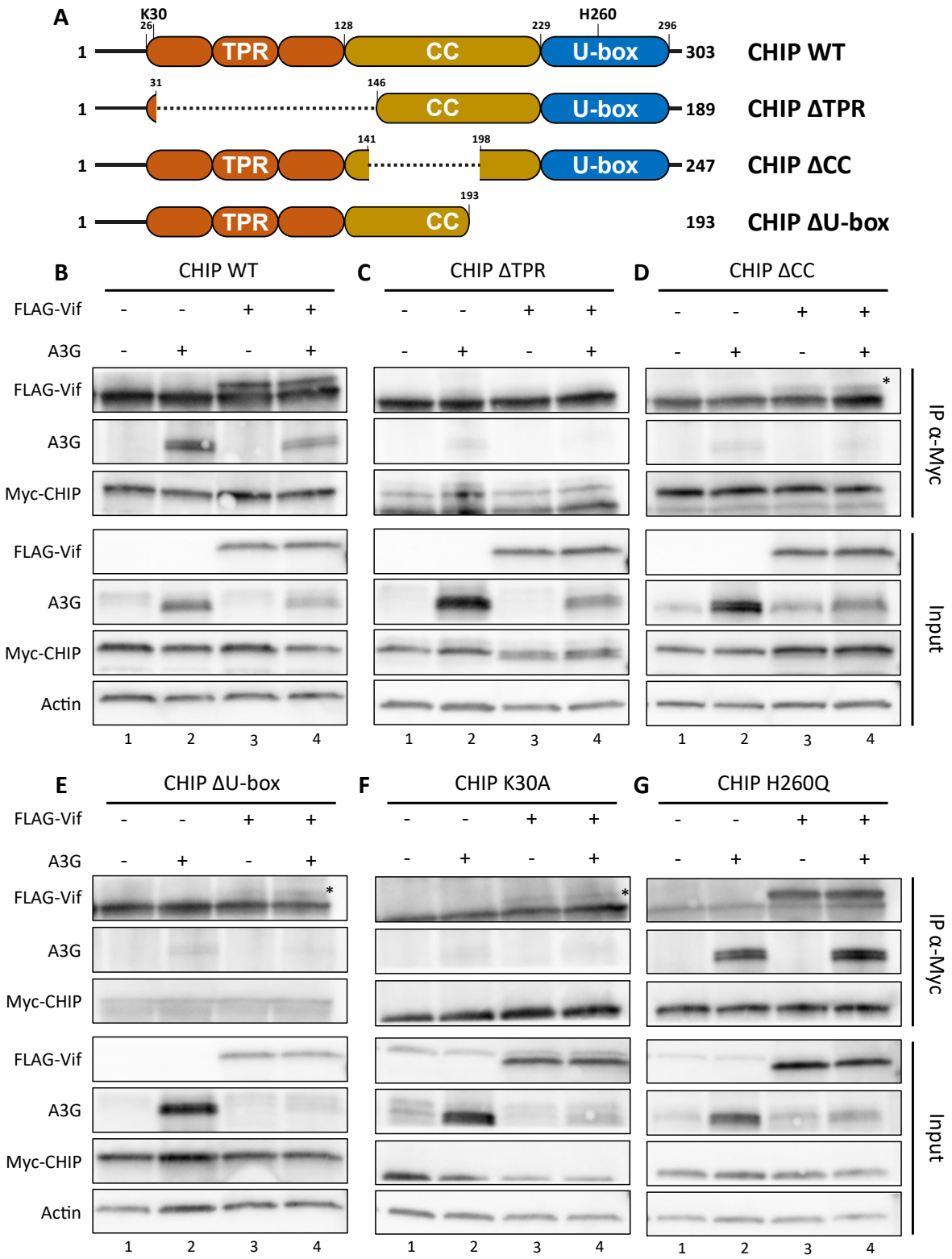


Figure 5: CHIP K30 residue is essential for its interaction with Vif and A3G. (**A**) Schematic representation of CHIP mutants. Their expression was analyzed by WB (**Figure S4**). (**B-G**) Co-IP against Myc-CHIP were performed as previously described using the various CHIP mutants. Faint Vif signals in IP are highlighted with a star (*). The strong signal under Vif on co-IP blots corresponds to α-Myc-IgG light chains, also recognized by the secondary antibody used. Note: WT image (panel A) are the same as in **Figure 4A**. Image setting (i.e. brightness and contrast) were unchanged and kept the same for every picture in this figure to facilitate comparison. We also verified that a non-tagged Vif was still able to interact with CHIP (data not shown). n=1.

CHIP inhibits A3G expression through a proteasome-independent manner but does not affect Vif. Next, we conducted experiments to characterize CHIP functions. As CHIP has been shown to be less present on A3G mRNA upon Vif presence (**Figure 3**), suggesting a potential positive effect of CHIP on A3G translation repressed by Vif, we overexpressed CHIP in absence of Vif and analyzed the expression level of A3G. Surprisingly, we did not observe a CHIP-mediated increase of A3G levels, but the contrary. Indeed, increasing quantities of CHIP clearly decreased A3G level (**Figure 6A, 6C**), suggesting that A3G is a target of CHIP. As CHIP induces the degradation of most of its target through the proteasome pathway, this experiment was repeated in presence of ALLN, a chemical proteasome inhibitor (**Figure 6B**). Interestingly, even in the presence of ALLN, we observed a strong decrease of A3G level, in the same extent as the one observed without ALLN, suggesting that CHIP induces A3G downregulation by a proteasome-independent pathway. We did not observe any significant decrease of Vif in the presence of increasing concentrations of CHIP (**Figure S5)**.

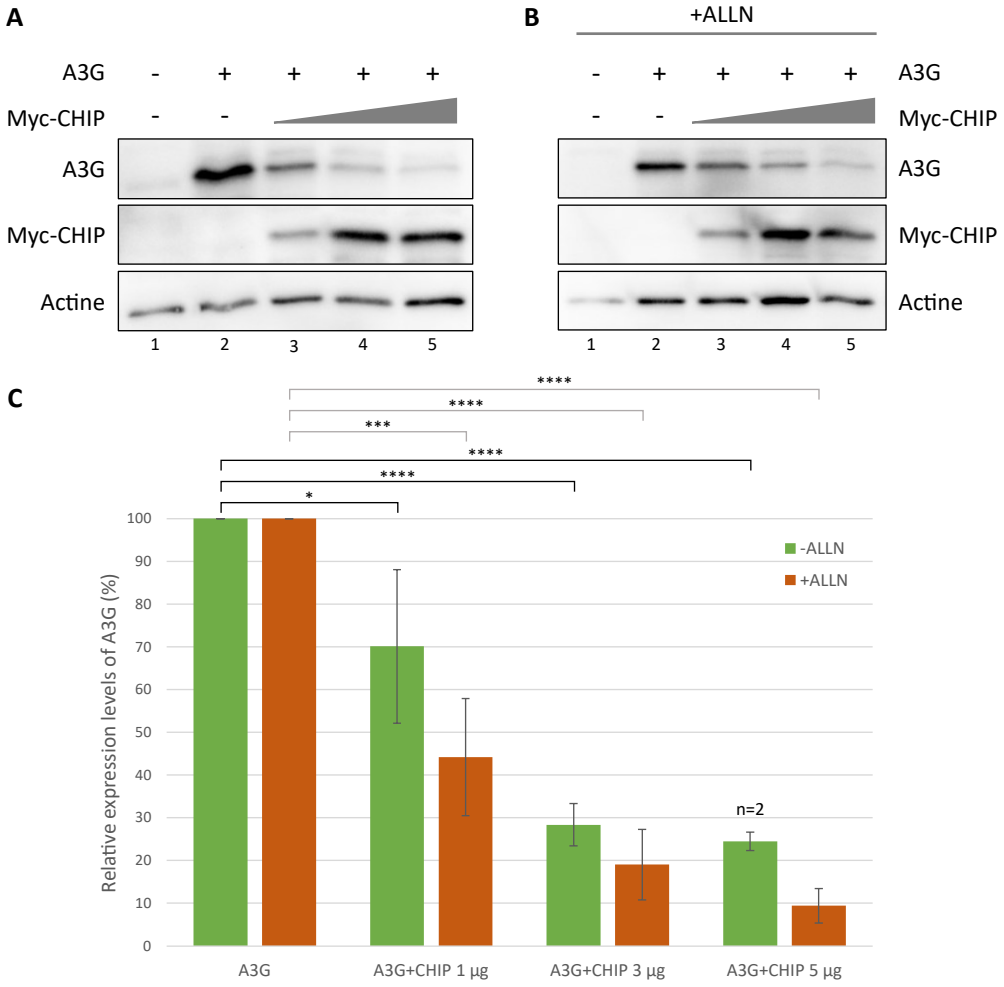


Figure 6: CHIP inhibits A3G expression through a proteasome-independent manner. A fixed quantity of A3G plasmid was transfected in HEK-293T cells along with increasing quantities of CHIP WT plasmid (1, 3 and 5 µg), in absence (**A**) or presence (**B**) of proteasome-inhibitor ALLN, and protein levels were analyzed by WB. Representative images of three independent experiments are shown. (**C**) Protein signals were quantified with ImageJ software and relative expression of A3 protein is represented. A3G signals were normalized to actin.

Reference A3G level, when the protein is expressed alone, was set to 100%. A3G levels in conditions of interest were compared to reference. Data represent the mean ± S.D of at least three independent experiments unless indicated otherwise. Two-tailed, unpaired Student's t-test p-values are indicated as follows: * ≤ 0.05, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001.

Overexpression of CHIP reduced A3G levels into HIV particles. We performed overexpression of CHIP and A3G along with pNL4.3 HIV molecular clones, expressing or not Vif in HEK-293T (**Figure 7**). First of all, we confirmed the downregulation of A3G in presence of CHIP (**Figure 7A**, compare lanes 3-4). Interestingly, this reduction of A3G expression is also observed in presence of pNL4.3 construct, and even stronger in presence of Vif (**Figure 7A**, compare lanes 7-8 and 11-12). As expected, we showed that Vif reduces A3G packaging into viral particles (**Figure 7B**, compare lanes 7-11) and this effect is even more pronounced in presence of CHIP (**Figure 7B**, compare lanes 8-12). We also observed that CHIP is packaged into viral particles but only upon overexpression (**Figure 7B**). It is possible that the packaged levels of endogenous CHIP are too low to be detected.

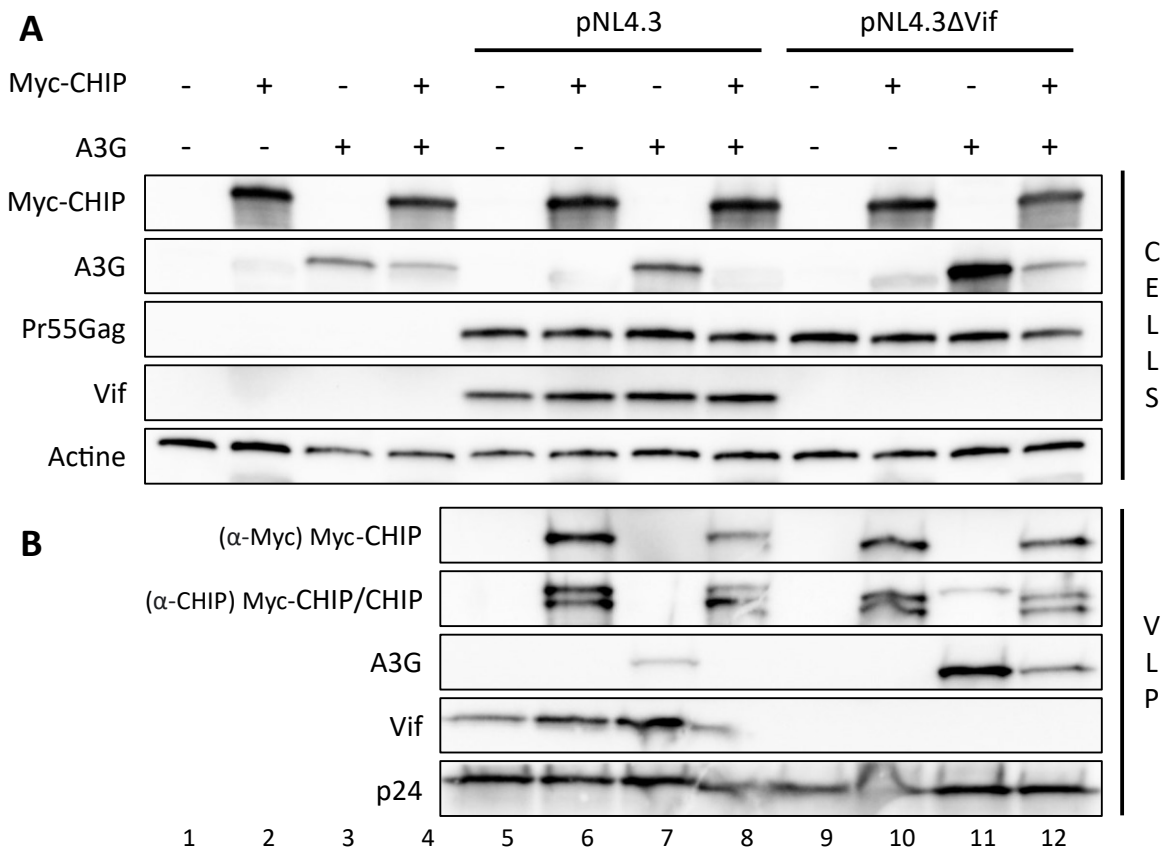


Figure 7: CHIP reduces A3G packaging upon overexpression and is packaged in HIV VLP. (**A**) HEK-293T cells were transfected with indicated plasmids. (**B**) Cell-culture media was collected after 48 h, filtered, and VLPs were concentrated. Protein levels of both cell extract and VLPs were analyzed by WB. For VLP blots, CHIP has been labeled with both α-myc and α-CHIP antibodies. For this later, two CHIP species are revealed; myc-tagged CHIP is the upper band. Representative images of three independent experiments are shown.

CHIP knock-down increases cellular A3G expression and packaging into viral particles. We then performed silencing experiment of our candidate of interest along with HIV-1 pNL4.3 expression, expressing or not Vif, and in presence of A3G. A VSV-G expressing construct was also co-transfected to pseudotype VLPs. In these experiments, cell lysates and VLPs were collected to analyze proteins levels by western blot (**Figure 8, 9**); purified VLPs were quantified (ELISA p24) (**Figure 9A**) and analyzed for their infectivity (**Figure 10**); and part of the cells was used for RNA quantification (**Figure 8B, 9A**). Firstly, silencing efficiency of either HPRT1 (positive control) or CHIP was measured. A strong silencing efficiency was always achieved for each target in any conditions and replicates, with protein and mRNA (data not shown here) levels reduced from 90-95% compared to the negative control (siNeg, a scrambled siRNA designed to target no human RNA). Upon CHIP silencing, we constantly observed an increase of A3G protein levels in absence (**Figure 8A**, "cells" panels, lanes 3-4, **8B**) or in presence (**Figure 8A**, lanes 11-12, **8B**) of pNL4.3ΔVif construct of about 2-fold. In presence of Vif expressed from pNL4.3, we observed an A3G increase of 4 to 12-fold (**Figure 8A**, lanes 7-8, **8B**). In any case, the increase of A3G level is clear upon CHIP silencing, in line with our previous results showing a regulation of A3G by CHIP. Consequently, we observed an increase in A3G level packaged into VLP in absence of Vif (**Figure 8A**, "VLP" panels, compare lanes 11-12, **8B**). Of note, VLP-packaged A3G levels in presence of Vif were too low to be quantified but showed similar tendencies when visible. The amount of packaged A3G level has been analyzed with respect to VLP-forming protein levels to take into account protein level variations: considering A3G to Pr55 and p24 levels, level of A3G increased 3 to 5-fold in cells and 2-fold into VLPs upon CHIP silencing (**Figure 8B**, compare "A3G per Pr55" and "Packaged A3G"). Surprisingly, we also observed an increase of A3G mRNA levels upon CHIP silencing (**Figure 8B**, "A3G mRNA"), that roughly followed the one of protein levels (about 2.5-fold). Taken together, upon CHIP silencing, we observed an increase of A3G protein levels in cells and in VLPs, confirming the anti-A3G effect of CHIP. Moreover, our data also suggest that CHIP regulates A3G at a pre-translational step (either at A3G transcription or A3G mRNA stability).

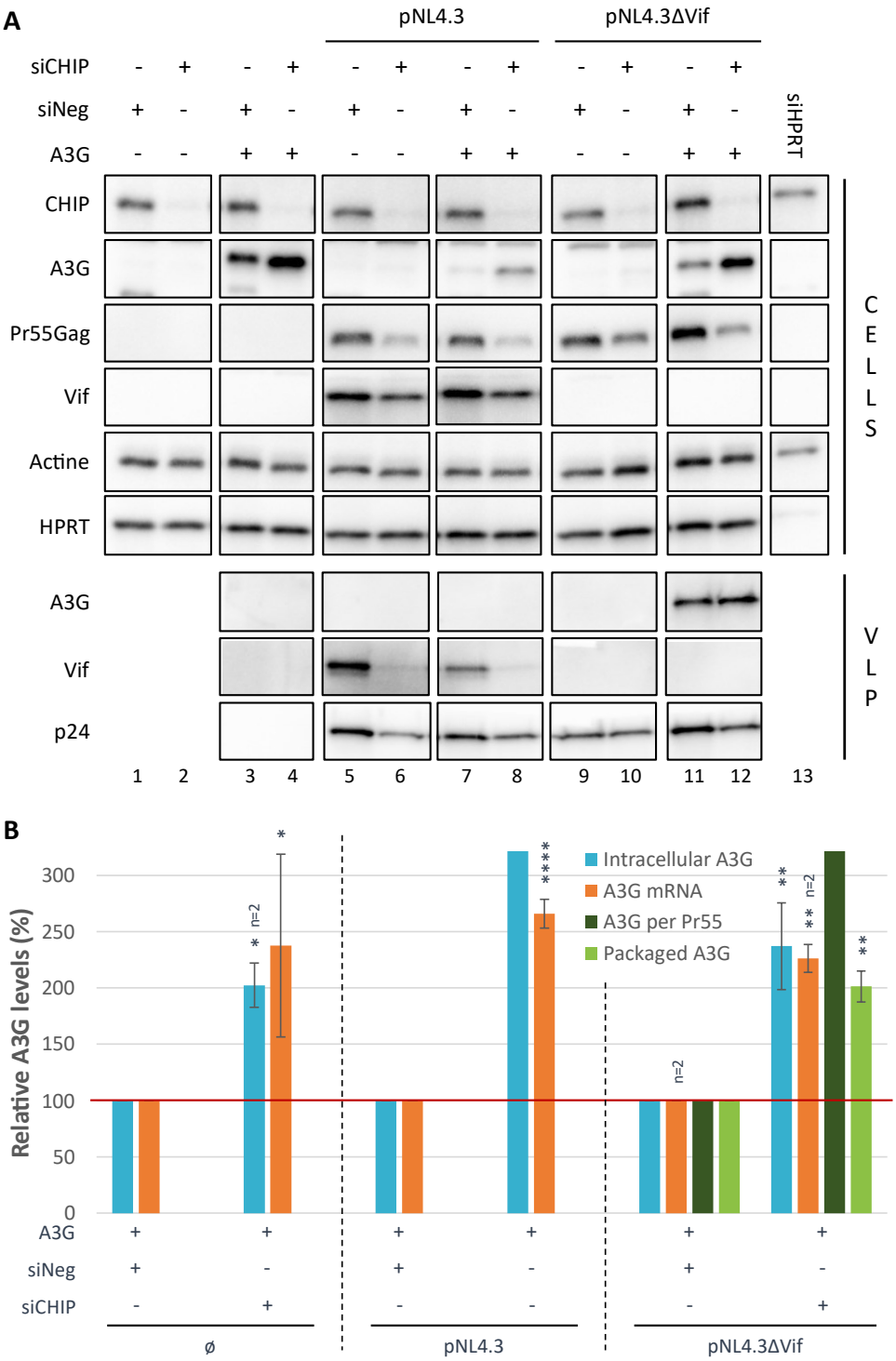


Figure 8: CHIP downregulates A3G expression. HEK-293T cells were transfected with a siRNA targeting CHIP or a scramble siRNA (siNeg) along with indicated plasmids and a VSV-G expressing construct. (**A**) Protein levels of both cell extracts and VLPs were analyzed by WB. Representative images of at least three independent experiments are shown. (**B**) Full-scaled histogram is in **Figure S6**, here the same histogram is presented with a narrower scale to facilitate comparisons. Protein signals in WB were quantified with ImageJ software and relative levels of A3G protein are represented. Cellular A3G signal was normalized to actin ("Intracellular A3G") and A3G signal on VLP blots were normalized to p24 ("Packaged A3G"). To account for both A3G and Pr55Gag protein level variations, the ratio of "A3G per Pr55" was also calculated. These two last parameters are only represented for pNL4.3ΔVif samples as A3G levels were too low in presence of Vif. Finally, cellular RNAs were also extracted and A3G mRNA levels were quantified ("A3G mRNA"). Measured parameters were compared in different conditions to the

reference siNeg condition set to 100% (100% is represented by the horizontal red line on the histograms). Data represent the mean ± S.D of at least three independent experiments unless indicated otherwise. Two-tailed, unpaired Student's t-test p-values are indicated as follows: * ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, **** ≤ 0.0001. Additional note: if we're assuming that transfection conditions (presence or absence of pNL4.3ΔEnv or pNL4.3ΔEnvΔVif) shouldn't affect A3G mRNA levels, we can analyze pooled-qPCR data, and in this case relative A3G mRNA levels upon CHIP silencing are of 245.4% ± SD=47.6, n=9, p<0.0001 compared to siNeg control.

CHIP knock-down decreases viral protein levels and Vif-packaged levels. We quantified viral proteins in cell extract by western blot and VLP proteins by p24 ELISA (**Figures 8A and 9)** and Vif and HIV unspliced (US) RNA levels in cell extracts (**Figure 9A**). First of all, we did not observe off-targeting of CHIP siRNA on HIV-1 expression (**Figure 9A**, "US RNA" and "Vif RNA"). Albeit one of the four conditions shows a 35% decrease (mean US RNA levels in every CHIP knock-down conditions are of 95% compared to siNeg). On another hand, protein levels of Pr55Gag (**Figure 8A**, **9A**, "Pr55 – WB") decreased about 2-fold upon CHIP knock-down. This variation showed similar tendencies when measuring p24 level by ELISA (**Figure 9A**, "p24 – WB"). Overall, these results suggest that CHIP-silencing does not affect HIV-1 US RNA but significantly reduces Pr55Gag expression. Concerning Vif, we observe a decrease of about 30% in RNA levels upon CHIP silencing (**Figure 9A**, "Vif RNA") (mean Vif RNA level of 71% in siCHIP conditions compared to siNeg). This decrease reflects at the protein level (**Figure 8A**, **9A**, "Vif – WB") with a decrease of about 30%. Of note, the decrease in Vif level upon CHIP silencing may contribute to the increase in A3G expression observed in this condition (**Figure 8A**, lanes 6 and 8). Vif levels were also represented while taking into account intracellular protein fluctuations of both Vif and Pr55Gag, next to p24-normalized Vif levels into VLP (**Figure 8A** & **9B**, "Vif per Pr55" and "Packaged Vif"). Interestingly, while "packageable" Vif level increased or stayed similar in our control condition, we observed a 5-fold decrease (80%) of packaged-Vif levels upon CHIP silencing.

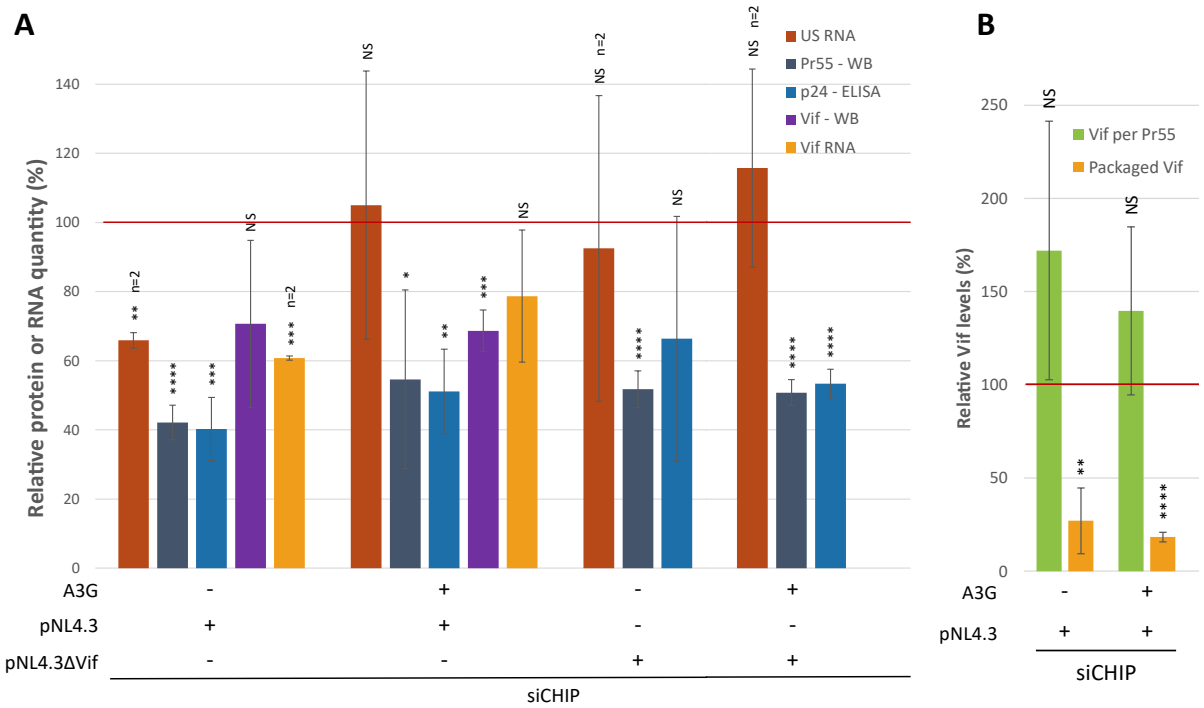


Figure 9: CHIP increases viral protein expression and impairs Vif packaging. See **Figure 8** legend for methods description as data originated from the same samples. (**A**) Protein signals in WB were quantified with ImageJ software and relative viral protein levels are represented. Cellular Pr55Gag and Vif signals were normalized to actin ("Pr55 – WB", "Vif – WB"). p24 levels of viral supernatant were quantified in parallel by ELISA ("p24 – ELISA"). Vif and HIV unspliced (US) RNA levels were quantified par RTqPCR ("US RNA", "Vif RNA"). (**B**) Relative Vif levels upon CHIP silencing. To account for Vif and VLP-structural precursor Pr55Gag level variations, the cell ratio of "Vif per Pr55" was calculated and represented. "Packaged Vif" represents Vif signal on VLP blots that were measured and normalized to p24. Each measured parameter in (**A**) and (**B**) are compared to the data measured in cognate siNeg control condition that were set to 100% (Controls not displayed on graph to ease readability. 100% is represented by the horizontal red line on the histograms). Data represent the mean ± S.D of at least three independent experiments unless indicated otherwise. Two-tailed, unpaired Student's t-test p-values are indicated as follows: * ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001. ns (not significant). Additional note: if we're assuming that transfection conditions (type of pNL4.3 vector or presence/absence of A3G) should not affect US RNA levels, we can analyze pooled-qPCR data, and in this case relative HIV US RNA levels upon CHIP silencing are of 95.9% ± SD=32.9, n=9, p=n.s. compared to siNeg control. With the same reasoning, Vif levels upon CHIP silencing are of 71.5% ± SD=16.7, n=5, p=0.0049 compared to siNeg control.

CHIP knock-down increases Vif-expressing pNL4.3 infectivity. Finally, we measured HIV-1 viral particle infectivity upon CHIP silencing (**Figure 10**). VLP quantities were adjusted for each sample (p24-ELISA) so that infectivity could be compared across conditions. When comparing infectivity values relative to the absence or presence of A3G (data not shown here), we observed a decrease of HIV-1 infectivity of about 30-40% (1.43 to 1.66-fold) in the presence of A3G for pNL4.3 WT, and of about 70-80% (3.33 to 5-fold) for pNL4.3ΔVif viruses, in accordance with A3G antiviral effect that is mostly impaired in presence of Vif. In **Figure 10**, infectivity values are represented relative to the infectivity of the cognate siNeg control condition. Surprisingly, we observed a statistical increase of 1.5 to 1.8-fold viral infectivity of Vif-expressing VLPs upon CHIP silencing. Infectivity of VLPs produced in absence of Vif and in absence

of A3G shows the same tendency, albeit the difference is not statistically significant. Taken together, our results suggest that CHIP have a negative effect on viral infectivity.

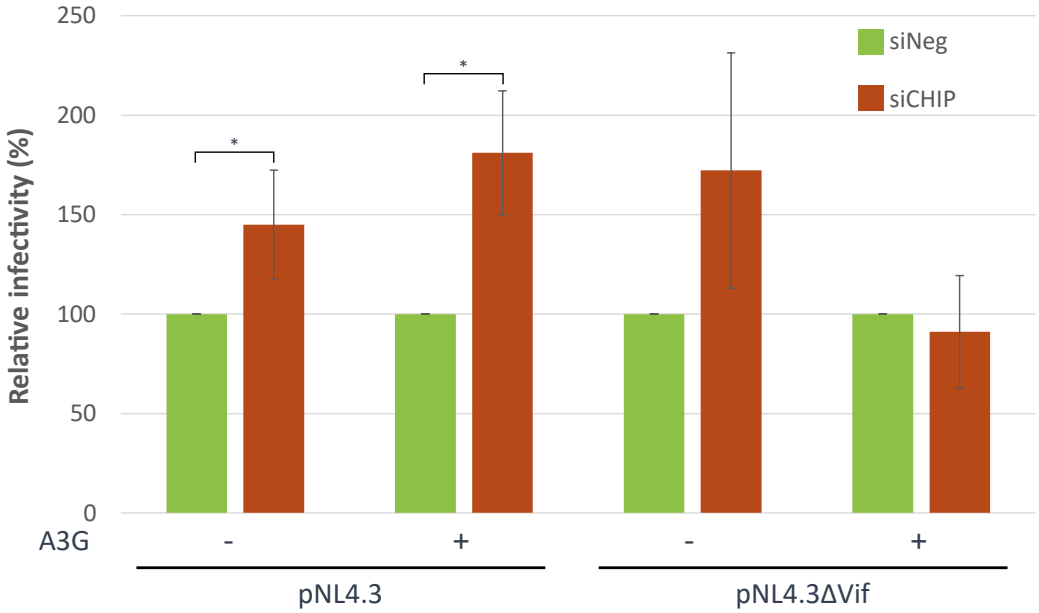


Figure 10: CHIP reduces HIV-1 infectivity. VSV-G pseudotyped VLPs produced during silencing experiments (same samples as **Figure 8 and 9**) were filtered from-cell debris, titrated, and used to perform infectivity assay with TZM-bl reporter cells. These cells allow infectivity measurement as they express an HIV LTR-regulated firefly luciferase, needing Tat expression by integrated VLPs Luciferase relative units were measured after 48 h of infection and are represented in %. Reference infectivity levels of VLPs expressed from siNeg conditions were set to 100% and infectivity levels of VLPs produced in conditions of interest were compared to reference. Data represent the mean ± S.D of at least three independent experiments two-tailed, unpaired Student's t-test p-values are indicated as follows: * ≤ 0.05.

Discussion

In the present study, we have for the first time identified the interactome of the A3G mRNA from HEK-293T cell lysates in different conditions and uncovered several A3G mRNA-associated proteins that appeared to be regulated by Vif and/or A3G protein, of which the E3 ubiquitin ligase CHIP. We showed an RNA-independent interaction of CHIP with both A3G and Vif proteins. Moreover, CHIP inhibits A3G expression by a proteasome-independent mechanism. CHIP loss or overexpression in HIV-1 replicative context further confirm CHIP-mediated regulation of A3G. Although the molecular mechanism is still unclear, CHIP negatively regulates HIV-1 replication.

Our RNA pull-down analysis revealed a core interactome of 109 proteins (**Figure 1**) which always remain associated with A3G mRNA independently of the experimental conditions, while 338 proteins are modulated depending on the presence of Vif and A3G proteins. Amongst the core interactome of A3G mRNA, we found proteins implicated in splicing, transport, translation and degradation. These proteins represent all of the typical interactants which play a role in the different steps of the life cycle of an mRNA.

Interestingly, the composition of A3G mRNA-associated protein complexes could be modulated by the presence of its own protein in the cellular lysate (**Figure S1**). This indicates that A3G protein influences the interactome of its own mRNA and might therefore play a role in the regulation of its own expression. It has been shown previously that A3G protein localizes to P-bodies in cells (Gallois-Montbrun et al., 2008, 2007; Marin et al., 2008; Wichroski et al., 2006). Moreover, A3G can interact with and bind to RNAs through its zinc-coordinating domain (Apolonia et al., 2015; Iwatani et al., 2006; Svarovskaia et al., 2004), including its own mRNA (Kozak et al., 2006). We observed an upregulation of RNP granule-associated proteins on A3G mRNA in the presence of A3G, and we recently reported that such storage compartment could be involved in A3G regulation (Libre et al., 2022).

In addition to A3G protein itself, Vif could also modulate the A3G mRNA interactome (**Figure 2, 3**). Surprisingly, a large proportion of cytoskeletal proteins have been identified as enriched in the presence of Vif. While keratins are typical contaminants in mass spectrometry (Hodge et al., 2013), the actin cytoskeleton and intermediate filaments might play a role in the mechanism of Vif-mediated translational inhibition, for example by mediating transport of A3G mRNA into mRNA granules. Indeed, we have recently shown that in stress conditions, Vif relocalizes A3G mRNA into stress granules (Libre et al., 2022). Moreover, Vif is known to associate with intermediate filaments in the cell (Karczewski and Strebel, 1996), which might explain their recruitment in our experiments.

Surprisingly, Vif does not seem to directly interact with most of the proteins that it regulates (**Figure S3**). Vif has been shown to bind to the 5'-UTR of A3G mRNA (Mercenne et al., 2010). The 5'-UTR of A3G

mRNA and more precisely a small uORF has been shown to be important for Vif-mediated inhibition of A3G translation (Guerrero et al., 2016; Libre et al., 2022). It is possible that Vif binds to A3G mRNA and induces changes to its secondary or even tertiary structure which could lead to the drop-off or recruitment of different RBPs without any physical interaction with Vif. Indeed, Vif has been shown to possess an RNA chaperone activity (Batisse et al., 2012; Henriet et al., 2009; Sleiman et al., 2014). Furthermore, most of the proteins regulated by Vif have been found to be phosphoproteins, which means that they can be regulated by phosphorylation. Vif is a known modulator of the phosphoproteome in cell (Greenwood et al., 2016). Therefore, Vif might induce changes in the phosphorylation status of A3G mRNA-associated proteins which could favor or hinder their interaction with the RNA. MYPT1 and NEB2 for example are phosphatase cofactors (Allen et al., 1997; Yamashiro et al., 2008) which seemed to be recruited onto A3G mRNA by Vif and are potentially involved in Vif-mediated modulation of the phosphoproteome. Further experiments will be needed to test this hypothesis.

CHIP and UPF1/RENT1 were the only proteins whose interaction with Vif was confirmed in co-immunoprecipitation experiments. While the interaction of RENT1 and CHIP with Vif would have rather suggested a recruitment of these proteins onto A3G mRNA by Vif, our analyses actually showed that Vif mediated their decrease on A3G mRNA. Possible explanations would be that Vif binds to these proteins to induce their degradation or to relocate them in cell. This would explain a direct interaction of Vif with these proteins and their downregulation on A3G mRNA.

In our study, we demonstrated that CHIP interacts with both Vif and A3G proteins (**Figure 4A, 4B, S3**), in an RNA-independent manner (**Figure 4C, 4D**). CHIP interaction with Vif was first identified in a high-throughput analysis of Vif proteome (Jäger et al., 2011) and further studied by Ali and colleagues (Ali et al., 2021). They also showed that the Vif-CHIP interaction was preserved upon A3G expression, and that A3G was pulled-down with Vif upon CHIP IP. Our results are in agreement with their results if we consider the Vif-CHIP interaction. However, we now show for the first time that CHIP is also able to interact with A3G, independently of its interaction with Vif (**Figure 4A**). To further characterize the interactions between CHIP, Vif and A3G, we analyzed several CHIP proteins mutated in its functional domains (**Figure 5**). Although our results showed that all domains are important for its interaction with A3G and/or Vif, we cannot exclude inappropriate folding of CHIP mutants, burying key interacting residues inside the protein. When looking more precisely into specific residues, we found that K30 was essential for CHIP interaction with both Vif and A3G. K30, located in the TPR domain, is an essential residue involved in CHIP interaction with chaperones (Hsp70/90), bringing CHIP in close contact to its substrate (Xu et al., 2002). Thus, CHIP potentially interacts with Vif and/or A3G thanks to such protein adaptor. Indeed, our co-IP experiments are carried-out with whole cell-lysate, which does not allow us

to determine if the observed interactions are direct or indirect (through Hsp). Interestingly, Hsp70 has previously been shown to interact with both A3G and Vif individually (Sugiyama et al., 2011). Though, in this study, A3G and Vif seemed to compete for Hsp70 binding, and Hsp70 overexpression reduced A3G degradation. Indeed, Vif interact with Hsp70 through its N-terminus, a region also essential for A3G binding, suggesting that Hsp70 titrates Vif by binding to similar A3G interfaces, thereby protecting the deaminase from Vif-mediated proteasomal degradation. However, Hsp70 knock-down did not affect A3G expression in absence of Vif (Sugiyama et al., 2011). Hsp70 has been co-purified with Vif and A3G upon production and purification of a Vif-EloB-EloC-CBF-A3G complex (Drillien et al., 2022), and direct A3G-Hsp90 interaction has been observed *in vitro* (Chen et al., 2017). In light of these elements, it would be interesting to perform co-IP experiments (against CHIP in presence of Vif and/or A3G) to detect the presence of chaperones proteins (Hsc8A/Hsc70, Hsp70 and Hsp90). Of note, Hsp70/90 are the best known CHIP adaptor to bind its target, but other proteins may exert the same function, such as CHIC2 (Koochaki et al., 2022).

Interestingly, K30 is essential for CHIP interaction with either A3G or Vif, but the signal intensity of A3G or Vif in our co-IP experiments remains roughly the same whether protein are alone or co-expressed (**Figure 4A**, compare lanes 2 and 3 to lane 4). The fact that we're not observing a binding competition reinforces the idea that A3G and Vif do not interact directly with CHIP through a common interface, but rather through an intermediate. However, A3G and Vif are also known to directly interact together. Thus, different models of interaction between CHIP and these two partners can be proposed (**Figure 11**). First, A3G and Vif may interact with CHIP through a different chaperone protein, or through the same one. In the first case, two possibilities arise: (1) both proteins exhibit more affinity for their chaperone than for one another and remains bound to it (**Figure 11**, model A), both complexes then being observed concurrently in IP blots. (2) A3G and Vif interact together with a stronger affinity than to their respective chaperone (**Figure 11**, model B). Finally, A3G and Vif may interact with CHIP through a common chaperone partner, but with different interaction interfaces (**Figure 11**, Model C). In this case, as the binding of both proteins to the chaperone is independent of their ability to interact together, they would be precipitated whether they interact together or not. Hsp70 may compete with A3G for Vif binding potentially through the same interfaces (Sugiyama et al., 2011), which would argue against model B and C. However, the strong and well-characterized Vif-A3G interaction would rather be against model A. More experiments will be necessary to decipher how these proteins interact together (for instance by performing co-IP experiments with non-interacting A3G and Vif mutants such as A3G D128K or Vif H42/43N to confirm or infirm model B).

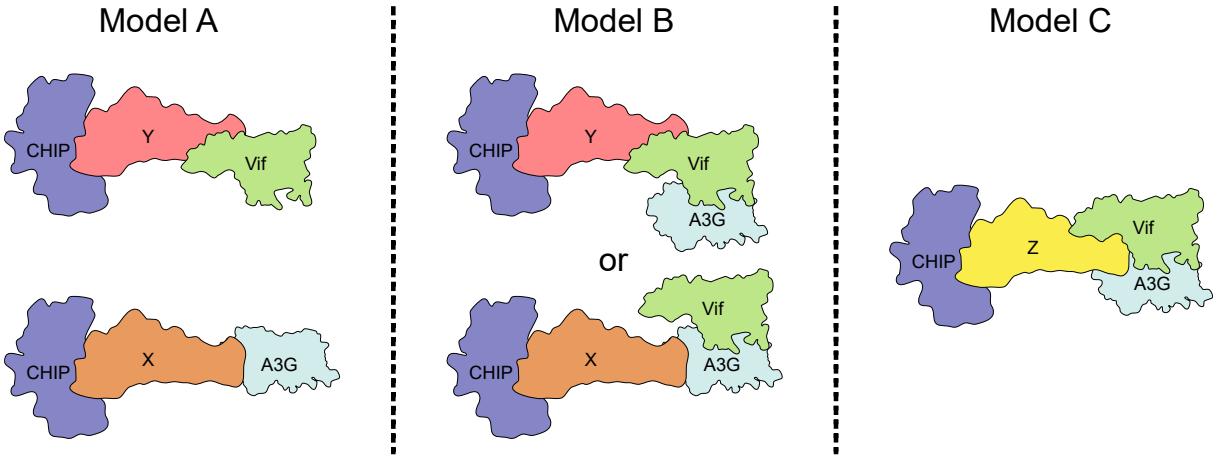


Figure 11: Hypothetical models for CHIP-Vif-A3G interaction. CHIP, Vif and A3G proteins are represented. X, Y and Z represent chaperone proteins. Of note, CHIP interacts with chaperones thanks to its TPR domain, and more specifically its K30 residue, with the C-terminal EEVD motif of these chaperones. Model (**A, B**): Vif and A3G interact with CHIP through a different partner. When co-expressed, proteins keep a higher affinity for their chaperone partner than for one another (**A**), or the opposite (**B**). Model (**C**): A3G and Vif interact with CHIP through the same partner through different interfaces. In this model, A3G-Vif interaction is optional.

Our results clearly show that CHIP regulates A3G expression independently of viral infection. Indeed, A3G protein levels increased upon CHIP silencing (**Figure 8**), and reciprocally decreased upon CHIP overexpression (**Figure 6,7**). CHIP is a known E3-ligase involved in the degradation of a wide range of substrates, especially by interacting with them through Hsp proteins. However, CHIP does not seem to induce A3G degradation through the proteasomal pathway, as chemical inhibition of the proteasome does not prevent CHIP-mediated inhibition of A3G (**Figure 6B**). Interestingly, CHIP can also mediate protein degradation through autophagic pathways (Ferreira et al., 2015, 2013; Maan and Pati, 2018; Shin et al., 2005; Zhang et al., 2005). Moreover, KFERQ-like motif serves as a signal for chaperone-mediated autophagy (Kirchner et al., 2019) in which CHIP takes part (Ferreira et al., 2015, 2013). Bio-informatic analysis of A3G amino-acid sequence with the "KFERQ finder" tool (https://rshine.einsteinmed.edu/; Kirchner et al., 2019) allowed us to identify that a canonical KFERQ-like motif was indeed present in A3G (**Figure 12**). We will test the possibility that CHIP mediates A3G degradation through autophagy by performing experiments in presence of 3-Methyladenine (3-MA) or bafilomycin A1 autophagy inhibitors, and by analyzing the catalytically-inactive H260Q CHIP. K30A CHIP mutant will be studied the same way, as the loss of interaction between CHIP and A3G (**Figure 5**) should also prevent a direct-A3G regulation by ubiquitin conjugation.

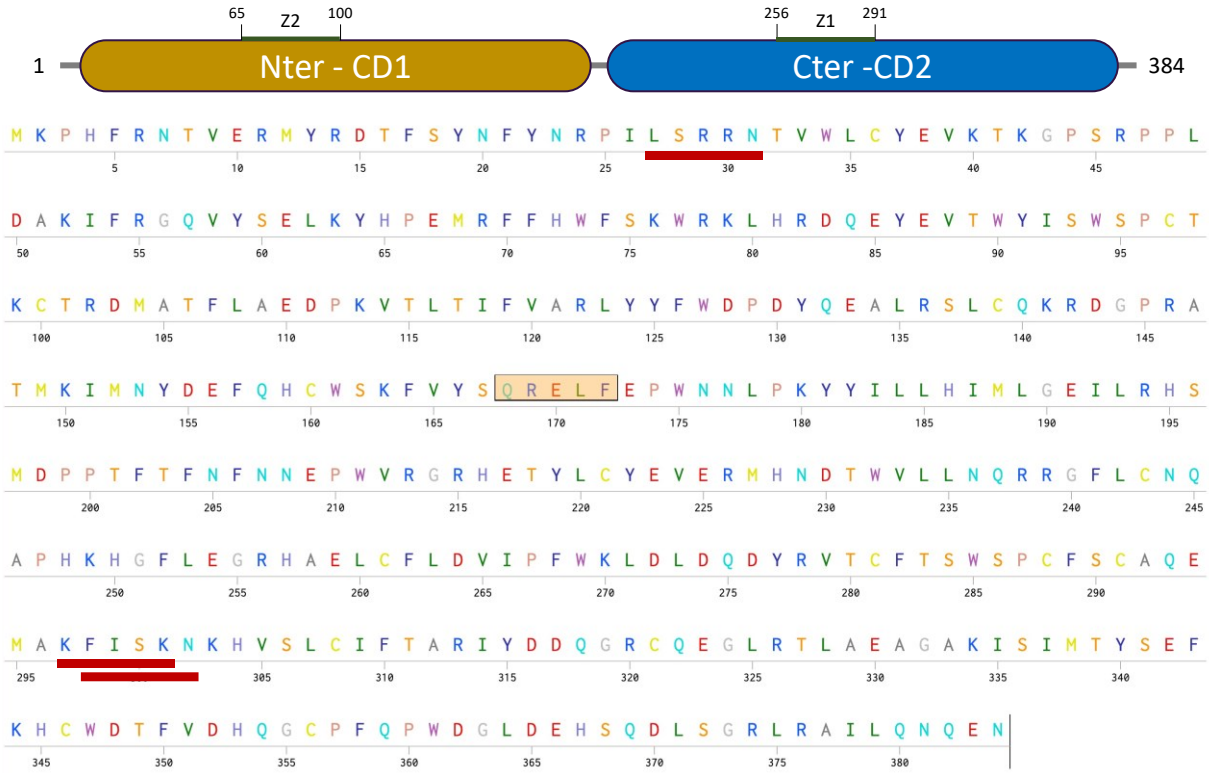


Figure 12: A3G contains a KFERQ-like motif. A schematic representation of A3G with its sequence below is shown. Zinc-coordinating domains are indicated, Z1 in the CD2 domain bears the catalytic activity while residues of the CD1 domain are involved in A3G-RNA and A3G-Vif binding. A3G amino-acid sequence was analyzed with the "KFERQ finder" tool (https://rshine.einsteinmed.edu/; Kirchner et al., 2019). One canonical KFERQ-like motif was detected from position 168 to 172 (highlighted in orange) and three additional putative motifs (underlined in red) that could be recognized as a KFERQ motif upon post-translational modifications. KFERQ-like motifs are recognized and bound by Hsc70 to target clients that are degraded by the chaperone-mediated autophagy (CMA) pathway, in which CHIP also acts.

Our RTqPCR results upon CHIP silencing (**Figure 8B**) showed an increase of A3G mRNA levels mostly equivalent to the one of protein levels. Unfortunately, as RTqPCR only gives an instantaneous snapshot of mRNA quantity, A3G mRNA stability or synthesis rate are not known. Still, this observation suggests that CHIP would rather regulate A3G at a pre-translational level than at a post-translational stage, probably by regulating its transcription. CHIP has been reported to target a wide range of transcription factors to degradation, such as TFEB (Sha et al., 2017), SMAD1/4 (Li et al., 2004), Runx1 (Shang et al., 2009), Runx2 (Li et al., 2008), among others (Bento et al., 2010; Dai et al., 2003b; Luan et al., 2018; Narayan et al., 2011), which could have a repercussion on their target transcription (Bento et al., 2010; Dai et al., 2003b; Li et al., 2004, 2008; Luan et al., 2018; Sha et al., 2017). CHIP-mediated A3G regulation could therefore take place in an indirect fashion, by inhibiting factors themselves important for A3G expression. In our experiments A3G was overexpressed from a plasmid bearing a CMV promotor, and transcriptional programs and factors involved in endogenous (chromosomic) and exogenous (plasmidic) A3G expression probably differ. More experiments will be needed to assess the possibility

that CHIP regulates A3G mRNA levels, whether directly or not (monitoring A3G mRNA quantity and stability during CHIP gradient experiments, CHIP overexpression or silencing). If transcription is indeed impacted, we will perform CHIP overexpression in cell endogenously expressing A3G to monitor A3G (mRNA and protein) and protein levels of known A3G transcription factors, such as Sp1/3 (Muckenfuss et al., 2007), NFATc1/2 and IRF-3/8 (Farrow et al., 2011) amongst others (Covino et al., 2018) to further assess this hypothesis. Moreover, endogenous A3G transcription is also regulated by RUNX and CBF-β transcription factors (Anderson and Harris, 2015); CHIP-mediated degradation of Runx1 and 2 is therefore particularly interesting in this context.

Regardless of the precise mechanism of A3G regulation by CHIP, it's still observed in presence of pNL4.3, whether Vif is expressed or not (**Figure 7, 8**). Indeed, we observed a clear decrease or increase of A3G expression and packaging upon CHIP overexpression or silencing, respectively. In addition, and as expected, when Vif is expressed, we observed a stronger decrease of intracellular and packaged A3G.

Considering CHIP and Vif regulations of A3G, we also tried to see if co-expression of both proteins would only lead to a cumulative inhibition of A3G or a synergistic effect between them would take place and result in a stronger inhibition of A3G than the cumulative effect of each protein alone. However, we were not able to answer this question (data not shown), presumably due to the detection limits of our methods. Indeed, A3G levels on WB are already low in presence of Vif, and further diminution of protein can be difficult to detect accurately in our settings. Of note, we also performed preliminary experiments of silencing or overexpression of CHIP along with A3G and Vif (in presence of ALLN) to observe a potential effect of the target on Vif mediated-translational inhibition of A3G, as this candidate was firstly identified in the goal of discovering A3G-translation related protein. Unfortunately, neither experiment seemed to show potential effects on A3G translation inhibition (data not shown). Experiments will be repeated to clarify these preliminary observations.

CHIP regulation of A3G may take place to avoid collateral damage of a loosely controlled deaminase on the host genome. Indeed, APOBEC3 proteins have been shown to play a role in carcinogenesis (Butler and Banday, 2023; Liu et al., 2023). To further investigate CHIP relevance in A3G regulation and its potential synergistic effect with Vif, we envisage to study the protein in a more relevant context (CRISP-Cas9 K.O. of CHIP in Jurkat TCD4+ cells that express physiological levels of A3G). It will first allow us to study the physiological regulatory function of CHIP on A3G in cells and proper expression conditions; then these cells will be infected with HIV-1 to monitor A3G levels, the impact on viral production and on infectivity in absence of CHIP, as previously done in HEK-293T cells

When Ali and coll. studied Vif-CHIP interactions, they showed that CHIP overexpression induced the degradation of Vif, thereby re-establishing higher levels of A3G (Ali et al., 2021). Concerning our study,

we did not observe any decrease of Vif expression when CHIP was overexpressed (up to a 3:1 CHIP-Vif ratio) (**Figure S5**). A slight decrease may occur at a 5:1 ratio, but it was not significant. Likewise, when co-expressing A3G, we were not able to observe any Vif downregulation nor A3G restoration (**Figure S5C**). These discrepancies between our studies may be due to plasmid ratio used to express A3G and CHIP (a 1:4 A3G-CHIP plasmid ratio was used in their experiments, while we're using a 1:10 ratio). However, our results show several lines of evidence that suggest a CHIP-mediated downregulation of A3G, which strongly goes against their observations showing a pro-A3G action of CHIP. Overall, as both Ali and us used similar conditions (same Vif and CHIP vectors, same cell line …), the reasons for such discrepancies are still unclear. We hope to clarify these observations in a more physiological model.

When looking at viral production upon CHIP knockdown, we observed that HIV-1 US RNA levels remain essentially similar to the negative condition, while Pr55Gag expression decreased (**Figure 9A**). This observation suggests that CHIP is involved in Pr55 upregulation at a post-transcriptional level (protein stability, translation). Vif protein expression also showed a mild decrease upon CHIP silencing, again at the opposite to what was observed by Ali and coll. (Ali et al., 2021, 2019). On the contrary, when we performed pNL4.3 transfection along with CHIP overexpression (**Figure 7A**), we did not observe any effect on Gag or Vif expression in cells. Of note, what we observe for Pr55Gag upon CHIP loss or overexpression is also in disagreement with Ali and coll. (Ali et al., 2019). Interestingly, in CHIP overexpression conditions (**Figure 7B**) CHIP was packaged into viral particles independently of Vif or A3G. Although the mechanism of CHIP packaging is unknown, it has previously been shown that several chaperone proteins, notably Hsp70 or 90, can be found into viral particles (Brenner and Wainberg, 1999; Gurer et al., 2002; Santos et al., 2012), suggesting a co-packaging of these partners. Another interesting observation is the strong decrease of Vif packaging into VLPs upon CHIP knockdown (**Figure 9B**). While further experiments should be performed to analyze in detail this observation, it may be possible that CHIP either stabilizes Vif or redirect the protein to a viral complex where Vif will be packaged.

VLP infectivity increase upon CHIP knockdown was however unexpected. CHIP might be important for the viral cycle (viral production decreased upon its loss (**Figure 9B**)), but moreover A3G was significantly increased into VLPs in these conditions (**Figure 8**). Although counter-intuitive, Ali and coll. also observed an increase of infectivity when CHIP was knock-out in TZM-bl cells (Ali et al., 2019).However, they correlated this effect to an increase of Tat quantity and activity (Tat being a CHIP target). Recently, it was observed that a transcriptionally active Tat is packaged into viral progeny, showing an important role in reverse transcription and transcription(Schatz et al., 2023). It would thus be interesting to analyze Tat expression and packaging in our conditions.

In conclusion, we have characterized the impact of A3G and Vif proteins on the proteome of A3G mRNA. It allowed us to identify potential cellular cofactors of A3G regulation and/or Vif partners. The cytoskeleton, as well as P-bodies and stress granules, have been the principal factors identified in this study; they might play a central role in the regulation of A3G expression. The main finding of our study is that CHIP, an E3-ubiquitin ligase and co-chaperone protein, is a binding partner of both A3G and Vif, but most importantly, is a negative regulator of A3G expression. Although work has still to be done to understand the complete action of CHIP on viral replication, our results underline the complex relationships between cell component and the multiple layers of protein expression regulation, and the potential impacts of these intricate networks on virus replication.

Acknowledgements.

We thank Dr Jonathan C. Schisler (McAllister Heart Institute, Chapel Hill, NC, USA) and Dr Matteo Negroni for kindly providing the different CHIP-myc and VSV expression plasmids, respectively. The following reagents were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: A3G polyclonal antibody (#9968) from Dr Warner Greene and Vif monoclonal antibody (#319) from Dr. Michael H. Malim. This work was supported by a grant from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) and SIDACTION to JCP, and by doctoral fellowships from the French Ministry of Research and Higher Education (TS, CV) and SIDACTION (CV).

Bibliography

Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**:284–291.

Ali A, Farooqui SR, Banerjea AC. 2019. The host cell ubiquitin ligase protein CHIP is a potent suppressor of HIV-1 replication. *Journal of Biological Chemistry* **294**:7283–7295. doi:10.1074/jbc.RA118.007257

Ali A, Kumar V, Banerjea AC. 2021. STUB1/CHIP promotes ubiquitination and degradation of HIV-1 Vif to restore the cellular level of APOBEC3G protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **574**:27–32. doi:10.1016/j.bbrc.2021.08.031

Allen PB, Ouimet CC, Greengard P. 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**:9956–9961. doi:10.1073/pnas.94.18.9956

Anderson BD, Harris RS. 2015. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-β/RUNX axis. *Science Advances* **1**:e1500296. doi:10.1126/sciadv.1500296

Apolonia L, Schulz R, Curk T, Rocha P, Swanson CM, Schaller T, Ule J, Malim MH. 2015. Promiscuous RNA Binding Ensures Effective Encapsidation of APOBEC3 Proteins by HIV-1. *PLoS Pathogens*.

doi:10.1371/journal.ppat.1004609

Barbosa C, Peixeiro I, Romão L. 2013. Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet* **9**. doi:10.1371/journal.pgen.1003529

Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix J-L, Marquet R, Tisné C, Paillart J-C. 2012. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Research*, Retroviral RNA, protein co-factors and chaperones **169**:361–376. doi:10.1016/j.virusres.2012.06.018

Beckmann K, Grskovic M, Gebauer F, Hentze MW. 2005. A Dual Inhibitory Mechanism Restricts msl-2 mRNA Translation for Dosage Compensation in Drosophila. *Cell* **122**:529–540. doi:10.1016/j.cell.2005.06.011

Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, Marques C, Shang F, Taylor A, Pereira P. 2010. The Chaperone-Dependent Ubiquitin Ligase CHIP Targets HIF-1α for Degradation in the Presence of Methylglyoxal. *PLOS ONE* **5**:e15062. doi:10.1371/journal.pone.0015062

Bergamaschi A, Ayinde D, David A, Le Rouzic E, Morel M, Collin G, Descamps D, Damond F, Brun-Vezinet F, Nisole S, Margottin-Goguet F, Pancino G, Transy C. 2009. The human immunodeficiency virus type 2 Vpx protein usurps the CUL4A-DDB1 DCAF1 ubiquitin ligase to overcome a postentry block in macrophage infection. *J Virol* **83**:4854–4860. doi:10.1128/JVI.00187-09

Brenner BG, Wainberg MA. 1999. Heat shock protein-based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**:80–90.

Butler K, Banday AR. 2023. APOBEC3-mediated mutagenesis in cancer: causes, clinical significance and therapeutic potential. *Journal of Hematology & Oncology* **16**:31. doi:10.1186/s13045-023-01425-5

Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. 2009. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:7507–7512. doi:10.1073/pnas.0810916106

Chen Z, Eggerman TL, Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Kurlander R, Patterson AP. 2017. Heat shock proteins stimulate APOBEC-3–mediated cytidine deamination in the hepatitis B virus. *J Biol Chem* **292**:13459–13479. doi:10.1074/jbc.M116.760637

Colomer-Lluch M, Castro-Gonzalez S, Serra-Moreno R. 2020. Ubiquitination and SUMOylation in HIV Infection: Friends and Foes. *Current Issues in Molecular Biology* **35**:159–194. doi:10.21775/cimb.035.159

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**:93–96. doi:10.1038/35050618

Covino DA, Gauzzi MC, Fantuzzi L. 2018. Understanding the regulation of APOBEC3 expression: Current evidence and much to learn. *Journal of Leukocyte Biology* **103**:433–444. doi:10.1002/JLB.2MR0717-310R

Dai Q, Zhang C, Wu Y, McDonough H, Whaley RA, Godfrey V, Li H-H, Madamanchi N, Xu W, Neckers L, Cyr D, Patterson C. 2003a. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *The EMBO Journal* **22**:5446–5458. doi:10.1093/emboj/cdg529

Dai Q, Zhang C, Wu Y, McDonough H, Whaley RA, Godfrey V, Li H-H, Madamanchi N, Xu W, Neckers L, Cyr D, Patterson C. 2003b. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J* **22**:5446–5458. doi:10.1093/emboj/cdg529

Drillien R, Pradeau-Aubreton K, Batisse J, Mezher J, Schenckbecher E, Marguin J, Ennifar E, Ruff M. 2022. Efficient production of protein complexes in mammalian cells using a poxvirus vector. *PLOS ONE* **17**:e0279038. doi:10.1371/journal.pone.0279038

Farrow MA, Kim E-Y, Wolinsky SM, Sheehy AM. 2011. NFAT and IRF Proteins Regulate Transcription of the Anti-HIV Gene, APOBEC3G. *J Biol Chem* **286**:2567–2577. doi:10.1074/jbc.M110.154377

Ferreira JV, Fôfo H, Bejarano E, Bento CF, Ramalho JS, Girão H, Pereira P. 2013. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **9**:1349–1366. doi:10.4161/auto.25190

Ferreira JV, Soares AR, Ramalho JS, Pereira P, Girao H. 2015. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep* **5**:10210. doi:10.1038/srep10210

Gallois-Montbrun S, Holmes RK, Swanson CM, Fernández-Ocaña M, Byers HL, Ward MA, Malim MH. 2008. Comparison of Cellular Ribonucleoprotein Complexes Associated with the APOBEC3F and APOBEC3G Antiviral Proteins. *Journal of Virology* **82**:5636–5642. doi:10.1128/JVI.00287-08

Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH. 2007. Antiviral Protein APOBEC3G Localizes to Ribonucleoprotein Complexes Found in P Bodies and Stress Granules. *J Virol* **81**:2165–2178. doi:10.1128/JVI.02287-06

Gebauer F, Grskovic M, Hentze MW. 2003. Drosophila Sex-Lethal Inhibits the Stable Association of the 40S Ribosomal Subunit with msl-2 mRNA. *Molecular Cell* **11**:1397–1404. doi:10.1016/S1097-2765(03)00176-X

Greenwood EJ, Matheson NJ, Wals K, van den Boomen DJ, Antrobus R, Williamson JC, Lehner PJ. 2016. Temporal proteomic analysis of HIV infection reveals remodelling of the host phosphoproteome by lentiviral Vif variants. *eLife* **5**:e18296. doi:10.7554/eLife.18296

Gregori J, Sanchez A, Villanueva J. 2014. msmsEDA: Exploratory Data Analysis of LC-MS/MS data by spectral counts. *R Package Version 1120*.

Guerrero S, Libre C, Batisse J, Mercenne G, Richer D, Laumond G, Decoville T, Moog C, Marquet R, Paillart J-C. 2016. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Sci Rep* **6**:39507. doi:10.1038/srep39507

Gurer C, Cimarelli A, Luban J. 2002. Specific Incorporation of Heat Shock Protein 70 Family Members into Primate Lentiviral Virions. *Journal of Virology* **76**:4666–4670. doi:10.1128/jvi.76.9.4666-4670.2002

Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH. 2003. DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell* **113**:803–809. doi:10.1016/S0092-8674(03)00423-9

Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart J-C, Marquet R. 2009. Tumultuous Relationship between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Infectivity Factor (Vif) and the Human APOBEC-3G and APOBEC-3F Restriction Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. doi:10.1128/mmbr.00040-08

Hodge K, Have ST, Hutton L, Lamond AI. 2013. Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *Journal of Proteomics*, Special Issue: New Horizons and Applications for Proteomics [EuPA 2012] **88**:92–103. doi:10.1016/j.jprot.2013.02.023

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2008. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**:44.

Hwang JR, Zhang C, Patterson C. 2005. C-terminus of heat shock protein 70– interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1– dependent apoptosis. *Cell Stress Chaperones* **10**:147–156. doi:10.1379/CSC-90R.1

Ikeda T, Shimizu R, Nasser H, Carpenter MA, Cheng AZ, Brown WL, Sauter D, Harris RS. 2023. APOBEC3 degradation is the primary function of HIV-1 Vif determining virion infectivity in the myeloid cell line THP-1. *mBio* **0**:e00782-23. doi:10.1128/mbio.00782-23

Ito F, Alvarez-Cabrera AL, Liu S, Yang H, Shiriaeva A, Zhou ZH, Chen XS. 2023. Structural basis for HIV-1 antagonism of host APOBEC3G via Cullin E3 ligase. *Science Advances* **9**:eade3168. doi:10.1126/sciadv.ade3168

Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K, Levin JG. 2006. Biochemical Activities of Highly Purified, Catalytically Active Human APOBEC3G: Correlation with Antiviral Effect. *Journal of Virology*. doi:10.1128/jvi.02680-05

Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E, Li M, Anderson BD, Yen L, Stanley D, Mahon C, Kane J, Franks-Skiba K, Cimermancic P, Burlingame A, Sali A, Craik CS, Harris RS, Gross JD, Krogan NJ. 2011. Vif hijacks CBF-β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **481**:371–375. doi:10.1038/nature10693

Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C. 2001. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276**:42938–42944. doi:10.1074/jbc.M101968200

Karczewski MK, Strebel K. 1996. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol*.

Kim DY, Kwon E, Hartley PD, Crosby DC, Mann S, Krogan NJ, Gross JD. 2013. CBFβ Stabilizes HIV Vif to Counteract APOBEC3 at the Expense of RUNX1 Target Gene Expression. *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2012.12.012

Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, Will B, Cuervo AM. 2019. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLOS Biology* **17**:e3000301. doi:10.1371/journal.pbio.3000301

Koochaki SHJ, Słabicki M, Lumpkin R, Zou C, Belizaire R, Fischer ES, Ebert BL. 2022. A STUB1 ubiquitin ligase/CHIC2 protein complex negatively regulates the IL-3, IL-5, and GM-CSF cytokine receptor common β chain (CSF2RB) protein stability. *Journal of Biological Chemistry* **298**. doi:10.1016/j.jbc.2022.102484

Kouno T, Shibata S, Shigematsu M, Hyun J, Kim TG, Matsuo H, Wolf M. 2023. Structural insights into RNA bridging between HIV-1 Vif and antiviral factor APOBEC3G. *Nat Commun* **14**:4037. doi:10.1038/s41467-023-39796-5

Kozak SL, Marin M, Rose KM, Bystrom C, Kabat D. 2006. The Anti-HIV-1 Editing Enzyme APOBEC3G Binds HIV-1 RNA and Messenger RNAs That Shuttle between Polysomes and Stress Granules. *J Biol Chem* **281**:29105–29119. doi:10.1074/jbc.M601901200

Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**:654–657. doi:10.1038/nature10117

Li L, Xin H, Xu X, Huang M, Zhang X, Chen Y, Zhang S, Fu X-Y, Chang Z. 2004. CHIP Mediates Degradation of Smad Proteins and Potentially Regulates Smad-Induced Transcription. *Mol Cell Biol* **24**:856–864. doi:10.1128/MCB.24.2.856-864.2004

Li X, Huang M, Zheng H, Wang Y, Ren F, Shang Y, Zhai Y, Irwin DM, Shi Y, Chen D, Chang Z. 2008. CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biol* **181**:959–972. doi:10.1083/jcb.200711044

Li Y-L, Langley CA, Azumaya CM, Echeverria I, Chesarino NM, Emerman M, Cheng Y, Gross JD. 2023. The structural basis for HIV-1 Vif antagonism of human APOBEC3G. *Nature* **615**:728–733. doi:10.1038/s41586-023-05779-1

Libre C, Seissler T, Guerrero S, Batisse J, Verriez C, Stupfler B, Gilmer O, Cabrera-Rodriguez R, Weber MM, Valenzuela-Fernandez A, Cimarelli A, Etienne L, Marquet R, Paillart J-C. 2022. A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor. *Biomedicines* **10**:13. doi:10.3390/biomedicines10010013

Liu W, Newhall KP, Khani F, Barlow L, Nguyen D, Gu L, Eng K, Bhinder B, Uppal M, Récapet C, Sboner A, Ross SR, Elemento O, Chelico L, Faltas BM. 2023. The Cytidine Deaminase APOBEC3G Contributes to Cancer Mutagenesis and Clonal Evolution in Bladder Cancer. *Cancer Research* **83**:506–520. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-2912

Lomakin IB, Stolboushkina EA, Vaidya AT, Zhao C, Garber MB, Dmitriev SE, Steitz TA. 2017. Crystal Structure of the Human Ribosome in Complex with DENR-MCT-1. *Cell Reports* **20**:521–528. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.025

Luan H, Mohapatra B, Bielecki TA, Mushtaq I, Mirza S, Jennings TA, Clubb RJ, An W, Ahmed D, El-Ansari R, Storck MD, Mishra NK, Guda C, Sheinin YM, Meza JL, Raja S, Rakha EA, Band V, Band H. 2018. Loss of the Nuclear Pool of Ubiquitin Ligase CHIP/STUB1 in Breast Cancer Unleashes the MZF1-Cathepsin Pro-oncogenic Program. *Cancer*

Research **78**:2524–2535. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2140

Maan M, Pati U. 2018. CHIP promotes autophagy-mediated degradation of aggregating mutant p53 in hypoxic conditions. *The FEBS Journal* **285**:3197–3214. doi:10.1111/febs.14602

Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. doi:10.1038/nature01709

Marin M, Golem S, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. 2008. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Functionally Interacts with Diverse APOBEC3 Cytidine Deaminases and Moves with Them between Cytoplasmic Sites of mRNA Metabolism. *Journal of Virology*. doi:10.1128/jvi.01078-07

Medenbach J, Seiler M, Hentze MW. 2011. Translational Control via Protein-Regulated Upstream Open Reading Frames. *Cell* **145**:902–913. doi:10.1016/j.cell.2011.05.005

Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. 2004. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* **18**:2861–2866. doi:10.1101/gad.1249904

Mehle A, Thomas ER, Rajendran KS, Gabuzda D. 2006. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* **281**:17259–17265. doi:10.1074/jbc.M602413200

Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriet S, Paillart J-C, Marquet R. 2010. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* **38**:633–646. doi:10.1093/nar/gkp1009

Millan ICR, Squillace ALA, Gava LM, Ramos CHI. 2013. The stability of wild-type and deletion mutants of human C-terminus Hsp70-interacting protein (CHIP). *Protein Pept Lett* **20**:524–529. doi:10.2174/0929866511320050005

Muckenfuss H, Kaiser JK, Krebil E, Battenberg M, Schwer C, Cichutek K, Münk C, Flory E. 2007. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res* **35**:3784–3796. doi:10.1093/nar/gkm340

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263–267. doi:10.1126/science.272.5259.263

Narayan V, Landré V, Ning J, Hernychova L, Muller P, Verma C, Walkinshaw MD, Blackburn EA, Ball KL. 2015. Protein–Protein Interactions Modulate the Docking-Dependent E3-Ubiquitin Ligase Activity of Carboxy-Terminus of Hsc70-Interacting Protein (CHIP). *Mol Cell Proteomics* **14**:2973–2987. doi:10.1074/mcp.M115.051169

Narayan V, Pion E, Landré V, Müller P, Ball KL. 2011. Docking-dependent Ubiquitination of the Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by the Ubiquitin Ligase CHIP*. *Journal of Biological Chemistry* **286**:607–619. doi:10.1074/jbc.M110.153122

Nguyen K-L, llano M, Akari H, Miyagi E, Poeschla EM, Strebel K, Bour S. 2004. Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology* **319**:163–175. doi:10.1016/j.virol.2003.11.021

Nguyen Quang N, Goudey S, Ségéral E, Mohammad A, Lemoine S, Blugeon C, Versapuech M, Paillart J-C, Berlioz-Torrent C, Emiliani S, Gallois-Montbrun S. 2020. Dynamic nanopore long-read sequencing analysis of HIV-1 splicing events during the early steps of infection. *Retrovirology* **17**:25. doi:10.1186/s12977-020-00533-1

Nikolay R, Wiederkehr T, Rist W, Kramer G, Mayer MP, Bukau B. 2004. Dimerization of the Human E3 Ligase CHIP via a Coiled-coil Domain Is Essential for Its Activity*. *Journal of Biological Chemistry* **279**:2673–2678. doi:10.1074/jbc.M311112200

Nishimura T, Wada T, Yamamoto KT, Okada K. 2005. The Arabidopsis STV1 Protein, Responsible for Translation Reinitiation, Is Required for Auxin-Mediated Gynoecium Patterning. *The Plant Cell* **17**:2940–2953. doi:10.1105/tpc.105.036533

Oliveros J-C. 2007. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. *https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html*.

Ospina Stella A, Turville S. 2018. All-Round Manipulation of the Actin Cytoskeleton by HIV. *Viruses* **10**:63. doi:10.3390/v10020063

Park H-S, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA. 2001. A Plant Viral "Reinitiation" Factor Interacts with the Host Translational Machinery. *Cell* **106**:723–733. doi:10.1016/S0092-8674(01)00487-1

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.

Rosen CA, Sodroski JG, Campbell K, Haseltine WA. 1986. Construction of recombinant murine retroviruses that express the human T-cell leukemia virus type II and human T-cell lymphotropic virus type III trans activator genes. *J Virol* **57**:379–384.

Santos S, Obukhov Y, Nekhai S, Bukrinsky M, Iordanskiy S. 2012. Virus-producing cells determine the host protein profiles of HIV-1 virion cores. *Retrovirology* **9**:65. doi:10.1186/1742-4690-9-65

Schatz M, Marty L, Ounadjela C, Tong PBV, Cardace I, Mettling C, Milhiet P-E, Costa L, Godefroy C, Pugnière M, Guichou J-F, Mesnard J-M, Blaise M, Beaumelle B. 2023. A Tripartite Complex HIV-1 Tat-Cyclophilin A-Capsid Protein Enables Tat Encapsidation That Is Required for HIV-1 Infectivity. *J Virol* **97**:e0027823. doi:10.1128/jvi.00278-23

Schleich S, Strassburger K, Janiesch PC, Koledachkina T, Miller KK, Haneke K, Cheng Y-S, Küchler K, Stoecklin G, Duncan KE, Teleman AA. 2014. DENR–MCT-1 promotes translation re-initiation downstream of uORFs to control tissue growth. *Nature* **512**:208–212. doi:10.1038/nature13401

Seissler T, Marquet R, Paillart J-C. 2017. Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins. *Viruses* **9**:322. doi:10.3390/v9110322

Sha Y, Rao L, Settembre C, Ballabio A, Eissa NT. 2017. STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *EMBO J* **36**:2544–2552. doi:10.15252/embj.201796699

Shang Y, Zhao X, Xu X, Xin H, Li X, Zhai Y, He D, Jia B, Chen W, Chang Z. 2009. CHIP functions an E3 ubiquitin ligase of Runx1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **386**:242–246. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.043

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646–650. doi:10.1038/nature00939

Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature Medicine* **9**:1404–1407. doi:10.1038/nm945

Shi C, Rubel C, Soss SE, Sanchez-Hodge R, Zhang S, Madrigal SC, Ravi S, McDonough H, Page RC, Chazin WJ, Patterson C, Mao C, Willis MS, Luo H-Y, Li Y, Stevens DA, Tang M, Du P, Wang Y, Hu Z, Xu Y, Schisler JC. 2018. Disrupted structure and aberrant function of CHIP mediates the loss of motor and cognitive function in preclinical models of SCAR16. *PLOS Genetics* **14**:e1007664. doi:10.1371/journal.pgen.1007664

Shin Y, Klucken J, Patterson C, Hyman BT, McLean PJ. 2005. The Co-chaperone Carboxyl Terminus of Hsp70-interacting Protein (CHIP) Mediates α-Synuclein Degradation Decisions between Proteasomal and Lysosomal Pathways*. *Journal of Biological Chemistry* **280**:23727–23734. doi:10.1074/jbc.M503326200

Simon JH, Fouchier RA, Southerling T E, Guerra C B, Grant C K, Simon JHM, Fouchier RONAM, Southerling Tamara E, Guerra Carolyn B, Grant Chris K, Malim MH. 1997. The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *Journal of virology*.

Simon JH, Southerling TE, Peterson JC, Meyer BE, Malim MH. 1995. Complementation of vif-defective human immunodeficiency virus type 1 by primate, but not nonprimate, lentivirus vif genes. *Journal of Virology* **69**:4166–4172. doi:10.1128/jvi.69.7.4166-4172.1995

Sleiman D, Bernacchi S, Xavier Guerrero S, Brachet F, Larue V, Paillart J-C, Tisne C. 2014. Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein. Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA biology* **11**:906–920. doi:10.4161/rna.29546

Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. 2003. HIV-1 Vif Blocks the Antiviral Activity of APOBEC3G by Impairing Both Its Translation and Intracellular Stability. *Molecular Cell* **12**:591–601. doi:10.1016/S1097-2765(03)00353-8

Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. 2011. Heat Shock Protein 70 Inhibits HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination and Degradation of APOBEC3G*. *Journal of Biological Chemistry* **286**:10051–10057. doi:10.1074/jbc.M110.166108

Svarovskaia ES, Xu H, Mbisa JL, Barr R, Gorelick RJ, Ono A, Freed EO, Hu W-S, Pathak VK. 2004. Human Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme-catalytic Polypeptide-like 3G (APOBEC3G) Is Incorporated into HIV-1 Virions through Interactions with Viral and Nonviral RNAs. *J Biol Chem* **279**:35822–35828. doi:10.1074/jbc.M405761200

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering C von. 2019. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* **47**:D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131

Usmani SM, Murooka TT, Deruaz M, Koh WH, Sharaf RR, Di Pilato M, Power KA, Lopez P, Hnatiuk R, Vrbanac VD, Tager AM, Allen TM, Luster AD, Mempel TR. 2019. HIV-1 Balances the Fitness Costs and Benefits of Disrupting the Host Cell Actin Cytoskeleton Early after Mucosal Transmission. *Cell Host & Microbe* **25**:73-86.e5. doi:10.1016/j.chom.2018.12.008

Wichroski MJ, Robb GB, Rana TM. 2006. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathogens*. doi:10.1371/journal.ppat.0020041

Xu W, Marcu M, Yuan X, Mimnaugh E, Patterson C, Neckers L. 2002. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12847–12852. doi:10.1073/pnas.202365899

Yamashiro S, Yamakita Y, Totsukawa G, Goto H, Kaibuchi K, Ito M, Hartshorne DJ, Matsumura F. 2008. Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1 Regulates Mitosis by Antagonizing Polo-like Kinase 1. *Developmental Cell* **14**:787–797. doi:10.1016/j.devcel.2008.02.013

Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu X-F. 2003a. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**:1056–1060. doi:10.1126/science.1089591

Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. 2003b. Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science*. doi:10.1126/science.1089591

Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*. doi:10.1038/nature01707

Zhang M, Windheim M, Roe SM, Peggie M, Cohen P, Prodromou C, Pearl LH. 2005. Chaperoned Ubiquitylation—Crystal Structures of the CHIP U Box E3 Ubiquitin Ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a Complex. *Molecular Cell* **20**:525–538. doi:10.1016/j.molcel.2005.09.023

Zhou P, Fernandes N, Dodge IL, Reddi AL, Rao N, Safran H, DiPetrillo TA, Wazer DE, Band V, Band H. 2003. ErbB2 Degradation Mediated by the Co-chaperone Protein CHIP*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:13829–13837. doi:10.1074/jbc.M209640200

Supplementary material

Supplementary methods

Co-immunoprecipitation of endogenous partners without cross-linking. HEK-293T cells were seeded in 10-cm dishes at $2.5.10^6$ cells per dish. After 16-18 h of seeding, cells were transfected with 0.4 µg of pCMV-A3G and 4 µg of pcDNA-Ø or pcDNA-Vif-FLAG. 10 h after transfection, cells were treated with 25 µM ALLN. 24 h after transfection, cells were washed once with PBS (Life Technologies), then 250 µl of of RIPA 1x was used to lyse cells as explained in "material & methods". 900 µg protein G Dynabeads (Invitrogen) per sample were washed 3 times with RIPA 1x, then resuspended in 30 µl RIPA 1x. Two µg of anti-FLAG M2 mouse monoclonal antibody (F1804, Sigma) were added and incubated for 2 h at room temperature under rotation. Then beads were washed with RIPA 1x, resuspended in the cellular lysate (around 1.5 mg per sample) and incubated at 4°C for 2 h under rotation. Beads were washed 5 times with RIPA 1x and bound proteins were eluted in WB buffer (1x NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), 1x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)) at 70°C for 10 min. The supernatant was recovered and analyzed by western blotting.

Co-immunoprecipitation of endogenous partners with crosslinking. HEK-293T cells were seeded into 10 cm-dishes at 2.5 million cells per dish in a final volume of 5 ml DMEM medium (Life Technologies; supplemented with 10% fetal calf serum (Pan Biotech), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies)). Cells were incubated at 37°C and 5% CO_2. Cells were transfected with expression plasmids around 16-18 h after their seeding with 0.4 µg of pCMV-A3G and 4 µg of pcDNA-Vif-FLAG per dish. The total amount of plasmid is adjusted to 4.4 µg using the pcDNA-Ø. 10 h after transfection, cells were treated with 25 µM ALLN. 24 h after transfection, cells were washed twice with cold PBSCM buffer (PBS (Life Technologies) supplemented with 0.1 mM $CaCl_2$ and 1 mM $MgCl_2$), and then incubated for 6 h at 4°C in PBSCM supplemented with 1 mM dithiobis-succinimidyl-propionate (DSP, ThermoFisher). PBSCM-DSP was discarded and cells were incubated for 15 min at 4°C in PBSCM supplemented with 20 mM Tris (pH 7.5). Cells were washed twice with cold PBSCM buffer and then incubated for 30 min at 4°C in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton x100, 1 x Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoScientific)). Cells were spun down at 17,000 × g for 15 min at 4°C and the supernatant was recovered (Around 1.5 mg per sample). 60 µl of Pierce anti-DYKDDDDK Magnetic Agarose Beads (Invitrogen) were used per sample. Beads were washed 3 times with PBS, resuspended with the cell lysate and incubated overnight at 4°C under rotation. Beads were washed 5 times with washing buffer (50 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton x100) and once with PBS,

then incubated at 37°C for 15 min in 2x LDS Sample Buffer (NuPage) supplemented with 50 mM DTT. The supernatant was recovered and analyzed by western blotting.

Supplementary figures

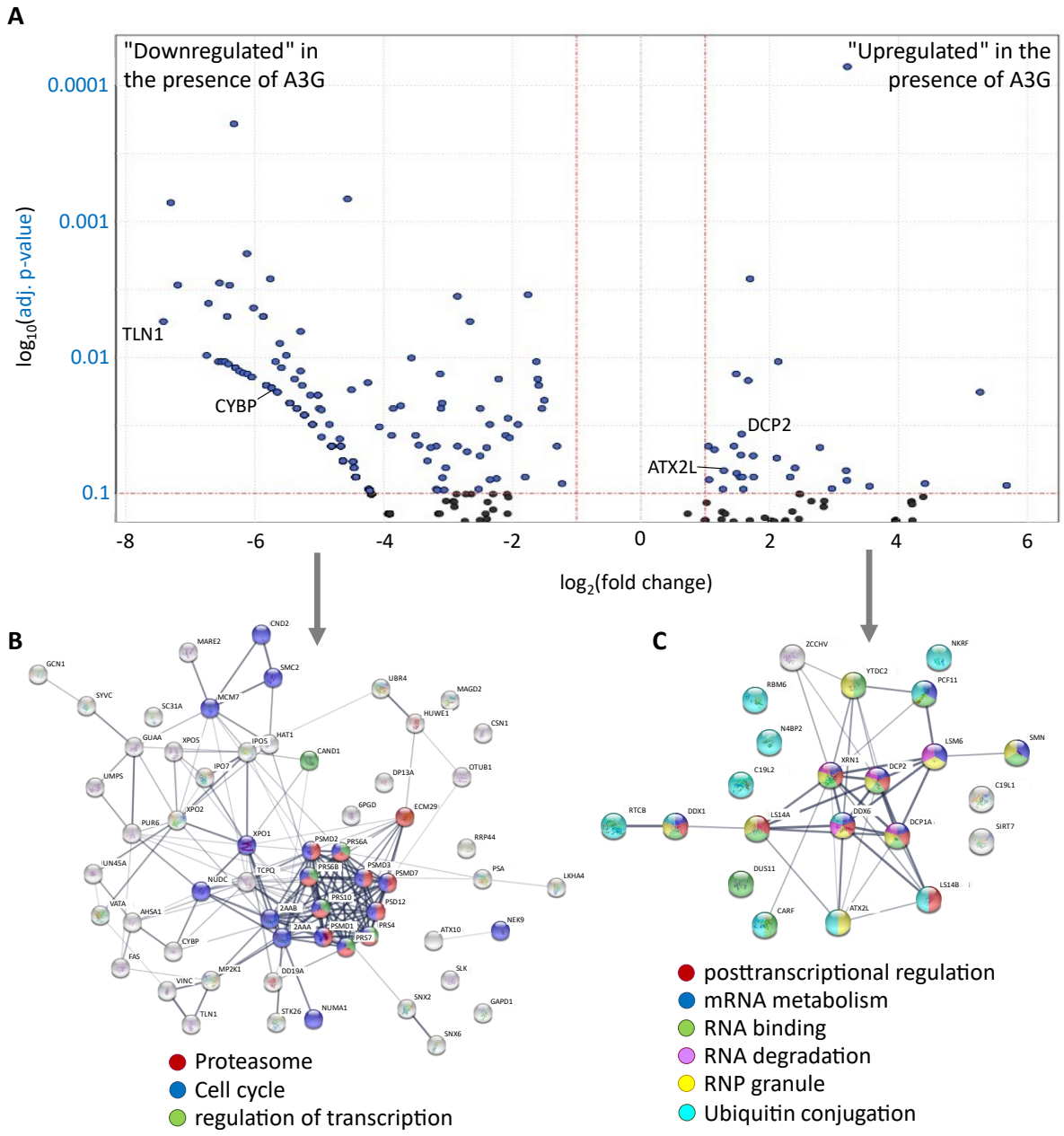
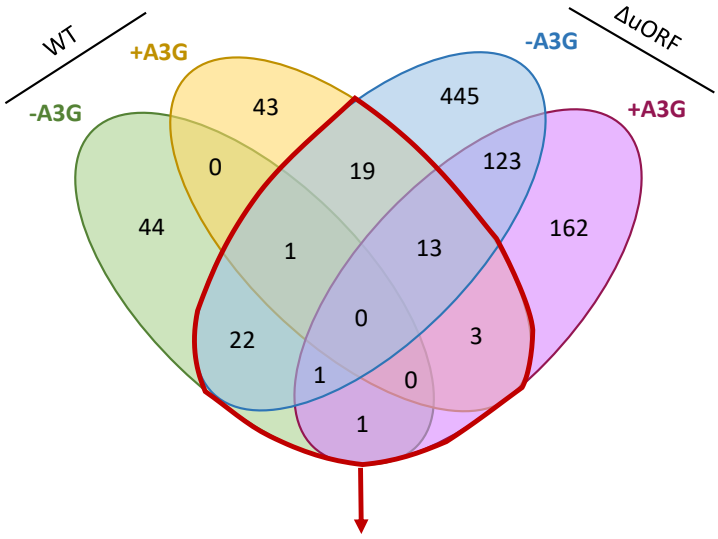


Figure S1: Effect of A3G protein on A3G mRNA interactome. A3G protein was expressed in cells with a ΔUTR construct. (**A**) Differential association of proteins with A3G mRNA in the presence and absence of A3G protein analyzed by a generalized linear model of a negative-binomial distribution. Proteins with a positive log2(fold change) are upregulated in the presence of A3G, while a negative log2(fold change) indicates downregulation in the presence of A3G. P-values are adjusted using the Bejamini-Hochberg method and the threshold of a p-value of 0.1 is indicated as a red line. Proteins (**B**) downregulated or (**C**) upregulated in the presence of A3G are represented as a string diagram. The thickness of lines indicates the confidence of association of the linked proteins. Proteins involved in some of the most represented functional clusters are colored as indicated.

Effect of A3G protein on the interactome composition. A total of 83 proteins bound to A3G mRNA changed significantly when A3G-ΔUTR. was expressed in HEK-293T cells (**Figure 2A; Supplementary Table 1**). The binding of 61 of these proteins to A3G mRNA seems to be negatively regulated by the addition of A3G protein. Amongst these proteins are many components of the proteasome and proteins implicated in cell cycle control (**Figure 2B**). In turn, 22 proteins are upregulated upon addition of A3G protein and amongst these are many factors involved in ubiquitin conjugation as well as several RNA binding proteins involved in RNA degradation, post-transcriptional regulation and RNA metabolism (**Figure 2C**). Some of these proteins are also components of RNP granules found in the cytoplasm like P-bodies or stress-granules. Overall, the A3G protein seems to significantly influence the interactome of its own mRNA, which might contribute to regulation of essential processes for its own expression.



1433S_HUMAN	DREB_HUMAN	PKP1_HUMAN
ACTN1_HUMAN	DSC1_HUMAN	PLAK_HUMAN
ACTN2_HUMAN	DSG1_HUMAN	SEPT2_HUMAN
ACTN4_HUMAN	FILA_HUMAN	SPB3_HUMAN
ARP3_HUMAN	FILA2_HUMAN	SPTB2_HUMAN
CAPZB_HUMAN	FLNA_HUMAN	SPTN1_HUMAN
CARF_HUMAN	FLNB_HUMAN	TPM3_HUMAN
CAZA1_HUMAN	FLNC_HUMAN	TPM4_HUMAN
CLAP2_HUMAN	IFIT5_HUMAN	WDR33_HUMAN
CNOT1_HUMAN	LIMA1_HUMAN	WDR91_HUMAN
COF1_HUMAN	LRC40_HUMAN	ZO2_HUMAN
CSRP2_HUMAN	MYH11_HUMAN	21 Keratins
DCP2_HUMAN	MYL6_HUMAN	
DESP_HUMAN	MYPT1_HUMAN	

Figure S2: Comparison of proteins whose association with WT and ΔuORF mRNA is regulated by Vif. Pull-down of proteins on WT and ΔuORF A3G mRNA has allowed identification of proteins that seem to be regulated by Vif in the presence or absence of A3G. Proteins that are regulated both on WT and ΔuORF A3G mRNA are indicated in the table below.

Effect of the uORF on proteins regulated by Vif. Previous studies have identified a short upstream ORF (uORF) in the 5'-UTR of A3G mRNA, and Vif-mediated translational inhibition of A3G has been shown to depend on the presence of this uORF (Libre et al., 2022). In order to gain a deeper insight into Vif-mediated translation regulation of A3G, the pull-down of cellular proteins in the presence and absence of Vif and A3G protein has therefore been repeated with a ΔuORF A3G mRNA. The proteins whose association with the ΔuORF A3G mRNA seemed to be modulated by Vif were compared to those obtained for WT A3G mRNA. Preliminary results suggest that amongst the 147 proteins regulated by Vif on WT A3G mRNA, 60 were also found to be regulated in the absence of the uORF (**Figure 5**, circled in red). Overall, the uORF seems to have a significant impact on the interactome of A3G mRNA.

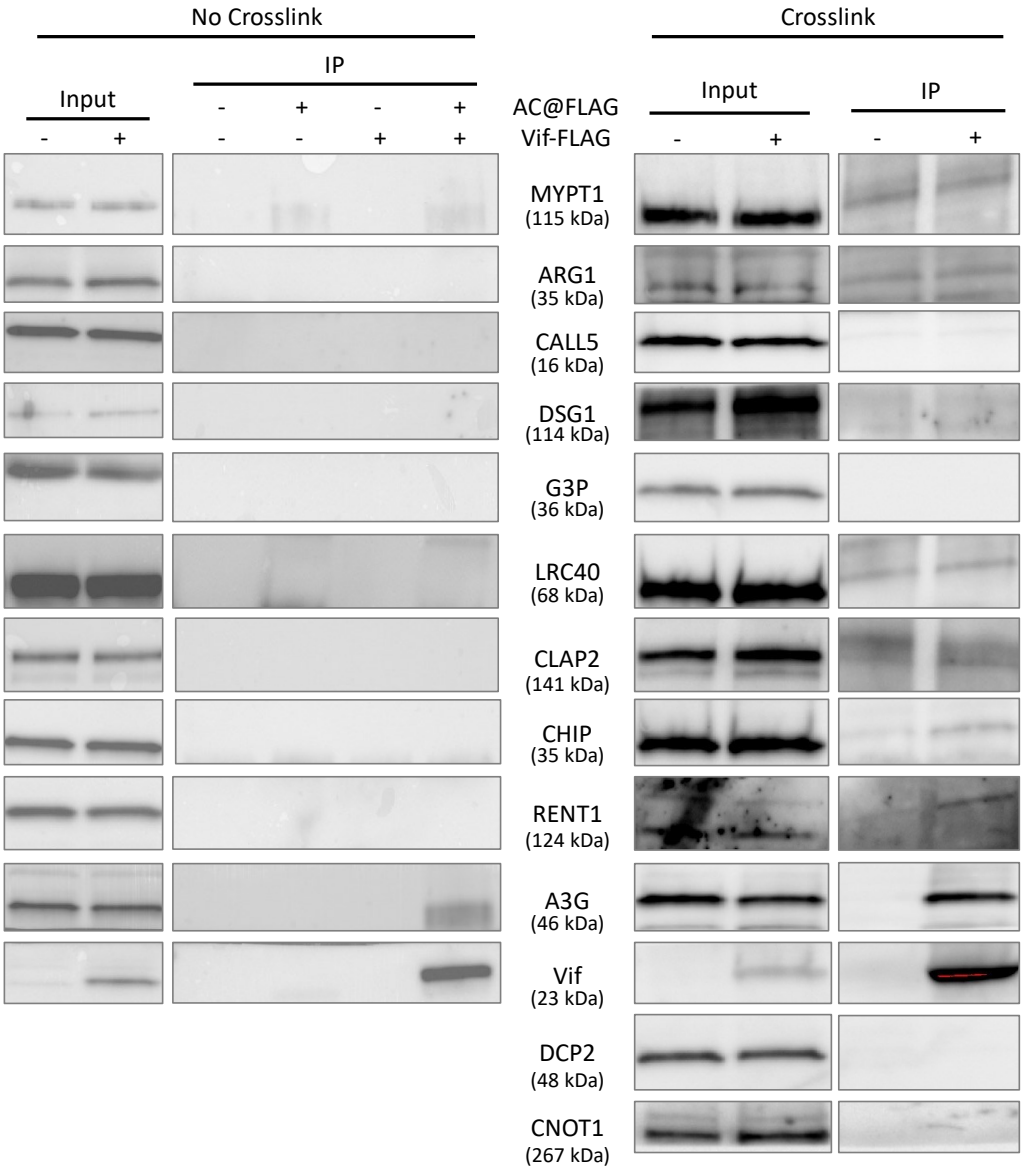


Figure S3: Interaction of Vif with selected proteins. Cells were transfected or not to express a FLAG-tagged version of Vif as indicated. Cellular proteins were cross-linked or not and then immunoprecipitated using an @FLAG antibody. The input as well as the immunoprecipitated (IP) samples were analyzed by western blot.

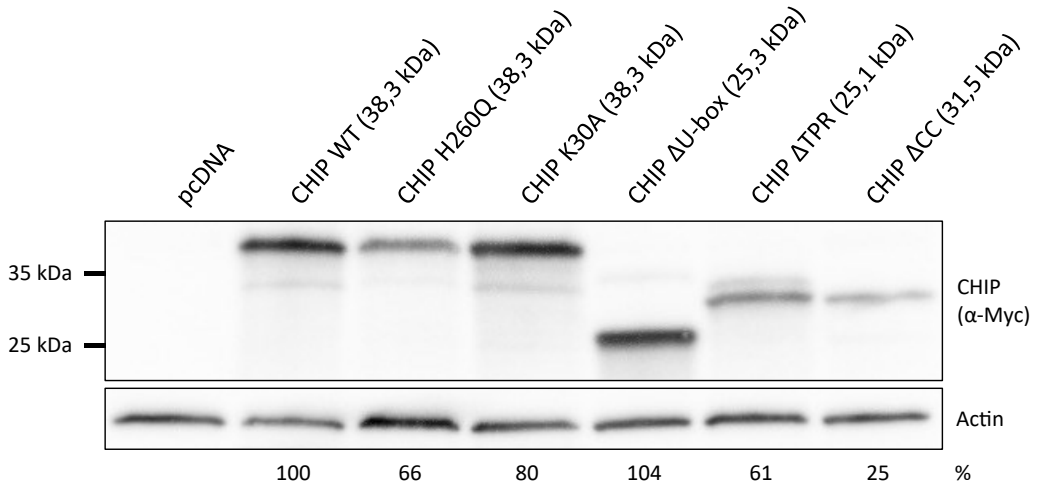


Figure S4: Differential expression of CHIP mutants. HEK-293T cells were transfected with 2 µg plasmids expressing WT or mutated CHIP-myc constructs. Cells were lysed after 24 h, then proteins were separated by SDS/PAGE and analyzed by WB. Expected molecular weight (taking into account tags and linkers regions) of each protein is indicated on top of associated condition. Total actin is shown under each experimental condition and serve as loading control. Bands were quantified using Image J, normalized with actin signal, and relative expression (in %) of CHIP proteins to the WT is indicated under the WB. n=1.

Globally CHIP mutants are correctly expressed, however expression levels seem to vary depending on the construct. These differences could be due to protein instability and a shorter half-life of the protein, especially for the deletion mutants. mRNA levels and stability have not been examined. Protein displayed expected size, except for ΔTPR mutant that seems heavier, around 31.5 kDA, as ΔCC. Plasmid map were confirmed by sequencing. This discrepancy may be due to post-translational modifications. Protein functionality (i.e. Hsp/substrat binding, dimerization, E3-ligase activity) was not verified by ourselves, but these mutants have been extensively used in the literature, and more especially K30A and H260Q mutants (Narayan et al., 2015; Shi et al., 2018; Zhou et al., 2003). For some deletion mutants, it seems that stability or dimerization-capacity was indeed adversely affected (Millan et al., 2013).

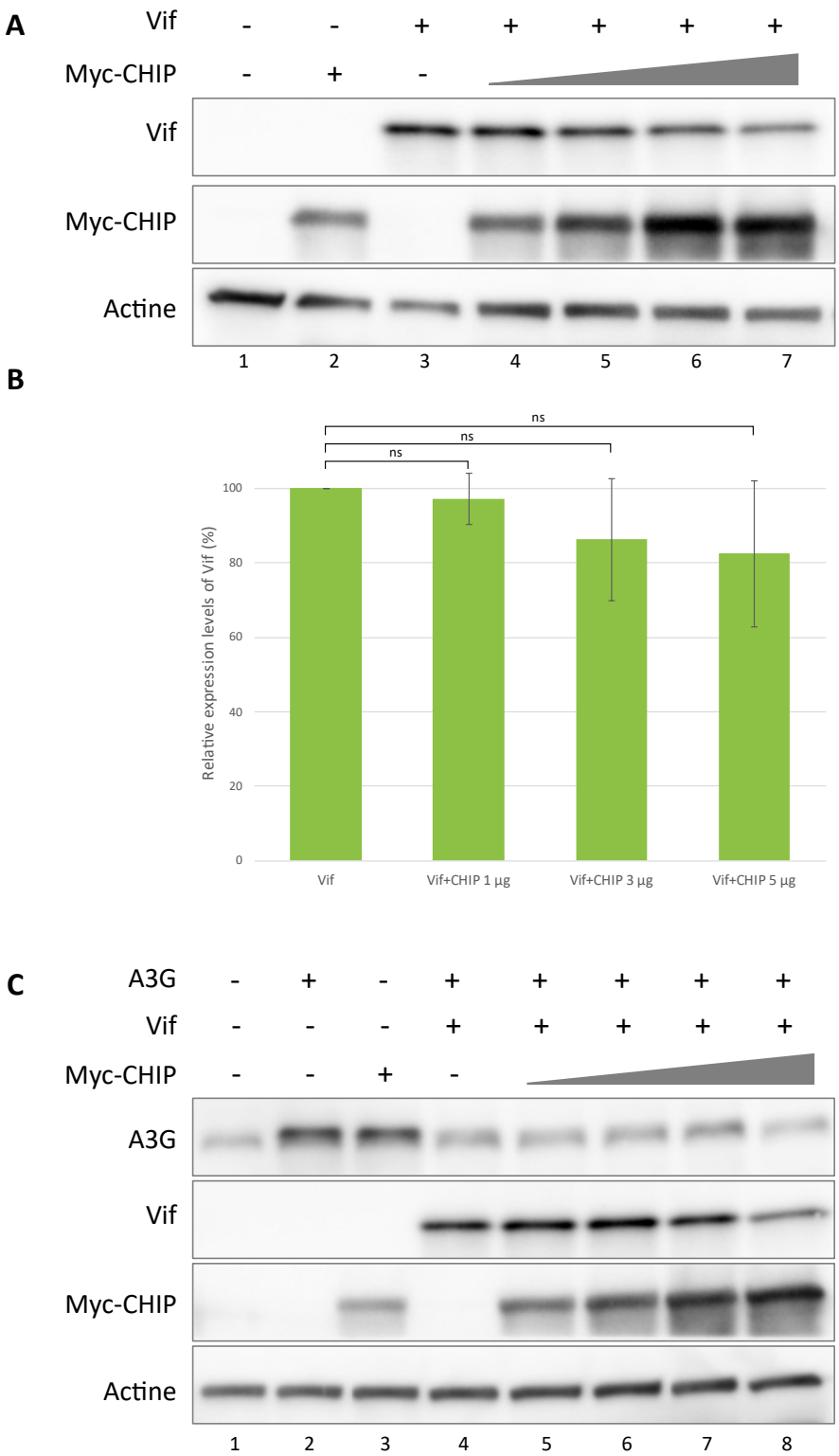


Figure S5: CHIP does not affect Vif expression. (**A**) A fixed quantity of Vif plasmid was transfected in HEK-293T cells along with increasing quantities of CHIP WT (0.5, 1, 3, 5 µg) and protein levels were analyzed by WB. Representative images of at least three independent experiments are shown. (**B**) Protein signals were quantified with ImageJ software and relative expression of Vif protein is represented. Vif signals were normalized to actin. Reference Vif level, when the protein is expressed alone, was set to 100%. Vif level in conditions of interest were compared to reference. Data represent the mean ± S.D of at least three independent experiments Two-tailed, unpaired Student's t-test p-values are indicated as follows: ns (not significant): >0.05. (**C**) Experiment was performed as in (**A**) along with A3G expression.

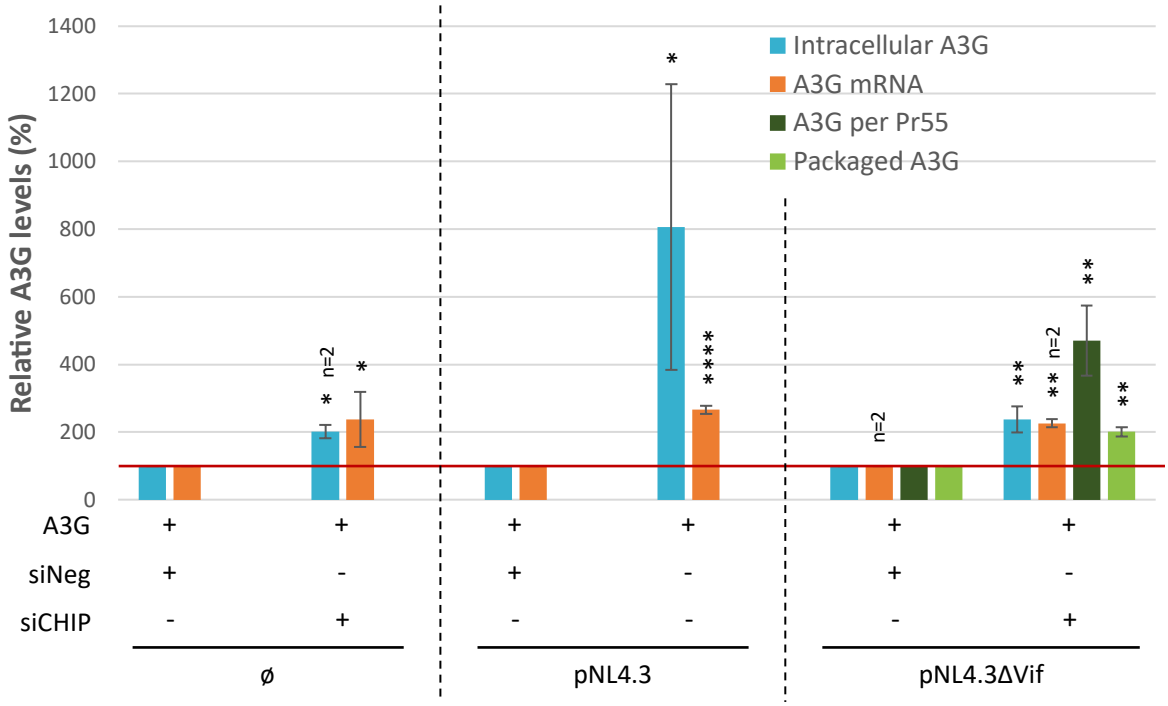


Figure S6: Full-scale histogram of Figure 8B.

Supplementary table 1: Proteins significantly regulated by the A3G protein. The protein Uniprot ID, Accession, common name and general function are indicated. The log2(fold change) of each protein in the presence of A3G protein as well as the associated adjusted p-value are indicated.

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
2AAA_HUMAN	P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Scaffolding of protein phosphatase 2A	-2.85	4.5E-02
2AAB_HUMAN	P30154	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	Scaffolding of protein phosphatase 2A	-5.51	9.7E-03
6PGD_HUMAN	P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Catalyzes a step in the pentose phosphate metabolic pathway	-4.81	4.5E-02
AHSA1_HUMAN	O95433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	Co-chaperone of HSP90AA1	-6.39	2.9E-03
ATX10_HUMAN	Q9UBB4	Ataxin-10	Role in survival of neurons	-4.56	6.8E-04
ATX2L_HUMAN	Q8WWM7	Ataxin-2-like protein	Regulation of stress granule and P-body formation	1.29	6.8E-02
C19L1_HUMAN	Q69YN2	CWF19-like protein 1	Potential role in splicing	1.54	7.6E-02
C19L2_HUMAN	Q2TBE0	CWF19-like protein 2	Potential role in splicing	1.75	5.3E-02
CAND1_HUMAN	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Assembly factor for SCF E3 ubiquitin ligases	-7.20	2.9E-03
CARF_HUMAN	Q9NXV6	CDKN2A-interacting protein	Regulates DNA damage response	1.55	5.2E-02
CND2_HUMAN	Q15003	Condensin complex subunit 2	Role in mitosis	-5.65	1.8E-02
CSN1_HUMAN	Q13098	COP9 signalosome complex subunit 1	Regulation of SCF-type E3 ubiquitin ligases	-4.81	4.5E-02
CYBP_HUMAN	Q9HB71	Calcyclin-binding protein	Molecular bridge in E3 ubiquitin ligases	-5.74	1.7E-02
DCP1A_HUMAN	Q9NPI6	mRNA-decapping enzyme 1A	Role in decapping and mRNA degradation	1.06	7.9E-02
DCP2_HUMAN	Q8IU60	m7GpppN-mRNA hydrolase	Mediates decapping, necessary for mRNA degradation	1.56	3.7E-02
DD19A_HUMAN	Q9NUU7	ATP-dependent RNA helicase DDX19A	Helicase involved in nulear mRNA export	-5.74	1.7E-02
DDX1_HUMAN	Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Potential role in polyadenylation, sensor of dsRNA for antiviral immunity	1.48	1.3E-02
DDX6_HUMAN	P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	Role in decapping and mRNA degradation	1.49	7.1E-02
DP13A_HUMAN	Q9UKG1	DCC-interacting protein 13-alpha	Involved in multiple signaling pathways	-5.76	2.6E-03
DUS11_HUMAN	O75319	RNA/RNP complex-1-interacting phosphatase	Potential role in mRNA metabolism	1.67	1.5E-02
ECM29_HUMAN	Q5VYK3	Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	Component of the 26S proteasome	-5.35	2.4E-02
FAS_HUMAN	P49327	Fatty acid synthase	Catalyzes formation of long-chain fatty acids	-4.50	1.7E-02
GAPD1_HUMAN	Q14C86	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	Participates in endocytosis and trafficking	-6.33	1.9E-04
GCN1_HUMAN	Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	Involved in repression of global protein synthesis and activation of gene-specific translation	-5.29	6.4E-03
GUAA_HUMAN	P49915	GMP synthase	Biosynthesis of GMP	-5.35	2.4E-02
HAT1_HUMAN	O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	Acetylation of histones	-5.00	2.4E-02
HUWE1_HUMAN	Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	E3 ubiquitin ligase	-6.30	1.2E-02
IPO5_HUMAN	O00410	Importin-5	Nuclear import of NLS-containing proteins	-3.57	1.0E-02
IPO7_HUMAN	O95373	Importin-7	Nuclear import of NLS-containing proteins	-5.82	1.6E-02
LKHA4_HUMAN	P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	Involved in synthesis of leukotriene B4	-4.81	4.5E-02
LS14A_HUMAN	Q8ND56	Protein LSM14 homolog A	Essential for formation of P-bodies	2.39	6.5E-02
LS14B_HUMAN	Q9BX40	Protein LSM14 homolog B	Potential role in translation	2.32	7.6E-02
LSM6_HUMAN	P62312	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	Involved in splicing, potential role in mRNA degradation	2.11	5.5E-02
MAGD2_HUMAN	Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D2	Regulation of NaCl transporters SLC12A1 and A3	-2.21	1.4E-02

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
MARE2_HUMAN	Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2	Role in microtubule stabilization	-4.81	4.5E-02
MCM7_HUMAN	P33993	DNA replication licensing factor MCM7	Role in DNA replication	-5.23	2.6E-02
MP2K1_HUMAN	Q02750	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Component of the Map kinase signal transduction pathway	-5.02	1.9E-02
N4BP2_HUMAN	Q86UW6	NEDD4-binding protein 2	Potential role in DNA repair	5.27	1.8E-02
NEK9_HUMAN	Q8TD19	Serine/threonine-protein kinase Nek9	Role in cell cycle progression	-3.09	2.2E-02
NKRF_HUMAN	O15226	NF-kappa-B-repressing factor	Transcriptional repression of NF-kB responsive genes	1.45	4.5E-02
NUDC_HUMAN	Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	Role in neurogenesis	-6.24	1.3E-02
NUMA1_HUMAN	Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	Binds to microtubules, involved in mitosis	-4.63	5.8E-02
OTUB1_HUMAN	Q96FW1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	Mediates Lys-48-linked deubiquitination	-4.81	4.5E-02
PCF11_HUMAN	O94913	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	Component of the pre-mRNA cleavage complex II	2.78	4.6E-02
PRS10_HUMAN	P62333	26S proteasome regulatory subunit 10B	Component of the 26S proteasome	-5.82	1.6E-02
PRS4_HUMAN	P62191	26S proteasome regulatory subunit 4	Component of the 26S proteasome	-5.46	2.2E-02
PRS6A_HUMAN	P17980	26S proteasome regulatory subunit 6A	Component of the 26S proteasome	-5.10	3.1E-02
PRS6B_HUMAN	P43686	26S proteasome regulatory subunit 6B	Component of the 26S proteasome	-5.82	1.6E-02
PRS7_HUMAN	P35998	26S proteasome regulatory subunit 7	Component of the 26S proteasome	-3.18	4.5E-02
PSA_HUMAN	P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Involved in antigen-processing for MHC-I	-5.82	1.6E-02
PSD12_HUMAN	O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	Component of the 26S proteasome	-5.46	2.2E-02
PSD13_HUMAN	Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Component of the 26S proteasome	-5.74	1.7E-02
PSMD1_HUMAN	Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Component of the 26S proteasome	-6.30	1.2E-02
PSMD2_HUMAN	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Component of the 26S proteasome	-6.18	1.3E-02
PSMD3_HUMAN	O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	Component of the 26S proteasome	-6.05	1.4E-02
PSMD6_HUMAN	Q15008	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	Component of the 26S proteasome	-5.46	2.2E-02
PSMD7_HUMAN	P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	Component of the 26S proteasome	-5.35	2.4E-02
PUR6_HUMAN	P22234	Multifunctional protein ADE2 [Includes: Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	Catalyzes a step in the IMP biosynthesis pathway	-5.46	2.2E-02
RBM6_HUMAN	P78332	RNA-binding protein 6	Binds poly-G RNAs	1.59	9.3E-02
RRP44_HUMAN	Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44	RNA degradation and processing	-6.43	5.0E-03
RTCB_HUMAN	Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	tRNA maturation, may act as an RNA ligase on other RNAs	1.05	4.5E-02
SC31A_HUMAN	O94979	Protein transport protein Sec31A	Role in vesicle transport from the ER	-5.23	2.6E-02
SIR7_HUMAN	Q9NRC8	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-7	Histone deacetylation	2.97	9.2E-02
SLK_HUMAN	Q9H2G2	STE20-like serine/threonine-protein kinase	Involved in apoptosis	-5.23	2.6E-02
SMC2_HUMAN	O95347	Structural maintenance of chromosomes protein 2	Role in mitosis	-6.47	1.1E-02
SMN_HUMAN	Q16637	Survival motor neuron protein	Involved in splicing	1.27	9.3E-02
SNX2_HUMAN	O60749	Sorting nexin-2	Involved in intracellular trafficking	-5.29	1.3E-02
SNX6_HUMAN	Q9UNH7	Sorting nexin-6	Involved in intracellular trafficking	-5.38	1.4E-02

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
STK26_HUMAN	Q9P289	Serine/threonine-protein kinase 26	Involved in cell growth and apoptosis	-5.27	1.6E-02
SYVC_HUMAN	P26640	Valine--tRNA ligase	Ligates valine to its tRNA	-5.65	1.8E-02
TCPQ_HUMAN	P50990	T-complex protein 1 subunit theta	Protein chaperone	-6.72	4.0E-03
TLN1_HUMAN	Q9Y490	Talin-1	Connection of the cytoskeleton to the plasma membrane	-7.42	5.4E-03
UBR4_HUMAN	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	E3-ubiquitin ligase	-5.23	2.6E-02
UMPS_HUMAN	P11172	Uridine 5'-monophosphate synthase	Biosynthesis of UMP	-3.17	9.5E-02
UN45A_HUMAN	Q9H3U1	Protein unc-45 homolog A	Co-chaperone of HSP90	-5.35	2.4E-02
VATA_HUMAN	P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A	Involved in acidification of intracellular compartments	-5.10	3.1E-02
VINC_HUMAN	P18206	Vinculin	Actin binding, involved in cell-cell adhesion	-4.81	4.5E-02
XPO1_HUMAN	O14980	Exportin-1	Nuclear export of NES-containing proteins and certain RNAs	-2.66	5.4E-03
XPO2_HUMAN	P55060	Exportin-2	Mediates export of importin-alpha	-2.70	4.9E-02
XPO5_HUMAN	Q9HAV4	Exportin-5	Nuclear export of dsRNA and proteins containing a dsRNA-binding domain	-4.24	1.5E-02
XRN1_HUMAN	Q8IZH2	5'-3' exoribonuclease 1	mRNA decay	3.21	7.3E-05
YTDC2_HUMAN	Q9H6S0	3'-5' RNA helicase YTHDC2	Involved in degradation of m6A-containing RNAs	1.70	2.6E-03
ZCCHV_HUMAN	Q7Z2W4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Recruits degradation machinery to viral RNAs	1.14	4.8E-02

Supplementary table 2: Proteins significantly regulated by Vif in the absence of the A3G protein. The protein Uniprot ID, Accession, common name and general function are indicated. The log_2(fold change) of each protein in the presence of Vif as well as the associated adjusted p-value are indicated.

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
ACTN4_HUMAN	O43707	Alpha-actinin-4	Involved in actin crosslinking and tight junction formation	9.72	1.6E-03
FLNB_HUMAN	O75369	Filamin-B	Anchoring of the cell membrane and proteins to actin	8.90	1.6E-03
ACTN1_HUMAN	P12814	Alpha-actinin-1	Involved in actin cross-linking	8.80	1.6E-03
DREB_HUMAN	Q16643	Drebrin	Recruitment of CXCR4 to immunological synapse, actin organization	8.15	1.6E-03
FLNA_HUMAN	P21333	Filamin-A	Anchoring of the cell membrane and proteins to actin	8.03	3.7E-03
LIMA1_HUMAN	Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1	Regulation of actin dynamics	7.72	1.6E-03
SPTN1_HUMAN	Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Involved in secretion	7.72	1.6E-03
SPTB2_HUMAN	Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	Involved in secretion	7.57	1.6E-03
CALD1_HUMAN	Q05682	Caldesmon	Interacts with ctin and myosin	7.30	1.6E-03
IQGA1_HUMAN	P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	Regulation of actin dynamics	7.09	1.6E-03
MYH10_HUMAN	P35580	Myosin-10	Involved in cytoskeleton reorganization and the stabilization of CO1A1 and CO1A2 mRNAs, antagonist of MYH9	7.09	1.6E-03
TPM4_HUMAN	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	Stabilization of actin filaments	7.03	1.6E-03
ACTN2_HUMAN	P35609	Alpha-actinin-2	Cross-linking of actin filaments	6.99	1.6E-03
ENAH_HUMAN	Q8N8S7	Protein enabled homolog	Cytoskeleton remodelling	6.89	1.6E-03
MYPT1_HUMAN	O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	Regulates PPP1C, binds to myosin, dephosphorylation of PLK1	6.85	1.6E-03
COR1C_HUMAN	Q9ULV4	Coronin-1C	Cytoskeleton organization, fission of vesicles from endosomal transport	6.82	1.6E-03
COR1B_HUMAN	Q9BR76	Coronin-1B	Cell motility	6.74	1.6E-03
FLNC_HUMAN	Q14315	Filamin-C	Organization of the actin cytoskeleton	6.74	1.6E-03
MYH9_HUMAN	P35579	Myosin-9	Cytoskeleton reorganization, antagonist of MYH10	6.74	1.6E-03
TPM3_HUMAN	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	Stabilization of actin filaments	6.70	1.6E-03
PALLD_HUMAN	Q8WX93	Palladin	Organization of the actin cytoskeleton	6.48	1.6E-03
MY18A_HUMAN	Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa	Cytoskeleton-associated protein that mediates transport of several proteins involved in immunity and inflammation	6.43	1.6E-03
TPM1_HUMAN	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	Stabilization of actin filaments	6.43	1.6E-03
TPM2_HUMAN	P07951	Tropomyosin beta chain	Stabilization of actin filaments	6.38	1.6E-03
VASP_HUMAN	P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	Cytoskeleton remodelling, link with ENAH ?	6.38	1.6E-03
PDLI1_HUMAN	O00151	PDZ and LIM domain protein 1	Recruits proteins like PALLD and ACTN1 to stress fibers	6.32	1.6E-03
SRC8_HUMAN	Q14247	Src substrate cortactin	Organization of the actin cytoskeleton	6.27	1.7E-03
SEPT9_HUMAN	Q9UHD8	Septin-9	Filament-forming GTPase	6.15	2.0E-03
CAPZB_HUMAN	P47756	F-actin-capping protein subunit beta	Caps and protects actin filament ends	6.08	2.0E-03
CSRP2_HUMAN	Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2	Role in vascular development	6.08	2.0E-03
ZYX_HUMAN	Q15942	Zyxin	Targets ENA/VASP proteins to focal adhesions	6.08	2.0E-03
AMOL1_HUMAN	Q8IY63	Angiomotin-like protein 1	Inhibits the Wnt/beta-catenin signaling	6.01	2.4E-03
EFHD1_HUMAN	Q9BUP0	EF-hand domain-containing protein D1	Calcium sensor	5.67	6.3E-03
COF1_HUMAN	P23528	Cofilin-1	Regulation of actin dynamics	5.64	4.9E-03
AIF1L_HUMAN	Q9BQI0	Allograft inflammatory factor 1-like	Promotes actin bundling	5.56	7.9E-03
CYTSA_HUMAN	Q69YQ0	Cytospin-A	Cytoskeleton organization	5.56	7.9E-03
MPRIP_HUMAN	Q6WCQ1	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	Targets myosin phosphatase to the actin cytoskeleton	5.56	7.9E-03
PAWR_HUMAN	Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	Induces apoptosis and inhibits transcription (NF-KB pathway)	5.56	7.9E-03
AFAD_HUMAN	P55196	Afadin	Cell-cell junctions	5.56	7.9E-03

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
SEPT2_HUMAN	Q15019	Septin-2	Cytoskeleton organization	5.56	7.9E-03
NEB2_HUMAN	Q96SB3	Neurabin-2	Involved in different signalling pathways, binds to actin, links protein phosphatase 1 to actin	5.44	1.1E-02
ARP3_HUMAN	P61158	Actin-related protein 3	Mediates formation of branched actin filaments	5.44	1.1E-02
AMOT_HUMAN	Q4VCS5	Angiomotin	Role in tight junction maintenance	5.38	1.1E-02
SEPT7_HUMAN	Q16181	Septin-7	Organization of the actin cytoskeleton, GTPase	5.31	1.6E-02
CAZA2_HUMAN	P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	Stabilization of actin filament extremities	5.16	2.4E-02
CD2AP_HUMAN	Q9Y5K6	CD2-associated protein	Mediates binding of actin to the plasma membrane	5.16	2.4E-02
PDLI7_HUMAN	Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7	Binding of proteins to actin	5.16	2.4E-02
RHG21_HUMAN	Q5T5U3	Rho GTPase-activating protein 21	Activates GTPase activity of RHOA and CDC42	5.16	2.4E-02
MYH11_HUMAN	P35749	Myosin-11	Muscle contraction	5.16	2.4E-02
EFHD2_HUMAN	Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	Potentially regulates apoptosis	4.99	4.1E-02
SPTN2_HUMAN	O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	Potential role in neuronal cytoskeleton	4.99	4.1E-02
SVIL_HUMAN	O95425	Supervillin	Links actin to the plasma membrane	4.99	4.1E-02
TMOD3_HUMAN	Q9NYL9	Tropomodulin-3	Role in actin dynamics	4.99	4.1E-02
ARC1B_HUMAN	O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	Mediates formation of branched actin filaments	4.78	6.5E-02
COR1A_HUMAN	P31146	Coronin-1A	Component of the cytoskeleton	4.78	6.5E-02
EVL_HUMAN	Q9UI08	Ena/VASP-like protein	cytoskeleton remodelling	4.78	6.5E-02
KCTD3_HUMAN	Q9Y597	BTB/POZ domain-containing protein KCTD3	Component of a K/Na channel	4.78	6.5E-02
NEXN_HUMAN	Q0ZGT2	Nexilin	Associated with the actin cytoskeleton	4.78	6.5E-02
SEPT6_HUMAN	Q14141	Septin-6	Organization of the actin cytoskeleton, GTPase	4.78	6.5E-02
ZO2_HUMAN	Q9UDY2	Tight junction protein ZO-2	Role in tight junctions	4.78	6.5E-02
MYL6_HUMAN	P60660	Myosin light polypeptide 6	Regulatory component of myosin	3.12	6.8E-02
CAZA1_HUMAN	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	Stabilization of actin filament extremities	2.87	9.1E-02
EIF3A_HUMAN	Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	RNA binding component of eIF3, can activate or repress translation	-1.63	9.4E-02
IFIT5_HUMAN	Q13325	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	RBP involved in innate immunity, recognizes 5' -ppp ends	-4.85	9.1E-02
PCF11_HUMAN	O94913	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	Component of pre-mRNA cleavage complex II	-5.02	6.5E-02
WDR33_HUMAN	Q9C0J8	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33	Maturation of mRNA 3' ends	-5.43	2.4E-02
WDR82_HUMAN	Q6UXN9	WD repeat-containing protein 82	Role in transcription regulation	-5.53	1.4E-02
DSG1_HUMAN	Q02413	Desmoglein-1	Component of desmosomes	5.29	4.9E-02
RENT1_HUMAN	Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1	Recruited to stalled ribosomes as part of the SURF complex to induce NMD	-4.85	9.1E-02

Supplementary table 3: Proteins significantly regulated by Vif in the presence of the A3G protein. The protein Uniprot ID, Accession, common name and general function are indicated. The log_2(fold change) of each protein in the presence of Vif as well as the associated adjusted p-value are indicated.

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
1433S_HUMAN	P31947	14-3-3 protein sigma	Adapter protein in many signaling pathways. Regulates MDM2	3.52	1.4E-02
ARGI1_HUMAN	P05089	Arginase-1	Converts L-arginine to urea and L-ornithine	5.16	4.8E-03
CALL5_HUMAN	Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	Binds calcium	5.14	5.4E-03
CARF_HUMAN	Q9NXV6	CDKN2A-interacting protein	Involved in signaling pathways in response to DNA damage	-1.47	1.5E-02
CASPE_HUMAN	P31944	Caspase-14	Non-apoptotic caspase involved in epidermal differentiation.	5.93	9.2E-05
CDSN_HUMAN	Q15517	Corneodesmosin	Important for the epidermal barrier integrity.	5.47	1.5E-03
CHIP_HUMAN	Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	E3-ubiquitin ligase	-5.41	7.3E-03
CLAP2_HUMAN	O75122	CLIP-associating protein 2	Stabilization of microtubules	-3.98	5.9E-04
CMTR1_HUMAN	Q8N1G2	Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 1	Methylation of the first nucleotide of mRNAs	-1.37	2.9E-03
CNOT1_HUMAN	A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	Component of the CCR4-NOT complex which is one of the major cellular mRNA deadenylases	-1.63	5.3E-02
CYTA_HUMAN	P01040	Cystatin-A	Proteinase inhibitor important in desmosome-mediated cell-cell adhesion	4.59	4.1E-02
DCP2_HUMAN	Q8IU60	m7GpppN-mRNA hydrolase	Decapping of mRNAs for degradation	-1.29	7.2E-02
DESP_HUMAN	P15924	Desmoplakin	Component of desmosomes	6.82	1.3E-52
DSC1_HUMAN	Q08554	Desmocollin-1	Component of desmosomes	6.35	8.8E-05
DSG1_HUMAN	Q02413	Desmoglein-1	Component of desmosomes	5.33	3.8E-13
ENOA_HUMAN	P06733	Alpha-enolase	Role in glycolysis, growth control, hypoxia tolerance, allergic responses	2.29	5.7E-02
EXOC6_HUMAN	Q8TAG9	Exocyst complex component 6	Involved in docking of exocytic vesicles with fusion site on the plasma membrane	-4.97	3.1E-02
FABP5_HUMAN	Q01469	Fatty acid-binding protein 5	Transport of fatty acids, modulates inflammation	6.81	1.3E-08
FBX50_HUMAN	Q6ZVX7	F-box only protein 50	Role in cell proliferation	4.31	8.0E-02
FILA_HUMAN	P20930	Filaggrin	Organizes keratin filaments	7.67	3.6E-04
FILA2_HUMAN	Q5D862	Filaggrin-2	Cell-cell adhesion	4.18	9.7E-07
G3P_HUMAN	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Role in glycolysis, component of the GAIT complex	1.89	4.1E-02
GSTP1_HUMAN	P09211	Glutathione S-transferase P	Metabolism	3.32	6.8E-02
HUTH_HUMAN	P42357	Histidine ammonia-lyase	L-histidine degradation into L-glutamate	4.31	8.0E-02
IGHG2_HUMAN	P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2		4.37	7.6E-02
IGHG4_HUMAN	P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4		4.37	7.6E-02
IGKC_HUMAN	P01834	Immunoglobulin kappa constant		4.41	7.7E-02
LMNA_HUMAN	P02545	Prelamin-A/C	Nuclear assembly and dynamics	2.64	4.8E-03
LRC40_HUMAN	Q9H9A6	Leucine-rich repeat-containing protein 40		-3.89	3.1E-03
NFH_HUMAN	P12036	Neurofilament heavy polypeptide	Intermediate filament in neurons	3.78	4.4E-03
NFX1_HUMAN	Q12986	Transcriptional repressor NF-X1	Regulates MHC class II expression	-1.18	4.1E-02
PKP1_HUMAN	Q13835	Plakophilin-1	Role in junctional plaques	6.64	9.6E-08
PLAK_HUMAN	P14923	Junction plakoglobin	Junction plaque	4.15	4.4E-13
POF1B_HUMAN	Q8WVV4	Protein POF1B	Regulates the actin cytoskeleton	5.28	3.1E-03
S10AE_HUMAN	Q9HCY8	Protein S100-A14	Regulates apoptosis by modulation of p53/TP53	4.59	4.1E-02
SBSN_HUMAN	Q6UWP8	Suprabasin		6.14	1.1E-05
SPB12_HUMAN	Q96P63	Serpin B12	Inhibitor of proteases	4.34	7.6E-02
SPB3_HUMAN	P29508	Serpin B3	Inhibitor of proteases, role in immune response against tumors	6.56	1.1E-03
SPB4_HUMAN	P48594	Serpin B4	Inhibitor of proteases, role in immune response against tumors	5.89	2.6E-03
SPB5_HUMAN	P36952	Serpin B5	Inhibitor of proteases, role in immune response against tumors	4.93	1.6E-02
SPR2B_HUMAN	P35325	Small proline-rich protein 2B	Keratinocyte envelope protein	6.04	2.7E-05
SPR2D_HUMAN	P22532	Small proline-rich protein 2D	Keratinocyte envelope protein	5.87	8.6E-05
SPR2E_HUMAN	P22531	Small proline-rich protein 2E	Keratinocyte envelope protein	6.32	4.1E-06
SPR2F_HUMAN	Q96RM1	Small proline-rich protein 2F	Keratinocyte envelope protein	5.56	7.1E-04
TBB2A_HUMAN	Q13885	Tubulin beta-2A chain	Component of tubulin	-1.68	1.5E-02
TBB2B_HUMAN	Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	Component of tubulin	-1.68	1.4E-02

UniprotKB ID	UniProtKB Accession	Protein Name	Function	Log(Fold change)	adj. P-value
TBB4A_HUMAN	P04350	Tubulin beta-4A chain	Component of tubulin	-1.55	4.0E-02
TBB8_HUMAN	Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	Component of tubulin	-1.64	9.7E-02
TGM3_HUMAN	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Cross-links Glu and Lys, keratinocyte envelope formation	6.70	4.3E-08
TKT_HUMAN	P29401	Transketolase	Metabolism	5.22	7.3E-03
WDR91_HUMAN	A4D1P6	WD repeat-containing protein 91	Involved in cargo transport between early and late endosomes	-4.84	4.6E-02

1) Discussion complémentaire et limitations de l'étude

Nos résultats soulèvent aussi la question de la régulation par CHIP de l'expression des autres membres de la famille APOBEC3. Comme nous disposons au laboratoire de constructions plasmidiques pour chaque membre, nous prévoyons d'explorer cette question avec des expériences de surexpression de CHIP, similaires à celles réalisées pour A3G.

La dégradation des protéines par les voies protéasomique et autophagique représente un mécanisme majeur de régulation de l'expression génique, et plusieurs acteurs pourraient être impliqués dans ces voies pour réguler étroitement le destin des protéines. Les enzymes de déubiquitination (DUBs) font partie de ces acteurs, et les recherches concernant la régulation d'A3G par certaines de ces DUBs gagnent en intérêt, notamment sur les USPs qui augmentent la stabilité d'A3G (Gao et al., 2021b; Pan et al., 2019; Zhao et al., 2022). Des interactions sont également montrées entre les USPs et les protéines du VIH (Ali et al., 2017; Gao et al., 2021a; Lata et al., 2022, 2018). De plus, l'USP3 est impliquée dans l'augmentation de l'expression des ARNm d'A3G et A3F même en l'absence de Vif (Zhao et al., 2022). Vif étant connu pour induire la dégradation protéasomique d'A3G, et nos travaux rapportant CHIP comme un nouveau régulateur de l'expression d'A3G, peut-être par le biais de la voie autophagique, il serait intéressant d'étudier les interactions de ces différentes USP dans l'axe A3G-CHIP-Vif.

CHIP est une protéine qui agit principalement de concert avec des chaperonnes pour cibler et dégrader leurs protéines clients. CHIP interagit avec Hsc70, une chaperonne exprimée de manière constitutive et élevée, mais elle interagit également avec des protéines induites par le stress telles que Hsp70 et Hsp90. Dès lors, il faut garder en tête que des résultats artéfactuels peuvent être observés suite à des stress induisant l'expression des chaperonnes, et recrutant ainsi plus efficacement CHIP vers différentes cibles, y compris A3G et/ou Vif. Dans nos expériences, nos protéines d'intérêt sont régulièrement exprimées à partir d'un plasmide, sous la dépendance d'un promoteur CMV permettant un haut niveau d'expression. La production importante et/ou la production rapide de protéines pourrait produire un nombre non négligeable de protéines mal repliées ou agrégées constituant alors un stress cellulaire (Gasser et al., 2008; Hohenblum et al., 2004; Tang et al., 2015), et des cibles préférentielles de CHIP. Cependant, nos cellules étaient contrôlées en routine par microscopie optique lors des diverses expériences, et la surexpression de nos protéines d'intérêt n'a jamais induit de

changement morphologique des cellules, suggérant qu'un stress, si présent, serait modéré ou faible. L'expression des Hsp induite par le stress ou l'expression et/ou la phosphorylation d'acteurs de la voie *unfolded protein response* (UPR) tels que IRE1α ou PERK sera suivie pour évaluer la présence de potentiels stress dans nos conditions d'intérêt.

Par ailleurs, l'inhibiteur du protéasome ALLN était utilisé dans nos expériences de co-IP pour éviter la dégradation protéasomique d'A3G induite par Vif. Le réactif est ajouté à chaque condition pour réduire les variations entre les échantillons et assurer une comparaison plus rigoureuse. Le protéasome étant une voie de contrôle de la qualité essentielle et une usine de recyclage des acides aminés, son inhibition induit logiquement un stress cellulaire. En effet, l'ALLN est hautement toxique pour les cellules : dans nos conditions d'utilisation 12 h après ajout du composé, une mortalité cellulaire faible à modérée est observée, tandis que 16 h après ajout, la mortalité s'avère très élevée. D'autre part, des expériences de co-IP réalisées sans ALLN (non montrées ici) ont donné des signaux de co-immunoprécipitation beaucoup plus faible avec CHIP. Il est possible que l'ALLN ait bloqué la dégradation naturelle de la protéine d'intérêt, aboutissant à un signal plus intense ; cependant ces conditions de stress pourraient aussi perturber l'expression des protéines et/ou conduire à l'observation d'interactions artificielles ou peu significatives. Pour mieux élucider la pertinence des interactions observées et s'assurer qu'elles ne soient pas artéfactuelles, nous prévoyons de réaliser des expériences de co-IP avec un mutant de Vif incapable d'induire la dégradation d'A3G (comme le Vif K26R ; (Guerrero et al., 2016)), un mutant de CHIP catalytiquement inactif (CHIP H260Q) et A3G exprimé à partir d'un plasmide A3G ΔUTR. En présence de protéines inaptes à induire la dégradation d'A3G, et d'un ARNm ΔUTR insensible à l'inhibition de la traduction médiée par Vif, un bon niveau d'expression de la protéine sera atteint et éliminera la nécessiter d'utiliser l'ALLN. D'autre part, les infections virales induisent également du stress dans les cellules hôtes, et le VIH induit notamment une forte production d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS) (Ivanov et al., 2016) ou encore la réponse UPR (Borsa et al., 2015; Fan and He, 2016) ; nos résultats restent ainsi intéressants malgré leurs potentiels biais. De surcroit, les expériences de *silencing* de CHIP sont réalisées en absence d'ALLN, et montrent aussi un effet non négligeable de CHIP sur l'expression d'A3G.

En tout état de cause, nous prévoyons maintenant d'évaluer la pertinence biologique de CHIP en ce qui concerne la régulation d'A3G et le cycle de réplication du VIH, comme expliqué dans la section discussion. En effet, les cellules HEK-293T ne sont pas des cellules

hôtes naturelles du VIH et n'expriment pas naturellement A3G. Répéter nos expériences dans une lignée de LT cibles du VIH, telle que Jurkat ou des cellules primaires, qui en plus expriment des niveaux physiologiques d'A3G, fournira des informations plus significatives concernant les relations CHIP-A3G.

Un commentaire supplémentaire sur les expériences de *silencing* est qu'il est difficile de déterminer si la diminution de l'expression d'une protéine d'intérêt (virale dans ce cas) reflète un effet direct du gène éteint dans la synthèse de la protéine d'intérêt, ou si l'extinction du gène affecte l'homéostasie cellulaire, provoquant alors des effets indirects sur la production de la protéine suivie (et sur le cycle viral).

Une chose qui peut être discutée concernant notre criblage est que CHIP n'est pas connu pour être une RBP, et ses domaines fonctionnels ne suggèrent effectivement pas de telles propriétés. Cependant, un *pull-down* d'ARN peut permettre l'identification de partenaires indirects, interagissant eux-mêmes avec de vraies RBP. Par exemple, il a été montré que CHIP pourrait lier directement eIF5A pour induire sa dégradation (Shang et al., 2014). Cependant, eIF5A est une protéine impliquée dans plusieurs étapes de la synthèse des protéines, telles que l'élongation ou la régulation de l'arrêt des ribosomes et la sélection d'AUG pour l'ARNm porteur d'uORF (Sfakianos et al., 2022). eIF5A pourrait lier l'ARNm d'A3G, qui contient un uORF, et interagir également avec CHIP, expliquant ainsi sa présence dans les cribles de capture d'ARN. À noter qu'eIF5A interagit avec la protéine Rev du VIH-1 pour exporter les ARNm viraux partiellement épissés (Ruhl et al., 1993) et est impliquée dans l'amplification du NMD (Hoque et al., 2017). Le repliement protéique étant concomitant à la traduction de l'ARN (Balchin et al., 2016), une autre explication est que CHIP pourrait lier des chaperonnes elles-mêmes liées aux polypeptides en cours de synthèse codés par l'uORF ou l'ORF d'A3G, rapprochant ainsi CHIP à proximité de l'ARN d'A3G. Enfin, nous avons observé une régulation par Vif de l'association de CHIP à l'ARN d'A3G uniquement lorsque la protéine A3G était exprimée, et nos expériences ultérieures montrent que CHIP se lie à A3G et régule son niveau d'expression. Ainsi, il est possible que CHIP soit un interactant "collatéral", liant A3G, elle-même liée à son ARN. CHIP pourrait alors être moins détectée sur l'ARN d'A3G en présence de Vif, conséquence indirecte de la dégradation d'A3G par Vif.

Pour répondre à cette critique, il serait intéressant de vérifier son association spécifique à l'ARN d'A3G en tant que vrai partenaire. Cela peut être étudié par des expériences de *RNA*

immunoprecipitation, où l'on immunoprécipite CHIP et extrait les ARN potentiellement co-immunoprécipités. L'ARN d'intérêt (ici celui d'A3G) serait alors détecté par RTqPCR. Il s'agit d'une méthode classique de validation orthogonale pour des candidats identifiés avec des techniques de capture d'ARN. En raison de contraintes de temps, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation fonctionnelle de CHIP une fois son interaction avec A3G et Vif validée. Une expérience RIP a néanmoins été effectuée une fois, mais sans succès (limitations techniques, manque de témoins positifs). Ces expériences seront répétées avec des contrôles appropriés pour valider ou non la spécificité de CHIP pour l'ARN d'A3G.

De manière intéressante, nous avons observé l'encapsidation de CHIP en cas de surexpression de la protéine (**Figure 7** de la partie précédente). Deux espèces de CHIP étaient observées avec le marquage anti-CHIP. CHIP dimérise pour exercer son activité. Ainsi, ces deux formes pourraient représenter soit un dimère de la forme CHIP-myc et CHIP endogène, soit un dimère de CHIP-myc, l'une des deux ayant perdu son étiquette par dégradation. L'utilisation du mutant CHIP ΔCC incapable de dimériser permettra de répondre à cette question. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à observer l'encapsidation de CHIP endogène, aussi bien dans les échantillons témoins des expériences de surexpression, que lors des expériences de *silencing* (blot non montré). Cet échec pourrait être lié à des limitations techniques, nos fractions VLP étant peu concentrées en protéines (malgré un enrichissement potentiel des protéines encapsidées), la quantité de CHIP est surement insuffisante pour être détectée. Cependant, les études de protéomique analysant la composition des particules virales purifiées n'ont pas encore rapporté la présence de CHIP dans les virions du VIH-1. Nos expériences seront répétées avec une quantité plus importante de VLP pour déterminer si CHIP est effectivement encapsidée a des niveaux d'expression physiologiques.

Finalement, les expériences d'immunoprécipitation avec les mutants de CHIP ou avec traitement RNase n'ont été réalisées qu'une seule fois. Ces expériences devront être répétées pour confirmer les résultats obtenus. Les résultats obtenus pour la co-IP avec les mutants de CHIP ont été analysés en l'état car un impact majeur sur l'interaction de CHIP avec A3G et Vif est observé. Répéter ces expériences nous permettra de quantifier précisément les niveaux d'interactions et/ou de perte d'interaction. À noter que nous avons transfecté la même quantité de plasmide pour les mutants de CHIP sans prendre en compte leurs niveaux d'expression.

Chapitre II : Étude des relations entre l'hélicase UPF1 et les protéines APOBEC3G et Vif

Parmi les cibles identifiées par notre méthodologie de pull-down, nous avons également identifié UPF1/RENT1 et validé l'interaction de la protéine endogène avec Vif (**Figure 2 et S3** du chapitre précédent). A l'image de CHIP, cette protéine était moins présente sur l'ARNm d'A3G en présence de Vif. UPF1 pourrait aussi être impliquée dans l'inhibition traductionnelle d'A3G médiée par Vif, bien que cela ne semble pas le plus probable. En effet, si Vif diminue la présence d'UPF1 sur l'ARNm d'A3G pour inhiber la traduction d'A3G, cela sous-tend qu'UPF1 est un facteur positif de cette dernière. Une interaction entre Vif et UPF1 est donc contre-intuitive, ou sous entendrait que Vif séquestre UPF1 à l'écart de l'ARNm, un mécanisme qui serait alors indépendant de la région uORF identifiée comme indispensable à l'action inhibitrice de Vif sur l'ARNm d'A3G. Nous avons cherché à étudier davantage l'interaction d'UPF1 avec Vif, et le rôle d'UPF1 dans le cycle réplicatif du VIH.

UPF1 est une *RNA-Binding protein*, exhibant des activités ATPase, hélicase d'ARN et possèdes des motifs en doigts de zinc (**Figure 22**). Cette protéine exerce de nombreux rôles, notamment sur la stabilité de l'ARN ou le métabolisme de l'ADN, souvent à l'aide de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (Isken and Maquat, 2008). Elle est surtout connue comme un acteur clé dans des voies de surveillance de l'ARNm et plus particulièrement celle du *non-sense mRNA decay* (NDM). Celui-ci entraine la dégradation des ARNm porteurs des codons d'arrêt prématurés (PTC), tels que les ARNm ayant des uORF dans leur 5'UTR, pour éviter la synthèse de protéines tronquées, qui pourraient être néfastes pour les cellules.

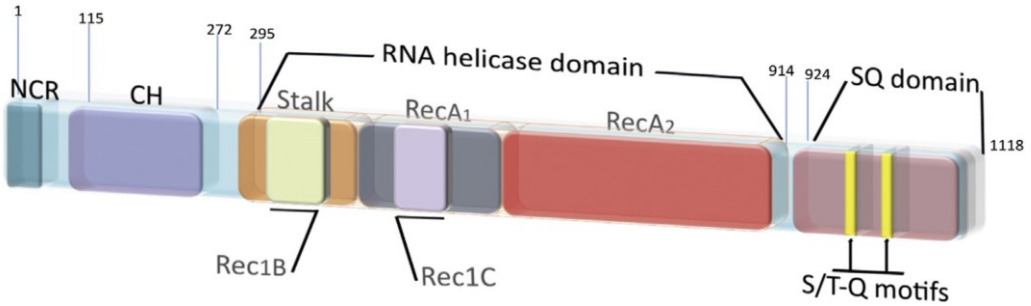


Figure 22 : Représentation schématique d'UPF1 et de ses domaines fonctionnels. Les positions des acides aminés sont indiquées. La région conservée N-terminale (NCR) ; le domaine riche en cystéine et histidine (CH) ; le domaine hélicase avec les motifs RecA1, RecA2, Rec1B et Rec1C ; et le domaine riche en sérine et glutamine (SQ), comprenant les motifs de reconnaissance et de phosphorylation S/T-Q, sont indiqués. Les domaines CH et SQ régulent l'activité hélicase de la protéine et sont impliqués dans l'interaction d'UPF1 avec ses nombreux partenaires tels que SMG1 et UPF2. Le domaine hélicase porte la fonction ATPase. Figure adaptée de Benhabiles et al., 2016.

1) Méthodes

J'ai étudié UPF1 en parallèle de CHIP, les immunoblots découpés proviennent notamment d'expériences communes. Les méthodes (plasmides, culture cellulaire, transfection, co-IP, silencing, production de VLP…) sont donc les mêmes que celles détaillées dans la partie « Material and methods » du chapitre précédent. Pour les expériences de surexpression, un pCMV-UPF1-WT a été utilisé, et est décrit dans l'article suivant (Isken et al., 2008). La protéine exprimée est taguée 6xHis-Myc à son extrémité N-terminale. Il a été généreusement donné par le Dr Yoon Ki Kim (Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Corée du Sud). Pour les expériences de co-IP, 4 µg de pCMV-UPF1-WT sont utilisés par boites de 10 cm ; pour les autres expériences effectuées en plaques 6-puits, 1 µg de plasmide est utilisé par puits. Dans les expériences de co-IP avec UPF1, un pcDNA3.1-A3G-HA codant pour la CDS d'A3G avec un tag HA en C-terminal a été utilisé (4 µg par boite de 10 cm). Pour les expériences de *silencing*, le siRNA utilisé était le suivant : 5'-GGCAGCCACAUUGUAAAUCACCUTG-3' (Ajamian et al., 2008). Pour les expériences de qPCR, le plasmide d'UPF1 a été utilisé pour établir une gamme d'étalonnage à nombres de copies de plasmide connus. Les amorces utilisées pour amplifier les cDNA d'UPF1 étaient les suivants : UPF1 Fwd 5-'GACCTGGGCCTTAACAAGAA-3' et UPF1 Rev 5'-GATGAGATATGCCTGCGGTAC-3'.

2) Étude des interactions UPF1-Vif-A3G et d'UPF1 en contexte viral

1. UPF1/RENT1 interagit avec Vif et A3G de manière indépendante de l'ARN

Comme mentionné dans le chapitre précédent, l'interaction de Vif et d'UPF1 endogène a été observée avec un protocole de co-IP précédé d'une étape de pontage par le DSP (dithiobis-succinimidyl-propionate) (**Figure S3** du chapitre précédent). La visualisation de l'interaction uniquement lorsqu'une étape de pontage est effectuée pourrait suggérer que l'interaction Vif-UPF1 est faible ou qu'elle est dynamique. J'ai poursuivi l'étude d'UPF1 en parallèle de CHIP avec les mêmes méthodologies en commençant par valider l'interaction d'UPF1 avec Vif et/ou A3G en contexte de surexpression. L'utilisation de protéine taguées nous permet d'effectuer les co-IP et co-IP inverse par l'utilisation d'anticorps anti-tag. Les IP dirigées contre Vif (α-FLAG) et contre UPF1 (α-Myc) ont chacune permis de confirmer l'interaction Vif-UPF1 (**Figure 23A**). À l'instar des expériences réalisées avec CHIP, lorsque ces co-IP sont réalisées avec A3G, les interactions Vif-UPF1 sont conservées (**Figure 23B**). De manière inattendue, nous pouvons

aussi observer une interaction UPF1-A3G (**Figure 23B,** panels à droite, piste 4). La co-IP inverse dirigée contre un A3G-HA nous a permis de valider cette interaction (**Figure 23C**). Comme UPF1 a été identifiée par notre approche de pull-down d'ARN, nous avons aussi analysé si les interactions UPF1-Vif et UPF1-A3G étaient promues par de l'ARN, en traitant les échantillons de co-IP avec des RNAse. Les signaux d'IP restant les mêmes avec ou sans RNase (**Figure 23E, 23F**, comparer pistes 6-7), UPF1 interagit avec A3G et Vif de manière indépendante de l'ARN. De manière intéressante, les interactions sont conservées lorsque A3G et Vif sont co-exprimées.

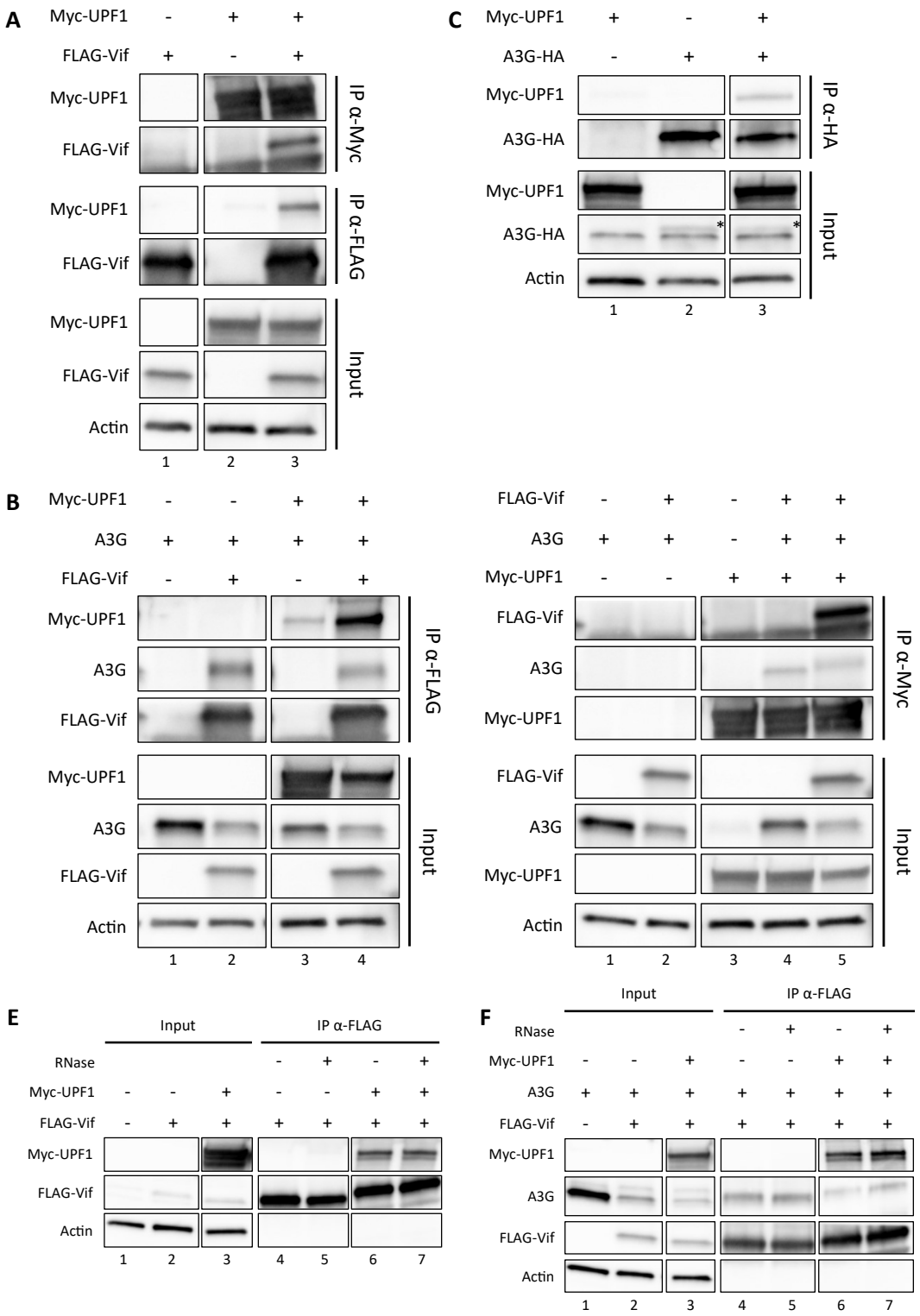


Figure 23 : UPF1 interagit à la fois avec Vif et A3G indépendamment de l'ARN. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec les plasmides indiqués, et l'interaction UPF1-Vif a été étudiée par immunoprécipitation (IP), soit en absence (**A, E**) soit en présence (**B, F**) d'A3G. Les inputs ainsi que les échantillons IP ont été analysés par western-blot (WB). Les IP réciproques (dirigées contre les étiquettes FLAG ou bien Myc) sont montrées par les panels supérieurs et centraux (**A**) ou par les panels de gauche et de droite (**B**). (**C**) L'interaction UPF1-A3G a été étudiée avec une IP α-HA. Le signal faible d'A3G en input est mis en évidence par une étoile (*). Pour (**E, F**) les échantillons ont été traités par un cocktail de RNases après IP dont l'activité a été confirmée en parallèle. Aucun changement d'intensité de signal n'est visible dans les IP après traitement RNase. L'IP α-HA et les IP + RNase (**C, E, F**) ont été réalisée une fois, les autres IP ont été réalisées au moins trois fois ; des images représentatives sont montrées.

2. Étude d'UPF1 dans le cycle viral

L'étude d'UPF1 a été moins approfondie que celle de CHIP pour le moment. Nous avons surexprimé UPF1 en présence des clones moléculaires pNL4.3 ou pNL4.3ΔViif et d'A3G, néanmoins l'expérience n'a été effectuée qu'une fois et n'était pas analysable pour A3G. Nous observons néanmoins que la surexpression d'UPF1 semble réduire l'expression de Pr55Gag en cellules (**Figure 24**, comparer pistes 1-2, 3-4, 5-6 et 7-8), et l'encapsidation de Vif dans les particules virales (**Figure 24**, panneaux « VLP », comparer pistes 1-2 et 3-4). D'autre part, en analysant les VLP (**Figure 24**, panneaux « VLP ») nous observons une encapsidation d'UPF1. Ces résultats restent préliminaires et les expériences doivent être répétées, notamment pour évaluer l'infectivité des virions produits.

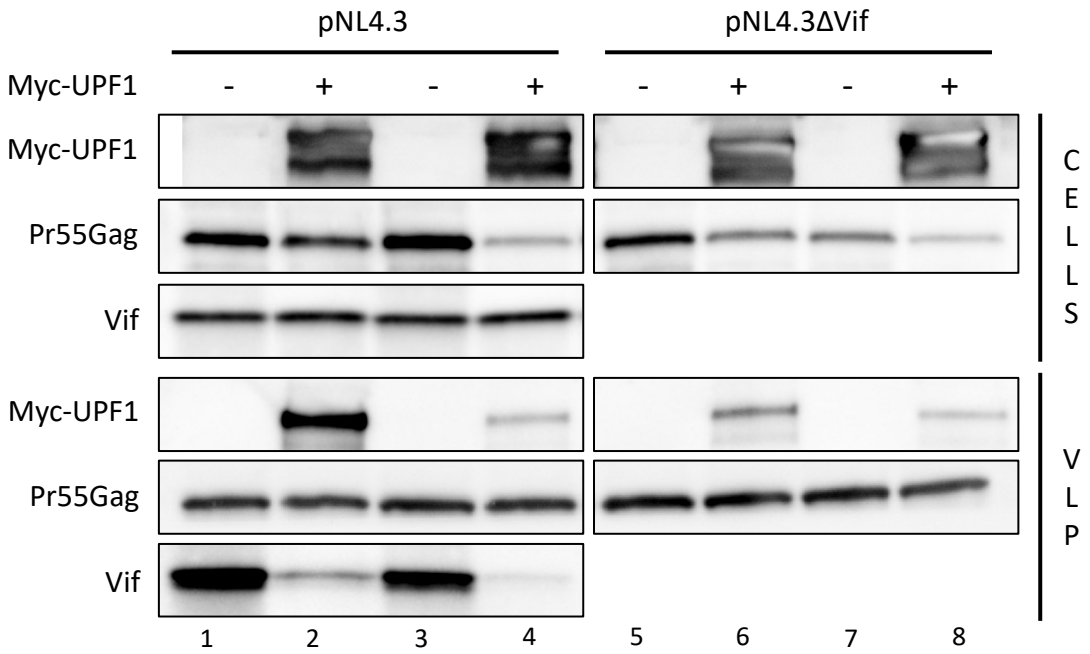


Figure 24 : UPF1 est encapsidée dans les VLP du VIH. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec les plasmides indiqués. Le milieu de culture cellulaire a été collecté après 48 heures, filtré et les VLP ont été concentrés. Les niveaux protéiques des extraits cellulaires et des VLP ont été analysés par WB. Note : les marques blanches sur la révélation d'UPF1 dans le panneau « cells » correspondent à un *photobleaching* de la membrane, le signal UPF1 étant trop élevé. La révélation de p24 et d'actine a été perdue. n=1.

Des expériences de *silencing* d'UPF1 en co-expression avec pNL4.3, pNL4.3, VSV-G et A3G aussi été réalisées. Les lysats cellulaires et les VLPs ont été collectés pour analyser les niveaux de protéines par western blot (**Figure 25**) ; les VLPs purifiées ont été quantifiées (ELISA p24) (**Figure 26A**) et analysées pour leur infectivité (**Figure 27**) ; une partie des cellules a été utilisée pour la quantification d'ARN (**Figure 25A, 26A**). L'extinction en ARN comme en protéine d'UPF1 a atteint 90 à 95% d'efficacité, à l'instar de CHIP et HPRT1 (données non présentées).

Lorsque l'expression d'UPF1 est éteinte, nous observons que les niveaux cellulaires d'A3G sont réduits de 1,5 à 1,7 fois lorsque Vif est absente (**Figure 25B**, "intracellular A3G"). Cet effet n'est cependant pas répercuté au niveau du taux d'A3G encapsidé (**Figure 25B,** "packaged A3G"). En suivant l'ARNm d'A3G, il apparait que ses niveaux sont réduits de moitié dans les conditions pNL4.3 en cas de *silencing* par rapport à la condition contrôle.

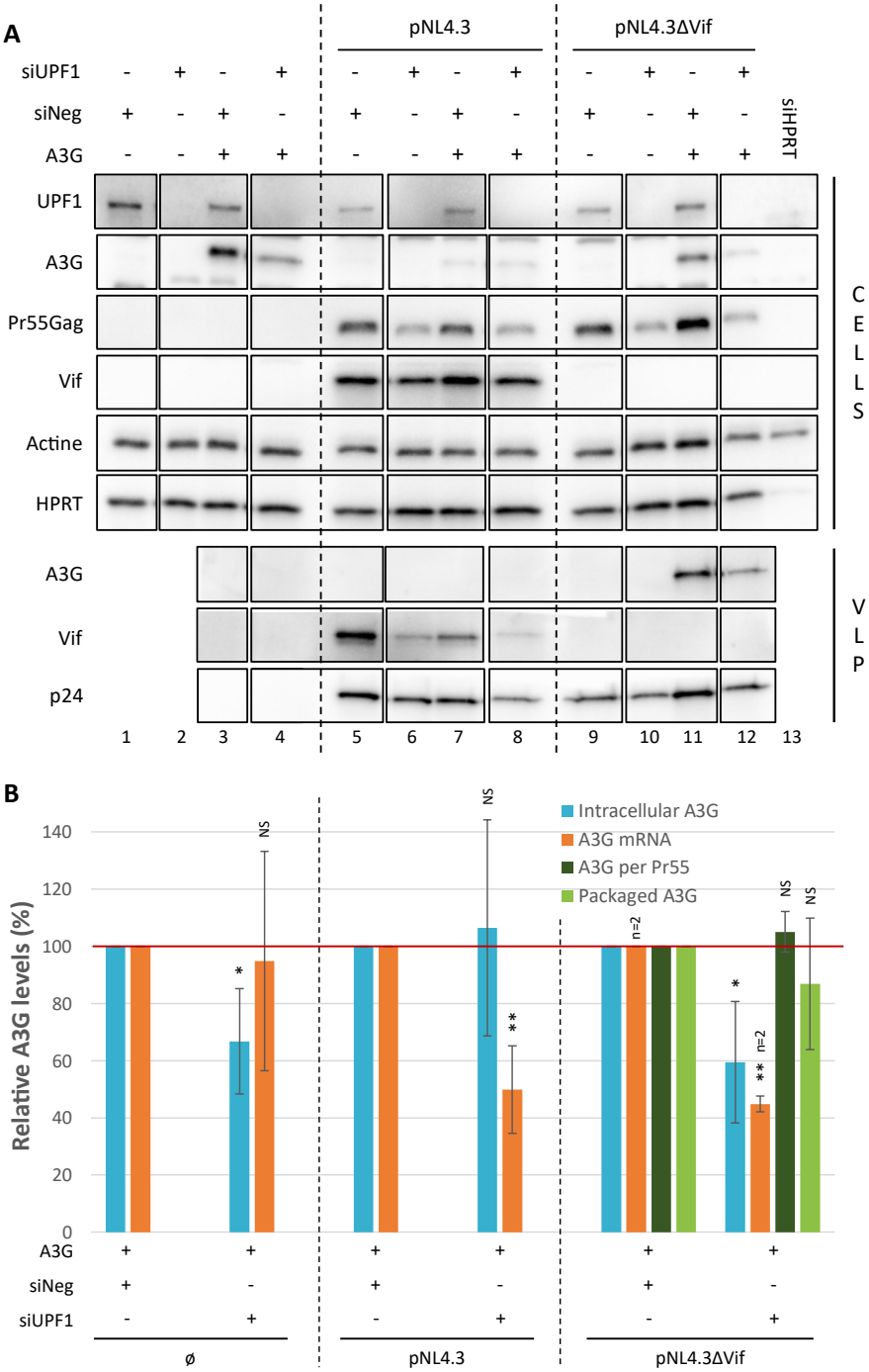


Figure 25 : Analyse de l'impact du silencing d'UPF1 sur les niveaux d'A3G. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec un ARN interférent (siARN) ciblant UPF1 ou un siARN témoin (siNeg) et les plasmides indiqués ont été transfectés, conjointement avec un plasmide codant pour VSV-G. (**A**) Les niveaux de protéines dans les

extraits cellulaires et les VLP ont été analysés par WB. Des images représentatives d'au moins trois expériences indépendantes sont montrées. (**B**) Les signaux protéiques dans les WB ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ et les niveaux relatifs de la protéine A3G sont représentés. Le signal cellulaire d'A3G a été normalisé par rapport à l'actine ("intracellular A3G") et le signal d'A3G sur les blots des VLP a été normalisé par rapport à p24 ("packaged A3G"). Pour tenir compte des variations des niveaux de protéines A3G et Pr55Gag, le ratio "A3G per Pr55" a également été calculé. Ces deux derniers paramètres sont représentés uniquement pour les échantillons pNL4.3ΔVif car les niveaux d'A3G étaient trop faibles en présence de Vif. Enfin, les ARN cellulaires ont également été extraits et les niveaux d'ARNm d'A3G ont été suivis par quantifiés ("A3G mRNA"). Chaque paramètre mesuré dans les différentes conditions d'intérêt a été comparé à celui de la condition contrôle siNeg fixé à 100% (100% est représenté par la ligne horizontale rouge sur l'histogramme). Les données représentent la moyenne ± l'écart-type d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire. Les *p-values* obtenues avec un test t de Student non apparié sont indiquées comme suit : * ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, **** ≤ 0.0001. ns (non significatif) : >0.05. Note : si nous supposons que les conditions de transfection (présence ou absence de pNL4.3ΔEnv ou pNL4.3ΔEnvΔVif) ne devraient pas affecter les niveaux d'ARNm d'A3G, nous pouvons analyser les données regroupées de qPCR : dans ce cas les niveaux relatifs d'ARNm d'A3G après le silence d'UPF1 sont de 65.5% ± écart-type = 32.9, n=9, p=0.0098 par rapport au témoin siNeg.

Nous avons également suivi la production et l'infectivité virale pour évaluer un éventuel rôle d'UPF1 dans le cycle réplicatif du VIH. Nous avons quantifié les protéines virales dans l'extrait cellulaire par WB et les protéines des VLP par ELISA p24 (**Figure 25A, 26**), ainsi que les niveaux des ARN Vif et non-épissé (US) du VIH dans les extraits cellulaires (**Figure 26A**). En cas de *silencing* d'UPF1 nous constatons que les niveaux de Pr55Gag et de p24 (**Figure 25A**, **26A**, "Pr55 – WB", "p24 – ELISA") sont en accord et diminuent globalement de 50 à 60% (soit 1,66 à 2 fois) par rapport aux conditions siNeg. Cette diminution mime la diminution des niveaux de l'ARN US (**Figure 26A**, "ARN US"). Pour Vif, la diminution de la protéine est plus modérée (**Figure 26A**, "Vif – WB", diminution de 20 à 30%), mais suit également la diminution de l'ARN (**Figure 26A**, "ARN Vif"). Les niveaux de Vif ont également été représentés en tenant compte des fluctuations des niveaux protéiques de Vif et de Pr55Gag, à côté des niveaux de Vif normalisés dans les VLP par rapport à p24 (**Figure 25A, 26B**, "Vif per Pr55" et "packaged Vif"). De manière intéressante, nous observons une diminution de 2,5 fois (60 %) des niveaux de Vif incorporé suite au *silencing* d'UPF1.

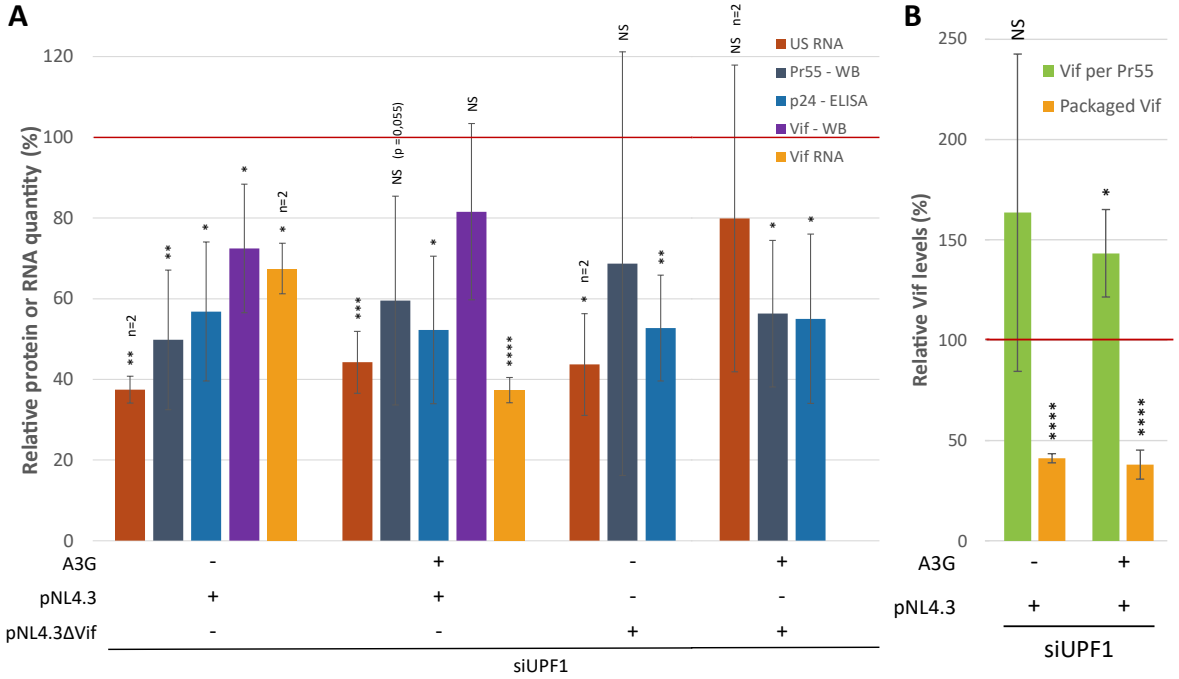


Figure 26 : Impact du silencing d'UPF1 sur les niveaux d'expression des protéines virales. Voir la légende de la **Figure 25** pour la description des méthodes, les données provenant des mêmes échantillons. (**A**) Les signaux protéiques en WB ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ et les niveaux relatifs de protéines virales sont représentés. Les signaux cellulaires de Pr55Gag et de Vif ont été normalisés à l'actine ("Pr55 – WB", "Vif – WB"). Les niveaux de p24 du surnageant viral ont été quantifiés en parallèle par ELISA ("p24 - ELISA"). Les niveaux des ARN non épissé (US) et Vif du VIH ont été quantifiés par RTqPCR ("ARN US", "ARN Vif"). (**B**) Les niveaux relatifs de Vif sont représentés. Pour prendre en compte les variations cellulaires des niveaux de Vif et de Pr55Gag, le rapport "Vif per Pr55" a été calculé et représenté. "packaged Vif" représente le signal de Vif sur les blots VLP qui a été mesuré et normalisé à p24. Chaque paramètre mesuré dans (**A**) et (**B**) est comparé à la donnée mesurée dans la condition témoin siNeg correspondante, fixée à 100% (Les témoins ne sont pas affichés sur le graphique pour faciliter la lisibilité. 100 % est représenté par la ligne horizontale rouge sur les histogrammes). Les données représentent la moyenne ± l'écart-type d'au moins trois expériences indépendantes, sauf indication contraire. Les p-values du test de Student bilatéral et non apparié sont indiquées comme suit : * ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001. ns (non significatif) : >0.05. Note : si nous supposons que les conditions de transfection (type de vecteur pNL4.3 ou présence/absence d'A3G) ne devraient pas affecter les niveaux d'ARN US, nous pouvons analyser les données regroupées de qPCR : dans ce cas les niveaux relatifs d'ARN US du VIH après le *silencing* d'UPF1 sont de 50,2% ± écart-type = 22,4, n=9, p<0.0001 par rapport au témoin siNeg. Avec le même raisonnement, les niveaux de Vif après le *silencing* d'UPF1 sont de 49,4% ± écart-type = 16,9, n=5, p=0,0002 par rapport au contrôle siNeg.

Enfin, l'infectivité des VLP collectés en conditions d'extinction d'UPF1 a été mesurée (**Figure 27**). Les quantités de VLP ont été ajustées pour chaque échantillon (p24-ELISA) afin que l'infectivité puisse être comparée entre les conditions. Les données provenant de l'expérience présentée en **Figure 10** du chapitre précédent, les niveaux d'infectivité mesurés en présence d'A3G des VLP NL4.3ΔVif et NL4.3 reflétaient respectivement l'action antivirale d'A3G, contrée par Vif. Dans la **Figure 27**, les valeurs d'infectiosité sont représentées par rapport à l'infectiosité de la condition témoin siNeg correspondante. Aucune différence statistiquement significative

ni tendance n'a été observée pour l'infectiosité des VLP produites dans les conditions UPF1-knock-down, indépendamment de la présence d'A3G ou du type de vecteur produisant les VLP.

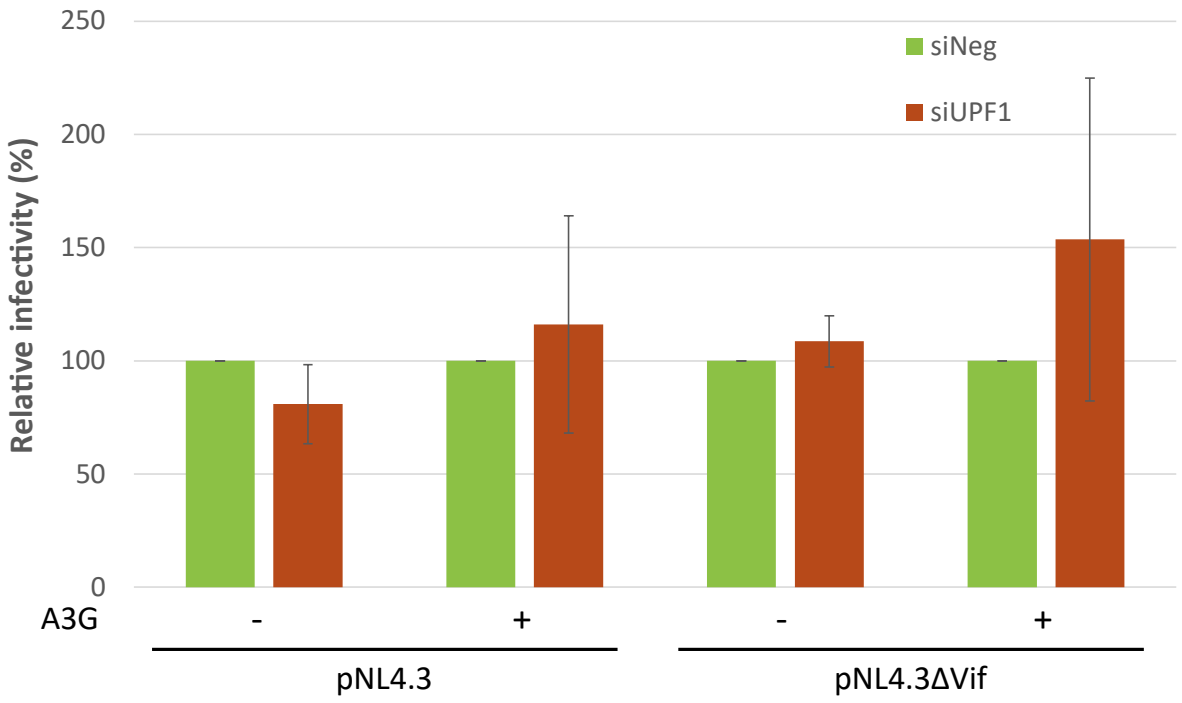


Figure 27 : Impact du silencing d'UPF1 sur l'infectiosité des VLP. Les VLPs pseudotypées VSV-G produites lors des expériences de silencing d'UPF1 (mêmes échantillons que dans les **figures 25 et 26**) ont été filtrées pour éliminer les débris cellulaires, titrées, et utilisées pour réaliser un essai d'infectivité avec des cellules reporter TZM-bl. Ces cellules permettent de mesurer l'infectivité par l'expression d'une *firefly* luciférase sous le contrôle d'un LTR du VIH-1, dépendant donc de la production de Tat par l'intégration et expression des VLPs. Les unités relatives de luciférase ont été mesurées après 48 h d'infection et sont représentées en %. Les niveaux d'infectivité de référence des VLP exprimées à partir des conditions siNeg ont été fixés à 100 % et les niveaux d'infectivité des VLPs produits dans les conditions d'intérêt y ont été comparés. Les données représentent la moyenne ± l'écart-type d'au moins trois expériences indépendantes. Il n'y a pas de différences significatives.

3) Discussion

Nous avons pu montrer pour la première fois les interactions d'UPF1 à la fois avec Vif et A3G (**Figure 23**). Ces interactions semblent indépendantes de l'ARN (**Figure 23E, 23F**). Compte tenu de la principale fonction d'hélicase d'ARN d'UPF1 et du crible initial ayant conduit à son identification, nous nous attendions à ce que l'ARN soit impliqué dans ces interactions. Cependant, le traitement RNase ayant été réalisé à la fin de la co-IP et pas en amont, nous ne pouvons pas exclure formellement l'implication d'un ARN dans l'interaction. En effet, l'interaction des deux protéines pourrait avoir protégé de la dégradation un potentiel ARN induisant l'interaction.

Nous n'avons pas caractérisé plus en détail les interfaces d'interaction d'UPF1 avec nos protéines d'intérêt, car nous ne disposons pas encore de mutants de délétion. UPF1 étant une protéine de 1118 acides aminés avec plus de 500 interactants identifiés (base de données Biogrid, consultée le 09/08/2023, https://thebiogrid.org/111908/summary/homo-sapiens/upf1.html), une étude minutieuse de la littérature devra être réalisée pour identifier des mutants de délétion ou des mutants ponctuels pertinents pour étudier les interactions UPF1-A3G et UPF1-Vif.

Étant donné ces interactions, il sera intéressant de réaliser le même type d'expérience de surexpression en gradient en présence d'A3G et/ou Vif afin d'étudier l'implication d'UPF1 dans l'expression d'A3G ou de Vif. De manière intéressante, UPF1 possède un domaine RING (Takahashi et al., 2008) qui exerce une activité d'E3-ligase induisant la dégradation de la protéine MYOD (Feng et al., 2017), et potentiellement d'autres protéines. Nous envisageons de tester deux mutants ponctuels en notre possession, l'un étant déficient pour sa liaison à l'ATP (R843C), abolissant ainsi son activité d'hélicase, et l'autre hyperphosphorylé déficient à la fois pour son activité hélicase et de liaison à E2 (UPF1 S124A/N138A/T139A/R843C/G495R/G497E).

Lorsqu'UPF1 était éteint, nous avons observé une diminution des niveaux d'expression des ARN d'A3G dans différentes conditions, impactant probablement les niveaux de la protéine (**Figure 25**). Nous avons utilisé le transcrit WT d'A3G (portant un uORF) dans ces expériences, qui pourrait donc être reconnu comme une cible d'UPF1 dans la voie du NMD. Nous aurions pu, à l'inverse, nous attendre à observer une hausse des niveaux d'A3G en conditions d'extinction d'UPF1. Cependant, la quantité d'ARN d'A3G ne semble pas être affectée par la présence ou l'absence de la région uORF (Libre et al., 2022), suggérant que le transcrit n'est pas une cible du NMD. Un *off-target* du siARN ciblant UPF1 est très improbable de par les homologies de séquences faibles (7 nucléotides contigus d'homologie au plus entre l'ARNm d'A3G et le siARN). Nos observations microscopiques des cellules éteintes pour UPF1 ont révélé des effets cytopathiques modérés (cellules plus petites) et une augmentation de la mort cellulaire modérée par rapport aux conditions contrôles. Les voies de surveillance de l'ARN sont des mécanismes essentiels à l'homéostasie cellulaire, et il est possible que leur dérèglement entraîne une perturbation de l'homéostasie cellulaire globale. L'extinction d'UPF1 pourrait ainsi être toxique pour les cellules compte tenu de son rôle majeur dans le

contrôle de la qualité de l'ARN (Azzalin and Lingner, 2006; Medghalchi et al., 2001). Néanmoins, de nombreuses études s'intéressant à UPF1 par l'extinction de l'expression du gène ou *via* des lignées délétées du gène démontrent que ce dernier n'est pas primordial à la survie cellulaire. D'autre part, en drosophile seul 10% du transcriptome se voit diminué par une extinction d'UPF1 (Rehwinkel et al., 2005). La baisse d'expression d'A3G en cas de *silencing* d'UPF1 pourrait être la conséquence d'effets délétères à l'échelle cellulaire de l'extinction du gène, mais est plus probablement liée à un rôle de l'hélicase dans l'expression d'A3G ; nos futures expériences, notamment de surexpression, permettront de clarifier le rôle d'UPF1.

Plusieurs travaux ont étudié UPF1 dans le contexte du VIH. Il a été montré qu'UPF1 accroit notamment l'export, la stabilité et la traduction de l'ARN US du VIH-1 (Ajamian et al., 2015, 2008; Rao et al., 2018), ainsi que la transcription inverse (Serquiña et al., 2013). Rev interagit aussi avec UPF1, relocalisant l'hélicase et diminuant alors l'activité du NMD (Prochasson et al., 2023). Le rôle précis d'UPF1 dans le cycle du VIH-1 et dans les types cellulaires infectés n'est pas encore connu, son extinction dans des macrophages dérivés des monocytes ne montrant aucun effet (Rao et al., 2019) tandis qu'en LT CD4+ UPF1 améliore l'expression virale et participe à la réactivation virale (Rao et al., 2018). Dans nos expériences, le *silencing* d'UPF1 a réduit de 50% les niveaux d'expression des ARN US du HIV-1, et de 50-60% les niveaux d'expression des précurseurs Gag dans les cellules et de p24 dans les VLP (**Figure 26A**). Ajamian et collaborateurs (Ajamian et al., 2008) rapportent aussi une diminution, bien que plus drastique, de l'ARN US et de Gag en cas de *silencing* d'UPF1. Cependant, dans nos expériences de surexpression (**Figure 24**), UPF1 semble au contraire diminuer l'expression de Gag, allant à l'encontre des travaux d'Ajamian et de nos résultats de *silencing*. D'un autre côté, Serquina et collaborateurs ne rapportent eux aucun impact du *silencing* ou de la surexpression d'UPF1 sur l'expression de Gag (Serquiña et al., 2013). Ils rapportent néanmoins une diminution de l'infectiosité des particules virales produites en absence d'UPF1, contrairement à nos résultats (**Figure 27**). Ainsi, nos résultats sont partiellement en désaccord la littérature publiée. Lorsque l'on s'intéresse à Vif, les niveaux d'ARN et de la protéine sont également diminués en cas de *silencing* d'UPF1 (**Figure 26A**). Comme discuté précédemment pour A3G, la diminution des niveaux d'expression d'ARN US et Vif pourrait avoir diverses origines. Là aussi, le *off-target* du siUPF1 est peu probable. UPF1 a déjà été montré comme essentielle pour la stabilité de l'ARN US, néanmoins l'hypothèse d'une perturbation de

l’homéostasie cellulaire globale par la perte d’UPF1 ne peut pas être exclue. De manière intrigante, nous observons également (**Figure 26B**), comme pour CHIP, que le *silencing* d’UPF1 induit une forte diminution de l'encapsidation de Vif. Un effet clair est observable sur les blots, cependant la quantification précise de cette perte est compliquée par le signal faible de Vif dans certaines conditions par rapport au bruit de fond de marquage. L’analyse d’une plus grande quantité de VLP permettra une quantification plus rigoureuse de ces écarts.

Nous avons également observé l'encapsidation d’UPF1 dans les VLP suite à sa surexpression (**Figure 24**), en accord avec de précédentes observations (Abrahamyan et al., 2010; Garcia-Moreno et al., 2023; Santos et al., 2012b; Serquiña et al., 2013). Cependant, nous n’avons pas réussi à observer cette encapsidation sans surexpression. A noter que le signal endogène d'UPF1 dans l'extrait cellulaire total est faible dans nos conditions, et les fractions VLP ne sont pas aussi riches en protéines que l'extrait cellulaire. La quantité d’UPF1 encapsidée est sûrement insuffisante pour être détectée. Nos résultats suggèrent également une diminution de l'encapsidation de Vif lorsque UPF1 est surexprimée (**Figure 24**, panneau "VLP", comparer les pistes 1-2 et 3-4). UPF1 est encapsidée (Serquiña et al., 2013), probablement *via* son interaction avec l'ARNg du VIH-1 (Ajamian et al., 2008; Garcia-Moreno et al., 2023; Hogg and Goff, 2010). De son côté, l'encapsidation de Vif dépend au moins partiellement de l'encapsidation de l'ARNg (Khan et al., 2001). La diminution de l'encapsidation de Vif pourrait être le résultat d'une compétition de liaison à l'ARN du VIH entre les deux protéines.

Enfin, comme mentionné précédemment, UPF1 possède un domaine RING (Takahashi et al., 2008) qui exerce une activité E3-ligase (Feng et al., 2017).De manière intéressante, UPF1 de levure interagit avec des polypeptides produits par des uORF et favorise leur dégradation par le protéasome (Kuroha et al., 2013, 2009). De plus ces polypeptides interagissent avec Hsp70 (Kuroha et al., 2013), et UPF1 pourrait se lier à Sse1, un partenaire impliqué dans un complexe Hsp90-Hsp70. Ainsi, ces observations suggèrent qu’UPF1 pourrait être impliquée dans l'homéostasie cellulaire et induire la dégradation des peptides codés par des uORF. Ces éléments, bien qu’encore très lointains de nos résultats, sont intéressants à considérer, compte tenu de l’interaction d’Hsp70 avec A3G (Sugiyama et al., 2011), de l'uORF d’A3G et de nos résultats concernant CHIP et A3G.

4) Limitations

Les diverses expériences présentées avec n=1 (co-IP + RNase, surexpression d'UPF1 en présence de pNL4.3) devront être répétées pour confirmer les résultats obtenus. Comme discuté plus haut, les expériences de *silencing* ne permettent pas de déterminer si la diminution de l'expression d'une protéine d'intérêt reflète un effet direct du gène éteint dans la synthèse de la protéine d'intérêt, ou si l'extinction du gène affecte l'homéostasie, provoquant alors des effets indésirables indirects sur la production de la protéine suivie.

Finalement, comme détaillé pour CHIP, l'interaction UPF1-ARNm d'A3G devra être validée par des méthodes orthogonales telles que le *RIP*. Des expériences préliminaires ne nous ont pas pour le moment permis de valider cette interaction. UPF1 pouvant lier de nombreux transcrits, nous nous attendons à détecter une telle interaction. Ces expériences seront répétées avec des témoins appropriés.

Conclusions et perspectives

APOBEC3G est une désaminase de cytidine ayant comme rôle principal celui de facteur de restriction (Sheehy et al., 2002). La protéine, de par son action enzymatique, ou de par ses capacités de fixation aux acides nucléiques agit avec un spectre large, en inhibant la réplication de nombreux virus. Une de ses cibles les mieux caractérisées est le VIH-1, la désaminase induisant principalement des mutations délétères dans le génome viral au cours de la transcription inverse. Le VIH-1 la contrecarre néanmoins grâce à sa protéine auxiliaire Vif, qui a pour fonction majeure d'inhiber l'expression des A3. Vif inhibe l'expression d'A3G en induisant sa dégradation, en inhibant sa transcription, et finalement en inhibant sa traduction (Verriez et al., 2020). Mon laboratoire s'intéresse à ce dernier mode d'action depuis de nombreuses années et a montré que Vif se fixe sur la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G (Mercenne et al., 2010). Cette région est importante pour la régulation traductionnelle par Vif (Guerrero et al., 2016). En effet, elle contient un uORF, localisé au niveau des motifs SL2 et SL3 de la 5'UTR, dont la présence est cruciale pour la régulation négative par la protéine virale. Cette région permet de plus à Vif de rediriger le transcrit d'A3G dans les granules de stress (Libre et al., 2022).

Notre hypothèse de travail est que Vif régule la traduction d'A3G en recrutant des facteurs négatifs de la traduction, ou inhibe le recrutement de facteurs positifs de cette dernière. L'objectif de ma thèse était ainsi de caractériser les mécanismes moléculaires régulant l'expression d'A3G, et plus précisément sa traduction en présence de Vif, par l'analyse des protéomes de l'ARN d'A3G ; puis de caractériser les protéines régulées et leurs rôles sur l'expression d'A3G et au cours de la réplication virale.

J'ai aussi contribué au cours de ma thèse à montrer l'importance d'une région uORF dans la régulation de l'expression d'A3G, premièrement en tant que motif de régulation à part entière, induisant des mécanismes suboptimaux de traduction pour l'ORF principale, tels que le *leaky-scanning* ou la réinitiation ; et deuxièmement en tant que motif essentiel pour l'action d'inhibition traductionnelle par Vif, la protéine virale n'exerçant plus cette activité en absence de la région uORF (Libre et al., 2022). Cet article est joint en annexe et ne sera pas approfondi dans cette discussion.

Nous avons identifié les interactomes de l'ARNm d'A3G dans différentes conditions, montrant ainsi l'effet de modulateur Vif et d'A3G sur les ribonucléoprotéines d'A3G. Notre crible a permis l'identification : (1) du core interactome de l'ARNm d'A3G, c'est-à-dire les

protéines associées à l'ARNm indépendamment des conditions analysées, qui sont en l'occurrence des interactants souvent retrouvés associés aux ARNm et jouant des rôles dans leur homéostasie (épissage, export, traduction, dégradation…). De manière intéressante, ce crible a permis d'identifier (2) les protéines dont la présence à l'ARNm d'A3G est modulée par la présence d'A3G ou Vif. Ces protéines sont alors des régulateurs potentiels d'A3G et/ou des partenaires de Vif. Celles-ci étaient principalement des facteurs lié au cytosquelette et aux compartiments cellulaires (P-bodies, granules de stress). Par ailleurs, de nombreuses phosphoprotéines ont également été retrouvées.

Il serait maintenant intéressant de définir les protéomes de l'ARNm ΔuORF d'A3G en présence de Vif et de les comparer aux protéomes de l'ARN WT d'A3G, afin d'identifier les protéines dont le recrutement est régulé à la fois par la protéine virale et par cette région, qui constitueraient des candidats de choix dans le mécanisme d'inhibition traductionnel d'A3G par Vif. J'ai initié de tels travaux au cours de ma thèse, en mettant en œuvre la capture d'un ARNm d'A3G WT ou ΔuORF *in cellula* à la différence de notre précédente approche basée sur un ARNm transcrit *in vitro*. Cette approche repose sur l'expression de l'ARNm d'A3G à partir d'un vecteur d'expression (permettant une utilisation facile de mutants) en cellules HEK-293T, en présence ou non de Vif. Les cellules ont été complémentées en 4-thiorudine (4-SU) afin que l'analogue soit incorporé dans les transcrits néosynthétisés, puis une exposition aux UV à 365 nm permet le pontage des ARN aux protéines en interaction directe. Les complexes ribonucléoprotéiques ainsi formés ont été capturés par des billes décorées par une gamme de désoxyoligonucléotides conçue pour être uniquement complémentaires à l'ARNm d'A3G. Le pontage de ces sondes aux billes ainsi que des protéines à nos ARN d'intérêt a permis d'effectuer des lavages stringents afin d'éliminer les protéines fixées aspécifiquement aux billes. Les protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse. Ces résultats trop préliminaires pour le moment n'ont pas été présentés dans ce manuscrit.

La réalisation d'expériences de *RNA immunoprecipitation* sera un ajout nécessaire pour confirmer ou non les cibles identifiées par nos cribles. Par la suite, la compréhension de l'inhibition traductionnelle d'A3G induite par Vif sera affinée par l'étude approfondie des candidats validés, notamment par des expériences de surexpression ou de *silencing* afin d'analyser l'action traductionnelle de Vif sur A3G indépendamment de son activité protéasomique (ajout d'ALLN/MG132, utilisation d'un mutant Cul5 dominant négatif).

Le mode d'action de Vif pour réguler la traduction d'A3G est encore mal compris, néanmoins nous pouvons proposer diverses hypothèses. Premièrement, Vif étant capable de fixer l'ARNm d'A3G avec une bonne affinité, elle pourrait par exemple bloquer le recrutement/scanning du ribosome par encombrement stérique. De manière intéressante, en absence de Vif, la densité de ribosome est plus importante sur l'uORF d'A3G que sur le reste de la 5'UTR (Libre et al., 2022), révélant un ralentissement du scanning, et/ou un blocage des ribosomes. Vif pourrait accentuer cet effet. Par ailleurs, Vif pouvant lier et réguler l'expression de l'ARNm d'A3G, mon laboratoire étudie la capacité de Vif à réguler d'autre ARN. Des analyses de PAR-CLIP montrent que Vif se fixe à une large gamme d'ARNm cellulaires, au niveau de leurs régions codantes ou non codantes (communication personnelle, Stupfler & Paillart). À la lumière de ces éléments, il serait intéressant d'effectuer des expériences de ribosome profiling en absence et en présence de Vif afin d'étudier la densité de ribosome sur la 5'UTR d'A3G, et plus généralement d'autres transcrits porteurs d'uORF.

Une autre hypothèse, sur laquelle mes méthodes et objectifs de thèse étaient centrés, est que Vif pourrait recruter des facteurs négatifs de la traduction, ou inhiber le recrutement de facteurs positifs de cette dernière. La manière précise dont Vif modulerait le recrutement de telles protéines reste néanmoins à élucider. Nos données ont rapporté un nombre non négligeable de phosphoprotéines parmi les protéines régulées par Vif sur l'ARNm d'A3G, la capacité de la protéine virale à modeler les phosphoprotéomes (Greenwood et al., 2016) est alors une caractéristique intrigante. Vif pourrait donc agir sur ces protéines *via* cette activité phosphomodulatrice. Par ailleurs, Vif est une chaperonne d'ARN. Elle pourrait ainsi agir en modifiant les structures secondaires de l'ARNm d'A3G, influençant en retour l'interaction de divers facteurs cellulaires.

Finalement, parmi les cibles identifiées *via* les analyses différentielles des protéomes de l'ARNm d'A3G en présence de Vif et/ou A3G, j'ai approfondi l'étude de deux candidats : 1) l'hélicase UPF1/RENT1, acteur majeur de l'homéostasie des ARNm impliqué dans de nombreuses voies de surveillance et de dégradation des ARN (notamment celle du NMD) ; et 2) l'E3-ubiquitine ligase CHIP/STUB1, un acteur essentiel de la protéostase qui agit de concert avec des protéines chaperonnes pour diriger des protéines mal repliées ou agrégées vers leur dégradation par les voies du protéasome et de l'autophagie. Ces deux protéines étaient significativement moins présentes sur l'ARNm WT d'A3G en présence de Vif, suggérant une

séquestration potentielle de ces protéines par Vif, et donc un effet positif de ces candidats dans l'expression d'A3G. J'ai pu confirmer l'interaction, indépendante de l'ARN, aussi bien de CHIP que d'UPF1 aux protéines Vif et A3G. Sur un plan technique, certaines expériences présentées ici devront être reproduites afin de renforcer nos observations, notamment des expériences de surexpression et de silencing en contexte infectieux.

L'étude d'UPF1 n'a pas été autant approfondie que celle de CHIP, et il sera intéressant d'étudier son rôle sur l'expression d'A3G grâce à des expériences de co-expression (ou *silencing*) avec A3G puis avec Vif en présence d'ALLN. La protéine pourrait aussi jouer un rôle dans la stabilité des transcrits d'A3G, son absence diminuant la quantité des ARNm d'A3G. Comme précédemment montré (Abrahamyan et al., 2010; Ajamian et al., 2015; Garcia-Moreno et al., 2023; Rao et al., 2018; Serquiña et al., 2013), nous avons observé une encapsidation d'UPF1 dans les particules virales ainsi qu'une action régulatrice de l'hélicase sur les niveaux d'ARNm du VIH-1. Nous n'avons néanmoins pas observé d'impact de la protéine sur l'infectiosité virale. D'autre part, nous avons observé un empaquetage réduit de Vif aussi bien en *silencing* qu'en surexpression d'UPF1. De manière intéressante Rev séquestre UPF1 dans le noyau (Prochasson et al., 2023), et nos résultats montrent une interaction Vif-UPF1. À l'image de Rev, Vif pourrait alors séquestrer UPF1 dans la cellule et être titré en cas de surexpression de l'hélicase. Les effets d'UPF1 sur l'encapsidation de Vif devront être approfondis.

En ce qui concerne CHIP, nos analyses de mutagenèse ont mis en évidence l'importance du résidu K30 pour son interaction à A3G et à Vif. Ce résidu a été montré dans la littérature comme essentiel à l'interaction de CHIP avec ses partenaires chaperonnes (Hsc70/Hsp90), ces dernières jouant le rôle d'intermédiaire entre CHIP et ses substrats, les clients des chaperonnes. D'autre part, des interactions entre A3G et les chaperonnes Hsp90 (Chen et al., 2017) ou Hsp70 (Sugiyama et al., 2011) ont déjà été rapportées. Il serait intéressant d'utiliser des mutants d'A3G et de Vif incapables d'interagir afin de déterminer précisément les mécanismes d'interaction du complexe CHIP-Vif-A3G, et d'étudier l'implication des protéines chaperonnes dans ces interactions, en confirmant d'abord leur présence par co-immunoprécipitation, puis en utilisant des mutants inaptes à interagir avec CHIP ou A3G/Vif.

Ces interactions pourraient en effet être essentielles à la régulation d'A3G par CHIP. Nos expériences de *silencing*, comme de surexpression, montrent un rôle inhibiteur de CHIP sur

l'expression d'A3G. Si cette régulation apparait être indépendante du protéasome, CHIP est aussi capable d'induire la dégradation par autophagie. De manière intéressante, des motifs KFERQ-like, signaux d'adressage à la voie de la *chaperone-mediated autophagie* (CMA) dont CHIP est un acteur, sont retrouvés dans la séquence protéique d'A3G. D'autre part, l'extinction de CHIP a entrainé une augmentation du niveau des ARNm d'A3G, ce qui suggère que CHIP pourrait réguler indirectement le niveau d'expression d'A3G en dégradant des facteurs de transcription tels que RUNX1/2. Il sera intéressant de poursuivre ces expériences (en présence d'inhibiteurs de l'autophagie, mutant catalytiquement inactif de CHIP et/ou déficient pour son interaction aux Hsp, mutagenèse du motif KFERQ-like ; analyse du niveau d'expression des ARNm d'A3G et des niveaux protéiques des facteurs de transcription d'A3G) pour comprendre plus en détail ces différents mécanismes. Ces résultats sont récapitulés de manière schématique ci-dessous (**Figure 28**).

De manière attendue, nous avons observé la répercussion de l'action régulatrice de CHIP sur les taux d'encapsidation d'A3G. Comme Vif et CHIP agissent toutes les deux comme inhibiteurs de l'expression d'A3G, il serait intéressant de déterminer si ces actions sont additives ou synergiques (suivi des niveaux d'expression d'A3G en co-expression avec Vif et CHIP). Nous n'avons observé aucun impact négatif de CHIP sur Vif (ni de rétablissement d'A3G en présence de Vif grâce à CHIP), et nos suivis de Pr55Gag en *silencing* de CHIP suggèrent même un rôle positif de CHIP sur la production ou la stabilité des protéines virales. Ces deux observations sont contraires à des travaux récemment publiés (Ali et al., 2021, 2019), et nous espérons y répondre en utilisant un modèle cellulaire plus approprié. De manière surprenante, l'absence de CHIP a aussi fortement diminué l'encapsidation de Vif. Malgré ces résultats (baisse de la production virale, augmentation d'A3G encapsidée et diminution de Vif encapsidée), nous avons observé une hausse modérée de l'infectivité des virions produits lorsque CHIP était éteinte, suggérant que CHIP a une action antivirale contre le VIH-1, cette fois en accord avec la littérature (Ali et al., 2019). Même si des résultats restent à confirmer, ils montrent une action complexe de CHIP dans la cellule infectée. CHIP pourrait inhiber des protéines cellulaires essentielles au cycle viral, ou d'autres protéines virales. De manière intéressante, la protéine multifonction HDAC6 a été montré comme un partenaire d'A3G et de Vif. Cette protéine stabilise A3G en la protégeant de l'action de Vif, et induit de surcroit la dégradation de Vif par une voie autophagique (Valera et al., 2015). Cette protéine, comme

CHIP, joue aussi un rôle de co-chaperonne (Kawaguchi et al., 2003; Ouyang et al., 2012). Ces éléments encouragent d'autant plus l'étude de l'autophagie dans le contexte de la régulation d'A3G par CHIP.

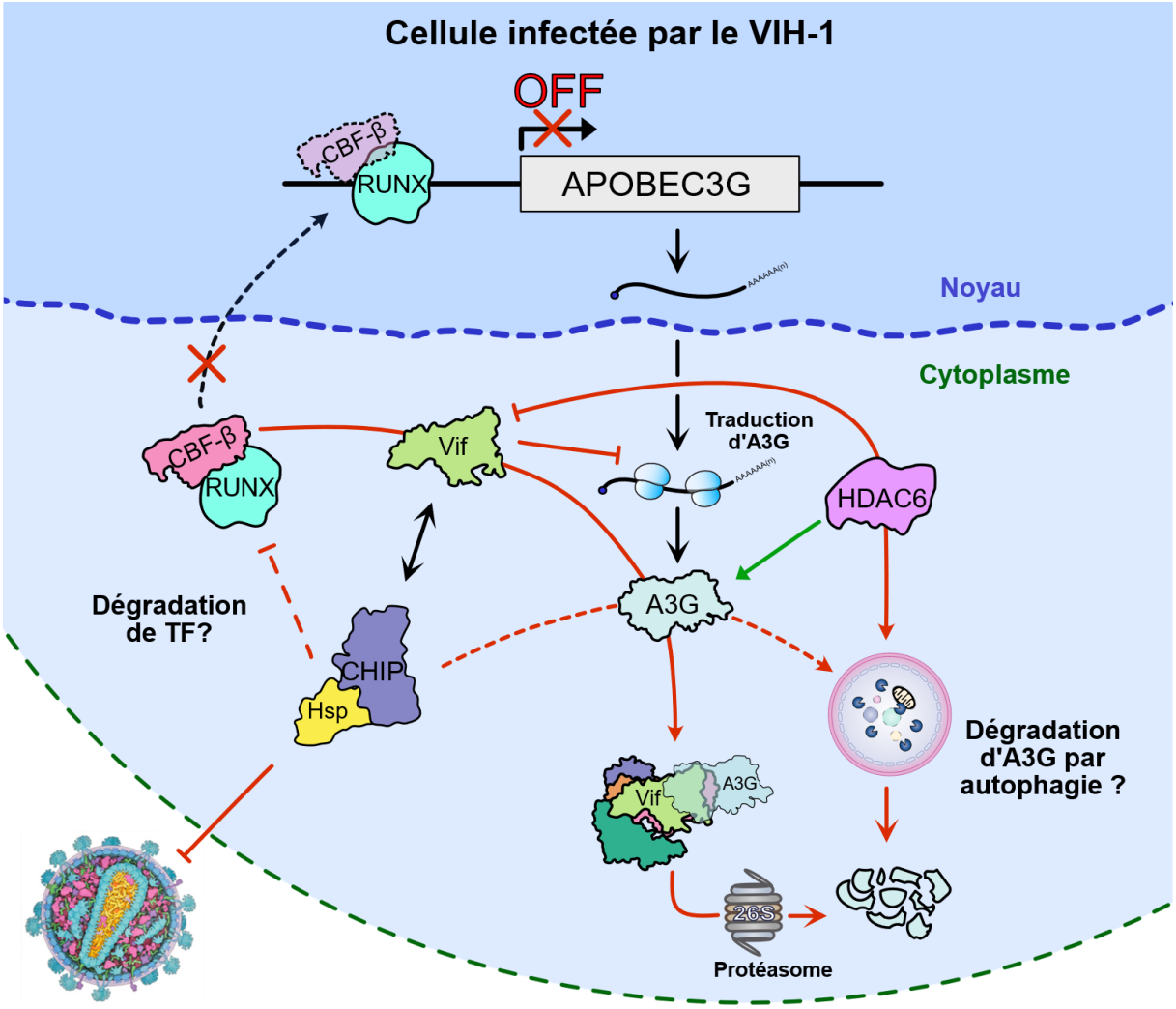


Figure 28 : Représentation des interactions A3G-Vif-CHIP. Les lignes rouges pleines symbolisent des interactions connues, ou des observations provenant de nos résultats. Les lignes rouges en pointillés symbolisent les actions potentielles de CHIP sur A3G. Les modes de régulations d'A3G par Vif sont représentés (inhibition de la transcription par séquestration de CBF-β, inhibition de la traduction et induction de la dégradation d'A3G par le protéasome). L'inhibition de l'infectiosité virale par CHIP ainsi que l'interaction Vif-CHIP (double flèche noire) sont symbolisées. Finalement CHIP inhibe l'expression d'A3G. Nos observations suggèrent deux hypothèses principales : (1) CHIP induit la dégradation d'un (ou de) facteur(s) de transcription d'A3G, comme par exemple RUNX1/2 ; (2) CHIP induit la dégradation d'A3G par une voie autophagique. De manière intéressante, la protéine HDAC6 fonctionne aussi comme une co-chaperonne et induit la dégradation de ses cibles par l'autophagie. Elle a déjà été montrée comme stabilisateur d'A3G (flèche verte) en même temps qu'inhibiteur du VIH-1, en induisant la dégradation de Vif par une voie autophagique.

D'autre part nous avons observé en condition de surexpression l'encapsidation de CHIP dans les particules virales. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour le

confirmer en condition physiologique, et si celle-ci s'opère par une co-encapsidation avec des protéines chaperonnes ou par un autre processus.

Il sera intéressant de valider la pertinence biologique de CHIP et de ses impacts aussi bien vis-à-vis de l'expression d'A3G que du cycle réplicatif du VIH-1 dans des contextes cellulaires plus physiologiques et pertinents, tels qu'en lignée T CD4+ exprimant A3G (Jurkat), par le biais d'expériences de *knock-out* (CRISP-Cas9) ou *knock-down* (*silencing*) de CHIP.

Finalement, nous déterminerons l'impact de CHIP sur les autres membres de la famille des APOBEC3 en reproduisant les expériences que nous avons effectuées et étudierons l'effet des désubiquitinases USP dans les interactions CHIP-A3G-Vif, ce type de protéine étant actuellement activement étudiée dans le contexte du VIH-1 et des relations A3G-Vif.

En conclusion, l'action physiologique de CHIP s'inscrit dans la continuité des multiples étapes de régulation de l'expression d'un gène, de sa transcription à la dégradation de la protéine qu'il exprime. À l'image de l'uORF que nous avons identifiée, nous démontrons que CHIP est un acteur supplémentaire dans la régulation de l'expression d'A3G. Ces deux éléments agissent au plus proche de l'étape d'expression protéique d'un gène, en modulant la synthèse de la protéine ou sa stabilité ; ils permettent ainsi de réguler l'expression de manière fine et immédiate, sans nécessiter un nouveau cycle de synthèse protéique, potentiellement en réaction à des stimuli tels que des stress. Les uORF sont en effet des motifs connus pour adapter la régulation des mORF aux conditions cellulaires. Les mécanismes de régulation de l'expression des A3, dont A3G, peuvent servir à réguler les désaminases et réduire les dommages collatéraux qu'elles peuvent induire sur le génome cellulaire. L'impact des A3 est en effet important en cancérogenèse. Il sera intéressant d'étudier si l'uORF d'A3G ainsi que la régulation de la protéine par CHIP sont eux aussi des mécanismes permettant d'adapter l'expression d'A3G en fonction des conditions cellulaires particulières. Qu'ils soient à un niveau traductionnel ou post-traductionnel, ces mécanismes de régulations sont intéressants et nous encouragent à poursuivre leur caractérisation. Leur compréhension fine permettra de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, aussi bien dans le cadre du VIH-1 que dans la cancérogenèse.

Références

Abrahamyan LG, Chatel-Chaix L, Ajamian L, Milev MP, Monette A, Clément J-F, Song R, Lehmann M, DesGroseillers L, Laughrea M, Boccaccio G, Mouland AJ. 2010. Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *Journal of Cell Science* **123**:369–383. doi:10.1242/jcs.055897

Ajamian L, Abel K, Rao S, Vyboh K, García-de-Gracia F, Soto-Rifo R, Kulozik AE, Gehring NH, Mouland AJ. 2015. HIV-1 Recruits UPF1 but Excludes UPF2 to Promote Nucleocytoplasmic Export of the Genomic RNA. *Biomolecules* **5**:2808–2839. doi:10.3390/biom5042808

Ajamian L, Abrahamyan L, Milev M, Ivanov PV, Kulozik AE, Gehring NH, Mouland AJ. 2008. Unexpected roles for UPF1 in HIV-1 RNA metabolism and translation. *RNA* **14**:914–927. doi:10.1261/rna.829208

Ajoge HO, Renner TM, Bélanger K, Greig M, Dankar S, Kohio HP, Coleman MD, Ndashimye E, Arts EJ, Langlois M-A, Barr SD. 2023. Antiretroviral APOBEC3 cytidine deaminases alter HIV-1 provirus integration site profiles. *Nat Commun* **14**:16. doi:10.1038/s41467-022-35379-y

Ali A, Farooqui SR, Banerjea AC. 2019. The host cell ubiquitin ligase protein CHIP is a potent suppressor of HIV-1 replication. *Journal of Biological Chemistry* **294**:7283–7295. doi:10.1074/jbc.RA118.007257

Ali A, Kumar V, Banerjea AC. 2021. STUB1/CHIP promotes ubiquitination and degradation of HIV-1 Vif to restore the cellular level of APOBEC3G protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **574**:27–32. doi:10.1016/j.bbrc.2021.08.031

Ali A, Raja R, Farooqui SR, Ahmad S, Banerjea AC. 2017. USP7 deubiquitinase controls HIV-1 production by stabilizing Tat protein. *Biochemical Journal* **474**:1653–1668. doi:10.1042/BCJ20160304

Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. 2021. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging* **1**:634–650. doi:10.1038/s43587-021-00098-4

Anderson BD, Harris RS. 2015. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-β/RUNX axis. *Science Advances* **1**:e1500296. doi:10.1126/sciadv.1500296

Angeletti PC, Walker D, Panganiban AT. 2002. Small glutamine-rich protein/viral protein U–binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell Stress Chaperones* **7**:258–268.

Azimi FC, Lee JE. 2020. Structural perspectives on HIV-1 Vif and APOBEC3 restriction factor interactions. *Protein Science* **29**:391–406. doi:10.1002/pro.3729

Azzalin CM, Lingner J. 2006. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* **16**:433–439. doi:10.1016/j.cub.2006.01.018

Babaahmady K, Oehlmann W, Singh M, Lehner T. 2007. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Human CD4+ T Cells by Microbial HSP70 and the Peptide Epitope 407-426. *Journal of Virology* **81**:3354–3360. doi:10.1128/jvi.02320-06

Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* **353**:aac4354. doi:10.1126/science.aac4354

Bao Q, Zhou J. 2023. Various strategies for developing APOBEC3G protectors to circumvent human immunodeficiency virus type 1. *European Journal of Medicinal Chemistry* **250**:115188. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115188

Barbosa C, Peixeiro I, Romão L. 2013. Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLOS Genetics* **9**:e1003529. doi:10.1371/journal.pgen.1003529

Barbosa JAF, Sparapani S, Boulais J, Lodge R, Cohen ÉA. 2021. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Mediates Degradation of APC1, a Scaffolding Component of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. *Journal of Virology* **95**:10.1128/jvi.00971-20. doi:10.1128/jvi.00971-20

Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868. doi:10.1126/science.6189183

Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology* **11**:877–883. doi:10.1038/nrmicro3132

Bartlett JA, DeMasi R, Quinn J, Moxham C, Rousseau F. 2001. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-1 infected adults. *AIDS* **15**:1369.

Bekker L-G, Tatoud R, Dabis F, Feinberg M, Kaleebu P, Marovich M, Ndung'u T, Russell N, Johnson J, Luba M, Fauci AS, Morris L, Pantaleo G, Buchbinder S, Gray G, Vekemans J, Kim JH, Levy Y, Corey L, Shattock R, Makanga M, Williamson C, Dieffenbach C, Goodenow MM, Shao Y, Staprans S, Warren M, Johnston MI. 2020. The complex challenges of HIV vaccine development require renewed and expanded global commitment. *The Lancet* **395**:384–388. doi:10.1016/S0140-6736(19)32682-0

Benhabiles H, Jia J, Lejeune F. 2016. Chapter 1 - General Aspects Related to Nonsense Mutations In: Benhabiles H, Jia J, Lejeune F, editors. Nonsense Mutation Correction in Human Diseases. Boston: Academic Press. pp. 1–76. doi:10.1016/B978-0-12-804468-1.00001-4

Bennett RP, Salter JD, Smith HC. 2018. A New Class of Antiretroviral Enabling Innate Immunity by Protecting APOBEC3 from HIV Vif-Dependent Degradation. *Trends in Molecular Medicine* **24**:507–520. doi:10.1016/j.molmed.2018.03.004

Bergantz L, Subra F, Deprez E, Delelis O, Richetta C. 2019. Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. *Cells* **8**:922. doi:10.3390/cells8080922

Bergmeier LA, Babaahmady K, Pido-Lopez J, Heesom KJ, Kelly CG, Lehner T. 2010. Cytoskeletal proteins bound to heat-shock protein 70 may elicit resistance to simian immunodeficiency virus infection of CD4+ T cells. *Immunology* **129**:506–515. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03202.x

Bernacchi S, Abd El-Wahab EW, Dubois N, Hijnen M, Smyth RP, Mak J, Marquet R, Paillart J-C. 2017. HIV-1 Pr55Gag binds genomic and spliced RNAs with different affinity and stoichiometry. *RNA Biol* **14**:90–103. doi:10.1080/15476286.2016.1256533

Bhat SA, Vasi Z, Adhikari R, Gudur A, Ali A, Jiang L, Ferguson R, Liang D, Kuchay S. 2022. Ubiquitin proteasome system in immune regulation and therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* **67**:102310. doi:10.1016/j.coph.2022.102310

Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, Chaloin L, Paillart J-C, Johansen T, Biard-Piechaczyk M. 2015. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* **29**:275. doi:10.1097/QAD.0000000000000554

Borsa M, Ferreira PLC, Petry A, Ferreira LGE, Camargo MM, Bou-Habib DC, Pinto AR. 2015. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. *Virol J* **12**:77. doi:10.1186/s12985-015-0298-0

Boso G, Kozak CA. 2020. Retroviral Restriction Factors and Their Viral Targets: Restriction Strategies and Evolutionary Adaptations. *Microorganisms* **8**:1965. doi:10.3390/microorganisms8121965

Boutant E, Bonzi J, Anton H, Nasim MB, Cathagne R, Réal E, Dujardin D, Carl P, Didier P, Paillart J-C, Marquet R, Mély Y, de Rocquigny H, Bernacchi S. 2020. Zinc Fingers in HIV-1 Gag Precursor Are Not Equivalent for gRNA Recruitment at the Plasma Membrane. *Biophys J* **119**:419–433. doi:10.1016/j.bpj.2020.05.035

Bracq L, Xie M, Benichou S, Bouchet J. 2018. Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1. *Frontiers in Immunology* **9**.

Brenner BG, Wainberg MA. 1999. Heat shock protein-based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**:80–90.

Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu W-S, Pathak VK. 2020. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**:5486–5493. doi:10.1073/pnas.1920631117

Cabrera-Rodríguez R, Pérez-Yanes S, Estévez-Herrera J, Márquez-Arce D, Cabrera C, Espert L, Blanco J, Valenzuela-Fernández A. 2021. The Interplay of HIV and Autophagy in Early Infection. *Frontiers in Microbiology* **12**.

Callahan MA, Handley MA, Lee Y-H, Talbot KJ, Harper JW, Panganiban AT. 1998. Functional Interaction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu and Gag with a Novel Member of the Tetratricopeptide Repeat Protein Family. *J Virol* **72**:5189–5197.

Chakraborty A, Edkins AL. 2023. CHIP: A Co-chaperone for Degradation by the Proteasome and Lysosome In: Edkins AL, Blatch GL, editors. The Networking of Chaperones by Co-Chaperones, Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing. pp. 351–387. doi:10.1007/978-3-031-14740-1_12

Chand K, Barman MK, Ghosh P, Mitra D. 2023. DNAJB8 facilitates autophagic-lysosomal degradation of viral Vif protein and restricts HIV-1 virion infectivity by rescuing APOBEC3G expression in host cells. *The FASEB Journal*

37:e22793. doi:10.1096/fj.202201738R

Chemudupati M, Kenney AD, Bonifati S, Zani A, McMichael TM, Wu L, Yount JS. 2019. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1866**:382–394. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.09.012

Chen B. 2019. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends in Microbiology* **27**:878–891. doi:10.1016/j.tim.2019.06.002

Chen Z, Eggerman TL, Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Kurlander R, Patterson AP. 2017. Heat shock proteins stimulate APOBEC-3–mediated cytidine deamination in the hepatitis B virus. *J Biol Chem* **292**:13459–13479. doi:10.1074/jbc.M116.760637

Chintala K, Mohareer K, Banerjee S. 2021a. Dodging the Host Interferon-Stimulated Gene Mediated Innate Immunity by HIV-1: A Brief Update on Intrinsic Mechanisms and Counter-Mechanisms. *Frontiers in Immunology* **12**.

Chintala K, Mohareer K, Banerjee S. 2021b. Dodging the Host Interferon-Stimulated Gene Mediated Innate Immunity by HIV-1: A Brief Update on Intrinsic Mechanisms and Counter-Mechanisms. *Frontiers in Immunology* **12**.

Chougui G, Munir-Matloob S, Matkovic R, Martin MM, Morel M, Lahouassa H, Leduc M, Ramirez BC, Etienne L, Margottin-Goguet F. 2018. HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat Microbiol* **3**:891–897. doi:10.1038/s41564-018-0179-6

Cisneros WJ, Cornish D, Hultquist JF. 2022. Application of CRISPR-Cas9 Gene Editing for HIV Host Factor Discovery and Validation. *Pathogens* **11**:891. doi:10.3390/pathogens11080891

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey M-A, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L. 1986. Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science* **233**:343–346. doi:10.1126/science.2425430

Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JHS, Godbole SV, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Cottle L, Zhang XC, Makhema J, Mills LA, Panchia R, Faesen S, Eron J, Gallant J, Havlir D, Swindells S, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano DD, Essex M, Hudelson SE, Redd AD, Fleming TR. 2016. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N Engl J Med* **375**:830–839. doi:10.1056/NEJMoa1600693

Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JHS, Godbole SV, Mehendale S, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Wang L, Makhema J, Mills LA, de Bruyn G, Sanne I, Eron J, Gallant J, Havlir D, Swindells S, Ribaudo H, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Fleming TR. 2011. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *New England Journal of Medicine* **365**:493–505. doi:10.1056/NEJMoa1105243

Colomer-Lluch M, Castro-Gonzalez S, Serra-Moreno R. 2020. Ubiquitination and SUMOylation in HIV Infection: Friends and Foes. *Current Issues in Molecular Biology* **35**:159–194. doi:10.21775/cimb.035.159

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**:93–96. doi:10.1038/35050618

Dai Q, Zhang C, Wu Y, McDonough H, Whaley RA, Godfrey V, Li H-H, Madamanchi N, Xu W, Neckers L, Cyr D, Patterson C. 2003. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *The EMBO Journal* **22**:5446–5458. doi:10.1093/emboj/cdg529

Daudé C, Décimo D, Trabaud M-A, André P, Ohlmann T, de Breyne S. 2016. HIV-1 sequences isolated from patients promote expression of shorter isoforms of the Gag polyprotein. *Arch Virol* **161**:3495–3507. doi:10.1007/s00705-016-3073-7

Daugherty MD, Malik HS. 2012. Rules of Engagement: Molecular Insights from Host-Virus Arms Races. *Annual Review of Genetics* **46**:677–700. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155522

De Breyne S, Ohlmann T. 2019. Focus on Translation Initiation of the HIV-1 mRNAs. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:101. doi:10.3390/ijms20010101

Deeks SG, Archin N, Cannon P, Collins S, Jones RB, de Jong MAWP, Lambotte O, Lamplough R, Ndung'u T, Sugarman J, Tiemessen CT, Vandekerckhove L, Lewin SR. 2021. Research priorities for an HIV cure: International

AIDS Society Global Scientific Strategy 2021. *Nat Med* **27**:2085–2098. doi:10.1038/s41591-021-01590-5

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. 2015. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers* **1**:1–22. doi:10.1038/nrdp.2015.35

Deforges J, de Breyne S, Ameur M, Ulryck N, Chamond N, Saaidi A, Ponty Y, Ohlmann T, Sargueil B. 2017. Two ribosome recruitment sites direct multiple translation events within HIV1 Gag open reading frame. *Nucleic Acids Research* **45**:7382–7400. doi:10.1093/nar/gkx303

Delviks-Frankenberry K, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, Hu W-S. 2011. Mechanisms and Factors that Influence High Frequency Retroviral Recombination. *Viruses* **3**:1650–1680. doi:10.3390/v3091650

Delviks-Frankenberry KA, Desimmie BA, Pathak VK. 2020. Structural Insights into APOBEC3-Mediated Lentiviral Restriction. *Viruses* **12**:587. doi:10.3390/v12060587

Demand J, Alberti S, Patterson C, Höhfeld J. 2001. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Current Biology* **11**:1569–1577. doi:10.1016/S0960-9822(01)00487-0

Dick RA, Mallery DL, Vogt VM, James LC. 2018. IP6 Regulation of HIV Capsid Assembly, Stability, and Uncoating. *Viruses* **10**:640. doi:10.3390/v10110640

Dikic I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry* **86**:193–224. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908

Drillien R, Pradeau-Aubreton K, Batisse J, Mezher J, Schenckbecher E, Marguin J, Ennifar E, Ruff M. 2022. Efficient production of protein complexes in mammalian cells using a poxvirus vector. *PLOS ONE* **17**:e0279038. doi:10.1371/journal.pone.0279038

Duggal NK, Emerman M. 2012. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat Rev Immunol* **12**:687–695. doi:10.1038/nri3295

Dutilleul A, Rodari A, Van Lint C. 2020. Depicting HIV-1 Transcriptional Mechanisms: A Summary of What We Know. *Viruses* **12**:1385. doi:10.3390/v12121385

Elangovan R, Jenks M, Yun J, Dickson-Tetteh L, Kirtley S, Hemelaar J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation, Abimiku AG, Agwale S, Archibald C, Avidor B, Barbás MG, Barre-Sinoussi F, Barugahare B, Belabbes EH, Bertagnolio S, Birx D, Bobkov AF, Brandful J, Bredell H, Brennan CA, Brooks J, Bruckova M, Buonaguro L, Buonaguro F, Buttò S, Buvé A, Campbell M, Carr J, Carrera A, Carrillo MG, Celum C, Chaplin B, Charles M, Chatzidimitriou D, Chen Z, Chijiwa K, Cooper D, Cunningham P, Dagnra A, Gascun CF de, Amo JD, Delgado E, Dietrich U, Dwyer D, Ellenberger D, Ensoli B, Essex M, Fleury H, Fonjungo PN, Foulongne V, Gadkari DA, Gao F, García F, Garsia R, Gershy-Damet GM, Glynn JR, Goodall R, Grossman Z, Guimarães ML, Hahn B, Hamers RL, Hamouda O, Handema R, He X, Herbeck J, Ho DD, Holguin A, Hosseinipour M, Hunt G, Ito M, Kacem MABH, Kahle E, Kaleebu P, Kalish M, Kamarulzaman A, Kang C, Kanki P, Karamov E, Karasi J-C, Kayitenkore K, Kelleher T, Kitayaporn D, Kostrikis LG, Kucherer C, Lara C, Leitner T, Liitsola K, Lingappa J, Linka M, Rivera IL de, Lukashov V, Maayan S, Mayr L, McCutchan F, Meda N, Menu E, Mhalu F, Mloka D, Mokili JL, Montes B, Mor O, Morgado M, Mosha F, Moussi A, Mullins J, Najera R, Nasr M, Ndembi N, Neilson JR, Nerurkar VR, Neuhann F, Nolte C, Novitsky V, Nyambi P, Ofner M, Paladin FJ, Papa A, Pape J, Parkin N, Parry C, Peeters M, Pelletier A, Pérez-Álvarez L, Pillay D, Pinto A, Quang TD, Rademeyer C, Raikanikoda F, Rayfield MA, Reynes J-M, Wit TR de, Robbins KE, Rolland M, Rousseau C, Salazar-Gonzales J, Salem H, Salminen M, Salomon H, Sandstrom P, Santiago ML, Sarr AD, Schroeder B, Segondy M, Selhorst P, Sempala S, Servais J, Shaik A, Shao Y, Slim A, Soares MA, Songok E, Stewart D, Stokes J, Subbarao S, Sutthent R, Takehisa J, Tanuri A, Tee KK, Thapa K, Thomson M, Tran T, Urassa W, Ushijima H, Perre P van de, Groen G van der, Laethem K van, Oosterhout J van, Sighem A van, Wijngaerden E van, Vandamme A-M, Vercauteren J, Vidal N, Wallace L, Williamson C, Wolday D, Xu J, Yang C, Zhang L, Zhang R. 2021. Global and Regional Estimates for Subtype-Specific Therapeutic and Prophylactic HIV-1 Vaccines: A Modeling Study. *Frontiers in Microbiology* **12**.

Etienne L, Bibollet-Ruche F, Sudmant PH, Wu LI, Hahn BH, Emerman M. 2015. The Role of the Antiviral APOBEC3 Gene Family in Protecting Chimpanzees against Lentiviruses from Monkeys. *PLOS Pathogens* **11**:e1005149. doi:10.1371/journal.ppat.1005149

Ezeonwumelu IJ, Garcia-Vidal E, Ballana E. 2021. JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. *Viruses* **13**:2379. doi:10.3390/v13122379

Fan Y, He JJ. 2016. HIV-1 Tat Induces Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes and Causes Neurotoxicity through Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Activation and Aggregation. *J Biol Chem*

291:22819–22829. doi:10.1074/jbc.M116.731828

Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, Tatem AJ, Sousa JD, Arinaminpathy N, Pépin J, Posada D, Peeters M, Pybus OG, Lemey P. 2014. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* **346**:56–61. doi:10.1126/science.1256739

Fauci AS. 2003. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med* **9**:839–843. doi:10.1038/nm0703-839

Feng Q, Jagannathan S, Bradley RK. 2017. The RNA Surveillance Factor UPF1 Represses Myogenesis via Its E3 Ubiquitin Ligase Activity. *Molecular Cell* **67**:239-251.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.034

Ferreira JV, Fôfo H, Bejarano E, Bento CF, Ramalho JS, Girão H, Pereira P. 2013. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **9**:1349–1366. doi:10.4161/auto.25190

Ferreira JV, Soares AR, Ramalho JS, Pereira P, Girao H. 2015. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep* **5**:10210. doi:10.1038/srep10210

Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Hatziioannou T, Skalka AM. 2020. Principles of Virology, 5e édition. ed. Hoboken, NJ: American Society for Microbiology.

Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Rall GF, Skalka A-M. 2015. Principles of Virology, 4e édition. ed. Washington, DC: ASM Press.

Freed EO. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* **13**:484–496. doi:10.1038/nrmicro3490

Gaba A, Flath B, Chelico L. 2021. Examination of the APOBEC3 Barrier to Cross Species Transmission of Primate Lentiviruses. *Viruses* **13**:1084. doi:10.3390/v13061084

Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen E-L, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon H-U, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* **36**:1811–1836. doi:10.15252/embj.201796697

Gao W, Li G, Zhao S, Wang H, Huan C, Zheng B, Jiang C, Zhang W. 2021a. Deubiquitinating Enzyme USP21 Inhibits HIV-1 Replication by Downregulating Tat Expression. *Journal of Virology* **95**:10.1128/jvi.00460-21. doi:10.1128/jvi.00460-21

Gao W, Rui Y, Li G, Zhai C, Su J, Liu H, Zheng W, Zheng B, Zhang W, Yang Y, Hua S, Yu X. 2021b. Specific Deubiquitinating Enzymes Promote Host Restriction Factors Against HIV/SIV Viruses. *Frontiers in Immunology* **12**.

Garcia-Moreno M, Truman R, Chen H, Iselin L, Lenz CE, Lee J, Dicker K, Noerenberg M, Sohier TJM, Palmalux N, Järvelin AI, Kamel W, Ruscica V, Ricci EP, Davis I, Mohammed S, Castello A. 2023. Incorporation of genome-bound cellular proteins into HIV-1 particles regulates viral infection. doi:10.1101/2023.06.14.544764

García-Sastre A. 2017. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host & Microbe* **22**:176–184. doi:10.1016/j.chom.2017.07.012

Gargan S, Ahmed S, Mahony R, Bannan C, Napoletano S, O'Farrelly C, Borrow P, Bergin C, Stevenson NJ. 2018. HIV-1 Promotes the Degradation of Components of the Type 1 IFN JAK/STAT Pathway and Blocks Anti-viral ISG Induction. *EBioMedicine* **30**:203–216. doi:10.1016/j.ebiom.2018.03.006

Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories* **7**:11. doi:10.1186/1475-2859-7-11

Ghimire D, Rai M, Gaur R. 2018. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *Journal of General Virology* **99**:435–446. doi:10.1099/jgv.0.001026

Gholizadeh Z, Iqbal MS, Li R, Romerio F. 2021. The HIV-1 Antisense Gene ASP: The New Kid on the Block. *Vaccines* **9**:513. doi:10.3390/vaccines9050513

Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. 2018. HIV. *The Lancet* **392**:685–697. doi:10.1016/S0140-6736(18)31311-4

González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev*

Immunol **12**:125–135. doi:10.1038/nri3133

Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, Goicochea P, Casapía M, Guanira-Carranza JV, Ramirez-Cardich ME, Montoya-Herrera O, Fernández T, Veloso VG, Buchbinder SP, Chariyalertsak S, Schechter M, Bekker L-G, Mayer KH, Kallás EG, Amico KR, Mulligan K, Bushman LR, Hance RJ, Ganoza C, Defechereux P, Postle B, Wang F, McConnell JJ, Zheng J-H, Lee J, Rooney JF, Jaffe HS, Martinez AI, Burns DN, Glidden DV. 2010. Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *New England Journal of Medicine* **363**:2587–2599. doi:10.1056/NEJMoa1011205

Greenwood EJ, Matheson NJ, Wals K, van den Boomen DJ, Antrobus R, Williamson JC, Lehner PJ. 2016. Temporal proteomic analysis of HIV infection reveals remodelling of the host phosphoproteome by lentiviral Vif variants. *eLife* **5**:e18296. doi:10.7554/eLife.18296

Guerrero S, Batisse J, Libre C, Bernacchi S, Marquet R, Paillart J-C. 2015. HIV-1 Replication and the Cellular Eukaryotic Translation Apparatus. *Viruses* **7**:199–218. doi:10.3390/v7010199

Guerrero S, Libre C, Batisse J, Mercenne G, Richer D, Laumond G, Decoville T, Moog C, Marquet R, Paillart J-C. 2016. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Scientific Reports* **6**:39507. doi:10.1038/srep39507

Guha D, Ayyavoo V. 2013. Innate Immune Evasion Strategies by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *International Scholarly Research Notices* **2013**:e954806. doi:10.1155/2013/954806

Guo C, Wu Y, Zhang Y, Liu X, Li A, Gao M, Zhang T, Wu H, Chen G, Huang X. 2021. Transmitted Drug Resistance in Antiretroviral Therapy-Naive Persons With Acute/Early/Primary HIV Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol* **12**:718763. doi:10.3389/fphar.2021.718763

Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppa D, Salgado M, Martinez-Picado J, Nijhuis M, Wensing AMJ, Lee H, Grant P, Nastouli E, Lambert J, Pace M, Salasc F, Monit C, Innes AJ, Muir L, Waters L, Frater J, Lever AML, Edwards SG, Gabriel IH, Olavarria E. 2019. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* **568**:244–248. doi:10.1038/s41586-019-1027-4

Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ, Hill A, Davis DH, Gregson J, Sawyer AW, Hamers RL, Ndembi N, Pillay D, Bertagnolio S. 2012. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. *The Lancet* **380**:1250–1258. doi:10.1016/S0140-6736(12)61038-1

Gurer C, Cimarelli A, Luban J. 2002. Specific Incorporation of Heat Shock Protein 70 Family Members into Primate Lentiviral Virions. *Journal of Virology* **76**:4666–4670. doi:10.1128/jvi.76.9.4666-4670.2002

Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. 2012. The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus*. *Journal of Biological Chemistry* **287**:40875–40883. doi:10.1074/jbc.R112.416925

He B, Tran JT, Sanchez DJ. 2019. Manipulation of Type I Interferon Signaling by HIV and AIDS-Associated Viruses. *Journal of Immunology Research* **2019**:e8685312. doi:10.1155/2019/8685312

Hemelaar J. 2013. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *Journal of Infection* **66**:391–400. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.026

Hennessy C, McKernan DP. 2021. Anti-Viral Pattern Recognition Receptors as Therapeutic Targets. *Cells* **10**:2258. doi:10.3390/cells10092258

Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. 2019. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:421–435. doi:10.1038/s41580-019-0101-y

Hogg JR, Goff SP. 2010. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* **143**:379–389. doi:10.1016/j.cell.2010.10.005

Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant Pichia pastoris. *Biotechnol Bioeng* **85**:367–375. doi:10.1002/bit.10904

Hoque M, Park JY, Chang Y, Luchessi AD, Cambiaghi TD, Shamanna R, Hanauske-Abel HM, Holland B, Pe'ery T, Tian B, Mathews MB. 2017. Regulation of gene expression by translation factor eIF5A: Hypusine-modified eIF5A enhances nonsense-mediated mRNA decay in human cells. *Translation (Austin)* **5**:e1366294. doi:10.1080/21690731.2017.1366294

Hotter D, Kirchhoff F. 2018. Interferons and beyond: Induction of antiretroviral restriction factors. *Journal of Leukocyte Biology* **103**:465–477. doi:10.1002/JLB.3MR0717-307R

Houzet L, Paillart JC, Smagulova F, Maurel S, Morichaud Z, Marquet R, Mougel M. 2007. HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic Acids Research* **35**:2695–2704. doi:10.1093/nar/gkm153

Hu W-S, Hughes SH. 2012. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006882. doi:10.1101/cshperspect.a006882

Hughes SH. 2015. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiology Spectrum* **3**:10.1128/microbiolspec.mdna3-0027–2014. doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0027-2014

Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. 2009. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* **360**:692–698. doi:10.1056/NEJMoa0802905

Isken O, Kim YK, Hosoda N, Mayeur GL, Hershey JWB, Maquat LE. 2008. Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell* **133**:314–327. doi:10.1016/j.cell.2008.02.030

Isken O, Maquat LE. 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet* **9**:699–712. doi:10.1038/nrg2402

Ito F, Alvarez-Cabrera AL, Liu S, Yang H, Shiriaeva A, Zhou ZH, Chen XS. 2023. Structural basis for HIV-1 antagonism of host APOBEC3G via Cullin E3 ligase. *Science Advances* **9**:eade3168. doi:10.1126/sciadv.ade3168

Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Kochetkov SN, Starodubova ES, Bartosch B, Isaguliants MG. 2016. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev* **2016**:8910396. doi:10.1155/2016/8910396

Iwami S, Takeuchi JS, Nakaoka S, Mammano F, Clavel F, Inaba H, Kobayashi T, Misawa N, Aihara K, Koyanagi Y, Sato K. 2015. Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. *eLife* **4**:e08150. doi:10.7554/eLife.08150

Iyer K, Chand K, Mitra A, Trivedi J, Mitra D. 2021. Diversity in heat shock protein families: functional implications in virus infection with a comprehensive insight of their role in the HIV-1 life cycle. *Cell Stress and Chaperones* **26**:743–768. doi:10.1007/s12192-021-01223-3

Iyer K, Mitra A, Mitra D. 2022. Identification of 5' upstream sequence involved in HSPBP1 gene transcription and its downregulation during HIV-1 infection. *Virus Res* **324**:199034. doi:10.1016/j.virusres.2022.199034

Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T. 2009. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* **6**:1. doi:10.1186/1742-4690-6-1

Jäger S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, Shales M, Mercenne G, Pache L, Li K, Hernandez H, Jang GM, Roth SL, Akiva E, Marlett J, Stephens M, D'Orso I, Fernandes J, Fahey M, Mahon C, O'Donoghue AJ, Todorovic A, Morris JH, Maltby DA, Alber T, Cagney G, Bushman FD, Young JA, Chanda SK, Sundquist WI, Kortemme T, Hernandez RD, Craik CS, Burlingame A, Sali A, Frankel AD, Krogan NJ. 2012a. Global landscape of HIV–human protein complexes. *Nature* **481**:365–370. doi:10.1038/nature10719

Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E, Li M, Anderson BD, Yen L, Stanley D, Mahon C, Kane J, Franks-Skiba K, Cimermancic P, Burlingame A, Sali A, Craik CS, Harris RS, Gross JD, Krogan NJ. 2012b. Vif hijacks CBF-β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **481**:371–375. doi:10.1038/nature10693

Janes H, Donnell D, Gilbert PB, Brown ER, Nason M. 2019. Taking stock of the present and looking ahead: envisioning challenges in the design of future HIV prevention efficacy trials. *The Lancet HIV* **6**:e475–e482. doi:10.1016/S2352-3018(19)30133-X

Jensen B-EO, Knops E, Cords L, Lübke N, Salgado M, Busman-Sahay K, Estes JD, Huyveneers LEP, Perdomo-Celis F, Wittner M, Gálvez C, Mummert C, Passaes C, Eberhard JM, Münk C, Hauber I, Hauber J, Heger E, De Clercq J, Vandekerckhove L, Bergmann S, Dunay GA, Klein F, Häussinger D, Fischer JC, Nachtkamp K, Timm J, Kaiser R, Harrer T, Luedde T, Nijhuis M, Sáez-Cirión A, Schulze zur Wiesch J, Wensing AMJ, Martinez-Picado J, Kobbe G. 2023. In-depth virological and immunological characterization of HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* **29**:583–587. doi:10.1038/s41591-023-02213-x

Jiang B, Shen H, Chen Z, Yin L, Zan L, Rui L. 2015. Carboxyl Terminus of HSC70-interacting Protein (CHIP) Down-regulates NF-κB-inducing Kinase (NIK) and Suppresses NIK-induced Liver Injury. *J Biol Chem* **290**:11704–11714. doi:10.1074/jbc.M114.635086

Jiang C, Lian X, Gao C, Sun X, Einkauf KB, Chevalier JM, Chen SMY, Hua S, Rhee B, Chang K, Blackmer JE, Osborn M, Peluso MJ, Hoh R, Somsouk M, Milush J, Bertagnolli LN, Sweet SE, Varriale JA, Burbelo PD, Chun T-W, Laird GM, Serrao E, Engelman AN, Carrington M, Siliciano RF, Siliciano JM, Deeks SG, Walker BD, Lichterfeld M, Yu XG. 2020. Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature* **585**:261–267. doi:10.1038/s41586-020-2651-8

Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C. 2001. CHIP Is a U-box-dependent E3 Ubiquitin Ligase: IDENTIFICATION OF Hsc70 AS A TARGET FOR UBIQUITYLATION*. *Journal of Biological Chemistry* **276**:42938–42944. doi:10.1074/jbc.M101968200

Jones CE, Tan WS, Grey F, Hughes DJ. 2021. Discovering antiviral restriction factors and pathways using genetic screens. *Journal of General Virology* **102**:001603. doi:10.1099/jgv.0.001603

Jourdain H, Gage SB de, Desplas D, Dray-Spira R. 2022. Real-world effectiveness of pre-exposure prophylaxis in men at high risk of HIV infection in France: a nested case-control study. *The Lancet Public Health* **7**:e529–e536. doi:10.1016/S2468-2667(22)00106-2

Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strebel K. 2003. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity. *Journal of Virology* **77**:11398–11407. doi:10.1128/jvi.77.21.11398-11407.2003

Kaushik S, Cuervo AM. 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**:365–381. doi:10.1038/s41580-018-0001-6

Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao T-P. 2003. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* **115**:727–738. doi:10.1016/S0092-8674(03)00939-5

Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, Crane HM, Willig J, Mugavero M, Saag M, Martin JN, Deeks SG. 2009. Incomplete Peripheral CD4+ Cell Count Restoration in HIV-Infected Patients Receiving Long-Term Antiretroviral Treatment. *Clinical Infectious Diseases* **48**:787–794. doi:10.1086/597093

Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, Strebel K. 2001. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is Packaged into the Nucleoprotein Complex through an Interaction with Viral Genomic RNA. *J Virol* **75**:7252–7265. doi:10.1128/JVI.75.16.7252-7265.2001

Khandia R, Dadar M, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Yatoo MI, Iqbal HMN, Singh KP, Joshi SK, Chaicumpa W. 2019. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells* **8**:674. doi:10.3390/cells8070674

Kim J, Vasan S, Kim JH, Ake JA. 2021. Current approaches to HIV vaccine development: a narrative review. *Journal of the International AIDS Society* **24**:e25793. doi:10.1002/jia2.25793

King CR, Mehle A. 2022. Retasking of canonical antiviral factors into proviral effectors. *Current Opinion in Virology* **56**:101271. doi:10.1016/j.coviro.2022.101271

Kopp Y, Lang W-H, Schuster TB, Martínez-Limón A, Hofbauer HF, Ernst R, Calloni G, Vabulas RM. 2017. CHIP as a membrane-shuttling proteostasis sensor. *eLife* **6**:e29388. doi:10.7554/eLife.29388

Kouno T, Shibata S, Shigematsu M, Hyun J, Kim TG, Matsuo H, Wolf M. 2023. Structural insights into RNA bridging between HIV-1 Vif and antiviral factor APOBEC3G. *Nat Commun* **14**:4037. doi:10.1038/s41467-023-39796-5

Kumar S, Basu M, Ghosh MK. 2022. Chaperone-assisted E3 ligase CHIP: A double agent in cancer. *Genes & Diseases* **9**:1521–1555. doi:10.1016/j.gendis.2021.08.003

Kuroha K, Ando K, Nakagawa R, Inada T. 2013. The Upf Factor Complex Interacts with Aberrant Products Derived from mRNAs Containing a Premature Termination Codon and Facilitates Their Proteasomal Degradation*. *Journal of Biological Chemistry* **288**:28630–28640. doi:10.1074/jbc.M113.460691

Kuroha K, Tatematsu T, Inada T. 2009. Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *EMBO reports* **10**:1265–1271. doi:10.1038/embor.2009.200

Kutluay SB, Zang T, Blanco-Melo D, Powell C, Jannain D, Errando M, Bieniasz PD. 2014. Global changes in the RNA binding specificity of HIV-1 Gag regulate virion genesis. *Cell* **159**:1096–1109. doi:10.1016/j.cell.2014.09.057

Lata S, Mishra R, Banerjea AC. 2018. Proteasomal Degradation Machinery: Favorite Target of HIV-1 Proteins. *Frontiers in Microbiology* **9**.

Lata S, Sood V, Banerjea AC. 2022. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Up-Regulates the Expression of Tat via AKT Signaling Pathway: Role of Ubiquitin Specific Protease 17. *Frontiers in Microbiology* **13**.

Lerner G, Weaver N, Anokhin B, Spearman P. 2022. Advances in HIV-1 Assembly. *Viruses* **14**:478. doi:10.3390/v14030478

Li C, Burdick RC, Nagashima K, Hu W-S, Pathak VK. 2021. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**:e2019467118. doi:10.1073/pnas.2019467118

Li G, De Clercq E. 2016. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **80**:679–731. doi:10.1128/mmbr.00065-15

Li JZ, Blankson JN. 2021. How elite controllers and posttreatment controllers inform our search for an HIV-1 cure. *J Clin Invest* **131**. doi:10.1172/JCI149414

Li X, Huang M, Zheng H, Wang Y, Ren F, Shang Y, Zhai Y, Irwin DM, Shi Y, Chen D, Chang Z. 2008. CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *Journal of Cell Biology* **181**:959–972. doi:10.1083/jcb.200711044

Li Y-L, Langley CA, Azumaya CM, Echeverria I, Chesarino NM, Emerman M, Cheng Y, Gross JD. 2023. The structural basis for HIV-1 Vif antagonism of human APOBEC3G. *Nature* **615**:728–733. doi:10.1038/s41586-023-05779-1

Li Z, Ning S, Su X, Liu X, Wang H, Liu Y, Zheng W, Zheng B, Yu X-F, Zhang W. 2018. Enterovirus 71 antagonizes the inhibition of the host intrinsic antiviral factor A3G. *Nucleic Acids Research* **46**:11514–11527. doi:10.1093/nar/gky840

Li Z, Yang X, Zhao Z, Liu X, Zhang W. 2022. Host Restriction Factor A3G Inhibits the Replication of Enterovirus D68 by Competitively Binding the 5' Untranslated Region with PCBP1. *Journal of Virology* **96**:e01708-21. doi:10.1128/JVI.01708-21

Libre C, Seissler T, Guerrero S, Batisse J, Verriez C, Stupfler B, Gilmer O, Cabrera-Rodriguez R, Weber MM, Valenzuela-Fernandez A, Cimarelli A, Etienne L, Marquet R, Paillart J-C. 2022. A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor. *Biomedicines* **10**:13. doi:10.3390/biomedicines10010013

Low JS, Fassati A. 2014. Hsp90: a chaperone for HIV-1. *Parasitology* **141**:1192–1202. doi:10.1017/S0031182014000298

Maan M, Pati U. 2018. CHIP promotes autophagy-mediated degradation of aggregating mutant p53 in hypoxic conditions. *The FEBS Journal* **285**:3197–3214. doi:10.1111/febs.14602

Maertens GN, Engelman AN, Cherepanov P. 2022. Structure and function of retroviral integrase. *Nat Rev Microbiol* **20**:20–34. doi:10.1038/s41579-021-00586-9

Majzoub K, Wrensch F, Baumert TF. 2019. The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans. *Viruses* **11**:758. doi:10.3390/v11080758

Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H, Landau NR. 2003. Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1 Virions by Vif. *Cell* **114**:21–31. doi:10.1016/S0092-8674(03)00515-4

Martin MM, Matkovic R, Larrous P, Morel M, Lasserre A, Vauthier V, Margottin-Goguet F. 2021. Binding to DCAF1 distinguishes TASOR and SAMHD1 degradation by HIV-2 Vpx. *PLoS Pathog* **17**:e1009609. doi:10.1371/journal.ppat.1009609

Martinat C, Cormier A, Tobaly-Tapiero J, Palmic N, Casartelli N, Mahboubi B, Coggins SA, Buchrieser J, Persaud M, Diaz-Griffero F, Espert L, Bossis G, Lesage P, Schwartz O, Kim B, Margottin-Goguet F, Saïb A, Zamborlini A. 2021. SUMOylation of SAMHD1 at Lysine 595 is required for HIV-1 restriction in non-cycling cells. *Nat Commun* **12**:4582. doi:10.1038/s41467-021-24802-5

Matkovic R, Morel M, Lanciano S, Larrous P, Martin B, Bejjani F, Vauthier V, Hansen MMK, Emiliani S, Cristofari G, Gallois-Montbrun S, Margottin-Goguet F. 2022. TASOR epigenetic repressor cooperates with a CNOT1 RNA degradation pathway to repress HIV. *Nat Commun* **13**:66. doi:10.1038/s41467-021-27650-5

McLaren PJ, Fellay J. 2021. HIV-1 and human genetic variation. *Nat Rev Genet* **22**:645–657. doi:10.1038/s41576-021-00378-0

Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM. 2001. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**:100–105. doi:10.1038/35050509

Medghalchi SM, Frischmeyer PA, Mendell JT, Kelly AG, Lawler AM, Dietz HC. 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Human Molecular Genetics* **10**:99–105. doi:10.1093/hmg/10.2.99

Menéndez-Arias L, Delgado R. 2022. Update and latest advances in antiretroviral therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* **43**:16–29. doi:10.1016/j.tips.2021.10.004

Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriet S, Paillart J-C, Marquet R. 2010. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Research* **38**:633–646. doi:10.1093/nar/gkp1009

Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A. 2019. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol* **4**:914–924. doi:10.1038/s41564-019-0421-x

Min J-N, Whaley RA, Sharpless NE, Lockyer P, Portbury AL, Patterson C. 2008. CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control. *Molecular and Cellular Biology* **28**:4018–4025. doi:10.1128/MCB.00296-08

Mock J-Y, Chartron JW, Zaslaver M, Xu Y, Ye Y, Clemons WM. 2015. Bag6 complex contains a minimal tail-anchor–targeting module and a mock BAG domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:106–111. doi:10.1073/pnas.1402745112

Mohseni Ahooyi T, Torkzaban B, Shekarabi M, Tahrir FG, Decoppet EA, Cotto B, Langford D, Amini S, Khalili K. 2019. Perturbation of synapsins homeostasis through HIV-1 Tat-mediated suppression of BAG3 in primary neuronal cells. *Cell Death Dis* **10**:1–12. doi:10.1038/s41419-019-1702-2

Moir S, Chun T-W, Fauci AS. 2011. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **6**:223–248. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254

Morishima Y, Wang AM, Yu Z, Pratt WB, Osawa Y, Lieberman AP. 2008. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Hum Mol Genet* **17**:3942–3952. doi:10.1093/hmg/ddn296

Müller TG, Zila V, Müller B, Kräusslich H-G. 2022. Nuclear Capsid Uncoating and Reverse Transcription of HIV-1. *Annual Review of Virology* **9**:261–284. doi:10.1146/annurev-virology-020922-110929

Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO reports* **2**:1133–1138. doi:10.1093/embo-reports/kve246

Murchu EO, Marshall L, Teljeur C, Harrington P, Hayes C, Moran P, Ryan M. 2022. Oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV: a systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness, safety, adherence and risk compensation in all populations. *BMJ Open* **12**:e048478. doi:10.1136/bmjopen-2020-048478

Mylvaganam S, Earnshaw R, Heymann G, Kalia SK, Kalia LV. 2021. C-terminus of Hsp70 Interacting Protein (CHIP) and Neurodegeneration: Lessons from the Bench and Bedside. *Curr Neuropharmacol* **19**:1038–1068. doi:10.2174/1570159X18666201116145507

Nardacci R, Ciccosanti F, Marsella C, Ippolito G, Piacentini M, Fimia GM. 2017. Role of autophagy in HIV infection and pathogenesis. *Journal of Internal Medicine* **281**:422–432. doi:10.1111/joim.12596

Ng'uni T, Chasara C, Ndhlovu ZM. 2020. Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions. *Frontiers in Immunology* **11**.

Nguyen Quang N, Goudey S, Ségéral E, Mohammad A, Lemoine S, Blugeon C, Versapuech M, Paillart J-C, Berlioz-Torrent C, Emiliani S, Gallois-Montbrun S. 2020. Dynamic nanopore long-read sequencing analysis of HIV-1 splicing events during the early steps of infection. *Retrovirology* **17**:25. doi:10.1186/s12977-020-00533-1

Nikolaitchik OA, Islam S, Kitzrow JP, Duchon A, Cheng Z, Liu Y, Rawson JMO, Shao W, Nikolaitchik M, Kearney MF, Maldarelli F, Musier-Forsyth K, Pathak VK, Hu W-S. 2023. HIV-1 usurps transcription start site heterogeneity of host RNA polymerase II to maximize replication fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**:e2305103120. doi:10.1073/pnas.2305103120

Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. 2013. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology* **23**:221–240. doi:10.1002/rmv.1739

Obr M, Schur FKM, Dick RA. 2021. A Structural Perspective of the Role of IP6 in Immature and Mature Retroviral Assembly. *Viruses* **13**:1853. doi:10.3390/v13091853

Ocwieja KE, Sherrill-Mix S, Mukherjee R, Custers-Allen R, David P, Brown M, Wang S, Link DR, Olson J, Travers K, Schadt E, Bushman FD. 2012. Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule

enrichment and long-read sequencing. *Nucleic Acids Research* **40**:10345–10355. doi:10.1093/nar/gks753

OhAinle M, Helms L, Vermeire J, Roesch F, Humes D, Basom R, Delrow JJ, Overbaugh J, Emerman M. 2018. A virus-packageable CRISPR screen identifies host factors mediating interferon inhibition of HIV. *eLife* **7**:e39823. doi:10.7554/eLife.39823

ONUSIDA. 2021. Fiche d'information — Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de sida. https://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet

Osiyemi O, De Wit S, Ajana F, Bisshop F, Portilla J, Routy JP, Wyen C, Ait-Khaled M, Leone P, Pappa KA, Wang R, Wright J, George N, Wynne B, Aboud M, van Wyk J, Smith KY. 2022. Efficacy and Safety of Switching to Dolutegravir/Lamivudine Versus Continuing a Tenofovir Alafenamide–Based 3- or 4-Drug Regimen for Maintenance of Virologic Suppression in Adults Living With Human Immunodeficiency Virus Type 1: Results Through Week 144 From the Phase 3, Noninferiority TANGO Randomized Trial. *Clinical Infectious Diseases* **75**:975–986. doi:10.1093/cid/ciac036

Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F, Dhe-Paganon S, Arrowsmith CH, Zhai RG. 2012. Protein Aggregates Are Recruited to Aggresome by Histone Deacetylase 6 via Unanchored Ubiquitin C Termini*. *Journal of Biological Chemistry* **287**:2317–2327. doi:10.1074/jbc.M111.273730

Pan T, Song Z, Wu L, Liu G, Ma X, Peng Z, Zhou M, Liang L, Liu B, Liu J, Zhang J, Zhang X, Huang R, Zhao J, Li Y, Ling X, Luo Y, Tang X, Cai W, Deng K, Li L, Zhang H. 2019. USP49 potently stabilizes APOBEC3G protein by removing ubiquitin and inhibits HIV-1 replication. *eLife* **8**:e48318. doi:10.7554/eLife.48318

Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, Moody MA, Verkerke HP, Myles A, Willis E, LaBranche CC, Montefiori DC, Lobby JL, Saunders KO, Liao H-X, Korber BT, Sutherland LL, Scearce RM, Hraber PT, Tombácz I, Muramatsu H, Ni H, Balikov DA, Li C, Mui BL, Tam YK, Krammer F, Karikó K, Polacino P, Eisenlohr LC, Madden TD, Hope MJ, Lewis MG, Lee KK, Hu S-L, Hensley SE, Cancro MP, Haynes BF, Weissman D. 2018. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *Journal of Experimental Medicine* **215**:1571–1588. doi:10.1084/jem.20171450

Picard L, Ganivet Q, Allatif O, Cimarelli A, Guéguen L, Etienne L. 2020. DGINN, an automated and highly-flexible pipeline for the detection of genetic innovations on protein-coding genes. *Nucleic Acids Research* **48**:e103. doi:10.1093/nar/gkaa680

Pido-Lopez J, Whittall T, Wang Y, Bergmeier LA, Babaahmady K, Singh M, Lehner T. 2007. Stimulation of Cell Surface CCR5 and CD40 Molecules by Their Ligands or by HSP70 Up-Regulates APOBEC3G Expression in CD4+ T Cells and Dendritic Cells1. *The Journal of Immunology* **178**:1671–1679. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1671

Prelli Bozzo C, Kmiec D, Kirchhoff F. 2022. When good turns bad: how viruses exploit innate immunity factors. *Current Opinion in Virology* **52**:60–67. doi:10.1016/j.coviro.2021.11.009

Prochasson L, Mghezzi-Habellah M, Roisin A, Palma M, Robin JP, Bossoreille S de, Sareoua L, Cluet D, Mouehli M, Decimo D, Réty S, Desrames A, Chaze T, Matondo M, Dutartre H, Thoulouze MI, Lejeune F, Jalinot P, Mocquet V. 2023. HTLV-1 Rex hijacks UPF1 in a CRM1 dependent manner, leading to NMD inhibition and revealing unexpected proviral roles of UPF1. doi:10.1101/2023.06.20.545693

Proulx J, Borgmann K, Park I-W. 2020. Post-translational modifications inducing proteasomal degradation to counter HIV-1 infection. *Virus Research* **289**:198142. doi:10.1016/j.virusres.2020.198142

Quintana-Gallardo L, Martín-Benito J, Marcilla M, Espadas G, Sabidó E, Valpuesta JM. 2019. The cochaperone CHIP marks Hsp70- and Hsp90-bound substrates for degradation through a very flexible mechanism. *Sci Rep* **9**:5102. doi:10.1038/s41598-019-41060-0

Raja R, Wang C, Mishra R, Das A, Ali A, Banerjea AC. 2022. Host AKT-mediated phosphorylation of HIV-1 accessory protein Vif potentiates infectivity via enhanced degradation of the restriction factor APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* **298**:101805. doi:10.1016/j.jbc.2022.101805

Rao S, Amorim R, Niu M, Breton Y, Tremblay MJ, Mouland AJ. 2019. Host mRNA decay proteins influence HIV-1 replication and viral gene expression in primary monocyte-derived macrophages. *Retrovirology* **16**:3. doi:10.1186/s12977-019-0465-2

Rao S, Amorim R, Niu M, Temzi A, Mouland AJ. 2018. The RNA surveillance proteins UPF1, UPF2 and SMG6 affect HIV-1 reactivation at a post-transcriptional level. *Retrovirology* **15**:42. doi:10.1186/s12977-018-0425-2

Rasheed S, Yan JS, Lau A, Chan AS. 2008. HIV Replication Enhances Production of Free Fatty Acids, Low Density Lipoproteins and Many Key Proteins Involved in Lipid Metabolism: A Proteomics Study. *PLOS ONE* **3**:e3003. doi:10.1371/journal.pone.0003003

REHWINKEL J, LETUNIC I, RAES J, BORK P, IZAURRALDE E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* **11**:1530–1544. doi:10.1261/rna.2160905

Renz PF, Valdivia-Francia F, Sendoel A. 2020. Some like it translated: small ORFs in the 5'UTR. *Experimental Cell Research* **396**:112229. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112229

Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* **361**:2209–2220. doi:10.1056/NEJMoa0908492

Rhee S-Y, Kassaye SG, Barrow G, Sundaramurthi JC, Jordan MR, Shafer RW. 2020. HIV-1 transmitted drug resistance surveillance: shifting trends in study design and prevalence estimates. *Journal of the International AIDS Society* **23**:e25611. doi:10.1002/jia2.25611

Richman DD. 1990. Susceptibility to nucleoside analogues of zidovudine-resistant isolates of human immunodeficiency virus. *The American Journal of Medicine*, Dideoxycydine (ddC): A Potent Antiretrovital Agent for Human Immunodeficietion Virus Infection **88**:S8–S10. doi:10.1016/0002-9343(90)90414-9

Ronnebaum SM, Wu Y, McDonough H, Patterson C. 2013. The Ubiquitin Ligase CHIP Prevents SirT6 Degradation through Noncanonical Ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology* **33**:4461–4472. doi:10.1128/MCB.00480-13

Rosati A, Leone A, Del Valle L, Amini S, Khalili K, Turco MC. 2007. Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *Journal of Cellular Physiology* **210**:676–683. doi:10.1002/jcp.20865

Rosser MFN, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, Cyr DM. 2007. Chaperone Functions of the E3 Ubiquitin Ligase CHIP*. *Journal of Biological Chemistry* **282**:22267–22277. doi:10.1074/jbc.M700513200

Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D. 1993. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *Journal of Cell Biology* **123**:1309–1320. doi:10.1083/jcb.123.6.1309

Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, Potard V, Versmisse P, Melard A, Prazuck T, Descours B, Guergnon J, Viard J-P, Boufassa F, Lambotte O, Goujard C, Meyer L, Costagliola D, Venet A, Pancino G, Autran B, Rouzioux C, Group the AVS. 2013. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLOS Pathogens* **9**:e1003211. doi:10.1371/journal.ppat.1003211

Salamango DJ, Harris RS. 2021. Dual Functionality of HIV-1 Vif in APOBEC3 Counteraction and Cell Cycle Arrest. *Frontiers in Microbiology* **11**.

Santos S, Obukhov Y, Nekhai S, Bukrinsky M, Iordanskiy S. 2012a. Virus-producing cells determine the host protein profiles of HIV-1 virion cores. *Retrovirology* **9**:65. doi:10.1186/1742-4690-9-65

Santos S, Obukhov Y, Nekhai S, Bukrinsky M, Iordanskiy S. 2012b. Virus-producing cells determine the host protein profiles of HIV-1 virion cores. *Retrovirology* **9**:65. doi:10.1186/1742-4690-9-65

Sarkar S, Balakrishnan K, Chintala K, Mohareer K, Luedde T, Vasudevan AAJ, Münk C, Banerjee S. 2022. Tough Way In, Tough Way Out: The Complex Interplay of Host and Viral Factors in Nucleocytoplasmic Trafficking during HIV-1 Infection. *Viruses* **14**:2503. doi:10.3390/v14112503

Sarkar S, Brautigan DL, Larner JM. 2017. Aurora Kinase A Promotes AR Degradation via the E3 Ligase CHIP. *Mol Cancer Res* **15**:1063–1072. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0062

Sauter D, Kirchhoff F. 2021. Evolutionary conflicts and adverse effects of antiviral factors. *eLife* **10**:e65243. doi:10.7554/eLife.65243

Sauter D, Kirchhoff F. 2019. Key Viral Adaptations Preceding the AIDS Pandemic. *Cell Host & Microbe* **25**:27–38. doi:10.1016/j.chom.2018.12.002

Schifferdecker S, Zila V, Müller TG, Sakin V, Anders-Österswein M, Laketa V, Kräusslich H-G, Müller B. 2022. Direct Capsid Labeling of Infectious HIV-1 by Genetic Code Expansion Allows Detection of Largely Complete Nuclear Capsids and Suggests Nuclear Entry of HIV-1 Complexes via Common Routes. *mBio* **13**:e01959-22. doi:10.1128/mbio.01959-22

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses.

Annu Rev Immunol **32**:513–545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231

Schoggins JW. 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* **6**:567–584. doi:10.1146/annurev-virology-092818-015756

Schoggins JW, Rice CM. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, Innate immunity/Antivirals and resistance/Emerging viruses **1**:519–525. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.008

Segal-Maurer S, DeJesus E, Stellbrink H-J, Castagna A, Richmond GJ, Sinclair GI, Siripassorn K, Ruane PJ, Berhe M, Wang H, Margot NA, Dvory-Sobol H, Hyland RH, Brainard DM, Rhee MS, Baeten JM, Molina J-M. 2022. Capsid Inhibition with Lenacapavir in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* **386**:1793–1803. doi:10.1056/NEJMoa2115542

Seissler T, Marquet R, Paillart J-C. 2017. Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins. *Viruses* **9**:322. doi:10.3390/v9110322

Serquiña AKP, Das SR, Popova E, Ojelabi OA, Roy CK, Göttlinger HG. 2013. UPF1 Is Crucial for the Infectivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Progeny Virions. *J Virol* **87**:8853–8861. doi:10.1128/JVI.00925-13

Sertznig H, Hillebrand F, Erkelenz S, Schaal H, Widera M. 2018. Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. *Virology* **516**:176–188. doi:10.1016/j.virol.2018.01.011

Sfakianos AP, Raven RM, Willis AE. 2022. The pleiotropic roles of eIF5A in cellular life and its therapeutic potential in cancer. *Biochemical Society Transactions* **50**:1885–1895. doi:10.1042/BST20221035

Shang Y, Zhao X, Tian B, Wang Y, Ren F, Jia B, Zhai Y, Chen W, He D, Chang Z. 2014. CHIP/Stub1 interacts with eIF5A and mediates its degradation. *Cellular Signalling* **26**:1098–1104. doi:10.1016/j.cellsig.2014.01.030

Shang Y, Zhao X, Xu X, Xin H, Li X, Zhai Y, He D, Jia B, Chen W, Chang Z. 2009. CHIP functions an E3 ubiquitin ligase of Runx1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **386**:242–246. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.043

Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**:a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841

Shaw GM, Hunter E. 2012. HIV Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006965. doi:10.1101/cshperspect.a006965

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646–650. doi:10.1038/nature00939

Shen Q, Kumari S, Xu C, Jang S, Shi J, Burdick RC, Levintov L, Xiong Q, Wu C, Devarkar SC, Tian T, Tripler TN, Hu Y, Yuan S, Temple J, Feng Q, Lusk CP, Aiken C, Engelman AN, Perilla JR, Pathak VK, Lin C, Xiong Y. 2023. The capsid lattice engages a bipartite NUP153 motif to mediate nuclear entry of HIV-1 cores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**:e2202815120. doi:10.1073/pnas.2202815120

Shin Y, Klucken J, Patterson C, Hyman BT, McLean PJ. 2005. The Co-chaperone Carboxyl Terminus of Hsp70-interacting Protein (CHIP) Mediates α-Synuclein Degradation Decisions between Proteasomal and Lysosomal Pathways*. *Journal of Biological Chemistry* **280**:23727–23734. doi:10.1074/jbc.M503326200

Slama L, Porcher R, Linard F, Chakvetadze C, Cros A, Carillon S, Gallardo L, Viard J-P, Molina J-M. 2023. Injectable long acting antiretroviral for HIV treatment and prevention: perspectives of potential users. *BMC Infectious Diseases* **23**:98. doi:10.1186/s12879-023-08071-9

Sloan RD, Wainberg MA. 2013. Harnessing the therapeutic potential of host antiviral restriction factors that target HIV. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **11**:1–4. doi:10.1586/eri.12.146

Snyder NA, Silva GM. 2021. Deubiquitinating enzymes (DUBs): Regulation, homeostasis, and oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry* **297**:101077. doi:10.1016/j.jbc.2021.101077

Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. 2003. HIV-1 Vif Blocks the Antiviral Activity of APOBEC3G by Impairing Both Its Translation and Intracellular Stability. *Molecular Cell* **12**:591–601. doi:10.1016/S1097-2765(03)00353-8

Stupfler B, Verriez C, Gallois-Montbrun S, Marquet R, Paillart J-C. 2021. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein. *Viruses* **13**:617. doi:10.3390/v13040617

Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Murakami Y, Takeuchi H, Takaku H. 2013. Induction of heat-shock protein 70 by prostaglandin A1 inhibits HIV-1 Vif-mediated degradation of APOBEC3G. *Antiviral Research* **99**:307–311. doi:10.1016/j.antiviral.2013.06.017

Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. 2011. Heat Shock Protein 70 Inhibits HIV-1 Vif-mediated Ubiquitination and Degradation of APOBEC3G*. *Journal of Biological Chemistry* **286**:10051–10057. doi:10.1074/jbc.M110.166108

Takahashi S, Araki Y, Ohya Y, Sakuno T, Hoshino S-I, Kontani K, Nishina H, Katada T. 2008. Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin ligase via its association with Upf3 in yeast. *RNA* **14**:1950–1958. doi:10.1261/rna.536308

Tang H, Bao X, Shen Y, Song M, Wang S, Wang C, Hou J. 2015. Engineering protein folding and translocation improves heterologous protein secretion in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology and Bioengineering* **112**:1872–1882. doi:10.1002/bit.25596

Tantale K, Garcia-Oliver E, Robert M-C, L'Hostis A, Yang Y, Tsanov N, Topno R, Gostan T, Kozulic-Pirher A, Basu-Shrivastava M, Mukherjee K, Slaninova V, Andrau J-C, Mueller F, Basyuk E, Radulescu O, Bertrand E. 2021. Stochastic pausing at latent HIV-1 promoters generates transcriptional bursting. *Nat Commun* **12**:4503. doi:10.1038/s41467-021-24462-5

Tebit DM, Arts EJ. 2011. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *The Lancet Infectious Diseases* **11**:45–56. doi:10.1016/S1473-3099(10)70186-9

Tenthorey JL, Emerman M, Malik HS. 2022. Evolutionary Landscapes of Host-Virus Arms Races. *Annual Review of Immunology* **40**:271–294. doi:10.1146/annurev-immunol-072621-084422

Thoueille P, Choong E, Cavassini M, Buclin T, Decosterd LA. 2022. Long-acting antiretrovirals: a new era for the management and prevention of HIV infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **77**:290–302. doi:10.1093/jac/dkab324

Tian Y, Wang M-L, Zhao J. 2019. Crosstalk between Autophagy and Type I Interferon Responses in Innate Antiviral Immunity. *Viruses* **11**:132. doi:10.3390/v11020132

Toccafondi E, Lener D, Negroni M. 2021. HIV-1 Capsid Core: A Bullet to the Heart of the Target Cell. *Frontiers in Microbiology* **12**.

Tracz M, Bialek W. 2021. Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination. *Cellular & Molecular Biology Letters* **26**:1. doi:10.1186/s11658-020-00245-6

Truman CT-S, Järvelin A, Davis I, Castello A. 2020. HIV Rev-isited. *Open Biology* **10**:200320. doi:10.1098/rsob.200320

Turk G, Seiger K, Lian X, Sun W, Parsons EM, Gao C, Rassadkina Y, Polo ML, Czernikier A, Ghiglione Y, Vellicce A, Varriale J, Lai J, Yuki Y, Martin M, Rhodes A, Lewin SR, Walker BD, Carrington M, Siliciano R, Siliciano J, Lichterfeld M, Laufer N, Yu XG. 2022. A Possible Sterilizing Cure of HIV-1 Infection Without Stem Cell Transplantation. *Ann Intern Med* **175**:95–100. doi:10.7326/L21-0297

Valera M-S, de Armas-Rillo L, Barroso-González J, Ziglio S, Batisse J, Dubois N, Marrero-Hernández S, Borel S, García-Expósito L, Biard-Piechaczyk M, Paillart J-C, Valenzuela-Fernández A. 2015. The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology* **12**:53. doi:10.1186/s12977-015-0181-5

Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. 2013. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* **10**:67. doi:10.1186/1742-4690-10-67

Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary theory* **1**:1–30.

Verriez C, Marquet R, Paillart J-C, Stupfler B. 2020. Les APOBEC3 : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes. *Virologie (Montrouge)* **24**:381–418. doi:10.1684/vir.2020.0870

Wainberg Z, Oliveira M, Lerner S, Tao Y, Brenner BG. 1997. Modulation of Stress Protein (hsp27 and hsp70) Expression in CD4+ Lymphocytic Cells Following Acute Infection with Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Virology* **233**:364–373. doi:10.1006/viro.1997.8618

Wang T, Wang W, Wang Q, Xie R, Landay A, Chen D. 2020. The E3 ubiquitin ligase CHIP in normal cell function and in disease conditions. *Ann N Y Acad Sci* **1460**:3–10. doi:10.1111/nyas.14206

Wang Y, Qian G, Zhu L, Zhao Z, Liu Y, Han W, Zhang Xiaokai, Zhang Y, Xiong T, Zeng H, Yu Xianghui, Yu Xiaofang, Zhang Xiaoyan, Xu J, Zou Q, Yan D. 2022. HIV-1 Vif suppresses antiviral immunity by targeting STING. *Cell Mol Immunol* **19**:108–121. doi:10.1038/s41423-021-00802-9

Wargo AR, Kurath G. 2012. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Current Opinion in Virology*, Virus evolution / Antivirals and resistance **2**:538–545. doi:10.1016/j.coviro.2012.07.007

Woldemeskel BA, Kwaa AK, Blankson JN. 2020. Viral reservoirs in elite controllers of HIV-1 infection: Implications for HIV cure strategies. *eBioMedicine* **62**. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103118

Xin H, Xu X, Li L, Ning H, Rong Y, Shang Y, Wang Y, Fu X-Y, Chang Z. 2005. CHIP Controls the Sensitivity of Transforming Growth Factor-β Signaling by Modulating the Basal Level of Smad3 through Ubiquitin-mediated Degradation*. *Journal of Biological Chemistry* **280**:20842–20850. doi:10.1074/jbc.M412275200

Xu W, Marcu M, Yuan X, Mimnaugh E, Patterson C, Neckers L. 2002. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12847–12852. doi:10.1073/pnas.202365899

Yang Q, Zhao J, Chen D, Wang Y. 2021. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed* **2**:23. doi:10.1186/s43556-021-00043-2

Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Liu X, Tamura M, Asada S, Fukushima T, Fukuyama T, Tanaka Y, Sawasaki T, Kitamura T, Goyama S. 2017. The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1–RUNX1T1. *Journal of Biological Chemistry* **292**:12528–12541. doi:10.1074/jbc.M117.785675

Yuan Y, Yuan H, Yang G, Yun H, Zhao M, Liu Z, Zhao L, Geng Y, Liu L, Wang J, Zhang H, Wang Y, Zhang X. 2020. IFN-α confers epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome by modulating GCN5-mediated succinylation of histone H3K79 to clear HBV cccDNA. *Clinical Epigenetics* **12**:135. doi:10.1186/s13148-020-00928-z

Zhang H, Wang Y, Lu J. 2019. Function and Evolution of Upstream ORFs in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* **44**:782–794. doi:10.1016/j.tibs.2019.03.002

Zhang M, Windheim M, Roe SM, Peggie M, Cohen P, Prodromou C, Pearl LH. 2005. Chaperoned Ubiquitylation—Crystal Structures of the CHIP U Box E3 Ubiquitin Ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a Complex. *Molecular Cell* **20**:525–538. doi:10.1016/j.molcel.2005.09.023

Zhao S, Zheng B, Wang L, Cui W, Jiang C, Li Z, Gao W, Zhang W. 2022. Deubiquitinase ubiquitin-specific protease 3 (USP3) inhibits HIV-1 replication via promoting APOBEC3G (A3G) expression in both enzyme activity-dependent and -independent manners. *Chinese Medical Journal* **135**:2706. doi:10.1097/CM9.0000000000002478

Zhou D, Wang Y, Tokunaga K, Huang F, Sun B, Yang R. 2015. The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Research* **195**:25–34. doi:10.1016/j.virusres.2014.08.021

Zila V, Margiotta E, Turoňová B, Müller TG, Zimmerli CE, Mattei S, Allegretti M, Börner K, Rada J, Müller B, Lusic M, Kräusslich H-G, Beck M. 2021a. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell* **184**:1032-1046.e18. doi:10.1016/j.cell.2021.01.025

Zila V, Müller TG, Müller B, Kräusslich H-G. 2021b. HIV-1 capsid is the key orchestrator of early viral replication. *PLOS Pathogens* **17**:e1010109. doi:10.1371/journal.ppat.1010109

Annexes

Article original « A conserved uORF regulates APOBEC3G translation and is targeted by HIV-1 Vif protein to repress the antiviral factor »

Libre, C., Seissler, T., Guerrero, S., Batisse, J., Verriez, C., Stupfler, B., Gilmer, O., Cabrera-Rodriguez, R., Weber, M., Valenzuela-Fernandez, A., Cimarelli, A., Etienne, L., Marquet, R. & Paillart, J.-C. (2022) A conserved uORF regulates APOBEC3G translation and is targeted by HIV-1 Vif protein to repress the antiviral factor. *Biomedicines*, **10**, 13

Résumé :

The HIV-1 Vif protein is essential for viral fitness and pathogenicity. Vif decreases expression of cellular restriction factors APOBEC3G (A3G), A3F, A3D and A3H, which inhibit HIV-1 replication by inducing hypermutation during reverse transcription. Vif counteracts A3G at several levels (transcription, translation, and protein degradation) that altogether reduce the levels of A3G in cells and prevent its incorporation into viral particles. How Vif affects A3G translation remains unclear. Here, we uncovered the importance of a short conserved uORF (upstream ORF) located within two critical stem-loop structures of the 5' untranslated region (5'-UTR) of A3G mRNA for this process. A3G translation occurs through a combination of leaky scanning and translation re-initiation and the presence of an intact uORF decreases the extent of global A3G translation under normal conditions. Interestingly, the uORF is also absolutely required for Vif-mediated translation inhibition and redirection of A3G mRNA into stress granules. Overall, we discovered that A3G translation is regulated by a small uORF conserved in the human population and that Vif uses this specific feature to repress its translation.

L'article est joint avec les figures supplémentaires. Les tables supplémentaires peuvent être retrouvées en ligne (https://www.mdpi.com/2227-9059/10/1/13)

biomedicines

MDPI

Article

A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor

Camille Libre [1,†], Tanja Seissler [1,†], Santiago Guerrero [1,2], Julien Batisse [1,3], Cédric Verriez [1], Benjamin Stupfler [1], Orian Gilmer [1], Romina Cabrera-Rodriguez [4], Melanie M. Weber [1,5], Agustin Valenzuela-Fernandez [4], Andrea Cimarelli [6], Lucie Etienne [6], Roland Marquet [1] and Jean-Christophe Paillart [1,*]

1 Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002, Université de Strasbourg: CNRS, 2 Allée Conrad Roentgen, F-67000 Strasbourg, France; camillelibre59300@gmail.com (C.L.); tanja.roulier_ext@novartis.com (T.S.); ssaguerreroji@uide.edu.ec (S.G.); batissej@igbmc.fr (J.B.); c.verriez@ibmc-cnrs.unistra.fr (C.V.); b.stupfler@ibmc-cnrs.unistra.fr (B.S.); o.gilmer@ibmc-cnrs.unistra.fr (O.G.); Melanie-Marie.Weber@web.de (M.M.W.); r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr (R.M.)
2 Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas de la Salud y de la Vida, Universidad Internacional del Ecuador, Quito 170113, Ecuador
3 IGBMC, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7104, INSERM U1258, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France
4 Laboratorio de Inmunología Celular y Viral, Unidad de Farmacología, Sección de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de La Laguna, 38320 Tenerife, Spain; rcabrerr@ull.edu.es (R.C.-R.); avalenzu@ull.edu.es (A.V.-F.)
5 Faculty of Biology, School of Biosciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sanderring 2, 97070 Würzburg, Germany
6 CIRI-International Center for Infectiology Research, INSERM U1111, Université Claude Bernard de Lyon 1, CNRS, UMR 5308, Ecole Normale de Lyon, Université de Lyon, F-69000 Lyon, France; andrea.cimarelli@ens-lyon.fr (A.C.); lucie.etienne@ens-lyon.fr (L.E.)
* Correspondence: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr; Tel.: +33-(0)6-88-41-70-35
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The HIV-1 Vif protein is essential for viral fitness and pathogenicity. Vif decreases expression of cellular restriction factors APOBEC3G (A3G), A3F, A3D and A3H, which inhibit HIV-1 replication by inducing hypermutation during reverse transcription. Vif counteracts A3G at several levels (transcription, translation, and protein degradation) that altogether reduce the levels of A3G in cells and prevent its incorporation into viral particles. How Vif affects A3G translation remains unclear. Here, we uncovered the importance of a short conserved uORF (upstream ORF) located within two critical stem-loop structures of the 5′ untranslated region (5′-UTR) of A3G mRNA for this process. A3G translation occurs through a combination of leaky scanning and translation re-initiation and the presence of an intact uORF decreases the extent of global A3G translation under normal conditions. Interestingly, the uORF is also absolutely required for Vif-mediated translation inhibition and redirection of A3G mRNA into stress granules. Overall, we discovered that A3G translation is regulated by a small uORF conserved in the human population and that Vif uses this specific feature to repress its translation.

Keywords: HIV-1; APOBEC3G; Vif; mRNA; translation; uORF

check for updates

Citation: Libre, C.; Seissler, T.; Guerrero, S.; Batisse, J.; Verriez, C.; Stupfler, B.; Gilmer, O.; Cabrera-Rodriguez, R.; Weber, M.M.; Valenzuela-Fernandez, A.; et al. A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor. *Biomedicines* **2022**, *10*, 13. https://doi.org/10.3390/biomedicines10010013

Academic Editor: Luísa Romão

Received: 3 November 2021
Accepted: 18 December 2021
Published: 22 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif (viral infectivity factor) protein is essential for the production of infectious particles in target cells [1]. Indeed, early studies demonstrated that Vif is necessary for virus replication in primary lymphoid and myeloid cells (also called non-permissive cells), but is dispensable in a subset of immortalized T cell lines (called permissive cells) [2–4]. This characteristic is due to the expression of a dominant inhibitor of HIV-1 replication in non-permissive cells [5,6], later identified as APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G), or

A3G [7]. A3G belongs to a large family of cytidine deaminases (A3A to A3H) that interfere with reverse transcription by inducing mutations during the synthesis of the viral (-) strand DNA, thus leading to cytidine to uridine transitions and the production of non-infectious viral particles [8]. Amongst these deaminases, A3D, A3F, A3G, and A3H have been shown to efficiently block HIV-1 replication after viral entry [9–14]. The HIV-1 non-structural Vif protein counteracts the antiviral activities of A3 proteins, in particular A3F and A3G, which are the most potent against HIV-1 [9,14,15]. In the absence of Vif, A3G and A3F are packaged into viral particles [16–21] and induce viral DNA hypermutation in the next replication cycle, which in turn results in non-functional viral proteins [22]. Furthermore, there is also evidence that A3G and A3F can inhibit the reverse transcription and integration steps through a deamination-independent mechanism [23–27].

In HIV-1, three distinct and mutually reinforcing mechanisms are employed by Vif to reduce A3G expression and counteract its antiviral activity [28,29]. First, Vif recruits a Cullin-RING E3 ligase 5 (CRL5) complex (composed of the Cullin 5, Elongin B/C, Rbx2, and ARIH2 proteins) to A3 proteins to promote their polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation [30–33]. This pathway was the first to be described and is well characterized [33–36]. Secondly, the interaction of the transcriptional cofactor CBF-β (Core Binding Factor β) with Vif-CRL5 complex affects its association with the RUNX family of transcription factors, leading to the downregulation of RUNX-dependent genes, to which A3G belongs [37,38]. Thirdly, Vif counteracts A3G expression by reducing its translation [39–41]. Indeed, we previously showed that two stem-loop structures (SL2-SL3) within the 5′-untranslated region (UTR) of A3G mRNA are essential for the translational inhibition of A3G by Vif [42]. Importantly, both proteasomal degradation and translational inhibition of A3G by Vif participate to reduce the intracellular level of A3G and inhibit its packaging into viral particles, demonstrating that HIV-1 has evolved complementary mechanisms to specifically inhibit the potent antiviral activity of A3G.

The regulation of translation represents a critical layer of gene expression control, allowing for rapid and localized changes in the expression of proteins in response to extra- and intracellular stimuli. Translational control can occur on a global basis by modifications of the basic translation machinery, or selectively target defined subsets of mRNAs. The latter commonly involves the sequence-specific recognition of target mRNAs by trans-acting factors such as miRNA complexes or RNA-binding proteins (RBP) [43,44]. To better understand the translational regulation of A3G by Vif, and the role of the two stem-loop structures within the 5′-UTR of A3G mRNA in this process, we searched for cis-acting regulatory elements within this region. We uncovered the importance of a short and conserved upstream open reading frame (uORF) in the distal part (SL2-SL3) of the 5′-UTR of A3G mRNA. Considering that the presence of uORFs usually correlates with a reduced protein expression of the downstream ORF, we studied the impact of this uORF on A3G translation and on Vif-mediated translational repression. Mutagenesis of the A3G 5′-UTR and uORF, combined with the analysis of the translation level, indicated that A3G mRNA is translated through a combination of leaky scanning and translation re-initiation. Interestingly, the disruption of the uORF abrogated the Vif-mediated downregulation of A3G translation. Furthermore, we showed that under stress conditions, A3G mRNA was targeted into stress granules in a Vif- and uORF-dependent manner that correlated with A3G translation inhibition. Taken together, we discovered that human A3G translation is regulated by a small uORF embedded within its 5′-UTR and that HIV-1 Vif uses this specific feature to repress A3G translation and target it to stress granules.

2. Materials and Methods

Plasmids

Plasmid pCMV-hA3G was previously described [40]. Mutated plasmids were generated by QuikChange site-directed mutagenesis (Table A1) (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) based on the secondary structure model of the 5′-UTR of A3G mRNA [40] and verified by DNA sequencing (Eurofins, Konstanz, Germany). The A3 uORF2 mu-

tants were constructed by inserting a G after the uAUG (translation initiation codon of the uORF) and deleting a G before the uUGA (termination codon of the uORF) in order to place the uUGA in frame with the uAUG, thus changing the wild type (wt) 23 amino acid sequence MTTRPWEVTLGRAVLKPEAWSRK to MDYEALGGHFREGCPKTRSLEQK. Vif was expressed from pcDNA-hVif expression vector encoding codon-optimized NL4.3 Vif [45] or from pCRV1-B-LAI [46] expressing Vif from the pLAI.2 strain of HIV-1. Plasmids expressing stress granule (pcDNA GFP-PABP, pcDNA GFP-TIA1) or P-body (pcDNA GFP-DCP1, pcDNA GFP-AGO2) markers were kindly provided by Dr S. Pfeffer (IBMC-CNRS, Strasbourg, France).

RACE-PCR

Rapid amplification of cDNA ends by PCR (RACE-PCR) was performed following the instructions of the supplier in the 5′/3′ RACE Kit, 2nd Generation (Roche). For the 5′-RACE-PCR, 0.2–0.5 μg of human spleen total RNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) served as template to synthesize the cDNA corresponding to the 5′-end of A3 RNAs by using the Transcriptor Reverse Transcriptase and a specific primer 1 (SP1) according to manufacturer recommendations (see Table A2 for primers). The cDNAs were produced for 1 h at 55 °C and the reaction was stopped by heating the mixture at 85 °C for 5 min. After a purification step, a poly-A tail was added to cDNAs, which were then amplified by a second PCR. This PCR used a dT-Anchor Primer and a second SP2 (0.25 μM each) to amplify 5 μL of polyadenylated cDNAs in a 50 μL mix containing 1 U of Phusion Polymerase, 0.2 mM dNTPs, and 1.5 mM $MgCl_2$. The PCR protocol was as follows: 3 min at 98 °C and 10 cycles of 15 s at 98 °C, 30 s at the optimal annealing temperature and 1 min at 72 °C. The elongation step was then increased by 20 s steps until it reached 2 min and 23 cycles were performed. A final elongation step of 7 min ended the amplification. A nested PCR was performed with 1 μL of amplicons from the last PCR, in an identical reactional mixture, except for the SP3 used. PCR products were cloned into pJET 1.2 vector (Thermofisher) and sequenced.

For the 3′-RACE-PCR, as mRNAs for the total RNA extract were already polyadenylated, the purification and poly-A tailing steps were not necessary. Using 1 μg of total RNA and a dT-Anchor primer, the cDNAs were synthesized according to the manufacturer protocol and used for a PCR amplification with a PCR Anchor Primer and SP5 primer. Both PCRs were performed as described above. A nested PCR, absent from the initial protocol, was added with a SP6 primer and the same PCR Anchor Primer used in the last PCR to obtain enough material for bacterial transformation. PCR products were cloned into pJET 1.2 vector (Thermofisher) and sequenced.

RNA modification by SHAPE (selective 2′-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)

RNA synthesis. RNAs corresponding to the first 1000 nucleotides of A3G mRNAs were synthesized by in vitro transcription from PCR products obtained from wt and mutant pCMV-hA3G plasmids ([40] and this study). PCR was performed using primers pST7-A3G1000 and pAS-A3G1000 (Table A1) with the following protocol: 3 min at 95 °C and 34 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 1 min at 72 °C, with a final elongation step of 5 min at 72 °C. Three additional Gs were inserted immediately downstream the T7 promotor (5′-end of RNA) to increase transcription efficiency. Transcription was performed using a MEGAscript T7 Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions and purified by exclusion chromatography on a TSKgel G4000SW column as previously described [40]. RNA integrity and purity were confirmed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

RNA modification with NMIA: 2 pmol of A3G RNA was heated at 90 °C for 2 min and placed on ice for 2 min, then refolded 20 min at 37 °C in 20 μL of HEPES buffer (final concentration: 30 mM HEPES pH 8.0; 300 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$), then 1 μg of a tRNA mix was added (total volume adjusted to 30 μL) and refolding further continued for 10 min at room temperature. One pmol of RNA was then treated in a final volume of 18 μL with 10 mM NMIA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis-MO, USA) in anhydrous DMSO (Sigma-Aldrich) (+) or only with anhydrous DMSO (control (−)). After 50 min at room

temperature, deionized water was added and material was precipitated with 3 volumes of 100% ethanol, 1/10 volume of 3 M sodium acetate pH 5.0, 1 µL of glycoBlue (ThermoFisher, Illkirch, France) for 30 min in a dry ice/ethanol bath and collected by centrifugation at 20,800× *g* for 30 min at 4 °C. The pellets were washed twice with 70% ethanol, dried, and resuspended in deionized water (7 µL final volume).

cDNA synthesis and analysis by capillary electrophoresis. RNA samples treated with NMIA (+) or DMSO (−) were mixed with 1 pmol of AS primer 1 (5′-TGGGTGGTACTTAAG TTCGG-3′: complementary to nts 476–495 of A3G RNA) labeled with Vic (Life Technologies SAS, Villebon-sur-Yvette, France). The mixture was heated at 90 °C for 2 min and placed on ice for 2 min. After the addition of 2 µL of avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (RT) buffer (final concentration: 50 mM Tris-HCl pH 8.3; 100 mM KCl; 4 mM DTT; 10 mM $MgCl_2$) and 10 min incubation at room temperature, reverse transcription was performed by adding 2 µL of AMV RT buffer (Life Sciences), 6 µL dNTPs 2.5 mM (Invitrogen), and 2 U of AMV RT (Life Sciences) in a final volume of 20 µL. Elongation was ensured by incubation for 20 min at 42 °C followed by 30 min at 50 °C. The enzyme was inactivated at 60 °C for 10 min. Simultaneously, a sequencing reaction was performed with 2 pmol of unmodified RNA and 2 µL of a 2 mM AS primer 1 labeled with Ned (Life Technologies SAS, France). Reverse transcription was performed for the SHAPE (+) and (−) elongation reactions except for the nucleotide mix added, which was composed of 6 µL G10 (0.25 mM dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM TTP), 2 µL ddGTP at 100 µM, 2 µL AMV RT buffer, and 2 U of AMV RT (Life Sciences).

The reaction volumes were adjusted to 100 µL and cDNAs were phenol–chloroform extracted (Roti-Phenol). For each experiment, the modified (+) and unmodified (−) samples were pooled each with a ddG sequencing reaction before ethanol precipitation. The cDNAs were resuspended in 10 µL Hi-Di formamide (Applied Biosystem, Waltham, MA, USA), denatured at 90 °C for 5 min, placed on ice for 10 min, and finally centrifuged for 5 min at 6000× *g*. The primer extension products were loaded on an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) and the electropherograms were analyzed with the QuShape software to extract reactivity data for each sample. The mean reactivity data from at least three independent experiments were obtained for each sample and used as constraints to fold the RNA secondary structure with the RNAstructure software version 6.0 [47]. No constraints other than the SHAPE reactivities were applied to the fold. The dot bracket file obtained from RNAstructure was then used to translate the structural data into VARNA version 3–93 [48] where the validated structure was redrawn.

Cell culture

HEK 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Life Technologies) at 37 °C and 5% CO_2 atmosphere. Transfections of HEK 293T cells were carried out using the X-tremeGene 9 DNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich) as recommended by the manufacturer. Briefly, 700,000 cells/well were seeded at 70% confluence in a 6-well plate and co-transfected with 100 ng of pCMV-hA3G constructs and 1 µg of pcDNA-hVif. Cells were also exposed to the chemical proteasome inhibitor ALLN (25 µM) for 14 h.

For FISH and immunofluorescence (IF) experiments, cells were plated on a glass coverslip in 6-well microplates (700,000 cells/well for HEK 293T cells and 350,000 cells/well for HeLa cells). Cells were cultured in DMEM. Transfections of HEK 293T and Hela cells were carried out as described above. When required, 0.5 µg of stress granules (GFP-PABP or GFP-TIA1) or P-body (GFP-DCP1 or GFP-AGO2) markers were transfected. Twenty-four hours post transfection, stress induction was performed either by treating cells with 500 µM sodium arsenite ($NaAsO_2$, Sigma-Aldrich) or by incubating them at 44 °C (heat shock) for 30 min before further analysis.

Immunoblotting

Twenty-four hours post-transfection, cells were washed in 1× PBS (140 mM NaCl, 8 mM NaH_2PO_4, 2 mM Na_2HPO_4) and lysed for 10 min at 4 °C in 1× RIPA (1× PBS, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS) supplemented with protease inhibitors (complete EDTA-free Cocktail, Roche, Basel, Switzeland). After 1 h centrifugation at 20,817× *g*, cell lysates were adjusted to equivalent protein concentration (Bradford assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), fractionated on Criterion TGX 4–15% gels (Bio-Rad) and transferred onto 22 µm PVDF membranes using the Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). Blots were probed with appropriate primary antibodies. Polyclonal anti-A3G (#9968), anti-A3H (#12155), anti-A3F (#11226), and monoclonal anti-Vif (#319) antibodies were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Polyclonal anti-A3C (#EB08307) and anti-A3D (#GTX87757) antibodies were obtained from Everest Biotech and Genetex, respectively. Monoclonal anti-β-actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich (#A5316). The PVDF membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad), and the proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad). Bands were quantified using ImageJ. Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Real-time qPCR

Twenty-four hours post-transfection, total RNA was isolated from HEK 293T cells using RNAzol®RT (Euromedex, Souffelweyersheim, France). After RNase-free DNase treatment (TURBO DNA-free kit, Invitrogen, Waltham, MA, USA), total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) as recommended by the manufacturer. Subsequent qPCR analysis was performed using the Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher) and was monitored on a CFX Real Time System (Bio-Rad). Gene-specific primers for A3G and β-actin are detailed in Table A1. The A3G mRNA levels were normalized to those of actin mRNA and relative quantification was determined using the standard curve-based method.

FISH and immunofluorescence (IF) assays

The fluorescence in situ hybridization (FISH) probe was obtained as follows: fragment from nucleotide position 100 to 406 of A3G mRNA was cloned between EcoRI and Xba1 sites into a pcDNA vector. After linearization by XbaI, T7 in vitro transcription was performed in presence of conjugated DIG-11-UTP (Roche) following the manufacturer instruction (1 mM of each dNTP, except dUTP at 0.65 mM and 0.35 mM of the labeled DIG-11-UTP). After DNAse I (Roche) treatment, A3G specific probe was purified by phenol–chloroform extraction and ethanol precipitation. Pellets were resuspended in 50 µL of deionized water giving a 100× concentrated A3G mRNA probe. Aliquots of 1 µL were stored at −80 °C.

For FISH and immunofluorescence (IF) assays, cells were fixed with 4% (w/vol) paraformaldehyde/PBS for 20 min at RT. Fixation was stopped in 100 mM glycine for 10 min at room temperature. Cells were then permeabilized with 0.2% (w/vol) TRITON X-100/PBS solution at room temperature for 5 min. For FISH assays, after 2 washes in PBS, coverslips were treated for 15 min at room temperature with DNAse I (Roche, 25 U/coverslip) then washed with 1 mL of PBS. One µL of specific A3G mRNA probe was diluted 100× in deionized water (concentration ~5 ng/µL). Coverslips were loaded with 50 µL of pre-warmed hybridization solution (formamide 50%; tRNA 0.1 µg/µL; SSPE 2× (NaCl 300 mM, NaH_2PO_4 20 mM, EDTA 2 mM); Denharts solution 5× (Ficoll 0.1%, polyvinylpyrrolidone 0.1%, BSA 0.1%); RNAse OUT 0.1 U/µL; and 25 ng of specific probe) for 16 h at 42 °C in humid atmosphere. Coverslips were then washed with 50 µL of pre-warmed buffer containing 50% formamide and SSPE 2× for 15 min at 42 °C, and then twice with 50 µL SSPE 2× for 5 min at 42 °C. Finally, for both FISH and IF assays, after a wash in PBS, coverslips were blocked with 3% (w/vol) BSA in PBS for 1 h at room temperature. Primary antibodies were diluted in 3% (w/vol) BSA/PBS and incubated 3 h at 37 °C,

followed by incubation of secondary antibodies at room temperature for 2 h in the dark. After a brief wash in PBS, coverslips were mounted in one drop of SlowFade Gold antifade reagent (Thermo Fisher) with (IF) or without (FISH) DAPI (Thermo Fisher).

The following primary antibodies were used: sheep polyclonal anti-DIG (Roche); Rabbit polyclonal anti-hA3G-C17 (#10082) and mouse monoclonal anti-HIV-1 Vif (#319) antibodies were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. All were used at a 1:500 dilution. The following dye-conjugated secondary antibodies were used: Alexa Fluor 647 anti-rabbit, Alexa Fluor 647 anti-goat, Alexa Fluor 488 anti-mouse, Alexa Fluor 546 anti-sheep, Alexa Fluor 405 anti-mouse, Alexa Fluor 594 anti-goat (Life Technologies). All were used at a 1:200 dilution.

Microscopy and image analysis

Images were acquired on a Zeiss LSM780 spectral microscope running Zen software, with a 63×/1.4NA Plan-Apochromat oil objective at the IBMP microscopy and cellular imaging platform (Strasbourg, France). Excitation and emission settings were spectrally selected among the 4 laser wavelengths available in the microscope (405, 488, 561, and 633 nm) according to the secondary antibody used. Image processing (contrast, brightness, and merges) were performed with ImageJ 1.43 m software [49]. An additional macro allowing the multichannel profile plot has been designed by Jerome Mutterer from the Microscopy platform. Percentage of cells showing a co-localization between FISH signal (A3G mRNA) and stress or P-body markers were counted on subsets of 100 cells (n = 3).

APOBEC3 genotype data

The NCBI dbSNP database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp, accessed on 31 July 2019) as well as the UCSC Genome Browser database (https://genome.ucsc.edu/, accessed on 31 July 2019) were mined for polymorphic variants in human A3G and A3F mRNA 5′-UTRs.

3. Results

3.1. In Silico Analyses of A3G mRNA 5′-UTR Identify a Conserved uORF

To understand the mechanism by which Vif inhibits A3G mRNA translation in a 5′-UTR-dependent manner [40,42], we searched for cis-acting elements within the 5′-UTR that could contribute to this repression. Using a computational platform capable of identifying RNA regulatory elements (RegRNA 2.0) [50], we identified a terminal oligopyrimidine (TOP) element that we previously excluded from the Vif-mediated translational control of A3G mRNA as the deletion of the 5′-end region (mutant A3G SL2-SL3) did not impact the Vif-mediated translation inhibition [42], and an uORF within the 5′-UTR of the A3G mRNA sequence (Figure 1). uORFs are cis-regulatory elements that negatively regulate translation of downstream ORF [51–54]. In A3G mRNA, our analysis showed that an uORF is encoded within the SL2 and SL3 domains of the 5′-UTR (Figure 1). Of note, we previously showed that these two SLs are required for Vif-mediated A3G translation inhibition [42], suggesting this uORF could be involved in translational inhibition. The uORF is positioned between nucleotides 177 (initiation codon uAUG) and 248 (termination codon uUGA) within the 5′-UTR, 49 nucleotides upstream of the main AUG (mAUG) initiation codon of A3G (nucleotide 298). It encodes a putative peptide of 23 amino acids (Figure 1) without any particular motif according to the PROSITE database (https://prosite.expasy.org, accessed on 3 November 2021). We also observed that the Kozak contexts around the upstream and major AUGs are considered as adequate for translation initiation, suggesting the uAUG is functional [55]. The Kozak consensus is NNNRNN<u>AUG</u>(A/C/U) where N is any base, -3R is a purine, +4 position is A, C, or U (the translation codon is underlined), and the actual sequences are GGGGCC<u>AUG</u>*A* and GCCA*A*GG<u>AUG</u>*A* for the uAUG and mAUG, respectively (the important −3 and +4 positions are in italics). The same uORF is also present in A3F mRNA, with 94% and 96% identity at the nucleotide and amino acid level, respectively. To determine if these uORFs are conserved in the human population, we mined the NCBI dbSNP (single nucleotide polymorphism database). In the A3G uORF

(+/− 10 nucleotides) region, which included the Kozak context, we did not find any variant with a minor allele frequency (MAF) above 0.005 (Table S1). In the A3F uORF region, there was a single common SNP (MAF > 0.01, rs35898507) that induced an amino acid change from G to V in the uORF (G being the ancestral allele present at >96% in the population) (Table S1). Overall, we did not find any variant with a MAF > 0.0005 that would dramatically impact the uORFs of A3G and A3F (i.e., that would impact the start codon, the stop codon, or would induce a frameshift). Lastly, the genetic distance between the uORF and the mAUG was also conserved. This showed that the herein identified A3G and A3F uORFs are highly conserved in the human population.

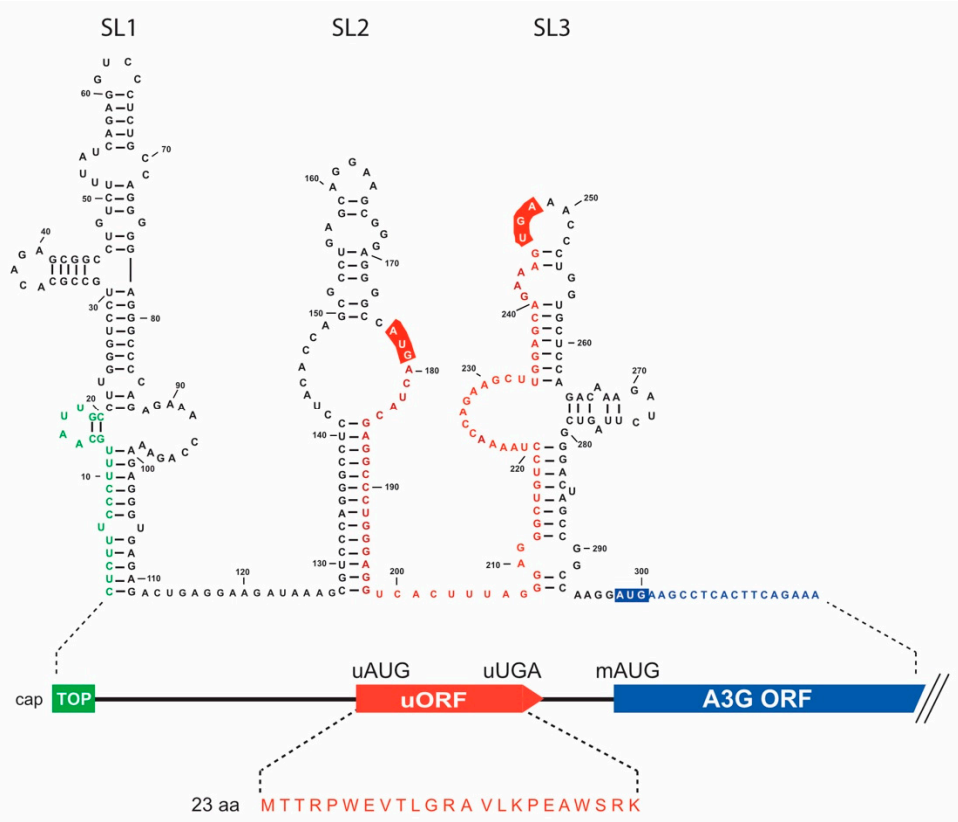


Figure 1. Schematic representation of the 5′-UTR of A3G mRNA. The secondary structure of the 5′-UTR of A3G mRNA as determined in [40] is indicated, as well as the TOP element (green) and of the uORF (red). The putative peptide expressed from the uORF is also indicated.

3.2. Vif Specifically Regulates the Translation of A3G and A3F among Members of the A3 Family

We previously showed that A3G was regulated at the translational level by HIV-1 Vif [40,42]. We now wondered whether this translational regulation could be extended to other A3 proteins. Thus, we performed 5′- and 3′-RACE (5′-rapid amplification of cDNA ends analysis) from human spleen total RNA with A3B, A3C, A3D, and A3H specific primers (Table A2) in order to identify their 5′- and 3′-UTRs (A3A vector (NM_145699.3) was a generous gift from Dr Vincent Caval, Pasteur Institute, Paris [56]; A3F (NM_145298.5) and A3G (NM_021822) were available in our lab). After cloning and sequencing of the expression constructs, corresponding full-length mRNA sequences were synthesized (Proteogenix, Schiltigheim, France) and consequently cloned into pCMV vectors (Figure 2A). The 5′-UTR sequences comprised 44, 106, 407, and 127 nucleotides for A3B, A3C, A3D, and A3H, respectively, while their 3′-UTR sequences contained 572, 431, 934, and 372 nucleotides, respectively (Figure 2A and Table S2). Sequences obtained for the 5′-UTR of A3D and A3H correspond to those published in GenBank™ (accession number NM_152426.3 and NM_001166003.1, respectively). The 5′-UTR sequence of A3B is shorter (44 versus 55 nucleotides) than the reference (NM_004900.4), while the one from A3C is a bit longer

(106 versus 103 nucleotides) than the reference (NM_014508.2). All A3 clones were transfected into HEK 293T cells in presence or absence of Vif and with or without ALLN (proteasome inhibitor) to discriminate between translational inhibition and proteasomal degradation [42]. Our results showed that all A3 proteins are well expressed from full-length mRNA expression constructs (Figure 2B, lanes 2) and are degraded in response to Vif expression as expected (Figure 2B, lanes 3; and Figure 2C, red bars), except for A3A and A3B. This behavior is not unusual for A3A/A3B and could be linked to their Vif-induced nucleocytoplasmic transport [57]. A3A presents two isoforms (A3A-L and A3A-S) due to a leaky scanning mechanism as previously observed [56]. A3D was not significantly reduced as previously observed [58]. However, in presence of ALLN, we only observed a significant decrease in A3G and A3F expression when Vif was present (Figure 2B, compare lanes 4 & 5; Figure 2C, blue bars), suggesting that these two A3 proteins are the only ones to be regulated at the translational level by Vif. Moreover, a sequence analysis of the 5′-UTR of A3A, A3B, A3C, and A3H did not reveal the presence of any uORF or other regulatory motifs. A short putative uORF (30 nucleotides) is present within the 5′-UTR of A3D (Table S2) but was not involved in the Vif-mediated translational inhibition (Figures 2B and 3C).

3.3. Mechanism of A3G mRNA Translation

Since uORFs usually reduce translational efficiency by approximatively 30–50% [54], we asked whether this motif naturally participates in A3G mRNA expression. First, we inactivated the uORF of this mRNA by either deleting the entire uORF (A3G ΔuORF), or by substituting the uAUG (A3G suAUG) (Figure 3A). The expression of these mutants was examined after transfection of HEK 293T cells and immunoblotting against the A3G protein (Figure 3B). As expected, uORF inactivation significantly increased A3G protein expression (Figure 3B, compare lanes 2–3 to lane 1), suggesting that uORF intrinsically represses A3G mRNA translation. Moreover, we tested whether those mutations affect mRNA levels by RTqPCR and showed that the A3G suAUG mRNA level was reduced by 30% (Figure 3B, lane 3 blue bar), further supporting an increase of A3G translation (ratio protein/RNA = 1.8 and 1.4 for A3G suAUG and A3G ΔuORF, respectively).

The results presented above show that the uORF negatively regulates A3G translation. According to the literature [51–54,59], uORFs can regulate the translation of the main ORF by different mechanisms, in cis or in trans, through the encoded peptide, or by affecting leaky scanning, direct translation initiation at an IRES, or translation re-initiation. To analyze the mechanism of A3G translation, we constructed a series of A3G mRNAs with mutations in the uORF sequence or its surrounding nucleotides and analyzed their expression after the transfection of HEK 293T cells (Figure 3).

First, we tested the possibility that the uORF peptide acts in trans to regulate the main ORF translation. To achieve this, we changed the uORF amino acid sequence by shifting the uORF by one nucleotide (see Materials and Methods) and studied its effect on A3G expression (mutant A3G uORF2). We observed no effect of the putative peptide in A3G expression (Figure 3B, lane 5), consistent with the fact that peptides expressed from an uORF generally do not play a functional role in translation regulation [60,61]. This result also suggests that the function of the uORF is dependent on features that drive uORF translation rather than the specific peptide produced.

Next, we examined if translation initiation at the uAUG is required for the regulatory mechanism. The frequency of ribosomal recognition of a translation initiation codon is determined by its sequence context [62], and positioning of a translation initiation codon within a "poor" sequence context will result in inefficient ribosomal recognition and bypassing (leaky scanning). We thus replaced the uAUG Kozak consensus sequence (GGGGCC<u>AUG</u>*A*) with a weak, non-favorable context (GAA*A*AA<u>AUG</u>*A*, mutant A3G WK) (Figure 3A). Consistent with the predicted decrease in the recognition of the modified uAUG context by ribosomes, we observed a significant increase in protein expression

(Figure 3B, lane 15), suggesting that the natural uAUG Kozak context is an essential element for translational repression.

In a natural context of A3G mRNA, the uORF encodes a putative peptide of 23 amino acids. Next, we created a mutant RNA where the translation termination codon of the uORF (uUGA) was inactivated and the uAUG placed in frame with the downstream major ORF (mAUG), thereby producing a fusion protein formed by the peptide produced from the uORF, the intercistronic region, and the A3G coding sequence. Thus, this construct (A3G suUGA) allows to directly monitor upstream translation initiation, prevents uORF termination and, thus re-initiation, and downstream translation is only possible by leaky scanning or through a direct entry of the ribosome (IRES: internal ribosome entry site) at the mAUG. Interestingly, two protein bands can now be observed (Figure 3B, lane 4). Indeed, in addition to the standard A3G protein encoded by the main ORF (Figure 3B, lane 4, lower band: 384 amino acids), an N-terminally elongated version (424 amino acids) produced by translation initiation at the uAUG can be detected (Figure 3B, lane 4, asterisk), demonstrating that the pre-initiation complex assembled on the uAUG. Moreover, we observed a significant decrease in the expression of the main A3G protein for this mutant (about 50%, with a ratio prot/ARN: 0.6) (Figure 3B, lane 4). Since re-initiation is impossible in this case due to the mutated uORF stop codon, these results strongly suggest that, in the wt situation, A3G is partially expressed by ribosomes re-initiating at the mAUG after having translated the uORF. However, the fact that wt A3G protein is still detected in this mutant also indicates that translation of the main ORF also involves leaky scanning or IRES-dependent translation.

To test the IRES hypothesis, we inserted a stable stem-loop at the 5′-end of A3G mRNA (Figure 3A, mutant A3G-SSL) that prevents binding of the 40S ribosomal subunit and inhibits ribosome scanning [63]. Then, if an IRES is present within the 5′-UTR of A3G mRNA, ribosomes should load directly on this site and efficiently initiate translation. As observed in Figure 3B (lane 14), expression of this mutant was very low (20%, ratio prot/ARN: 0.2), ruling out the hypothesis of an efficient IRES-dependent A3G translation.

To further analyze re-initiation, we constructed additional mutants based on previous reports [64,65]. Indeed, re-initiation was more efficient when uORF sequences are short [65] whereas leaky scanning was not dependent on the length of the uORF [64]. Then, reducing the uORF length should enhance A3G expression if a re-initiation mechanism is involved. We thus tested mutants of A3G uORF where the putative 23 amino acids peptide was reduced to 15, 10, 5, and 2 amino acids (Figure 3A). The results showed that these mutants significantly decreased (20–40%, ratio prot/RNA: 0.8–0.9) A3G protein expression (Figure 3B, lanes 6–9), suggesting that reducing the length of the uORF somehow down-regulates the translation of A3G mRNA. Because re-initiation is also dependent on the distance between the stop codon uUGA and the main AUG of an ORF (inter-ORF region) [64], we then reduced this distance to 24 (mutant A3G Δ249–273) and 6 (mutant A3G Δ249–291) nucleotides by deletions, or by inserting a stop codon at positions 276 (A3G suUGA276) or 289 (A3G suUGA289), thus reducing the inter-ORF region to 21 and 9 nucleotides, respectively (Figure 3A). If A3G translation initiation is mediated by a re-initiation mechanism, reducing this distance should lower protein expression. Interestingly, A3G protein expression was significantly decreased (ratio prot/RNA: 0.7–0.8) when the inter-ORF region was reduced (Figure 3B, lanes 10–13), suggesting that A3G may also be translated through a re-initiation mechanism, except for mutant A3G suUGA276 (ratio prot/RNA: 1.2), which did not show any significant effect on A3G protein expression (Figure 3B, lane 12).

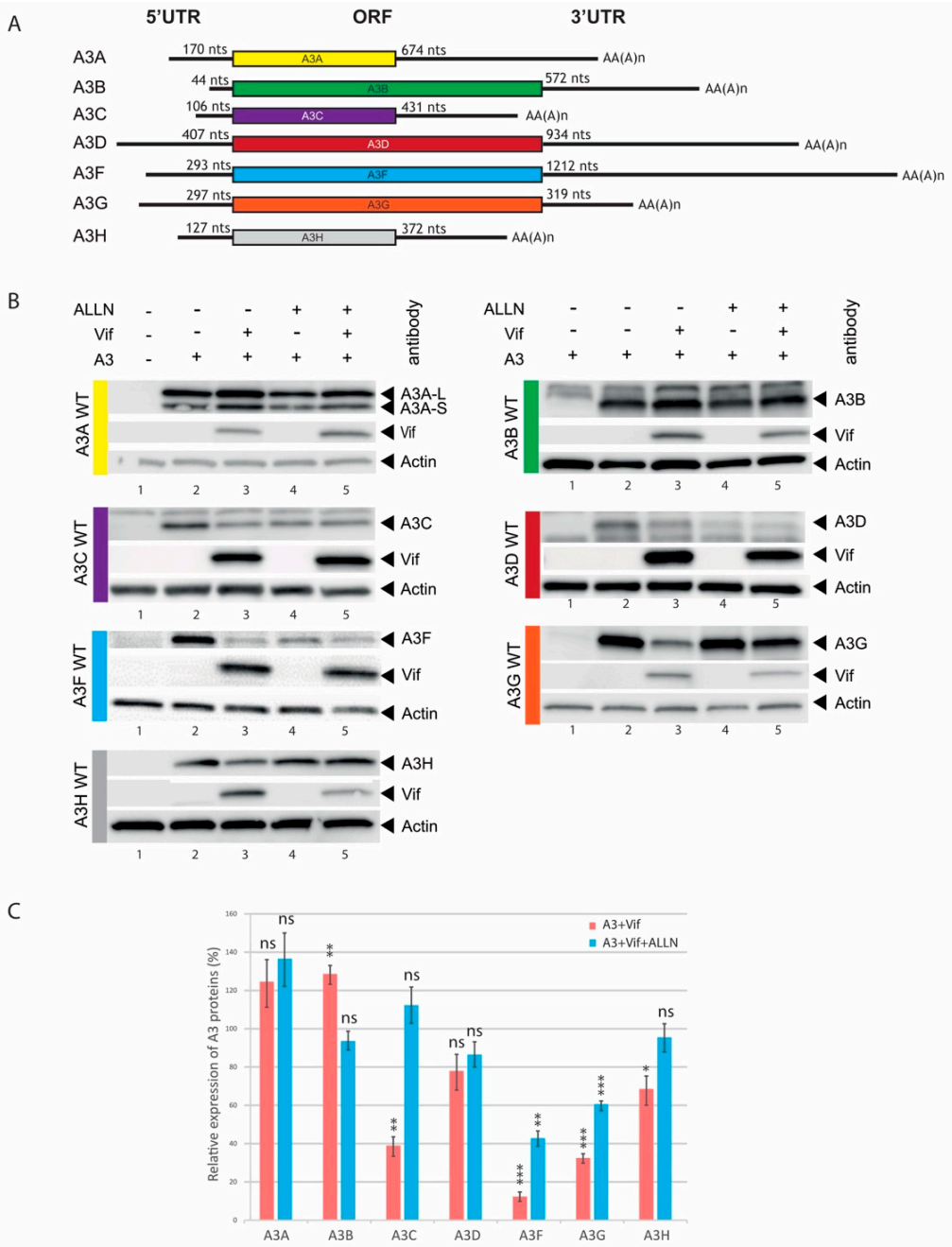


Figure 2. Vif does not inhibit the translation of all APOBEC3 mRNAs. (**A**) Schematic representation of A3 mRNAs identified by RACE-PCR. The lengths of the various 5′- and 3′-UTRs are indicated. (**B**) HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing the different A3 proteins in the presence or absence of Vif and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). Proteins were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblotting with appropriate antibodies (see Materials and Methods) except A3A and A3B which were detected with anti-A3G (#9968) antibody. (**C**) Bands were quantified using ImageJ and relative expression of A3 proteins is represented. After normalization to actin, A3 + Vif (red bars, lanes 3 of panel B) and A3G + Vif + ALLN (blue bars, lanes 5 of panel B) were compared to their equivalent without Vif (lanes 2 and 4, respectively) set to 100%, respectively. Data represent the mean ± S.E.M. for at least three independent experiments. *p*-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, *** <0.001. ns (not significant): >0.05.

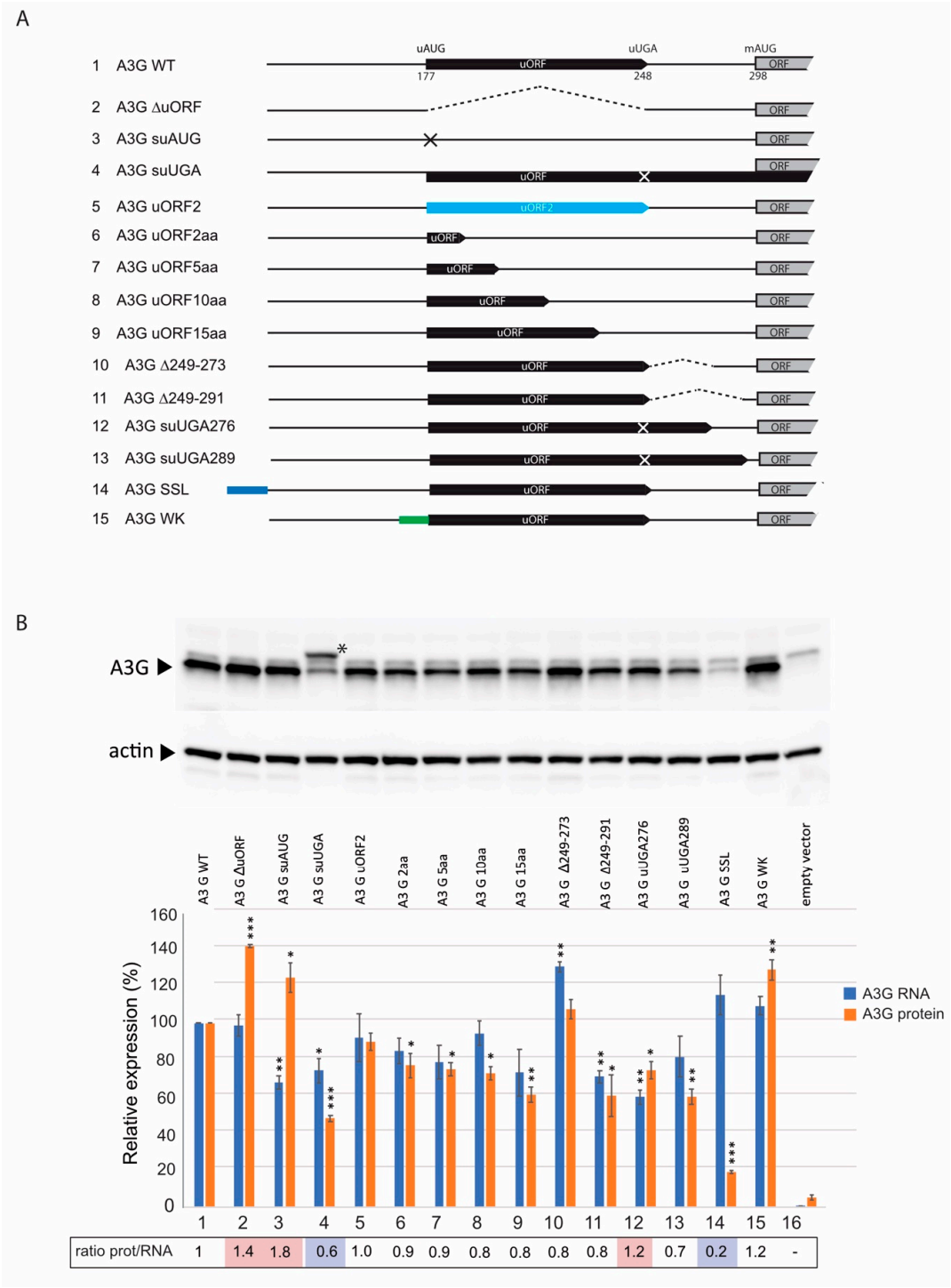


Figure 3. Importance of the uORF for A3G mRNA expression. (**A**) Schematic representation of the different A3G 5′-UTR constructs used in this study. (**B**) HEK 293T cells were transfected with wt or mutated A3G constructs. Proteins were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-A3G (#9968) and anti-β-actin (#A5316) antibodies. Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin, and relative expression of A3G is represented in a histogram (orange bars). Total RNA was extracted from transfected cells and RTqPCR was performed to study the relative expression of wt and mutated A3G constructs (blue bars). The ratio protein/RNA is indicated below. Data represent the mean ± S.E.M. for at least three independent experiments. *p*-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, *** <0.001.

To exclude potential structural effects of the mutations on A3G translation, we analyzed the secondary structure of wt and mutant A3G mRNAs by SHAPE (see Materials and Methods). This analysis was performed on in vitro transcribed RNA corresponding to the first 1000 nucleotides of A3G mRNA. Here, we focused on the 5′-UTR (nucleotides 1–300) as it contains all mutations described in this study. First of all, we confirmed that the 5′-UTR of wt A3G mRNA folds into independent domains that are mostly similar to our previously published secondary structure [40], with three main stem-loop structures (SL1, SL2 and SL3) and the uORF encompassing SL2 and SL3 (Figure S5 and Table S3 for the reactivity values). Differences between wt structures are mainly due to the size of the RNA that was used in both studies (1000 nucleotides versus 300 in [40]). Of note, domain 4 (SL4), which contains the mAUG, was not previously predicted as it was not included in our RNA [40], and these four SLs are connected through a stem involving long-distance interactions between regions 98–122 and 381–405 (Figure S5). Interestingly, most of tested A3G mRNA mutants contain the four mentioned domains (Figures S5 and S6). The only exceptions are the two mutants containing a large deletion (A3G ΔuORF and A3G Δ249–289), which despite a conservation of SL1, SL2, and the interdomain stem, showed structural perturbation of domain 3 and/or 4 (Figure S6). Taken together, these results suggest that the 5′-UTR of A3G mRNA folds into independent domains and that mutations did not significantly impact the RNA secondary structure.

3.4. Initiation at the uORF Is Required in Vif-Mediated A3G Translation Inhibition

To further characterize the molecular mechanism of Vif-mediated A3G translation inhibition, we sought to determine if the uORF plays a role in this translational repression. We therefore transfected various A3G mRNA mutants in HEK 293T cells in the presence or absence of Vif and with or without the proteasome inhibitor ALLN in order to discriminate translational inhibition from proteasomal degradation [42]. First, when we co-transfected wt A3G construct with Vif, we observed, as expected, a strong decrease in A3G expression due to a cumulative effect of proteasomal degradation and translation inhibition by Vif (Figure 4, red bar, see also Figure S1 for western blots), whereas in the presence of ALLN, we observed a typical 30–40% reduction in A3G synthesis due to A3G translational repression by Vif (Figure 4, blue bar), as previously observed [42]. In a second step, we similarly analyzed the effect of Vif (+/− ALLN) on different A3G mRNA constructs. The results showed that A3G ΔuORF mutant presents a strong inhibition of A3G protein expression in the presence of Vif (between 60–70%) (Figure 4, mutant ΔuORF), but less pronounced than with the wt A3G construct. Furthermore, in presence of ALLN, we did not observe any significant decrease in A3G expression when Vif was present (Figure 4, blue bars), indicating that the uORF is required for the Vif-mediated translational inhibition. To validate this finding, we transfected the A3G suAUG construct containing a single substitution at the upstream initiation codon. As expected, translational inhibition was not observed with this mutant (Figure 4, blue bar), and inhibition in the absence of ALLN was also reduced compared to the wt construct (Figure 4, red bar).

Finally, we asked whether the inhibition of re-initiation (A3G suUGA) and the peptide identity (A3G uORF2) were important for the translational inhibition of A3G by Vif. These two constructs were transfected into HEK 293T cells as described above and analyzed by western blot (Figure S1). As expected, A3G proteins expressed from these constructs are degraded through the proteasome in the presence of Vif (Figure 4, red bars). Interestingly, both mutants presented a wt A3G expression level in the presence of Vif and ALLN (Figure 4, blue bars), suggesting that (i) the uORF peptide has no role in the Vif-induced translational inhibition (A3G uORF2), and (ii) Vif only affects the leaky scanning (re-initiation is inhibited in the A3G suUGA mutant). Of note, none of the mutations significantly impacted RNA expression levels (Figure S2). Taken together, these results indicate that translation initiation at the uORF is essential for the Vif-mediated A3G translational inhibition.

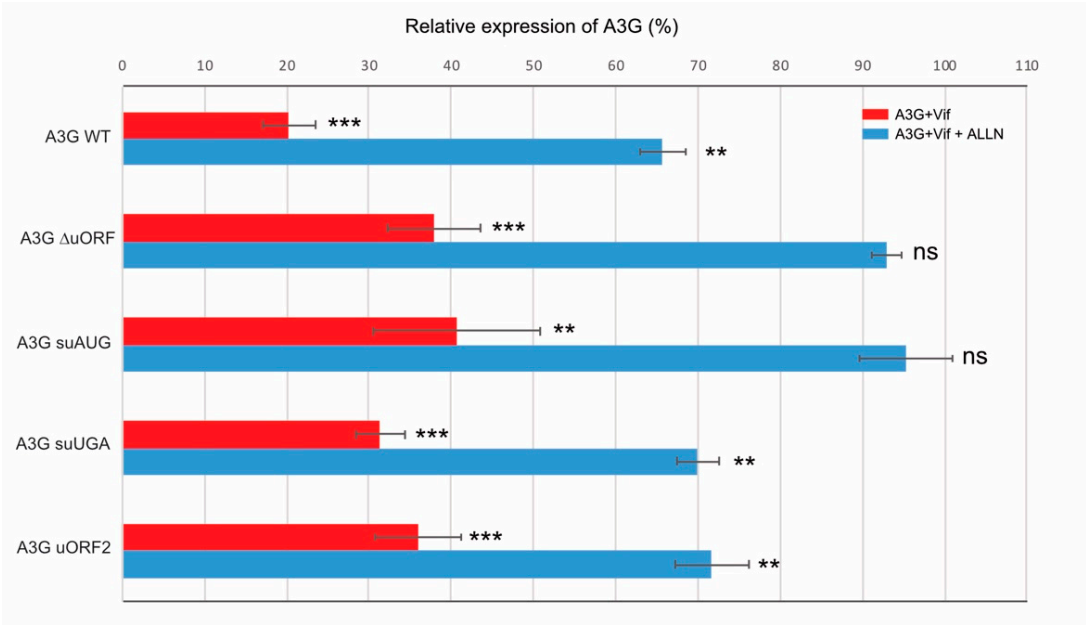


Figure 4. Effect of the uORF on Vif-mediated A3G translation inhibition. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wt and mutated A3G constructs in the presence or absence of Vif and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). Proteins were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblotting (see supporting Figure 2). Bands were quantified using ImageJ, normalized to actin, and relative expression of A3G proteins is represented. Histograms represent the effects of Vif on A3G: degradation + translation (red bars), and translation only (blue bars). Each condition is compared to the corresponding one without Vif and set to 100% (as above). Data represent the mean ± S.E.M. for at least three independent experiments. *p*-values are indicated as follows: ** <0.01, *** <0.001; ns: not significant.

3.5. Relocation of A3G mRNA to Stress Granules Is Dependent on the uORF and Vif

Mechanisms of translational control dictate which mRNA transcripts gain access to ribosomes, and this process is highly regulated by the interplay of RNA binding proteins (RBPs) and RNA granules, such as processing bodies (P-bodies) or stress granules (SG). SGs are transient foci enriched in translation initiation factors and 40S ribosomal subunits, whereas P-bodies are enriched in RNA decay machinery. Hence, SGs and P-bodies can be considered as extensions of the messenger ribonucleoprotein (mRNP) translational control cycle, i.e., as compartments where translationally silenced mRNPs are stored [66,67]. Thus, we asked whether Vif can relocate A3G mRNA into these storage compartments and participate in the downregulation of A3G translation, and if so, if the uORF plays a role in this process. To test this hypothesis, we analyzed the wt A3G mRNA and two mutant constructs: A3G Δ5′-UTR and A3G suAUG. These two mutants (deletion of the 5′-UTR and single substitution of the uAUG) were chosen because their translation is not downregulated by Vif ([42] and this study). We began with a careful examination of the intracellular localization of A3G mRNAs and proteins by FISH and immunofluorescence (IF) analysis, respectively, after transfection of HEK 293T cells (Figure S3). As expected, wt A3G mRNA and protein were detected in the cytoplasm (Figure S3, lane 4). Similarly, mRNAs and proteins expressed from mutants A3G Δ5′-UTR and suAUG were also present in the cytoplasm (Figure S3, lanes 5 & 6), suggesting that mutations do not impact mRNA localization and protein expression.

Next, we analyzed the co-localization of A3G mRNAs and proteins with SG and P-body markers in the presence or absence of Vif. We co-transfected HEK 293T cells with A3G constructs in the presence or absence of Vif, and then briefly exposed them to arsenite sodium (ARS) or high temperature (44 °C) to induce a stress condition. We then performed FISH analysis (A3G mRNAs) and immunofluorescence staining using

antibodies directed against Vif and A3G. Stress granule (PABP1 and TIA-1) and P-body (AGO2 and DCP1) marker proteins were expressed as GFP fusion proteins, allowing their direct fluorescence detection. First, concerning wt A3G mRNA, we observed as expected that PABP1 was localized into SGs regardless of stress conditions (Figure 5A). Interestingly, under stress conditions, while we observed a clear co-localization of A3G and PABP1 proteins into punctate granules in the presence or absence of Vif (Figure 5A, column 7), the co-localization of A3G mRNA and PABP1 was mainly observed in the presence of Vif (Figure 5A, column 6, yellow dots; Figure S4). We obtained between 50–70% and 45–55% co-localization for PABP1/A3G mRNA (Figure 5D, blue bars) and TIA-1/A3G mRNA (Figure 5E, blue bars), respectively, in the presence of Vif. Meanwhile, we also performed FISH and IF analysis for A3G Δ5′-UTR (Figure 5B) and suAUG (Figure 5C) mRNA mutants. Interestingly, whereas a co-localization of A3G and PABP1 proteins was still detected for these two constructs (Figure 5B,C, column 7; Figure S3), we observed a significant decrease (around 30%) of A3G Δ5′-UTR (Figure 5D red bars) and A3G suAUG (Figure 5E, green bars) mRNAs into SGs in the presence of Vif, suggesting that the relocation of A3G mRNA into SGs depends not only on Vif but also on the uORF functionality. Of note, stress conditions (ARS or 44 °C) did not relocate the different A3G mRNAs in the absence of Vif (Figure 5D,E, left part). Finally, we performed similar experiments with P-body markers (AGO2 and DCP1) (Figure 6). Under physiological conditions, while A3G and AGO2 proteins co-localized (Figure 6A, column 7), A3G mRNAs (wt or mutants) were rarely observed co-localizing with P-body markers (less than 20% co-localization), regardless of the presence of Vif (Figure 6B).

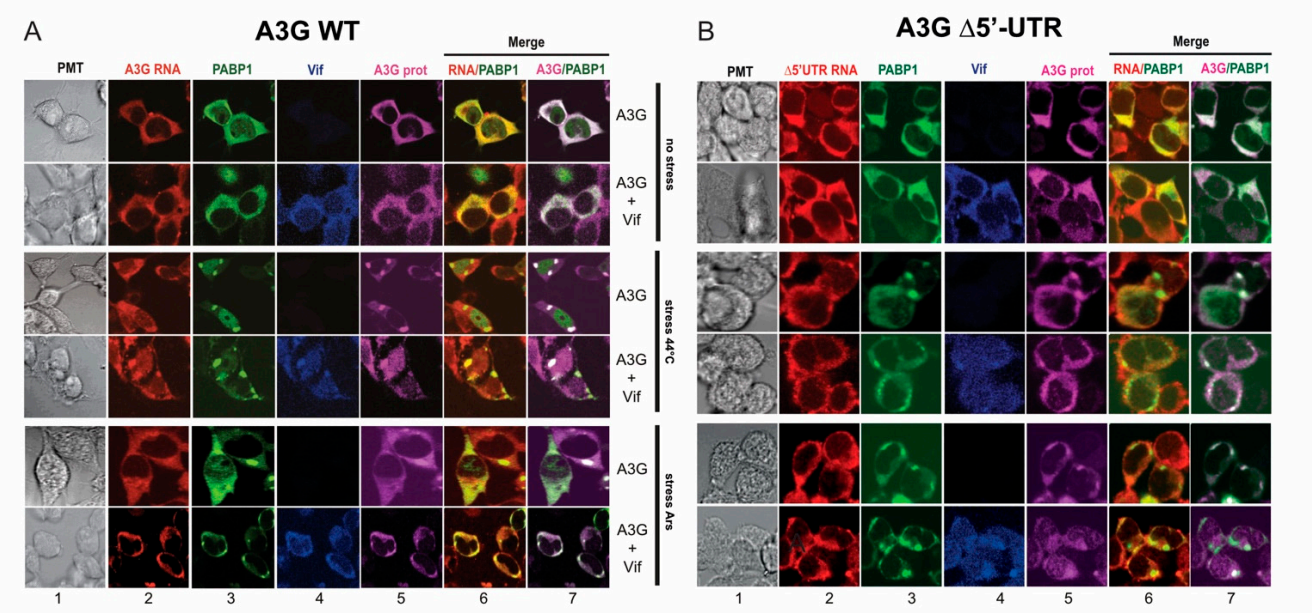


Figure 5. *Cont.*

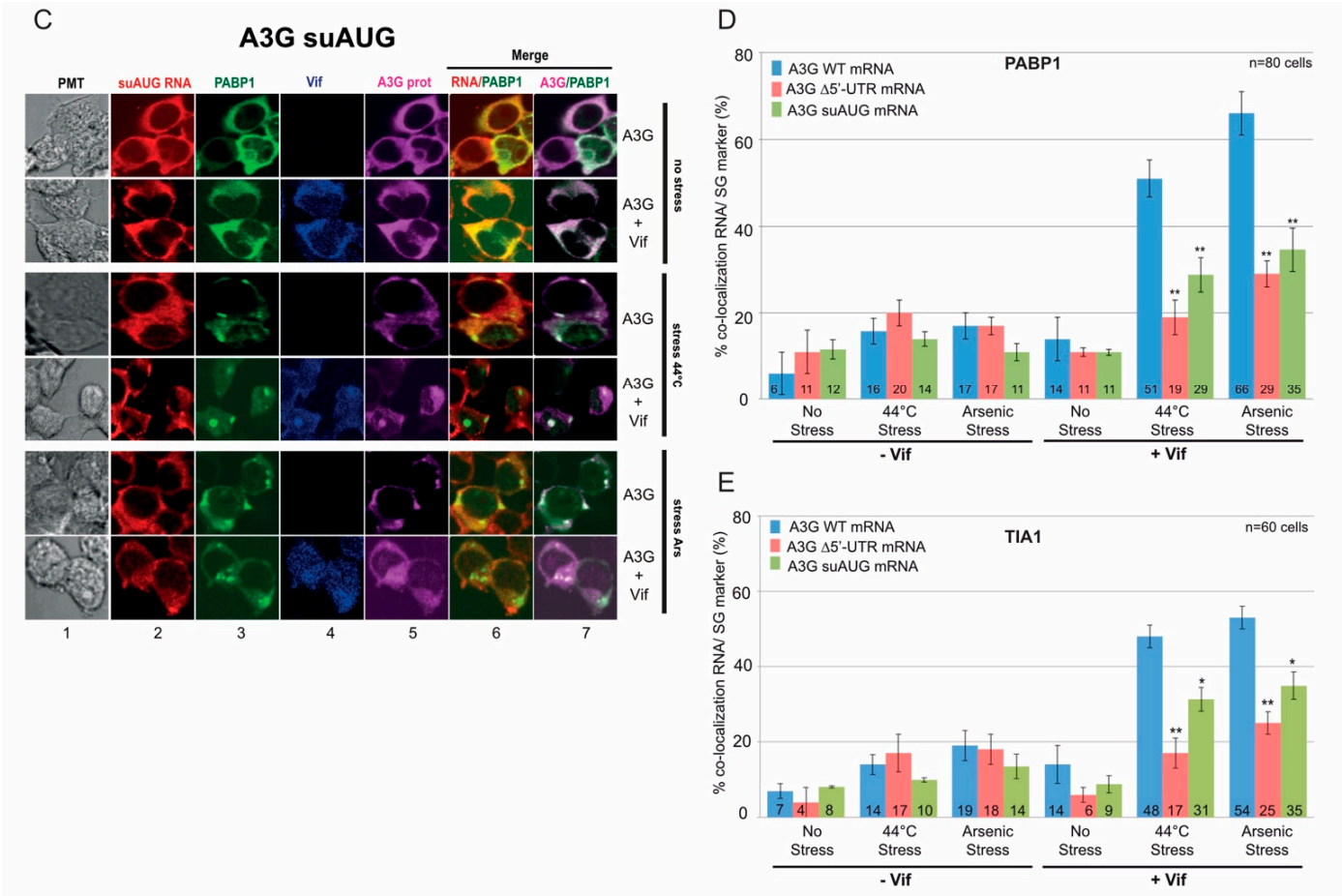


Figure 5. Importance of the uORF for the relocation of A3G mRNA into stress granules by Vif. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wt A3G (**panel A**) as well as Δ5′-UTR (**panel B**) and suAUG (**panel C**) mRNAs, in absence or presence of Vif, and with a vector expressing GFP-PABP1 (SG marker). Cells were cultured in various conditions: (i) untreated (no stress), or stressed by (ii) incubation at 44 °C or (iii) with arsenite sodium (Ars). Cells were fixed and probed with anti-DIG (A3G mRNAs), anti-A3G (A3G protein), and anti-Vif antibodies. PABP1 and SGs were visualized by direct fluorescence of the GFP-PABP1 fusion protein. Cells were stained with Dapi to visualize nuclei and the images were merged digitally. Histograms represent the percentage of co-localization of A3G mRNAs with PABP1 (**panel D**) or with TIA I (**panel E**). Standard deviations are representative for at least three independent experiments. *p*-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01.

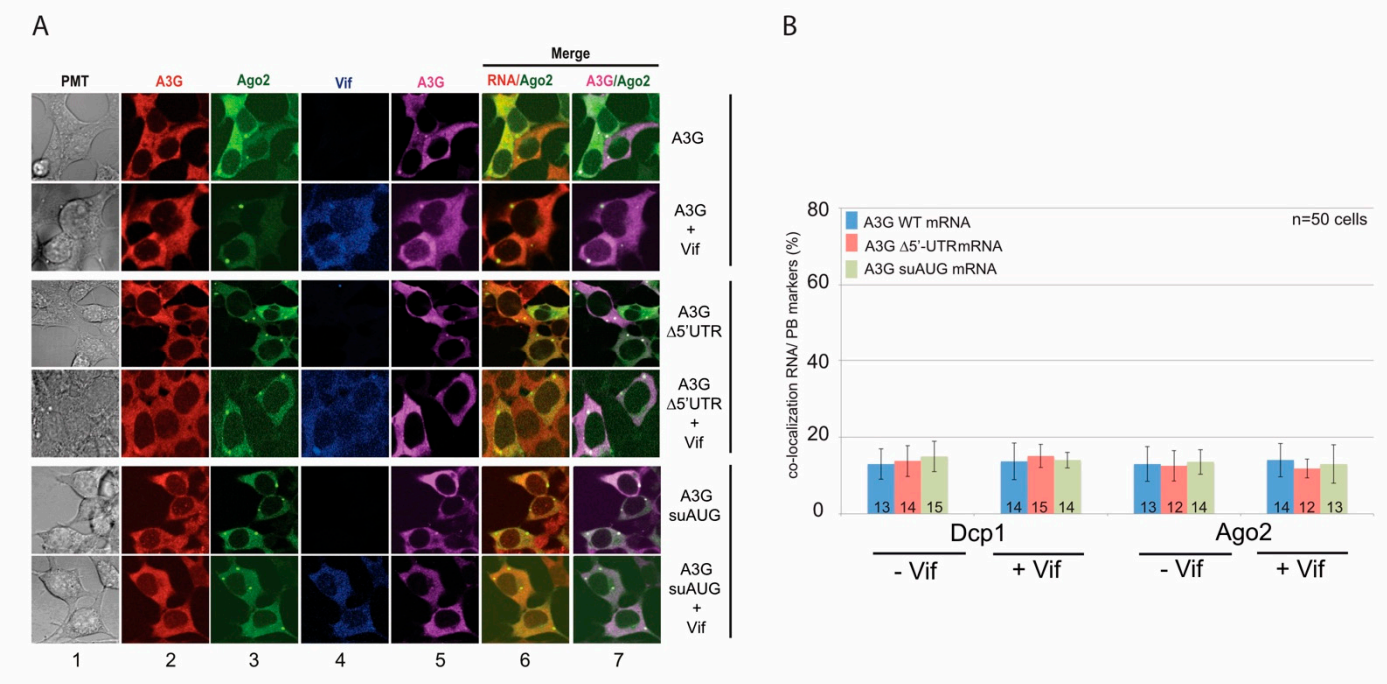


Figure 6. The uORF does not contribute to A3G mRNA relocation to P-bodies by Vif. (**A**) HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wt A3G as well as Δ5′-UTR and suAUG mRNAs, in absence or presence of Vif, and with a vector expressing GFP-AGO2 (P-body marker). Cells were fixed and probed with anti-DIG (A3G mRNAs), anti-A3G (A3G protein), anti-Vif antibodies. AGO2 was visualized by direct fluorescence of the GFP-AGO2 fusion protein. Cells were stained with Dapi to visualize nuclei and the images were merged digitally. (**B**) Histograms represent the percentage of co-localization of A3G mRNAs with AGO2 or DCP1 (another P-body marker). Standard deviations are representative for at least three independent experiments.

4. Discussion

The HIV Vif protein acts as a key antagonist of A3G and as such it plays a major role in promoting efficient viral infection. Vif counteracts A3G according to two distinct mechanisms that concur in reducing its intracellular levels: direct protein degradation and protein translation inhibition. While mechanisms leading to A3G degradation through the recruitment of an E3 ubiquitin ligase complex by Vif are well-understood, little is known concerning its translational regulation by Vif. Recently, we showed that the 5′-UTR of A3G mRNA, specifically the SL2-SL3 domain, was required for the Vif-induced translation inhibition of A3G [42]. In the present study, we reported that a highly conserved uORF embedded within these structures plays a crucial role in modulating A3G translation both under physiological conditions and during Vif-mediated translation repression.

Here, we showed that the translation of A3G was significantly increased when the uORF was disrupted (deletion of the uORF or substitution of the uAUG) (Figure 3), indicating that the uORF is indeed a repressive element, as previously observed for several other genes like the tyrosine kinases hematopoietic cell kinase (HCK), lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), Zeta-chain of T cell receptor associated protein 70 kDa (ZAP70), and YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase (YES1), or the oncogenes murine double minute 2 (MDM2) and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) [68]. Generally, the presence of uORFs modulates ribosome access to the downstream ORF and can reduce its translational efficiency by 30–48% [54]. While current data do not suggest that A3 are oncogenes, recent literature clearly showed that A3A and A3B are active in cancer genomes and may impact tumor progression [69]. Previous studies found that A3G was overexpressed in patients with diffuse large B-cell leukemia [70] and in pancreatic cancers [71]. While cancer development is multifactorial, it is tempting to speculate that cells

evolved to limit their expression and that the uORF in the 5′-UTR of A3G mRNA may participate in this repression/regulation. Endogenous retroelements, such as ERV, LINE-1, or Alu elements (~42% of the human genome) [72,73] are also finely regulated to avoid genetic diseases and cancers [74,75]. Interestingly, A3 proteins have evolved to protect hosts from the genomic instability caused by retroelements [76] and have been shown to counteract LINE-1 and Alu retrotransposition [77–83]. The translational control of mRNA is an important feature of innate immunity but even if the mechanisms remain ill-defined, a fine-tuning of their expression must be advantageous for cell integrity.

uORFs can regulate translation by multiple mechanisms [84,85]. Using mutated A3G mRNA constructs to analyze the impact of the uORF on these various mechanisms, we showed that (i) the distance between the 5′ cap and the uORF does not impact A3G translation [42]; (ii) the context around the uAUG is favorable to initiate translation, indicating that the uAUG is efficiently recognized by the scanning ribosomes but can also be leaky scanned by the ribosome which will then initiate at the main AUG to express A3G; (iii) A3G may also be translated through a re-initiation mechanism as lengthening the uORF or shortening the intercistronic distance enhanced translation repression [86–88]. In this later case, and as previously observed, the distance between the uORF stop codon and the initiation codon of the main ORF would be too short for the scanning 40S to reacquire a new eIF2•GTP•Met-tRNA^{iMet} complex and initiate translation at the main AUG [89–91]. Surprisingly, we did not observe any increase in A3G expression when we reduced the size of the potentially encoded uORF peptide (Figure 3). Indeed, these mutants present a longer intercistronic region (Figure 3A) and should benefit from re-initiation. While this mechanism is not fully understood yet, it is possible that the intrinsic sequence of the uORF or its secondary/tertiary structure is of importance for this repression which might be caused by the stalling of the elongating ribosomes. While we did not assess the densities of ribosome profiling reads over the 5′UTR of A3G mRNA, we retrieved data from the "Genome Wide Information on Protein Synthesis" website (https://gwips.ucc.ie/, accessed on 3 November 2021) and observed that the uORF is occupied by ribosomes (Figure S7A). Interestingly, ribosome occupancy is higher in the second half of the uORF. This suggests the ribosomes stall during elongation and create a roadblock, hindering the scanning 43S preinitiation complexes that pass through the uORF start codon, which would explain the reduced translation of A3G (a similar profile could be observed for A3F 5′-UTR, Figure S7B). Besides, we showed that the identity of the putative 23 amino acids peptide expressed from the uORF (mutant A3G uORF2) has no function in the translational regulation of A3G, reinforcing the importance of the uORF (sequence/structure) over the peptide sequence.

Furthermore, we showed that the highly structured 5′-UTR of A3G mRNA ([40] and Figures S5 and S6) did not drive significant translation through a potential IRES, as the insertion of a stable stem-loop at the 5′-end of the mRNA, designed to prevent 43S subunit loading, almost completely inhibited A3G translation (Figure 3). Moreover, a genome-wide search yielding a large number of mammalian cellular IRESs did not identify the 5′-UTR of A3G as a potential IRES [92]. Altogether, these results suggest that A3G is translated through a dual leaky scanning and re-initiation mechanism. Further studies will be needed to evaluate: (i) the re-initiation efficiency, the accurate determination of which will be difficult as differentiating sole re-initiation from a leaky scanning/re-initiation mechanism is hard to achieve; (ii) how the ribosome is stalled, whether through a specific RNA structure or the termination context [93].

Beyond the effects of the uORF on A3G translation, studies in mammalian cells and yeast showed that uORF-containing mRNAs are susceptible to be targeted by NMD, which is attributed to the termination events occurring at uORF stop codons [94,95]. Moreover, the presence of uORF in the 5′ leader of mRNAs was associated with a reduced transcript level and reduced translation, which together resulted in a decrease in ORF translation efficiency (averaging 30–48% reduction) [54]. Indeed, under conditions where the proteasomal pathway was inhibited, we showed that Vif was not able to reduce the translation of A3G expressed from mRNA constructs devoid of a functional uORF (ΔuORF and suAUG),

suggesting that Vif induces A3G translational repression during the initiation steps at the uORF, or that it increases the stalling of elongating ribosomes. To the best of our knowledge, the uORF of A3G mRNA would represent the second example (and the first one in vertebrates) of an uORF being co-regulated by a protein factor, the first example being the SXL (sex lethal protein), which mediates translation inhibition through association to uORFs of the Drosophila msl2 5′-UTR mRNA [96–98]. Indeed, in females, msl-2 expression needs to be repressed for viability (dosage compensation), and this repression is achieved by the binding of SXL to uridine stretches in the 5′ and 3′-UTRs [99,100]. Both mechanisms synergize to achieve full msl-2 translational repression [96]. Similarly, multiple mechanisms also exist to inhibit A3G expression through its proteasomal degradation and translational inhibition by Vif. Whereas additional experiments will be needed to clearly decipher this mechanism, one can imagine that Vif interacts with components of the eukaryotic translation initiation machinery to reduce the translational rate of A3G, or may recruit cellular factors involved in the negative regulation of the translation (Figure 7).

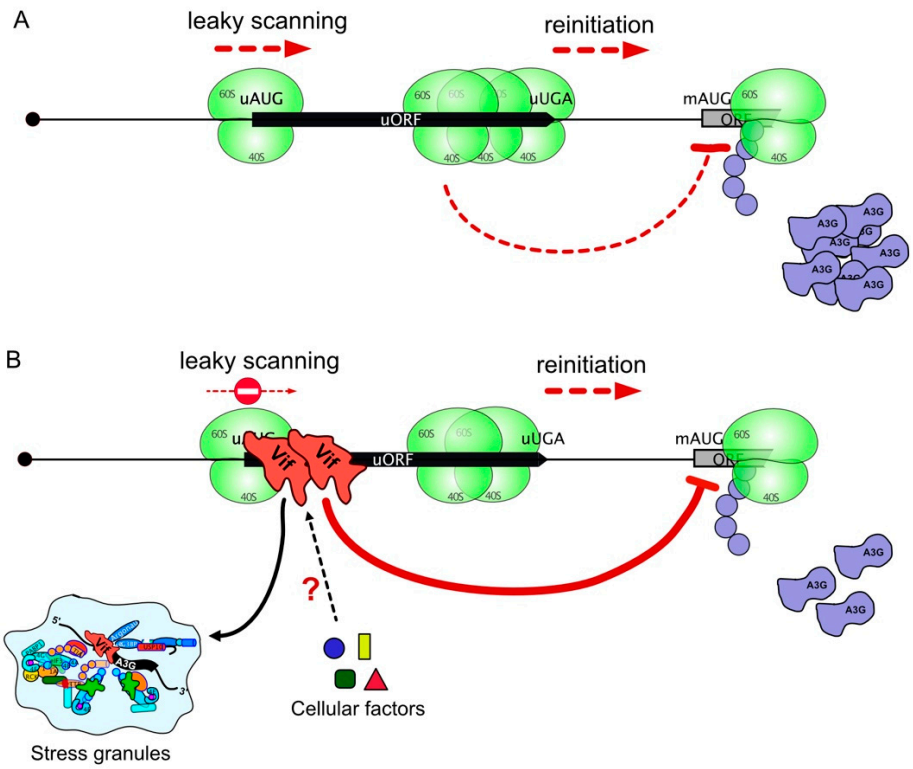


Figure 7. Simplified model of A3G mRNA uORF-mediated translational control. (**A**) In absence of Vif, translation of A3G mRNA is controlled by the uORF embedded within its 5′UTR, leading to basal A3G protein translation through leaky scanning and reinitiation. Ribosome stalling at uORF termination codon is likely participating in reducing A3G yield. (**B**) In presence of Vif, the uORF strengthens the translational inhibition leading to reduced yield of A3G protein, mainly by inhibiting the leaky scanning mechanism. Vif may interact with components of the eukaryotic translation initiation machinery to reduce the translational rate of A3G or recruit cellular factors involved in the negative regulation of the translation. Moreover, relocation of A3G mRNA into storage compartments in presence of Vif participates in the global reduction of A3G level.

Finally, we observed a strong correlation between the presence and functionality of the uORF on A3G mRNA and its co-localization, under stress conditions, into SGs in a Vif-dependent manner. Indeed, when the uORF was not functional (inhibition of uORF initiation or ΔuORF), the presence of mutated A3G mRNAs was significantly reduced into SGs when Vif was co-expressed (Figure 5). However, A3G protein expressed from these constructs can be found in P-bodies and SGs, as previously observed [57,101–103]. The

presence of wt A3G mRNA in SGs in the presence of Vif is probably not so surprising, since SGs play an important role in the regulation of gene expression at the translational level in response to a variety of external stimuli [104]. Therefore, these results validate the notion that the uORF acts as a negative regulator of A3G expression by directing the relocation of A3G mRNA into storage compartments in the presence of Vif (Figure 7).

To summarize, we identified a short uORF within the 5′-UTR of A3G mRNA that is conserved in the human population, regulates A3G translation, and is required by HIV-1 Vif to repress its translation (Figure 7). While the relocation in SGs of A3G mRNA by Vif through the uORF could explain in part the downregulation of A3G expression, additional work will be required to firmly establish this mechanism. Deciphering the mechanisms of the Vif-mediated translational inhibition of A3G mRNAs will be important to finding new molecular inhibitors able to counteract Vif activity and reduce viral infectivity.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10010013/s1, Figure S1: Effect of Vif on the translation of the different A3G mRNA constructs; Figure S2: A3G mRNA expression level in HEK 293T transfected cells; Figure S3: Analyses of A3G mRNAs and protein by FISH and immunofluorescence; Figure S4: Intensity plots; Figure S5: Comparison of the SHAPE reactivity profiles of the 5′ region of wild-type and mutant A3G mRNAs; Figure S6: Comparison of the SHAPE reactivity profiles of the 5′ region of wild-type and mutant A3G mRNAs; Figure S7: Densities of ribosome profiling reads over the 5-′UTR of A3G (A) and A3F (B) mRNAs; Table S1: Variants identified in the human A3G and A3F uORF (+/− 10 nt) regions; Table S2: 5′-UTR sequences of APOBEC3 mRNAs identified by RACE-PCR; Table S3: SHAPE data sets.

Author Contributions: Conceptualization, J.-C.P.; methodology, C.L., T.S., S.G., J.B. and O.G.; validation, B.S., C.V., M.M.W. and R.C.-R.; writing—original draft preparation, J.-C.P.; writing—review and editing, J.-C.P., R.M., A.C., L.E. and A.V.-F.; supervision, J.-C.P.; funding acquisition, J.-C.P., L.E., and A.V.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) (#ECTZ134179) and SIDACTION (#20-1-AEQ-12613-1) to JCP, and by postdoctoral (JB, BS) and doctoral fellowships from ANRS (SG, CL) and the French Ministry of Research and Higher Education (TS, CV). LE is supported by the CNRS and by grants from amfAR (Mathilde Krim Phase II Fellowship #109140-58-RKHF), the ANR LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048 of the Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir (ANR-11-IDEX-0007)), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM #ING20160435028), the FINOVI, and the ANRS (#ECTZ19143 and ECTZ118944). RC-R is funded by RD16/0025/0011 (Programa de Ayudas de Movilidad (2020) from the Spanish HIV/AIDS Research Network (RIS), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid) and ProID2020010093 ("Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información" and European Social Fund). AV-F is supported by the European Regional Development Fund (ERDF), RTI2018-093747-B-100 ("Ministerio de Ciencia e Innovación", Spain), "Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades" (Spain), ProID2020010093 ("Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información" and European Social Fund), UNLL10-3E-783 (ERDF and "Fundación CajaCanarias"), "SEGAI-ULL", and by RD16/0025/0011 (the Spanish AIDS network, "Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA", as part of the "Plan Nacional" R + D + I and cofunded by Spanish "Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdirección General de Evaluación" and "Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (European Regional Development Fund (ERDF))").

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Vincent Caval (Institut Pasteur Paris, France) and Sébastien Pfeffer (IBMC-CNRS, Strasbourg) for kindly providing the APOBEC3A and the different P-body and SG markers, respectively. The following reagents were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: anti-A3G polyclonal antibody (#9968) from Warner C. Greene, HIV-1 Vif monoclonal antibody (#319) from Michael H. Malim, rabbit anti-human

A3F polyclonal antibody (#11226) from Immunodiagnostics, and anti-human A3H monoclonal antibody (P3A3-A10, #12155) from Michael Emerman and Reuben Harris.

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

Appendix A

Table A1. Description of the primers used in this study.

Mutants	Primers	Sequences (5′ to 3′)
A3G ΔuORF	pS-ΔuORF	GAAGCGGGAGGGGCCAACCCTGGTGCTCCA
	pAS-ΔuORF	TGGAGCACCAGGGTTGGCCCCTCCCGCTTC
A3G suAUG	pS-suAUG	GAAGGGGGAGGGGCCAAGACTACGAGGCCCTGG
	pAS-suAUG	CCAGGGCCTCGTAGTCTTGGCCCCTCCCCCTTC
A3G suUGA	pS-suUGA	GCCTGGAGCAGAAAGGAAACCCTGGTGCTCCA
	pAS-suUGA	TGGAGCACCAGGGTTTCCTTTCTGCTCCAGGC
A3G 2aa	pS-A3G2aa	GCCATGACTACGTGATGATGGGAGGTCACT
	pAS-A3G2aa	AGTGACCTCCCATCATCACGTAGTCATGGC
A3G 5aa	pS-A3G5aa	ACGAGGCCCTGGTGATGAACTTTAGGGAGG
	pAS-A3G5aa	CCTCCCTAAAGTTCATCACCAGGGCCTCGT
A3G 10aa	pS-A3G10aa	GTCACTTTAGGGTGATGAGTCCTAAAACCA
	pAS-A3G10aa	TGGTTTTAGGACTCATCACCCTAAAGTGAC
A3G 15aa	pS-A3G15aa	GCTGTCCTAAAATGATGAGCTTGGAGCAGA
	pAS-A3G15aa	TCTGCTCCAAGCTCATCATTTTAGGACAGC
A3G Δ249–273	pS-Δ249–273	TGGAGCAGAAAGTGATTAGTCGGGACTAGC
	pAS-Δ249–273	GCTAGTCCCGACTAATCACTTTCTGCTCCA
A3G Δ249–291	pS-Δ249–291	TGGAGCAGAAAGTGACCAAGGATGAAGCCT
	pAS-Δ249–291	AGGCTTCATCCTTGGTCACTTTCTGCTCCA
A3G WK	pS-WK	GAAGCGGGAAAAAAAATGGCTACGAGGCCCT
	pAS-WK	AGGGCCTCGTAGCCATTTTTTTTCCCGCTTC
A3G uORF2	pS-uORF2	GGGAGGGGCCATGGACTACGAGGCCCTGG
	pAS-uORF2	CCAGGGCCTCGTAGTCCATGGCCCCTCCC
	pS-uORF2	CTTGGAGCAGAAATGAAACCCTGGTGCTCC
	pAS-uORF2	GGAGCACCAGGGTTTCATTTCTGCTCCAAG
A3G uUGA276	pS-uUGA276	CTCCAGACAAAGATCTGATTAGTCGGGACTAGC
	pAS-uUGA276	GCTAGTCCCGACTAATCAGATCTTTGTCTGGAG
A3G uUGA289	pS-uUGA289	TTAGTCGGGACTAGCTGACGGCCAAGGATGAAG
	pAS-uUGA289	CTTCATCCTTGGCCGTCAGCTAGTCCCGACTAA
A3G SSL	pS-SSL	TAGTGAACCGTCAGAAGCTCCACCACGGCCCAAGCTTGGGCCGTGGTGGAGCT CTCTTTCCCTTTGCA
	pAS-SSL	TGCAAAGGGAAAGAGAGCTCCACCACGGCCCAAGCTTGGGCCGTGGTGGAGCT TCTGACGGTTCACTA
PCR A3G	pST7-A3G1000	TAATACGACTCACTATAGGGCTCTTTCCCTTTGCAATTGC
	pAS-A3G1000	GCAGGACCCAGGTGTCATTG
RTqPCR	A3G-fp	GGATCCACCCACATTCACTT
	A3G-rp	ATGCGCTCCACCTCATAAC
RTqPCR	β-actin-fp	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	β-actin-rp	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Table A2. Description of the primers used for the RACE PCRs.

Target Gene	Primer Name	Primer Sequence	Tm
APOBEC3B	A3B SP1	GCA CAG CCC CAG GAG AAG CA	62.7 °C
	A3B SP2	GAC CCT GTA GAT CTG GGC CG	59.6 °C
	A3B SP3	GGC GCT CCA CCT CAT AGC AC	60.7 °C
	A3B SP5	CGG CCC AGA TCT ACA GGG TC	59.6 °C
	A3B SP6	ACC AGC AAA GCA ATG TGC TC	56.6 °C
APOBEC3C	A3C SP1	GAG ACT CTC CCG TAG CCT TC	56.5 °C
	A3C SP2	CAT GAT CTC CAC AGC GAC CC	57.9 °C
	A3C SP3	AGA GGC GGG CGG TGA AGA TG	62.3 °C
	A3C SP5	GGG TCG CTG TGG AGA TCA TG	57.9 °C
	A3C SP6	ATC CAT CCA CCC CCA CAG AC	59.2 °C
APOBEC3D	A3DE SP1	CAT TGG GGT GCT CAG CCA AG	59.1 °C
	A3DE SP2	AGG TGA TCT GGA AGC GCC TG	59.7 °C
	A3DE SP3	CAC ATT TCT GCG TGG TTC TC	54.2 °C
	A3DE SP5	TGC AGC CTG AGT CAG GAA GG	59.5 °C
	A3DE SP6	TAG AGT GCA ATG GCT GGA TC	55.6 °C
APOBEC3H	A3H SP1	AGC GGT TTC TCG TGG TCC AC	60 °C
	A3H SP2	TCC ACA CAG AAG CCG CAG CC	63 °C
	A3H SP3	GTC AAC CAG CTC CCA GGC AC	61 °C
	A3H SP5	GGC TGC GGC TTC TGT GTG GA	63 °C
	A3H SP6	GGT CCC GGT GGA GGT CAT GG	62.5 °C
	PCR Anchor Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	59.8 °C
	dT Anchor Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV	

References

1. Strebel, K.; Daugherty, D.; Clouse, K.; Cohen, D.; Folks, T.; Martin, M.A. The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nat. Cell Biol.* **1987**, *328*, 728–730. [CrossRef]
2. Sharma, B. Effect of omeprazole and domperidone on adult asthmatics with gastroesophageal reflux. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1706–1710. [CrossRef]
3. Sakai, H.; Shibata, R.; Sakuragi, J.; Kawamura, M.; Adachi, A. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.* **1993**, *67*, 1663–1666. [CrossRef]
4. An, P.; Bleiber, G.; Duggal, P.; Nelson, G.; May, M.; Mangeat, B.; Alobwede, I.; Trono, D.; Vlahov, D.; Donfield, S.; et al. APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS. *J. Virol.* **2004**, *78*, 11070–11076. [CrossRef] [PubMed]
5. Madani, N.; Kabat, D. An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *J. Virol.* **1998**, *72*, 10251–10255. [CrossRef] [PubMed]
6. Simon, J.H.M.; Gaddis, N.; Fouchier, R.; Malim, M. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1397–1400. [CrossRef] [PubMed]
7. Sheehy, A.M.; Gaddis, N.; Choi, J.D.; Malim, M. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *418*, 646–650. [CrossRef]
8. Harris, R.S.; Bishop, K.N.; Sheehy, A.M.; Craig, H.M.; Petersen-Mahrt, S.K.; Watt, I.N.; Neuberger, M.S.; Malim, M. DNA Deamination Mediates Innate Immunity to Retroviral Infection. *Cell* **2003**, *113*, 803–809. [CrossRef]
9. Malim, M.H. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2008**, *364*, 675–687. [CrossRef]
10. Mangeat, B.; Turelli, P.; Caron, G.; Friedli, M.; Perrin, L.; Trono, D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *424*, 99–103. [CrossRef] [PubMed]
11. Mbisa, J.L.; Barr, R.; Thomas, J.; Vandegraaff, N.; Dorweiler, I.J.; Svarovskaia, E.S.; Brown, W.L.; Mansky, L.M.; Gorelick, R.J.; Harris, R.S.; et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNAs Produced in the Presence of APOBEC3G Exhibit Defects in Plus-Strand DNA Transfer and Integration. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7099–7110. [CrossRef]

12. Ooms, M.; Brayton, B.; Letko, M.; Maio, S.M.; Pilcher, C.D.; Hecht, F.M.; Barbour, J.D.; Simon, V. HIV-1 Vif Adaptation to Human APOBEC3H Haplotypes. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 411–421. [CrossRef] [PubMed]
13. Sato, K.; Izumi, T.; Misawa, N.; Kobayashi, T.; Yamashita, Y.; Ohmichi, M.; Ito, M.; Takaori-Kondo, A.; Koyanagi, Y. Remarkable Lethal G-to-A Mutations in vif- Proficient HIV-1 Provirus by Individual APOBEC3 Proteins in Humanized Mice. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9546–9556. [CrossRef]
14. Refsland, E.W.; Hultquist, J.; Luengas, E.M.; Ikeda, T.; Shaban, N.M.; Law, E.K.; Brown, W.L.; Reilly, C.; Emerman, M.; Harris, R.S. Natural Polymorphisms in Human APOBEC3H and HIV-1 Vif Combine in Primary T Lymphocytes to Affect Viral G-to-A Mutation Levels and Infectivity. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004761. [CrossRef]
15. Sato, K.; Takeuchi, J.S.; Misawa, N.; Izumi, T.; Kobayashi, T.; Kimura, Y.; Iwami, S.; Takaori-Kondo, A.; Hu, W.-S.; Aihara, K.; et al. APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and Evolution in Humanized Mouse Model. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004453. [CrossRef] [PubMed]
16. Alce, T.M.; Popik, W. APOBEC3G Is Incorporated into Virus-like Particles by a Direct Interaction with HIV-1 Gag Nucleocapsid Protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34083–34086. [CrossRef]
17. Douaisi, M.; Dussart, S.; Courcoul, M.; Bessou, G.; Vigne, R.; Decroly, E. HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *321*, 566–573. [CrossRef]
18. Strebel, K.; A Khan, M. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: Which RNA is it? *Retrovirology* **2008**, *5*, 55. [CrossRef] [PubMed]
19. Zennou, V.; Perez-Caballero, D.; Göttlinger, H.; Bieniasz, P.D. APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12058–12061. [CrossRef] [PubMed]
20. Svarovskaia, E.S.; Xu, H.; Mbisa, J.L.; Barr, R.; Gorelick, R.J.; Ono, A.; Freed, E.O.; Hu, W.-S.; Pathak, V.K. Human Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme-catalytic Polypeptide-like 3G (APOBEC3G) Is Incorporated into HIV-1 Virions through Interactions with Viral and Nonviral RNAs. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35822–35828. [CrossRef]
21. Wang, X.; Li, X.; Ma, J.; Zhang, L.; Ma, L.; Mi, Z.; Zhou, J.; Guo, F.; Kleiman, L.; Cen, S. Human APOBEC3F incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virus Res.* **2014**, *191*, 30–38. [CrossRef] [PubMed]
22. Bélanger, K.; Langlois, M.-A. Comparative analysis of the gene-inactivating potential of retroviral restriction factors APOBEC3F and APOBEC3G. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2878–2887. [CrossRef] [PubMed]
23. Bishop, K.N.; Verma, M.; Kim, E.-Y.; Wolinsky, S.; Malim, M.H. APOBEC3G Inhibits Elongation of HIV-1 Reverse Transcripts. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000231. [CrossRef] [PubMed]
24. Iwatani, Y.; Chan, D.S.; Wang, F.; Stewart-Maynard, K.; Sugiura, W.; Gronenborn, A.M.; Rouzina, I.; Williams, M.C.; Musier-Forsyth, K.; Levin, J.G. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7096–7108. [CrossRef] [PubMed]
25. Mbisa, J.L.; Bu, W.; Pathak, V.K. APOBEC3F and APOBEC3G Inhibit HIV-1 DNA Integration by Different Mechanisms. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5250–5259. [CrossRef] [PubMed]
26. Gillick, K.; Pollpeter, D.; Phalora, P.; Kim, E.-Y.; Wolinsky, S.; Malim, M.H. Suppression of HIV-1 Infection by APOBEC3 Proteins in Primary Human CD4+T Cells Is Associated with Inhibition of Processive Reverse Transcription as Well as Excessive Cytidine Deamination. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1508–1517. [CrossRef]
27. Pollpeter, D.; Parsons, M.; Sobala, A.E.; Coxhead, S.; Lang, R.D.; Bruns, A.M.; Papaioannou, S.; McDonnell, J.M.; Apolonia, L.; Chowdhury, J.A.; et al. Deep sequencing of HIV-1 reverse transcripts reveals the multifaceted antiviral functions of APOBEC3G. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 220–233. [CrossRef] [PubMed]
28. Seissler, T.; Marquet, R.; Paillart, J.-C. Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins. *Viruses* **2017**, *9*, 322. [CrossRef] [PubMed]
29. Stupfler, B.; Verriez, C.; Gallois-Montbrun, S.; Marquet, R.; Paillart, J.-C. Degradation-Independent Inhibition of APOBEC3G by the HIV-1 Vif Protein. *Viruses* **2021**, *13*, 617. [CrossRef]
30. Yu, X.; Yu, Y.; Liu, B.; Luo, K.; Kong, W.; Mao, P.; Yu, X.-F. Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science* **2003**, *302*, 1056–1060. [CrossRef] [PubMed]
31. Shirakawa, K.; Takaori-Kondo, A.; Kobayashi, M.; Tomonaga, M.; Izumi, T.; Fukunaga, K.; Sasada, A.; Abudu, A.; Miyauchi, Y.; Akari, H.; et al. Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif–Cullin5–ElonginB–ElonginC complex. *Virology* **2006**, *344*, 263–266. [CrossRef] [PubMed]
32. Mehle, A.; Strack, B.; Ancuta, P.; Zhang, C.; McPike, M.; Gabuzda, D. Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7792–7798. [CrossRef]
33. Hüttenhain, R.; Xu, J.; Burton, L.A.; Gordon, D.E.; Hultquist, J.; Johnson, J.; Satkamp, L.; Hiatt, J.; Rhee, D.; Baek, K.; et al. ARIH2 Is a Vif-Dependent Regulator of CUL5-Mediated APOBEC3G Degradation in HIV Infection. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 86–99.e7. [CrossRef]
34. Stanley, B.J.; Ehrlich, E.S.; Short, L.; Yu, Y.; Xiao, Z.; Yu, X.-F.; Xiong, Y. Structural Insight into the Human Immunodeficiency Virus Vif SOCS Box and Its Role in Human E3 Ubiquitin Ligase Assembly. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8656–8663. [CrossRef] [PubMed]
35. Bergeron, J.R.C.; Huthoff, H.; Veselkov, D.A.; Beavil, R.L.; Simpson, P.; Matthews, S.; Malim, M.H.; Sanderson, M.R. The SOCS-Box of HIV-1 Vif Interacts with ElonginBC by Induced-Folding to Recruit Its Cul5-Containing Ubiquitin Ligase Complex. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000925. [CrossRef] [PubMed]

36. Guo, Y.; Dong, L.; Qiu, X.; Wang, Y.; Zhang, B.; Liu, H.; Yu, Y.; Zang, Y.; Yang, M.; Huang, Z. Structural basis for hijacking CBF-β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *505*, 229–233. [CrossRef] [PubMed]
37. Kim, D.Y.; Kwon, E.; Hartley, P.D.; Crosby, D.C.; Mann, S.; Krogan, N.J.; Gross, J.D. CBFβ Stabilizes HIV Vif to Counteract APOBEC3 at the Expense of RUNX1 Target Gene Expression. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 632–644. [CrossRef] [PubMed]
38. Anderson, B.D.; Harris, R.S. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-β/RUNX axis. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500296. [CrossRef]
39. Stopak, K.; de Noronha, C.; Yonemoto, W.; Greene, W.C. HIV-1 Vif Blocks the Antiviral Activity of APOBEC3G by Impairing Both Its Translation and Intracellular Stability. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 591–601. [CrossRef]
40. Mercenne, G.; Bernacchi, S.; Richer, D.; Bec, G.; Henriet, S.; Paillart, J.-C.; Marquet, R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, 633–646. [CrossRef] [PubMed]
41. Kao, S.; Khan, M.A.; Miyagi, E.; Plishka, R.; Buckler-White, A.; Strebel, K. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity. *J. Virol.* **2003**, *77*, 11398–11407. [CrossRef]
42. Guerrero, S.; Libre, C.; Batisse, J.; Mercenne, G.; Richer, D.; Laumond, G.; Decoville, T.; Moog, C.; Marquet, R.; Paillart, J.-C. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5′UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39507. [CrossRef] [PubMed]
43. Jackson, R.J.; Hellen, C.U.T.; Pestova, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 113–127. [CrossRef] [PubMed]
44. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745. [CrossRef] [PubMed]
45. Nguyen, K.-L.; Llano, M.; Akari, H.; Miyagi, E.; Poeschla, E.M.; Strebel, K.; Bour, S. Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology* **2004**, *319*, 163–175. [CrossRef]
46. Binka, M.; Ooms, M.; Steward, M.; Simon, V. The Activity Spectrum of Vif from Multiple HIV-1 Subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. *J. Virol.* **2011**, *86*, 49–59. [CrossRef]
47. Reuter, J.S.; Mathews, D.H. RNAstructure: Software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 129. [CrossRef]
48. Darty, K.; Denise, A.; Ponty, Y. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1974–1975. [CrossRef] [PubMed]
49. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [CrossRef] [PubMed]
50. Chang, T.H.; Huang, H.Y.; Hsu, J.B.; Weng, S.L.; Horng, J.T.; Huang, H.D. An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*. [CrossRef]
51. Calvo, S.E.; Pagliarini, D.J.; Mootha, V.K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7507–7512. [CrossRef]
52. Renz, P.F.; Valdivia-Francia, F.; Sendoel, A. Some like it translated: Small ORFs in the 5′UTR. *Exp. Cell Res.* **2020**, *396*, 112229. [CrossRef]
53. Johnstone, T.G.; A Bazzini, A.; Giraldez, A.J. Upstream ORF s are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* **2016**, *35*, 706–723. [CrossRef] [PubMed]
54. Chew, G.-L.; Pauli, A.; Schier, A.F. Conservation of uORF repressiveness and sequence features in mouse, human and zebrafish. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11663. [CrossRef] [PubMed]
55. Hernández, G.; Osnaya, V.G.; Pérez-Martínez, X. Conservation and Variability of the AUG Initiation Codon Context in Eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **2019**, *44*, 1009–1021. [CrossRef] [PubMed]
56. Caval, V.; Suspène, R.; Khalfi, P.; Gaillard, J.; Caignard, G.; Vitour, D.; Roingeard, P.; Vartanian, J.-P.; Wain-Hobson, S. Frame-shifted APOBEC3A encodes two alternative proapoptotic proteins that target the mitochondrial network. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 297. [CrossRef]
57. Marin, M.; Golem, S.; Rose, K.M.; Kozak, S.L.; Kabat, D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Functionally Interacts with Diverse APOBEC3 Cytidine Deaminases and Moves with Them between Cytoplasmic Sites of mRNA Metabolism. *J. Virol.* **2008**, *82*, 987–998. [CrossRef] [PubMed]
58. Hultquist, J.F.; Lengyel, J.A.; Refsland, E.W.; LaRue, R.S.; Lackey, L.; Brown, W.L.; Harris, R.S. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11220–11234. [CrossRef] [PubMed]
59. Barbosa, C.; Peixeiro, I.; Romão, L. Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003529. [CrossRef]
60. Law, G.L.; Raney, A.; Heusner, C.; Morris, D.R. Polyamine Regulation of Ribosome Pausing at the Upstream Open Reading Frame of S-Adenosylmethionine Decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38036–38043. [CrossRef]
61. Fang, P.; Spevak, C.C.; Wu, C.; Sachs, M.S. A nascent polypeptide domain that can regulate translation elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4059–4064. [CrossRef] [PubMed]
62. Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 947–950. [CrossRef]

63. Kozak, M. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 5134–5142. [CrossRef] [PubMed]
64. Kozak, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **2005**, *361*, 13–37. [CrossRef] [PubMed]
65. Hinnebusch, A.G. Translational regulation of gcn4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 407–450. [CrossRef] [PubMed]
66. Guzikowski, A.R.; Chen, Y.S.; Zid, B.M. Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2019**, *10*, e1524. [CrossRef]
67. White, J.P.; Lloyd, R.E. Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 175–183. [CrossRef] [PubMed]
68. Wethmar, K.; Schulz, J.; Muro, E.M.; Talyan, S.; A Andrade-Navarro, M.; Leutz, A. Comprehensive translational control of tyrosine kinase expression by upstream open reading frames. *Oncogene* **2015**, *35*, 1736–1742. [CrossRef] [PubMed]
69. Green, A.M.; Weitzman, M.D. The spectrum of APOBEC3 activity: From anti-viral agents to anti-cancer opportunities. *DNA Repair* **2019**, *83*, 102700. [CrossRef] [PubMed]
70. Jais, J.-P.; De L'Adulte, F.T.G.D.D.L.; Haioun, C.; Molina, T.; Rickman, D.S.; De Reynies, A.; Berger, F.; Gisselbrecht, C.; Brière, J.; Reyes, F.; et al. The expression of 16 genes related to the cell of origin and immune response predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP and rituximab. *Leukemia* **2008**, *22*, 1917–1924. [CrossRef] [PubMed]
71. Wu, J.; Pan, T.-H.; Xu, S.; Jia, L.-T.; Zhu, L.-L.; Mao, J.-S.; Zhu, Y.-L.; Cai, J.-T. The virus-induced protein APOBEC3G inhibits anoikis by activation of Akt kinase in pancreatic cancer cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12230. [CrossRef] [PubMed]
72. Refsland, E.W.; Harris, R.S. The APOBEC3 Family of Retroelement Restriction Factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *371*, 1–27. [CrossRef] [PubMed]
73. Ito, J.; Gifford, R.J.; Sato, K. Retroviruses drive the rapid evolution of mammalianAPOBEC3genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 610–618. [CrossRef]
74. Kazazian, H.H.; Wong, C.; Youssoufian, H.; Scott, A.F.; Phillips, D.G.; Antonarakis, S.E. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nat. Cell Biol.* **1988**, *332*, 164–166. [CrossRef] [PubMed]
75. Morse, B.; Rotherg, P.G.; South, V.J.; Spandorfer, J.M.; Astrin, S.M. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nat. Cell Biol.* **1988**, *333*, 87–90. [CrossRef]
76. Schumann, G. APOBEC3 proteins: Major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 637–642. [CrossRef] [PubMed]
77. Kinomoto, M.; Kanno, T.; Shimura, M.; Ishizaka, Y.; Kojima, A.; Kurata, T.; Sata, T.; Tokunaga, K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2955–2964. [CrossRef]
78. Bogerd, H.P. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 89–95. [CrossRef]
79. Chiu, Y.-L.; Witkowska, H.E.; Hall, S.C.; Santiago, M.; Soros, V.B.; Esnault, C.; Heidmann, T.; Greene, W.C. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15588–15593. [CrossRef] [PubMed]
80. Bulliard, Y.; Turelli, P.; Röhrig, U.F.; Zoete, V.; Mangeat, B.; Michielin, O.; Trono, D. Functional Analysis and Structural Modeling of Human APOBEC3G Reveal the Role of Evolutionarily Conserved Elements in the Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Alu Transposition. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12611–12621. [CrossRef] [PubMed]
81. Hulme, A.E.; Bogerd, H.P.; Cullen, B.R.; Moran, J.V. Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene* **2007**, *390*, 199–205. [CrossRef]
82. Koyama, T.; Arias, J.F.; Iwabu, Y.; Yokoyama, M.; Fujita, H.; Sato, H.; Tokunaga, K. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84228. [CrossRef]
83. McLaughlin, R.N., Jr.; Gable, J.T.; Wittkopp, C.J.; Emerman, M.; Malik, H.S. Conservation and Innovation of APOBEC3A Restriction Functions during Primate Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1889–1901. [CrossRef] [PubMed]
84. Morris, D.R.; Geballe, A.P. Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8635–8642. [CrossRef] [PubMed]
85. Young, S.K.; Wek, R.C. Upstream open reading frames differentially regulate genespecific translation in the integrated stress response. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 16927–16935. [CrossRef] [PubMed]
86. Andreev, D.; O'Connor, P.B.F.; Fahey, C.; Kenny, E.M.; Terenin, I.; E Dmitriev, S.; Cormican, P.; Morris, D.; Shatsky, I.N.; Baranov, P.V. Translation of 5′ leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *eLife* **2015**, *4*, e03971. [CrossRef]
87. Terenin, I.; Akulich, K.A.; Andreev, D.E.; Polyanskaya, S.; Shatsky, I.N.; Dmitriev, S.E. Sliding of a 43S ribosomal complex from the recognized AUG codon triggered by a delay in eIF2-bound GTP hydrolysis. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, 1882–1893. [CrossRef]
88. Kozak, M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **2002**, *299*, 1–34. [CrossRef]
89. Vattem, K.M.; Wek, R.C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11269–11274. [CrossRef]
90. Harding, H.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1099–1108. [CrossRef]
91. Lu, P.D.; Harding, H.; Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **2004**, *167*, 27–33. [CrossRef] [PubMed]

92. Weingarten-Gabbay, S.; Elias-Kirma, S.; Nir, R.; Gritsenko, A.A.; Stern-Ginossar, N.; Yakhini, Z.; Weinberger, A.; Segal, E. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **2016**, *351*, 240. [CrossRef] [PubMed]
93. Wethmar, K. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2014**, *5*, 765–768. [CrossRef] [PubMed]
94. He, F.; Li, X.; Spatrick, P.; Casillo, R.; Dong, S.; Jacobson, A. Genome-Wide Analysis of mRNAs Regulated by the Nonsense-Mediated and 5′ to 3′ mRNA Decay Pathways in Yeast. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1439–1452. [CrossRef]
95. Mendell, J.T.; A Sharifi, N.; Meyers, J.L.; Martinez-Murillo, F.; Dietz, H.C. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 1073–1078. [CrossRef]
96. Medenbach, J.; Seiler, M.; Hentze, M.W. Translational Control via Protein-Regulated Upstream Open Reading Frames. *Cell* **2011**, *145*, 902–913. [CrossRef]
97. Gebauer, F.; Merendino, L.; Hentze, M.; Valcarcel, J. The Drosophila splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA* **1998**, *4*, 142–150.
98. Beckmann, K.; Grskovic, M.; Gebauer, F.; Hentze, M.W. A Dual Inhibitory Mechanism Restricts msl-2 mRNA Translation for Dosage Compensation in Drosophila. *Cell* **2005**, *122*, 529–540. [CrossRef]
99. Graindorge, A.; Militti, C.; Gebauer, F. Posttranscriptional control of X-chromosome dosage compensation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *2*, 534–545. [CrossRef] [PubMed]
100. Duncan, K.E.; Strein, C.; Hentze, M.W. The SXL-UNR Corepressor Complex Uses a PABP-Mediated Mechanism to Inhibit Ribosome Recruitment to msl-2 mRNA. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 571–582. [CrossRef]
101. Gallois-Montbrun, S.; Kramer, B.; Swanson, C.; Byers, H.; Lynham, S.; Ward, M.; Malim, M.H. Antiviral Protein APOBEC3G Localizes to Ribonucleoprotein Complexes Found in P Bodies and Stress Granules. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2165–2178. [CrossRef]
102. Wichroski, M.J.; Robb, G.B.; Rana, T.M. Human Retroviral Host Restriction Factors APOBEC3G and APOBEC3F Localize to mRNA Processing Bodies. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e41. [CrossRef] [PubMed]
103. Kozak, S.L.; Marin, M.; Rose, K.M.; Bystrom, C.; Kabat, D. The Anti-HIV-1 Editing Enzyme APOBEC3G Binds HIV-1 RNA and Messenger RNAs That Shuttle between Polysomes and Stress Granules. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29105–29119. [CrossRef] [PubMed]
104. Kedersha, N.; Anderson, P. Stress granules: Sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, A117. [CrossRef]

Supplementary Figures and Tables

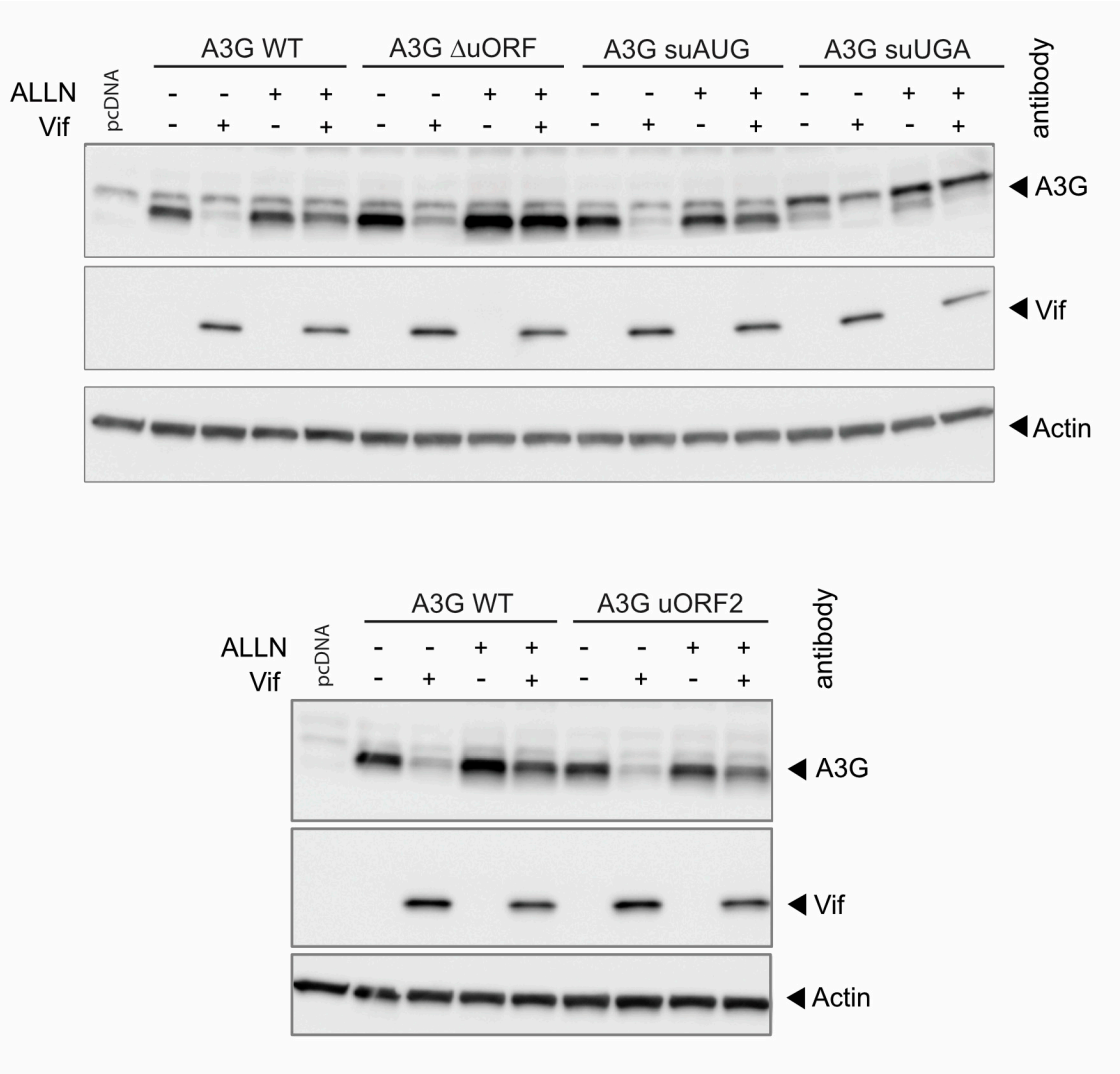


Figure S1. Effect of Vif on the translation of the different A3G mRNA constructs. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wt and mutated A3G constructs in the presence or absence of Vif and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). Proteins were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblotting. Bands were quantified using Image J and relative expression of A3G proteins are represented in histograms (see Figure 4).

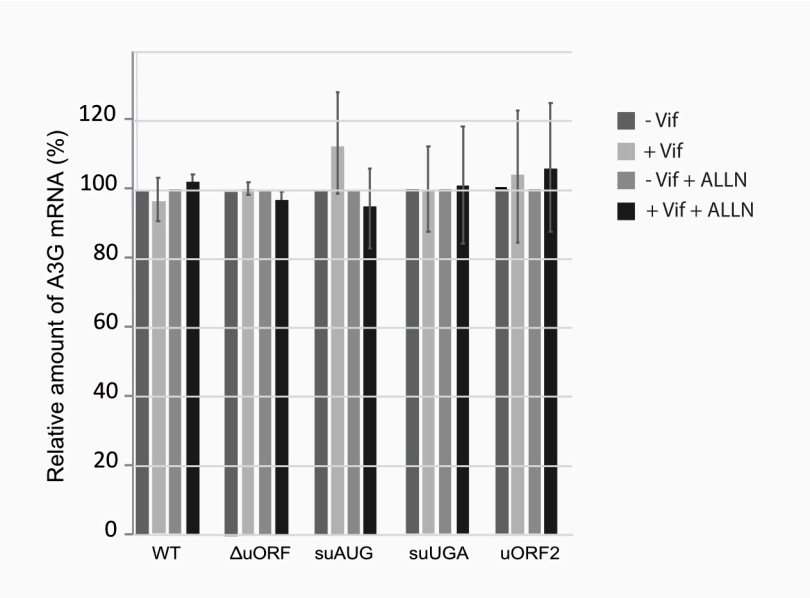


Figure S2. A3G mRNA expression level in HEK 293T transfected cells. Total RNA was extracted from transfected HEK 293T cells and A3G RTqPCR were performed to study the expression of wt and mutated A3G constructs. Data represent the mean ± S.E.M. for at least three independent experiments.

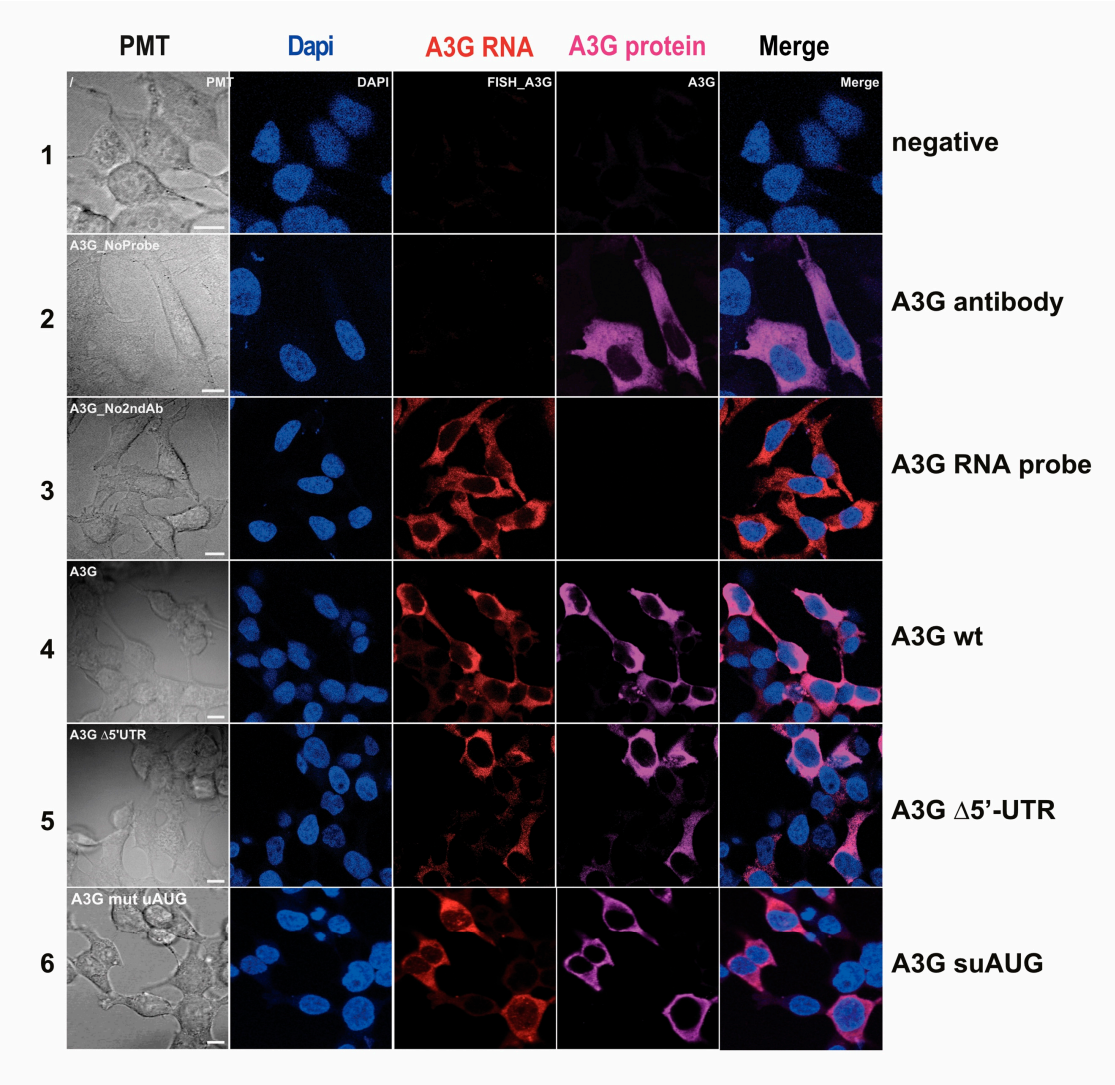


Figure S3. Analyses of A3G mRNAs and protein by FISH and immunofluorescence. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wt A3G as well as Δ5′-UTR and suAUG mRNAs. Cells were fixed and probed with anti-DIG (A3G mRNAs) and anti-A3G (A3G protein) antibodies. Cells were stained with Dapi to visualize nuclei and the images were merged digitally. Controls and A3G mRNAs (lines 1 to 6) are indicated on the right of the panels.

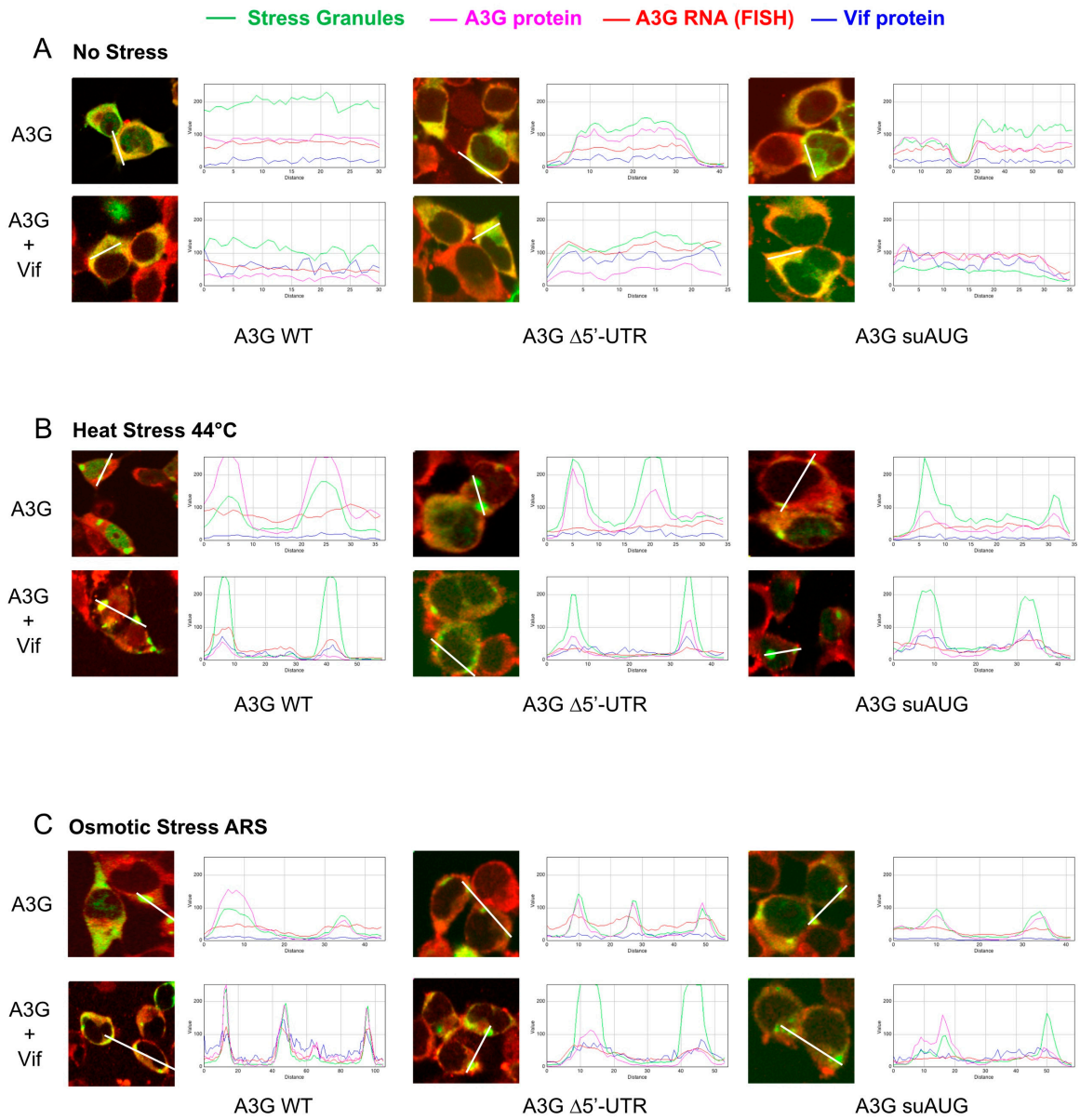


Figure S4. Intensity plots (FISH) obtained from the cytoplasmic signals of PAPB1 (green lines), A3G (pink lines), and A3G mRNA (red lines) in the absence or presence of Vif in physiological (A), or in stress conditions: 44 °C (B) or sodium arsenite (C).

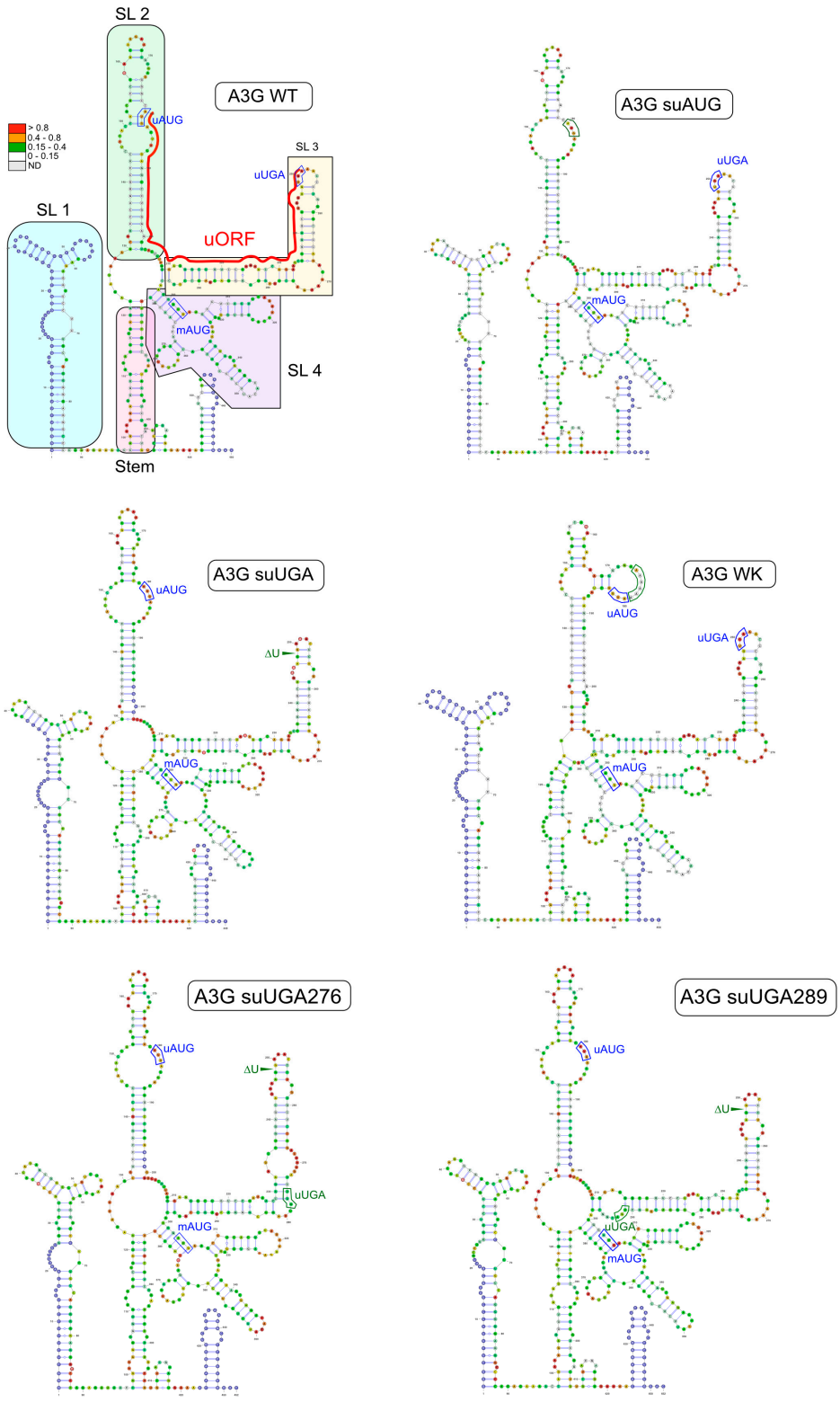


Figure S5. Comparison of the SHAPE reactivity profiles of the 5′ region of wild-type and mutant A3G mRNAs. The SHAPE reactivity profiles of nucleotides 1-400 for A3G mRNAs WT, suAUG, suUGA, WK, suUGA276 and suUGA289 are represented. The SHAPE reactivity values are drawn on the structure and color-coded as indicated in the inset. They were used as constraints for the RNAstructure software (version 6.0). Positions of uORF (red), translation initiation codons (uAUG for uORF and mAUG for A3G in blue), translation stop codon (uUGA for uORF in blue) and mutations (green) are indicated. Four independent domains can be deduced from these structures and are indicated on the wild-type structure.

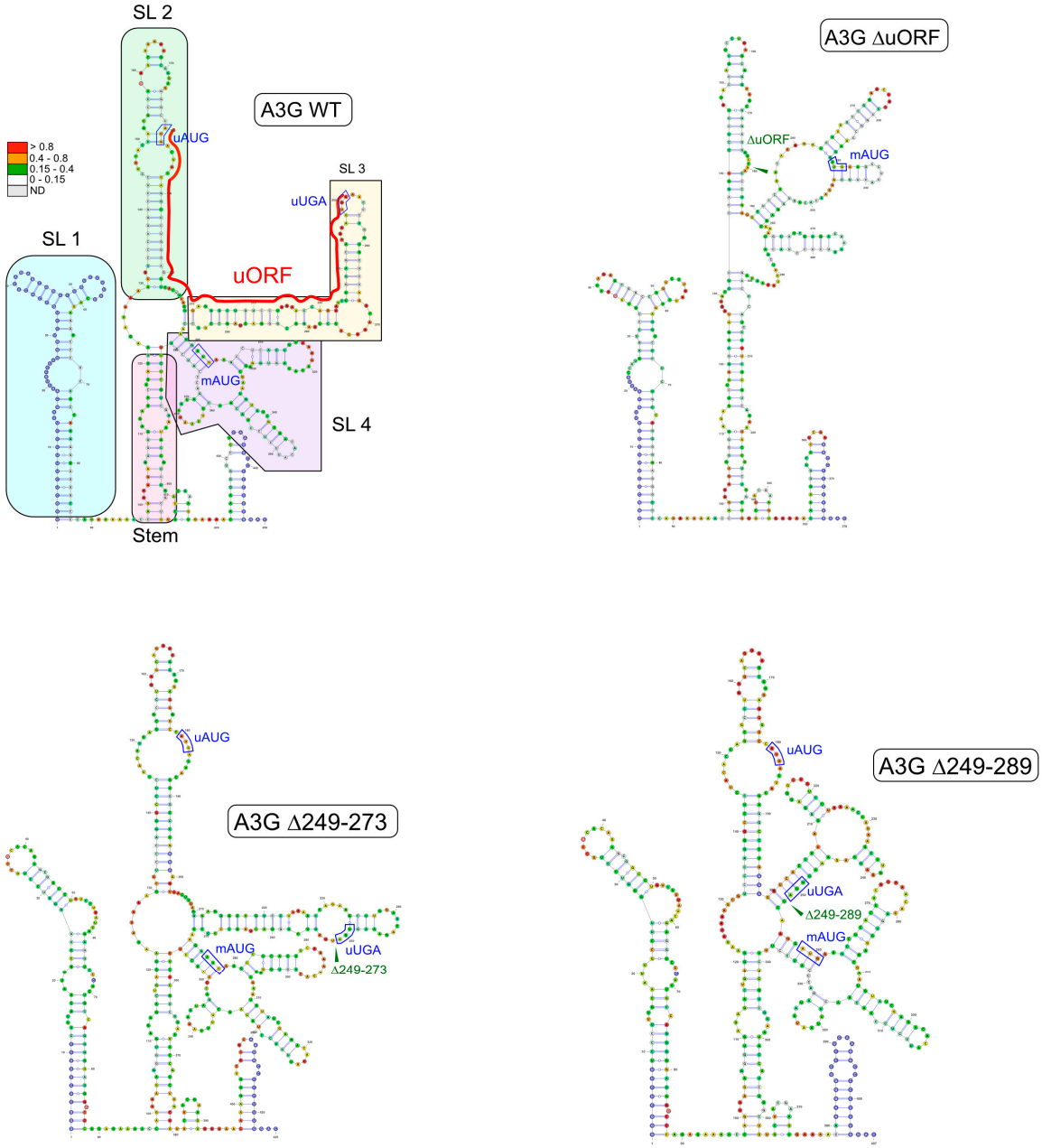


Figure S6. Comparison of the SHAPE reactivity profiles of the 5′ region of wild-type and mutant A3G mRNAs. The SHAPE reactivity profiles of nucleotides 1-400 for A3G mRNAs WT, ΔuORF, Δ249-273 and Δ249-289 are represented. The SHAPE reactivity values are drawn on the structure and color-coded as indicated in the inset. They were used as constraints for the RNAstructure software (version 6.0). Positions of uORF (red), translation initiation codons (uAUG for uORF and mAUG for A3G in blue), translation stop codon (uUGA for uORF in blue) and mutations (green) are indicated. Four independent domains can be deduced from these structures and are indicated on the wild-type structure.

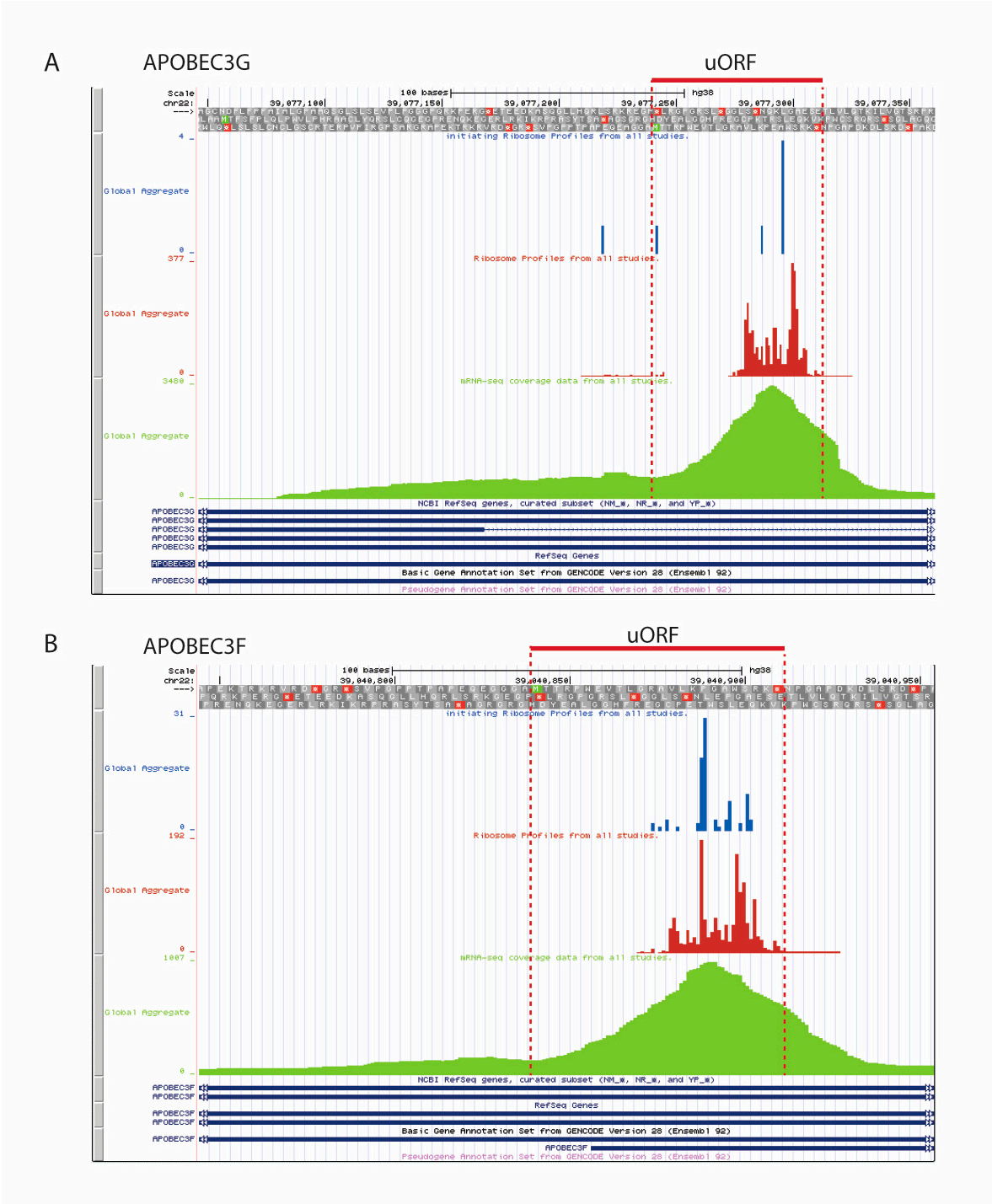


Figure S7. Densities of ribosome profiling reads over the 5′UTR of A3G (A) and A3F (B) mRNAs. Data were retrieved from the "Genome Wide Information on Protein Synthesis" website (https://gwips.ucc.ie/). Ribosomes profiles (red), mRNA-seq coverages (green), and position of the uORF (above the amino acids sequence) are indicated.

Table S1. Variants identified in the human A3G and A3F uORF (+/- 10 nt) regions. In bold, the common SNP (MAF>1%); In italics, variants that would impact uORF (i.e. at the uAUG position or inducing frameshift). Data from the NCBI dbSNP database (July 31st 2019); Homo sapiens:GRCh38.p12 (GCF_000001405.38)Chr 22 (NC_000022.11).

Table S2. 5′-UTR sequences of APOBEC3 mRNAs identified by RACE-PCR. APOBEC3 genes are indicated, as well as their 5′-UTR length. The translation initiation codon AUG of the main APOBEC3 ORF is indicated (blue) as well as the potential uORF (orange).

Table S3. SHAPE data sets. The different sheets correspond to SHAPE reactivities obtained for wt and mutated A3G mRNAs.

Revue de littérature « Les APOBEC3 : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes »

Verriez, C., Marquet, R., Paillart, J.-C. & Stupfler, B (2020) Les APOBEC : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes. *Virologie,* **24**, 381-418

Résumé :

La réponse immunitaire innée est une réponse non spécifique qui constitue la première ligne de défense en cas d'infection, notamment en permettant l'élimination des pathogènes par phagocytose ou apoptose. Au sein des cellules immunitaires, cette réponse innée se caractérise entre autres par la synthèse de protéines nommées facteurs de restriction dont le rôle est d'inhiber la réplication virale. Parmi ces facteurs, les protéines de la famille APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3 ou A3) constituent des facteurs antiviraux majeurs qui ciblent de nombreux types de virus. L'une des cibles des A3 est le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) : l'activité désaminase de certaines A3 convertit une fraction des cytidines du génome viral en uridines et perturbe son expression. Néanmoins, le VIH-1 contrecarre les A3 en exprimant la protéine Vif qui les inhibe en détournant divers mécanismes cellulaires. Par ailleurs, les APOBEC3 participent au maintien de l'intégrité génétique par l'inhibition des rétroéléments mais contribuent également à la cancérogenèse, à l'image d'A3A et A3B, deux facteurs majeurs dans ce processus. L'éventail de leurs activités, combiné aux récentes études montrant leur implication dans la régulation de virus émergents (Zika, SARS-CoV-2), permettent d'envisager les A3 ainsi que leurs partenaires viraux comme axes thérapeutiques.

Revue

Virologie

Virologie 2020, 24 (6) : 381-418

Les APOBEC3 : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes

APOBEC3s: history of an antiviral and mutagenic protein family

Cédric Verriez
Roland Marquet
Jean-Christophe Paillart
Benjamin Stupfler

Université de Strasbourg, CNRS, Architecture et réactivité de l'ARN, UPR 9002, IBMC, 2 Allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg, France
<jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr>

Résumé. La réponse immunitaire innée est une réponse non spécifique qui constitue la première ligne de défense en cas d'infection, notamment en permettant l'élimination des pathogènes par phagocytose ou apoptose. Au sein des cellules immunitaires, cette réponse innée se caractérise entre autres par la synthèse de protéines nommées facteurs de restriction dont le rôle est d'inhiber la réplication virale. Parmi ces facteurs, les protéines de la famille APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3* ou A3) constituent des facteurs antiviraux majeurs qui ciblent de nombreux types de virus. L'une des cibles des A3 est le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) : l'activité désaminase de certaines A3 convertit une fraction des cytidines du génome viral en uridines et perturbe son expression. Néanmoins, le VIH-1 contrecarre les A3 en exprimant la protéine Vif qui les inhibe en détournant divers mécanismes cellulaires. Par ailleurs, les APOBEC3 participent au maintien de l'intégrité génétique par l'inhibition des rétroéléments mais contribuent également à la cancérogenèse, à l'image d'A3A et A3B, deux facteurs majeurs dans ce processus. L'éventail de leurs activités, combiné aux récentes études montrant leur implication dans la régulation de virus émergents (Zika, SARS-CoV-2), permettent d'envisager les A3 ainsi que leurs partenaires viraux comme axes thérapeutiques.

Mots clés : facteurs de restriction, APOBEC3, VIH-1, Vif, cancer

Abstract. The innate immune response is nonspecific and constitutes the first line of defense against infections by pathogens, mainly by enabling their elimination by phagocytosis or apoptosis. In immune cells, this response is characterized, amongst others, by the synthesis of restriction factors, a class of proteins whose role is to inhibit viral replication. Among them, the proteins of the APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3* or A3) family are major antiviral factors that target a wide range of viruses. One of their targets is the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1): the deaminase activity of some A3 proteins converts a fraction of cytidines of the viral genome into uridines, impairing its expression. Nevertheless, HIV-1 counteracts A3 proteins thanks to its Vif protein, which inhibits them by hijacking several cellular mechanisms. Besides, APOBEC3 proteins help maintaining the genome integrity by inhibiting retroelements but they also contribute to carcinogenesis, as it is the case for A3A and A3B, two major factors in this process. The large range of A3 activities, combined with recent studies showing their implication in the regulation of emerging viruses (Zika, SARS-CoV-2), allow A3 and their viral partners to be considered as therapeutic areas.

Key words: Restriction factors, APOBEC3, deaminase, HIV-1, Vif, cancer

doi:10.1684/vir.2020.0870

Correspondance : J.-C. Paillart, B. Stupfler
<jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr>
<b.stupfler@ibmc-cnrs.unistra.fr>

Pour citer cet article : Verriez C, Marquet R, Paillart JC, Stupfler B. Les APOBEC3 : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes. *Virologie* 2020; 24(6) : 381-418 doi:10.1684/vir.2020.0870

Introduction

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense dès les premières heures de l'infection. Cette réponse non spécifique se caractérise par la mise en route d'un programme cellulaire de défense avec la production de médiateurs, cytokines et chimiokines dont les interférons (IFN) de types I et III. Cela permet le recrutement rapide des cellules immunitaires au lieu d'infection et l'induction d'une inflammation par la production de cytokines et chimiokines. L'activation de nombreux types cellulaires (macrophages, neutrophiles, cellules T *natural killer*) permet l'élimination des pathogènes par phagocytose ou apoptose [1]. La stimulation des cellules hôtes par l'IFN entraîne ou accentue la production d'un certain nombre de protéines nommées ISG (*Interferon Stimulated Genes*). Au sein des cellules une forme d'immunité innée, nommée immunité intrinsèque, repose sur des protéines appelées facteurs de restriction dont l'expression est constitutive et/ou induite par les médiateurs de l'immunité innée, classant certains facteurs de restriction parmi les ISG. Leur expression basale reste cependant suffisante pour agir de manière dominante et autonome afin d'inhiber l'infection virale dès le premier contact. Ces facteurs impactent différentes étapes du cycle viral, que ce soit pendant la phase précoce (entrée, transcription inverse, réplication du génome) ou lors de la phase tardive du cycle (assemblage, bourgeonnement). Parmi eux, nous avons la famille des protéines APOBEC3 (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3* ou A3) [2, 3], objet de cette revue. Nous développerons ses rôles antiviraux et cellulaire, dont son impact dans la cancérogenèse. Nous considérerons son importance dans la réponse antivirale dans le cas d'infections virales humaines, avec une attention particulière portée sur le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

La superfamille des APOBEC

Découverte et activités des APOBEC

L'activité de la première protéine APOBEC a été identifiée il y a plus de 30 ans suite à l'étude des mécanismes de synthèse des apolipoprotéines B (apo-B) [4]. Ces dernières sont des constituants protéiques majeurs des lipoprotéines, complexes permettant le transport de lipides dans l'organisme, que sont les chylomicrons, les LDL (*Low Density Lipoprotein*) et les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Dans les cellules intestinales, la protéine apo-B48 est synthétisée à partir d'un ARNm exprimant habituellement la protéine apo-B100 grâce à l'édition de l'ARNm par une enzyme responsable de la désamination d'une unique cytidine en thymidine, générant ainsi un codon stop. La protéine REPR (*apo B mRNA Editing PRotein*) identifiée chez le rat est responsable de l'édition de l'ARNm d'apoB [5]. Plus tard, cette protéine a été renommée APOBEC1 et son équivalent humain a été caractérisé [6] (*figure 1*). La protéine APOBEC2 a été identifiée en 1999 [7] (*figure 1*). Chez la souris, un défaut d'activité d'APOBEC2 entraîne une diminution de la masse corporelle, des myopathies [8], des anomalies mitochondriales et des mitophagies au sein des muscles squelettiques [9]. APOBEC2 serait ainsi un inhibiteur de la différentiation myoblastique lors de la régénération musculaire [10]. Par ailleurs, le virus de l'hépatite B augmente l'expression d'APOBEC2 dans les hépatocytes suite à l'inhibition de l'expression de miR-122 qui reconnaît la région non traduite en 3' (3'UTR, *UnTranslated Region*) de l'ARNm d'APOBEC2 et diminue ainsi sa traduction. L'expression accrue d'APOBEC2 aboutit à la prolifération de cellules cancéreuses hépatiques [11]. Tout comme APOBEC1, aucune activité antivirale n'a été observée pour cette protéine. Le cluster des sept gènes *APOBEC3* (protéines A3A, B, C, D, F, G et H), a été mis en évidence en 2002 [12] (*figure 1*), en même temps que la découverte de la protéine A3G et de son activité antivirale contre le VIH-1 [13]. Les propriétés de ces protéines seront discutées plus en détail dans la suite de cette revue. La protéine AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), essentielle pour l'immunité, a été identifiée en 2000 [14] (*figure 1*). Elle est impliquée dans les mécanismes assurant la variabilité des immunoglobulines, dont la mutation hypersomatique, la commutation isotypique et la conversion génique [14, 15]. L'activité d'AID, que nous ne développerons pas ici, a été largement documentée (pour une revue récente, voir [16]). APOBEC4, identifiée en 2005 par une analyse informatique chez l'humain [17] activerait de nombreux promoteurs, y compris viraux, aboutissant *in vitro* à une production accrue du VIH-1 [18] (*figure 1*). Cependant, la faible quantité d'études concernant APOBEC4 ne permet pas de définir son impact sur les infections virales humaines.

Structure et activité enzymatique des APOBEC3

Les gènes des A3 humaines sont localisés sur le chromosome 22, et la famille compte sept membres : A3A, B, C, D, F, G et H (*figure 1*). Un pseudogène correspondant à A3E est retrouvé au sein de ce cluster mais n'est pas exprimé [12]. L'apparition du premier gène d'*APOBEC3* chez les mammifères proviendrait d'un événement de duplication du gène *AID* [19]. Au cours de l'évolution, la famille A3 s'est accrue et diversifiée *via* de nouvelles duplications et mutations. On retrouve notamment les sept membres humains chez les primates du nouveau monde (chimpanzés) et de l'ancien monde (macaques rhésus) alors qu'un unique gène est retrouvé chez la souris. L'expansion des A3 a été provo-

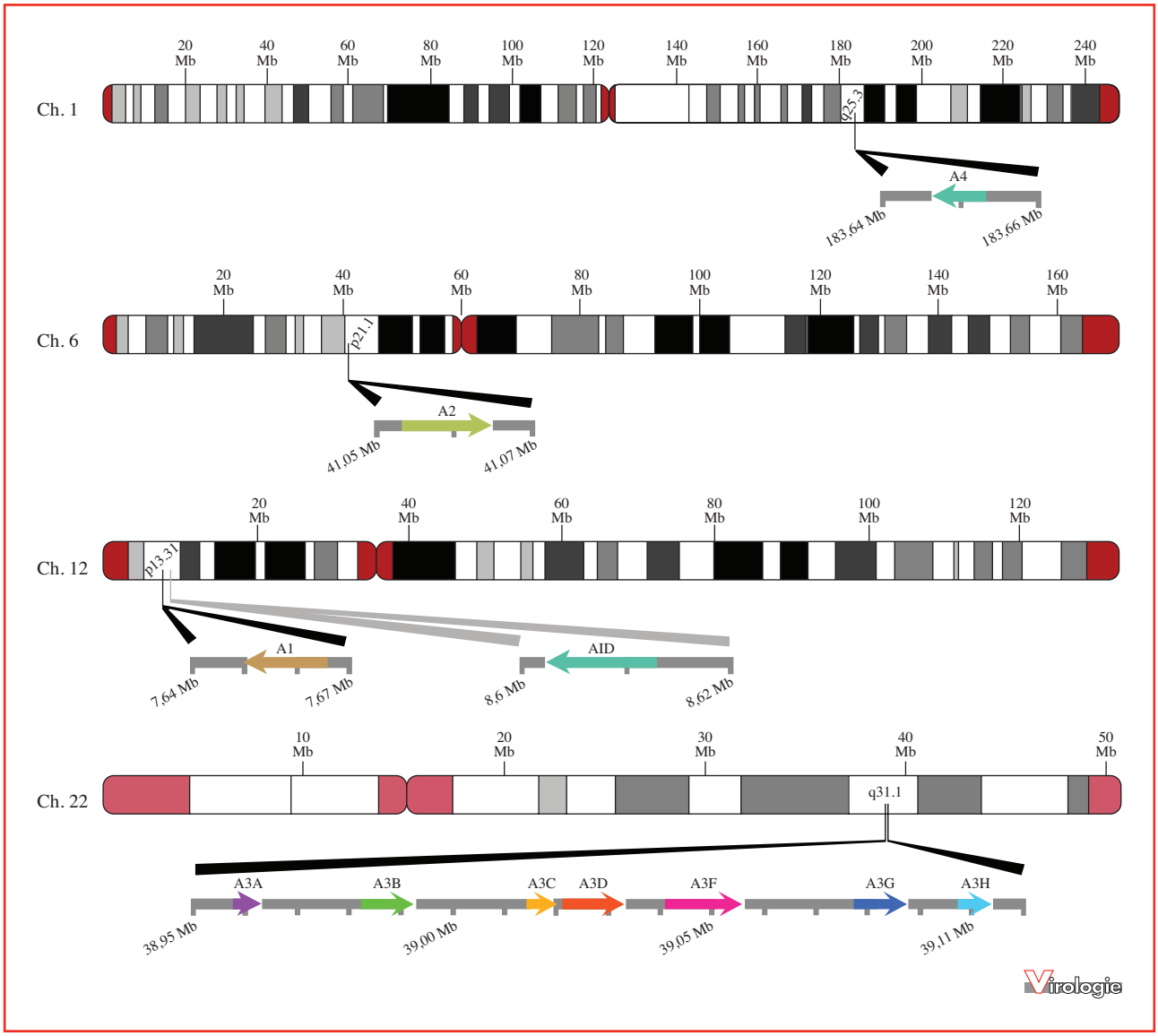


Figure 1. Localisation chromosomique des APOBEC. Les gènes *APOBEC* sont localisés sur les chromosomes humains annotés par tranches de 10 ou 20 mégabases (Mb). L'orientation des gènes est symbolisée par une flèche.

quée en réponse à l'accumulation d'éléments transposables endogènes tels que les rétrotransposons et rétrovirus endogènes [20, 21].

Les A3 contiennent un ou deux domaine(s) catalytique(s) (CD, *Catalytic Domain*) caractérisé(s) par un motif conservé coordinant le zinc (ZDD), suivant la structure générale : H-X_1-E-$X_{23\text{-}28}$-P-C-$X_{2\text{-}4}$-C (X correspond à n'importe quel acide aminé) (*figure 2A*). Les ZDD et leurs régions périphériques sont classés en trois groupes phylogénétiques distincts (Z1-3) (*figure 2A*) [22]. A3A, A3C et A3H ne contiennent qu'un seul CD, contre deux pour A3B, A3D, A3F et A3G (*figure 2A*). Dans le cas des A3 à double domaine, le domaine N-terminal (NTD) est catalytiquement inactif et est responsable de la liaison aux acides nucléiques, tandis que le domaine C-terminal (CTD) porte l'activité désaminase [23-25]. Lors de la désamination, une molécule d'eau coordinée dans le site actif par un ion Zn^{2+} est déprotonée en ion hydroxyde qui va réagir avec le carbone C4 de la cytosine. Cette attaque est suivie d'un transfert de proton entre l'acide glutamique et l'azote N3 de la cytosine et finalement par l'élimination d'une molécule d'ammoniac et la formation du carbonyle en C4 (*figure 2B*) [12, 26].

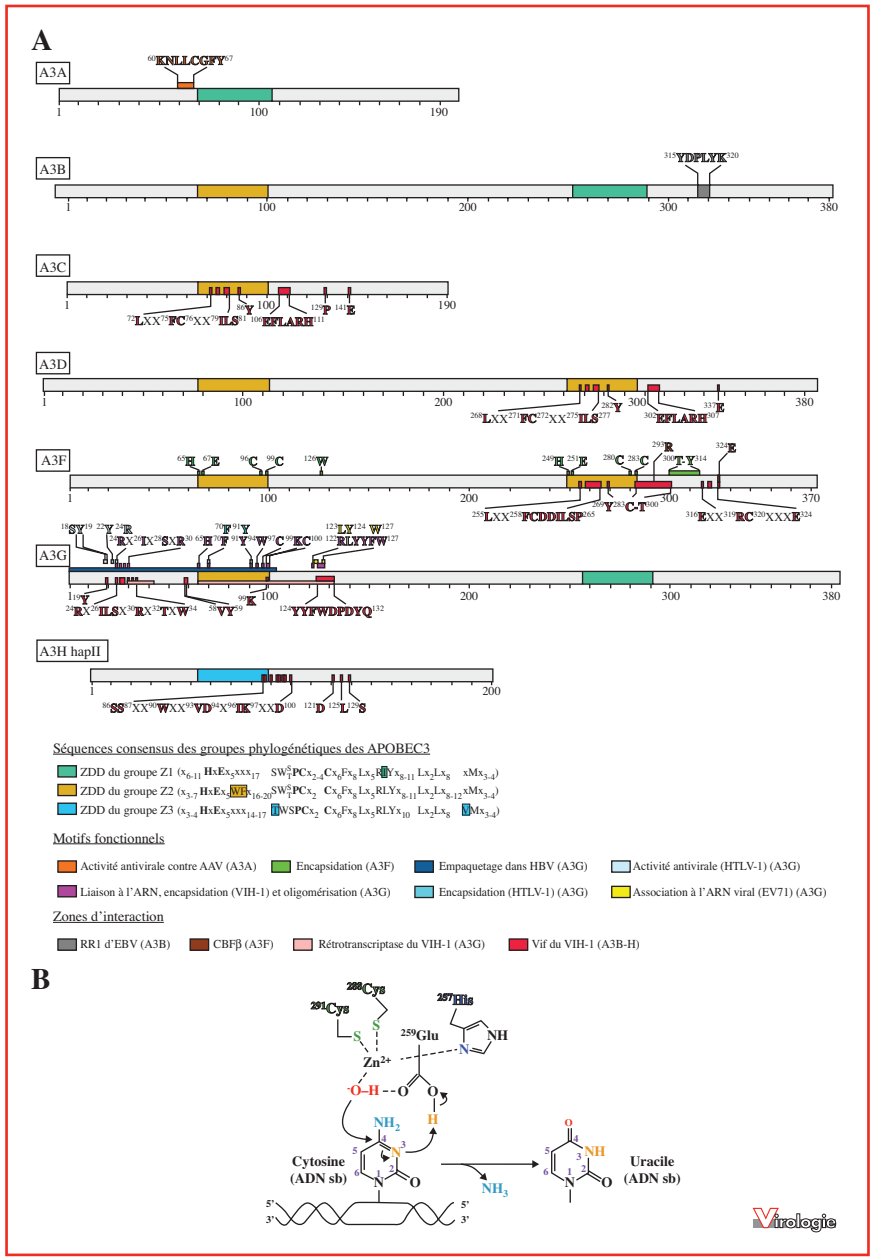


Figure 2. Représentation schématique des APOBEC3 et de leurs sites fonctionnels. A) Les A3 sont représentées et alignées sur leur premier ZDD. Les ZDD caractéristiques des différents groupes phylogénétiques des A3 sont représentés en couleur, les séquences en acides aminés correspondantes sont détaillées au bas de la figure (adaptées de [22]). Les structures sont annotées par tranches de dix acides aminés (traits noirs en-dessous de chaque structure). Les motifs fonctionnels sont symbolisés par des rectangles de couleur au-dessus de chaque structure et les régions d'interaction à d'autres protéines sont colorées au sein de chaque structure. Les résidus associés à ces régions et mentionnés dans le texte sont indiqués (A3A GenBank NM_145699, UniProtKB – P31941 (ABC3A_HUMAN) ; A3B GenBank NM_004900, UniProtKB – Q9UH17 (ABC3B_HUMAN) ; A3C GenBank NM_014508, UniProtKB – Q9NRW3 (ABC3C_HUMAN) ; A3D GenBank NM_152426, UniProtKB – Q96AK3 (ABC3D_HUMAN) ; A3F GenBank NM_145298, UniProtKB – Q8IUX4 (ABC3F_HUMAN) ; A3G GenBank NM_021822, UniProtKB – Q9HC16 (ABC3G_HUMAN) ; A3H GenBank NM_001166003, UniProtKB – Q6NTF7 (ABC3H_HUMAN)). B) Le mécanisme catalytique d'A3G permettant la désamination d'une cytosine en uracile au niveau d'un ADN sb est représenté. Les acides aminés constituant le site catalytique permettant l'accommodation d'un ion zinc et l'utilisation d'une molécule d'eau convertie en anion hydroxyde sont représentés en couleur et numérotés selon leur position au sein d'A3G. Les transferts d'électrons permettant la réaction enzymatique sont représentés par des flèches entre les atomes et/ou liaisons prenant part à la réaction.

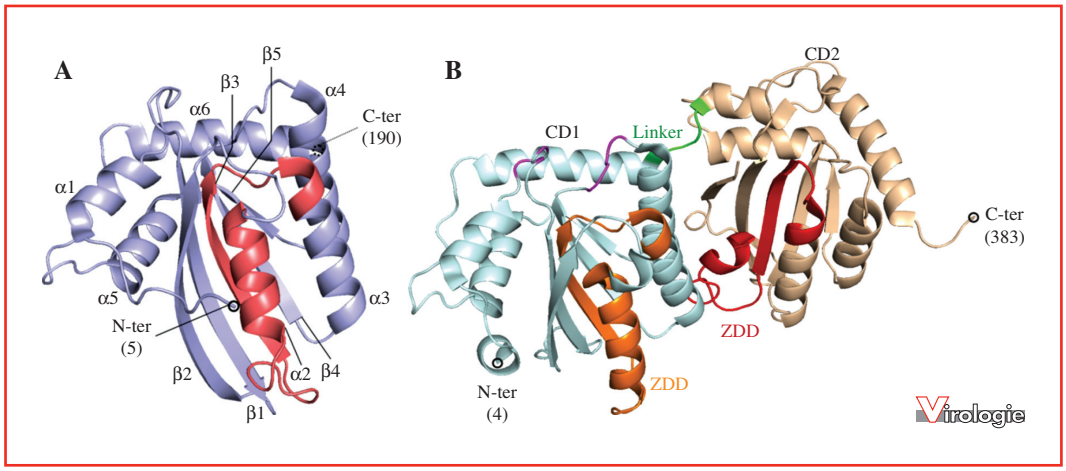


Figure 3. Structures de protéines APOBEC3 contenant un ou deux domaines CD. A) Structure d'A3C humaine (hA3C) (PDB : 3VOW). Le CD et le ZDD sont représentés respectivement en violet et en rose. Les motifs de structure secondaire sont indiqués et sont transposables à la structure de rA3G en B). Les extrémités N- et C-terminales (respectivement N-ter et C-ter) sont annotées. B) Structure d'A3G de macaque rhésus (rA3G) (PDB : 6P3X). Les domaines CD1 et CD2 sont représentés respectivement en cyan et en beige (ZDD respectifs en orange et rouge). La région de liaison (*linker*) reliant les deux CD est représentée en vert, les acides aminés communs entre rA3G et hA3G assurant la dimérisation d'A3G sont représentés en violet (résidus R24, I26, S28 et la région Y124 à W127) (44). Les extrémités N- et C-terminales (respectivement N-ter et C-ter) sont annotées.

Le repliement tridimensionnel des CD est aussi conservé entre les A3, ces derniers étant composés de cinq feuillets β antiparallèles et de six hélices α. Le site catalytique est notamment formé par les hélices α2, α3 et le feuillet β3 (*figure 3A*). Les variations de taille, composition et localisation d'éléments de structure secondaire, tels que les boucles, sont liées à la localisation, la fonction, la régulation de l'activité désaminase ou encore à la sélection de substrat des différentes A3 [27-30]. S'il a été proposé qu'A3A et A3G peuvent désaminer l'ARN [31-33], l'ADN simple brin (sb, d'origine cellulaire ou virale) constitue le substrat principal des A3. L'interaction entre l'ADN sb et la protéine est réalisée au niveau d'un sillon contenant des résidus chargés positivement qui permettent de stabiliser les interactions avec le squelette ribose-phosphate de l'acide nucléique et des résidus aromatiques s'empilant avec les bases azotées [30, 34, 35]. Ces protéines sont néanmoins principalement connues pour désaminer l'ADN des rétrovirus comme celui du VIH-1 [36]. Les A3 désaminent les cytidines (soulignées) en ciblant des motifs spécifiques au sein des acides nucléiques : majoritairement le dinucléotide 5'-CC-3' (5'-TC-3' minoritairement) pour A3G, et 5'-TC-3' pour les autres A3 [37]. Ce dinucléotide est le motif minimal, mais il existe des préférences selon les A3 pour des motifs tri-nucléotidiques, notamment le motif 5'-CCC-3' pour A3G, 5'-TTC-3' pour A3F [38] et 5'-YTC-3' pour A3H (Y : base pyrimidique) [39] (*tableau 1*). La boucle 7 des A3 est notamment responsable de la spécificité pour le nucléotide -1 des motifs ciblés [29, 40, 41].

Les nucléotides directement adjacents au site de désamination 5'-CC-3' et la structure du site de désamination influencent l'activité d'A3G. A3G cible préférentiellement les sites 5'-CC-3' flanqués par des A, C ou T dans des régions ADN sb non structurées [42]. L'activité d'A3G observée est la plus importante dans le cas d'un site 5'-CCCC-3' d'une boucle de quatre nucléotides. Cependant, A3G est peu active sur un site 5'-CC-3' présent dans une boucle de trois nucléotides ou dans une tige [42]. Concernant le site 5'-TC-3', A3A, A3F et A3H montrent une préférence lorsqu'il est flanqué par des A ou des T, tandis que l'ensemble des A3 exercent une activité minimale dans le cas d'un site 5'-GTCG-3' [43]. A3G quant à elle présente une activité maximale dans le cas d'un site 5'-CTCC-3'. De plus, le nucléotide directement en aval du site de désamination (+1) dans un motif 5'-CTCX-3' semble déterminant dans l'efficacité enzymatique des A3. En effet, A3A et A3B semblent légèrement privilégier la présence d'un C, tandis qu'A3F présente une préférence pour un A ou un C. Par ailleurs, A3H présente une activité réduite en cas de G ou de C à cette position, tandis qu'A3G présente une activité diminuée dans le cas d'un G [43]. En règle générale, les A3 ciblent préférentiellement les sites 5'-TC-3' situés dans des régions ADN sb plutôt que dans des boucles ou des renflements, avec une préférence variable selon le contexte nucléotidique et les structures secondaires proches des sites [43]. Le *tableau 1* récapitule les principales caractéristiques des A3 et leurs interactions avec le VIH-1 détaillées dans cette revue.

Tableau 1 Caractéristiques des APOBEC3. Les motifs nucléotidiques cibles sont présentés en face du type de substrat concerné avec le dinucléotide consensus, la position désaminée est soulignée et les contextes nucléotidiques préférentiels en position -2 et +1 sont précisés entre parenthèses. Y = base pyrimidique (C, T, U) ; R = base purique (A, G).

	Caractéristiques générales						Cibles de restriction (hors VIH-1)	Cas du VIH-1		
	Domaines catalytiques et groupes phylogénétiques des ZDD	Localisation cellulaire	Substrat	Motifs nucléotidiques cibles	Mode de déplacement sur le substrat	Oligomérisation (Dimères, tétramères, oligomères...)		Incorporation dans les virions et activité antivirale (Contexte physiologique)	Mécanismes d'action observés	Régulation par Vif
APOBEC3A	1 (Z1)	Noyau Cytoplasme	ADN sb ARN sb	5'-(Y)TC(A)-3' 5'-UC-3'	Glissement Saut	Non	AAV, HPV EV71, HCMV HTLV-1 HBV, LINE-1 Alu, IAP	Non	/	Relocalisation cytoplasmique
APOBEC3C	1 (Z2)	Noyau Cytoplasme	ADN sb	5'-(T)TC-3'	Difficultés de déplacement	Non	ZIKV HCoV-NL63 HPV, HSV-1 HTLV-1, HBV LINE-1, IAP	Non	/	Dégradation par le protéasome Inhibition de la transcription
APOBEC3H (haplotype II)	1 (Z3)	Noyau Cytoplasme	ADN sb ADN/ARN	5'-(Y)TC-3'	Glissement Saut Transfert intersegmental	Oui	HCoV-NL63 HTLV-1 HBV LINE-1	Oui	Hypermutation Inhibition de la rétrotranscription	Dégradation par le protéasome Inhibition de la transcription
APOBEC3B	2 (Z2-Z1)	Noyau	ADN sb	5'-(R)TC(A)-3'	Glissement Saut et/ou Transfert intersegmental	Oui	EBV, HTLV-1 HBV, LINE-1, Alu, IAP	Non	/	Relocalisation cytoplasmique
APOBEC3D	2 (Z2-Z2)	Cytoplasme	ADN sb	5'-(A)TC-3'	Inconnu(s)	Oui	EV71, HTLV-1 LINE-1	Oui	Hypermutation	Dégradation par le protéasome Inhibition de la transcription
APOBEC3F	2 (Z2-Z2)	Cytoplasme HMM (*P-bodies*, granules de stress...)	ADN sb	5'-(T)TC-3'	Saut	Oui	HCoV-NL63 EV71 HTLV-1, HBV LINE-1, IAP	Oui	Hypermutation Inhibition de la rétrotranscription	Dégradation par le protéasome Inhibition de la transcription Inhibition de l'encapsidation Inhibition traductionnelle
APOBEC3G	2 (Z2-Z1)	Cytoplasme HMM (*P-bodies*, granules de stress...)	ADN sb ARN sb	5'-(C)CC-3' 5'-(C)TC-3' 5'-CC-3'	Glissement Saut Transfert intersegmental	Oui	HCV, HPV, PV EV71, CA16 HTLV-1 HBV, LINE-1 Alu, IAP	Oui	Hypermutation Inhibition de la rétrotranscription	Dégradation par le protéasome Inhibition de la transcription Réduction de la phosphorylation Inhibition de l'encapsidation Inhibition traductionnelle

La structure tridimensionnelle des A3 humaines possédant un seul CD a été résolue (A3C, *figure 3A*), et la structure complète d'une A3G à double CD simienne (macaque rhésus) a été élucidée récemment (*figure 3B*) [44]. Les caractéristiques structurales des A3 et leurs implications dans les interactions avec leurs substrats et partenaires protéiques ont fait l'objet de revues récentes et ne seront pas détaillées ici [26, 30, 45].

Les ARNm d'A3 sont globalement exprimés dans les cellules hématopoïétiques. Leurs niveaux d'expression sont comparables entre lymphocytes T (LT) et B (LB) et moins élevé dans les monocytes, à l'exception d'A3A et d'A3B dont les niveaux d'expression sont respectivement prédominants dans les monocytes et les LB. Au sein des cellules hématopoïétiques, l'ARNm d'A3G est majoritairement exprimé [46, 47]. L'expression constitutive de l'ARNm d'A3G dans les cellules hématopoïétiques se traduit au niveau protéique [46]. Certains travaux indiquent que l'activation des $CD4^+$ ne module pas les niveaux d'expression des ARNm d'A3G et d'A3F [46], tandis que d'autres rapportent une stimulation de l'expression des ARNm de l'ensemble des A3, avec des effets plus marqués pour A3C, A3G et A3H [47]. L'IFNα ne module pas ou très faiblement les niveaux d'ARNm des A3 en LT [46, 47] tandis qu'il induit la transcription de ces gènes au sein des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) [47] indiquant qu'au moins un de ces autres types cellulaires est régulé par la chimiokine. Dans les macrophages et les cellules dendritiques, l'IFNα induit la transcription d'A3G, ce qui est reflété au niveau protéique [46]. Différents mécanismes de régulations de l'expression des A3 existent donc entre types cellulaires.

Activités des APOBEC3 en absence d'infection et autres propriétés

Désamination au cours de la réplication de l'ADN cellulaire

L'ADN en cours de réplication constitue la cible préférentielle de certaines A3 dans la cellule. Les A3 agissent majoritairement sur les cytosines non méthylées [48] même si A3A est capable de désaminer les 5-MeC presque aussi efficacement que les cytidines non méthylées [49]. Les mutations induites par les A3 sont dispersées sur le génome de manière non homogène [50, 51]. Elles peuvent se regrouper au niveau de régions couvrant quelques centaines de nucléotides à plusieurs mégabases. Ce phénomène, appelé *kataegis*, correspond à des mutations dans un contexte 5'-TC-3' et est observé dans de nombreux cancers [50-52]. Ces clusters de mutations sont associés à des cassures d'ADN double brin (db) et sont en général limités à un seul des deux brins d'ADN [50, 51, 53] bien que certains clusters présentent une permutation de brin, c'est-à-dire que les mutations sont présentes sur le brin positif en 5' du cluster alors qu'elles sont retrouvées sur le brin négatif en 3'du cluster [53, 54]. Chez *E. coli*, lorsque le CTD d'A3G est surexprimé et l'expression d'UNG (*Uracile N-Glycosylase*) abolie, un nombre plus élevé de cytosines mutées est observé sur le brin indirect (ou brin servant de matrice à une synthèse discontinue, à opposer au brin direct servant de matrice à une synthèse continue) suite à la réplication de l'ADN (*figure 4A, 4B*) [55]. En modèle levure A3A et A3B induisent la désamination du brin indirect lors de la réplication de l'ADN, confirmant que les A3 peuvent cibler les ADN sb formés à l'initiation de chaque brin d'Okazaki (*figure 4C, 4D*, panneaux de droite). Ce phénomène est également accentué en cas de stress réplicatif [56]. D'après Haradhvala *et al*. cette activité existe chez l'homme et la mutagenèse engendrée par les membres de la famille APOBEC s'effectue sur le brin indirect lors de la réplication de l'ADN dans le cas de cancers [57]. Les mutations sont au moins deux fois plus fréquentes sur le brin indirect que sur le brin direct durant la réplication de l'ADN. Les mutations regroupées en cluster sont plus associées aux cassures d'ADN db que les mutations non regroupées [48] ; l'activité des A3 est responsable de l'apparition de cassures au niveau de l'ADN génomique. Pour preuve, l'expression d'A3A est accompagnée de la phosphorylation du variant d'histone H2AX au niveau du résidu S139 (gH2AX), un marqueur de cassures db de l'ADN et l'un des premiers déclencheurs de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR ou *DNA Damage Response*). De plus, la surexpression d'A3A entraîne l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules d'ostéosarcome ou d'hépatome, suite à l'activation de *checkpoints* (points de contrôle) assurant à la fois l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (activation par ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*) et ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)). La désamination et les dommages de l'ADN induits par A3A sont augmentés lors de la réplication de l'ADN et l'apparition de gH2AX est plus importante dans les cellules en réplication que dans les cellules quiescentes. Le modèle proposé suggère que l'activité catalytique d'A3A au niveau des fourches de réplication à l'arrêt entraîne des cassures sur l'ADN sb, ce qui résulte en la dissociation des fourches et à des cassures db (*figure 4C, 4D* panneaux de gauche) [58].

Par ailleurs, dans un modèle de lignée cellulaire de leucémie myélogène aiguë (AML) exprimant A3A, l'inhibition de la kinase *checkpoint* ATR déclenche l'apoptose [59]. Au niveau des fourches de réplication de l'ADN, l'activité désaminase d'A3A induit la formation de sites abasiques suite à l'action d'UNG2, déclenchant l'activation d'ATR qui empêche l'apparition de cassures db. Ainsi, l'inhibition

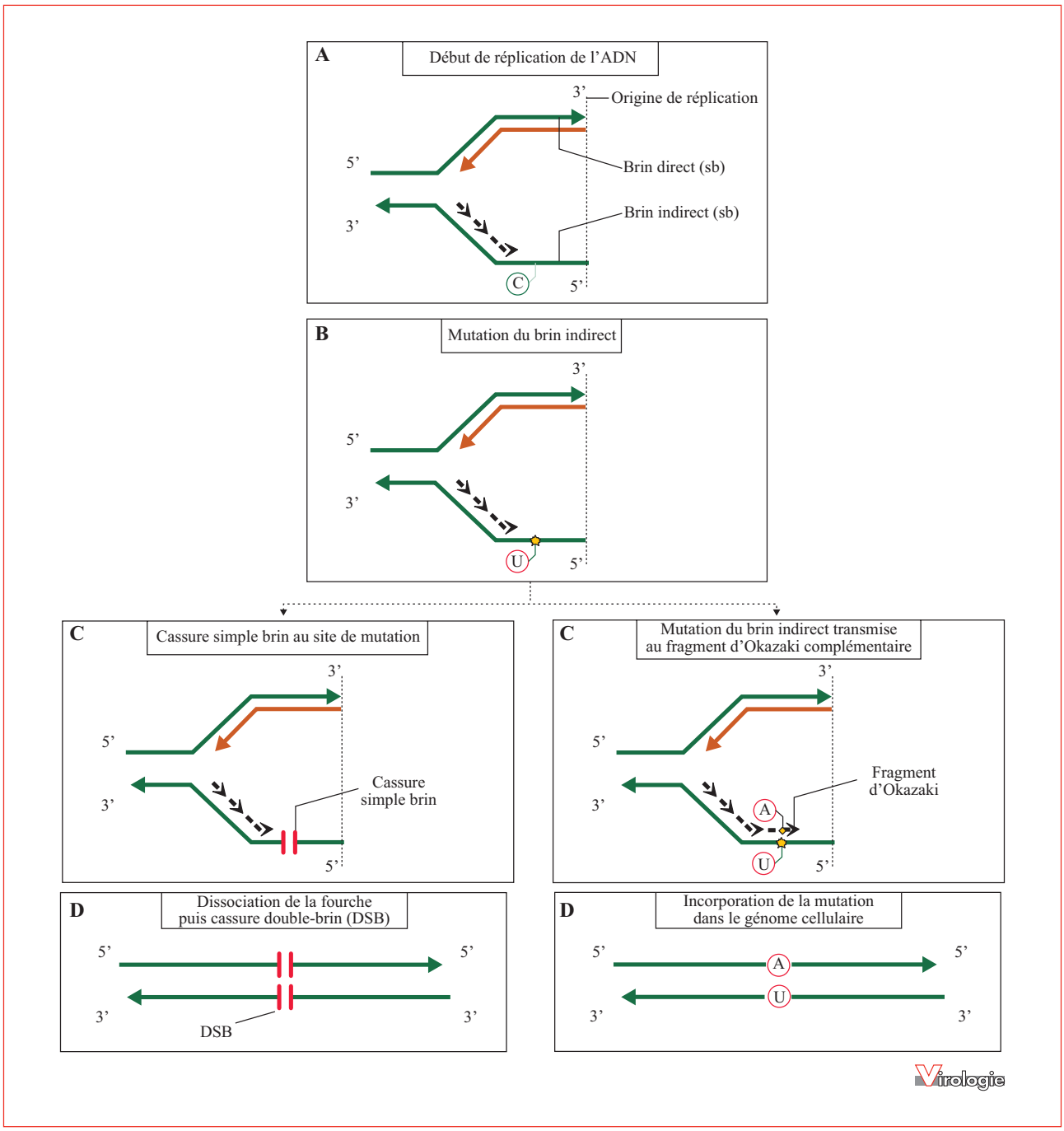


Figure 4. Activité des A3 lors de la réplication de l'ADN. A) Initiation du mécanisme de réplication de l'ADN génomique. B) Mutation de cytidine(s) en uridine(s) par activité enzymatique des A3 sur le brin indirect (simple brin) qui peut soit mener à (panneaux de gauche) C) une cassure simple brin du brin indirect au(x) lieu(x) de mutation(s) qui aboutit à D) la dissociation de la fourche de réplication puis à une cassure double brin, soit mener à (panneaux de droite) C) l'incorporation de mutation(s) au sein des fragments d'Okazaki puis D) dans le génome cellulaire à la fin du processus de réplication.

d'ATR dans des cellules d'ostéosarcome exprimant A3A résulte en l'accumulation de sites abasiques qui favorisent l'arrêt de la polymérase et l'exposition d'ADN sb substrats d'A3A. Cette boucle de rétroaction positive aboutit à un « cataclysme réplicatif », c'est-à-dire un stress réplicatif fatal caractérisé par l'apparition de centaines de cassures d'ADN db. A3B agirait de la même manière qu'A3A au niveau des fourches de réplication, étant donné que l'inhibition d'ATR dans des lignées à forte activité A3B endogène entraîne le même cataclysme réplicatif [60]. De plus, une forte expression d'A3B dans des cellules p53-déficientes aboutit à l'apparition d'un profil de mutations caractéristique du phénomène de *kataegis* mais également à une hypersensibilité pour des inhibiteurs de protéines impliquées dans le DDR, telle qu'ATR [61]. L'activité d'A3A et d'A3B présente donc un intérêt thérapeutique dans le cas de thérapies anti-cancéreuses ciblant ATR afin d'accélérer la mort des cellules malignes.

Désamination au cours de la réparation de l'ADN cellulaire

Chez la levure, l'expression d'A3A exerce une activité désaminase lors du BIR (*Break Induced Replication*), une voie de réparation des cassures db de l'ADN. La « bulle de migration » caractéristique du BIR permet une génération asynchrone des brins direct et indirect et donc une accumulation d'ADN sb substrats d'A3A. Les dommages à l'ADN dus à l'activité d'A3A sont fréquemment à l'origine de réarrangements chromosomiques lors du BIR [62].

A3B est capable de désaminer les fragments ADN sb génomiques impliqués dans la réparation des cassures de l'ADN générées par la technologie CRISPR-Cas9. En effet, la présence d'uracile dans l'ADN génomique sb généré durant la réparation d'une cassure sb liée aux mutants Cas9 D10A ou H840A peut aboutir à des insertions ou des délétions. Le mécanisme proposé est que l'uracile générée par A3B est reconnu puis converti en site abasique, à l'origine d'une cassure db au niveau du site de désamination. Cette cassure db permettrait l'apparition d'une insertion ou d'une délétion génomique lors de sa réparation [63].

Désamination au cours de la transcription

L'activité catalytique des APOBEC est également observée lors de la transcription. Chez la levure, une activité mutagène d'AID et d'A3G a été retrouvée au niveau des promoteurs de gènes activement transcrits. Les régions désaminées se trouvent directement en amont du site d'initiation de la transcription où l'assemblage du complexe de pré-initiation a lieu, entraînant l'ouverture de l'ADN et l'apparition de deux ADN sb [64]. L'activité désaminase d'A3B observée est transcription-dépendante et facilitée au niveau du brin indirect par la formation de *R-loops*, hybrides ARN-ADN résultant de l'hybridation des ARN néoformés avec leur matrice ADN sb lors de la transcription. Elle est plus importante au niveau des gènes d'ARNt qu'au niveau de gènes codant des protéines, et plus particulièrement au niveau du brin non transcrit de ces gènes [65].

Désamination d'une matrice ARN

Au-delà de l'activité désaminase d'ADN bien établie pour les A3, une activité d'édition des ARN par A3A et A3G a été recensée [31-33]. L'activité désaminase d'ARN d'A3A a été observée sur un grand nombre de transcrits dans des monocytes et certains macrophages. Cette activité est induite par l'IFN de type I et/ou par l'hypoxie et dépend du site catalytique fonctionnel d'A3A [31, 66]. L'activité désaminase d'ARN d'A3G a été observée principalement au sein des LT *natural killer* et dans une moindre mesure des LT $CD8^+$. L'activité d'A3G induite par un stress hypoxique permet de faciliter l'adaptation cellulaire à ce stress [33]. Les deux domaines désaminase d'A3G sont requis pour l'édition d'ARN [32]. À l'image de leurs préférences de désamination dans l'ADN, A3A et A3G désaminent préférentiellement les ARN respectivement sur des motifs dinucléotidiques 5'-U<u>C</u>-3' et 5'-C<u>C</u>-3' (*tableau 1*). L'édition d'ARN dépend aussi des structures secondaires de l'ARN, les motifs cibles étant retrouvés majoritairement dans les boucles de motifs tiges-boucles [67]. Ces éditions d'ARN surviennent dans des régions codantes de l'ARN et peuvent entraîner des mutations non-sens ou faux-sens. Si la désamination des ARN par A3G est ici liée à une réponse au stress, ce type d'édition dynamique en réponse à des facteurs environnementaux n'est pas totalement compris. Cette activité pourrait de plus être liée à des pathogenèses, au développement de cancers, ou constituer une nouvelle facette de l'activité antivirale de ces protéines.

Impact sur les cancers

Des liens de plus en plus étroits entre les A3 et les cancers ont été révélés ces dernières années.

Surexpression d'APOBEC et mutations signatures associées à des cancers

Une surexpression à des degrés variables d'A3 est en effet observée dans la majorité des cancers [68] et des mutations « signature » des APOBEC, plus particulièrement A1, A3A et/ou A3B, caractérisées par des transitions C→T et transversions C→G au niveau de trinucléotides 5'-T<u>C</u>N-3' (N pour n'importe quelle base) sont retrouvées dans 16/30 types de cancers testés [69]. La mutation signature de type substitution C→T et C→G dans des motifs 5'-T<u>C</u>A/T-3' est significativement retrouvée dans de nombreux cancers (vessie, col de l'utérus, sein, voies aérodigestives supé-

rieures et poumon) d'après l'analyse de 954 247 mutations issues de 2680 exomes [51]. A3A cible préférentiellement les séquences 5'-YTCA-3' (Y pour pyrimidine) et A3B les séquences 5'-RTCA-3' (R pour purine) [70].

Dans le cas d'A3A, un polymorphisme récurrent caractérisé par la délétion du gène *APOBEC3B* et la substitution de la 3'UTR d'A3A par celle d'A3B a été constaté [71]. Cet hybride A3A/B code une protéine identique à celle d'A3A et est retrouvé à un faible taux dans les populations africaines et européennes (respectivement 0,9 % et 6 %) et de manière plus importante dans les populations d'Asie de l'est et amérindiennes (respectivement 36,9 % et 57,7 %) et d'Océanie (92,9 %) [71]. Or, l'ARNm chimérique A3A/B est plus stable que l'ARNm d'A3A sauvage, d'où une quantité intracellulaire plus importante de la protéine et un risque accru de développement de cancer du sein et de cancer épithélial ovarien. A3B serait une source majeure de mutations dans le cancer du sein [52, 72, 73] et serait responsable, avec A3H, des mutations signatures des APOBEC dans le cas de cancer du sein et du poumon [74]. Un nombre plus important de mutations signatures serait associé à A3A (dans 14 types de cancers différents) plutôt qu'à A3B [70]. Dans les tumeurs, A3A exerce également son activité catalytique au niveau de motifs 5'-CAUC-3' dans des tiges boucles ARN présentant une boucle de 3, 4 ou 5 nucléotides et des tiges fortement appariées [75]. Plus précisément, la plus forte fréquence de mutation est observée lorsque le U du motif 5'-UC-3' se situe au centre de la boucle. Néanmoins, cette activité ne représente en moyenne qu'une proportion de quelques pourcents de la population d'un ARN édité, bien que cette proportion puisse être supérieure à 30 % dans certains cas [75]. Par ailleurs, A3A est la seule A3 dont l'expression de l'ARNm est corrélée aux mutations signatures des APOBEC dans un panel de plusieurs centaines de banques de données de séquençage haut-débit issues de tumeurs primaires du sein, du col de l'utérus et des voies aérodigestives supérieures, tandis que les expressions d'A3A et A3B sont toutes deux corrélées aux mutations signatures APOBEC dans le cas du cancer de la vessie [76]. De plus, le stade d'avancement du cancer du sein, l'atteinte ganglionnaire et le grade histologique sont associés à une augmentation de l'expression de l'ARNm d'A3A, tandis que l'âge du patient et une forte expression du facteur de prolifération ki-67 sont associés à l'augmentation de l'expression de l'ARNm d'A3A et d'A3B [77]. En outre, plusieurs A3 (A3A, A3C, A3D et A3H) voient leur expression augmentée après activation chimique (Nutlin-3) du régulateur transcriptionnel et suppresseur de tumeur p53, tandis qu'A3B est réprimée indirectement par p53 *via* le recrutement d'un complexe répresseur au niveau de son promoteur sauf dans le cas de mutants de p53 associés à divers cancers [78, 79]. L'expression d'A3B est accrue dans le cas de carcinome hépatocellulaire (HCC) et bien que l'influence d'A3B sur les mutations génomiques observées dans le cas d'HCC ne soit pas clairement établie [80, 81], il a été démontré qu'une activité désaminase-indépendante d'A3B favorise sa progression [80], en induisant le recrutement de TAM (*Tumor Associated Macrophages*) et de MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) [81]. D'après Wu *et al*. A3G favorise la prolifération cancéreuse en procurant une résistance face à l'anoïkose, un type de mort cellulaire programmée basée sur les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire [82].

Surexpression induite par HPV et cancer

Par ailleurs, l'expression de l'ARNm d'A3B et son activité enzymatique sont augmentées en cas d'infection par un papillomavirus humain (HPV) à haut risque cancérigène (HPV16/18) [83, 84]. Au sein du promoteur d'A3B, la région régulée par la protéine E6 d'HPV16 contient trois régions cibles de la famille des facteurs de transcription TEAD (*TEA Domain family member*). TEAD4 étant suffisant pour induire l'expression d'A3B induite par E6, la dégradation de p53 par E6 serait nécessaire mais pas suffisante pour augmenter l'expression de TEAD4 et ainsi celle d'A3B [85]. A3B jouerait donc un rôle central dans la carcinogenèse engendrée par une infection HPV à haut risque cancérigène. De plus la stabilisation d'A3A par la protéine E7 du HPV favoriserait la progression de cancers associés à HPV [86].

Effets cytotoxiques d'APOBEC en présence d'antitumoraux et APOBEC comme marqueur pronostic

A3B entraîne une cytotoxicité induite par les protéines requises pour le mécanisme de réparation de l'ADN MMR (*MisMatch Repair*) et par p53 dans des cellules cancéreuses pour lesquelles l'activité d'UNG2 est abolie [87]. Néanmoins, un mécanisme nécessitant l'activité d'UNG2 permet à A3B d'accroître la toxicité du cisplatine, un composé utilisé en chimiothérapie générant des dégâts au niveau de l'ADN, dans le cas de CCOC (*Clear-Cell Ovarian Carcinoma*) faisant d'A3B un marqueur favorable dans ce type de cancer [88].

Par ailleurs, A3B est un marqueur de pronostic défavorable dans le cas de cancers du sein ER (*Estrogen Receptor*)-positifs [89] où l'expression d'A3B est augmentée après traitement avec du cisplatine ou de l'œstradiol [90]. A3B s'associe avec l'ER α et désamine les cytidines au niveau des régions liées par ce dernier, entraînant le recrutement de différents facteurs comme UNG2 afin de générer des cassures db au niveau de l'ADN. La modification et le remodelage de la chromatine au niveau des régions régulatrices des gènes ciblés par l'ER favorisent ainsi leur expression [91].

L'expression d'A3C est associée à un pronostic favorable dans le cancer du sein [92] et son activité désaminase lui permet d'accentuer la réponse cytotoxique en présence d'artésunate, un générateur de dérivés réactifs de l'oxygène, dans une lignée cellulaire de carcinome pulmonaire [93]. Le faible nombre de travaux concernant A3C, A3F et A3H et leur impact sur le développement des cancers ne permet pas de conclure de manière définitive sur leur rôle global dans la progression de ces pathologies. Une seule étude a constaté un pronostic défavorable concernant la survie sans récidive de patients atteints d'HCC lié à HBV et exprimant fortement A3F [94]. Dans le cas d'A3G, sa forte expression chez des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B et traités par chimiothérapie est associée à un pronostic défavorable [95]. A3G accroît la radiorésistance des cellules de lymphomes et de cellules souches de tumeurs gliales. A3G s'accumule dans le noyau après exposition des cellules à des radiations ionisantes, permettant son recrutement au niveau de complexes de réparation de cassures db de l'ADN et son activité catalytique afin de faciliter la réparation de l'ADN [96, 97]. De plus, A3G est surexprimée dans le cas de cellules cancéreuses pancréatiques [82]. L'expression d'A3G est toutefois corrélée à un pronostic favorable dans le cas de cancer ovarien séreux de haut grade et constituerait un biomarqueur de LT infiltrant les tumeurs [98], suggérant une possible activité anticancéreuse d'A3G.

En conclusion, les A3 sont des agents mutagènes majeurs au cours du cycle cellulaire pouvant agir lors de la réplication de l'ADN et la réparation de ses dommages. Ces événements peuvent aboutir à l'apparition de cancer, les activités principales des A3 lors de ce processus étant assurées par A3A et A3B, bien qu'A3G pourrait jouer un rôle essentiel sur l'évolution de certains cancers.

Propriétés antivirales des APOBEC3 : le cas du VIH-1

En cas d'infection par le VIH-1, les cellules ciblées expriment des facteurs de restriction dont les A3 font partie. Ces facteurs ont pour rôle de diminuer la réplication virale en interférant avec différentes étapes du cycle réplicatif. Les A3 sont encapsidées dans les particules virales néoformées et exercent leurs activités antivirales lors du cycle suivant. Elles sont capables d'inhiber la réplication du VIH grâce à leur activité désaminase [99] et à des activités complémentaires. Si la protéine Vif (*Virion Infectivity Factor*) du VIH-1 contrecarre les A3, des hypermutations signatures de l'activité désaminase des A3 sont cependant retrouvées dans des génomes proviraux intégrés de patients séropositifs [100, 101]. L'encapsidation d'un seul dimère d'A3G par particule virale permet d'inactiver une fraction significative de celles-ci [99]. Ainsi, en cas de neutralisation incomplète des A3 par Vif, et donc d'un reliquat d'A3 encapsidée dans les virions, une restriction de la réplication virale peut subsister. L'efficacité de Vif à neutraliser les différentes A3 fluctue selon la souche virale ou selon les variants de Vif. Par exemple, les protéines Vif de certains isolats de sous-type B (92TH026, AD.MDR01 et 93TH305) sont incapables de neutraliser efficacement l'haplotype II d'A3H (A3H hapII) [102].

Si la plupart des A3 ont expérimentalement un effet anti-VIH-1 dans la lignée cellulaire HEK293T en cas d'expression ectopique, dans un contexte plus physiologique (lignée lymphoïde SupT1 et cellules primaires LT $CD4^+$, macrophages), seules A3D, F, G et H exercent une activité de restriction contre le VIH [37]. L'activité antivirale des A3 varie selon le membre de la famille, l'allèle du membre, voire l'isoforme issue d'un épissage alternatif. A3G a la plus forte activité antivirale [103]. Différents variants de ces quatre gènes d'*APOBEC3* existent au sein de la population humaine. A3H est le cas le plus notable, avec sept haplotypes majeurs (I à VII), et quatre variants d'épissage [104], mais seuls les haplotypes II, V et VII exercent une activité anti-VIH-1. Dans cette revue, les effets d'A3H évoqués ne concerneront qu'A3H hapII, qui possède la plus forte activité inhibitrice [105]. Récemment, quatre variants d'A3D provenant d'épissage alternatif ont également été identifiés. Bien qu'ils présentent des formes tronquées à un (A3Dv2, v6 et v7) ou deux (A3Dv1) CD et des localisations cellulaires différentes (cytoplasme et noyau), ces variants exercent une activité désaminase générant des transitions C/G > T/A au sein de l'ADN génomique du VIH-1 [106].

Activités antivirales dépendantes de l'activité désaminase

Effets de la désamination

Les A3 ont majoritairement pour substrat l'ADN sb. Elles contrecarrent l'infection du VIH-1 en ciblant son ADN sb de polarité négative, premier brin synthétisé lors de la rétrotranscription de l'ARN génomique (ARNg) en ADN viral db. Plus spécifiquement, la rétrotranscription est assurée par la rétrotranscriptase (RT) du virus qui possède aussi une activité RNase H. Cette endonucléase clive de manière concomitante l'ARN hybridé à l'ADN nouvellement synthétisé, laissant ainsi libre accès aux A3 pour catalyser la désamination des cytidines ciblées en uridines sur l'ADN (-) sb (*figure 2B*). Ensuite, lors de la synthèse du brin d'ADN (+) par la RT, les uridines sont utilisées comme matrice, entraînant l'apparition des mutations dites « G vers A » sur le brin codant du virus [36]. Si un nombre suffisant de mutations est généré, l'ADN proviral résultant ne permettra pas

une expression efficace du virus ; le virus est alors défectif et l'ADN est dit hypermuté.

Les mutations entraînées par les A3 dans les régions codantes peuvent induire des changements d'acides aminés au sein des protéines (mutation faux-sens). Les A3 peuvent de plus induire des codons stop (mutation non-sens) en éditant le codon tryptophane 5'-TGG-3'. La désamination par A3G des sites 5'-CCA-3' ou 5'-C CCA-3' dans l'ADN viral de polarité (-) aboutit respectivement à 5'-TAG-3' ou 5'-TGA G-3' dans l'ADN de polarité (+). A3D, A3F et A3H induisent l'apparition de codons stop en ciblant les codons tryptophane dans le contexte nucléotidique suivant : 5'-TGG A-3' (désamination de 5'-T CCA-3' dans l'ADN viral de polarité (-)) [107]. Dans les deux cas, les protéines peuvent être inactivées par ces mutations. Ara *et al.* ont étudié les mutations induites par A3G et A3F sur le gène de la protéase du VIH. Pour un même nombre de mutations, A3G inactive la protéase plus fréquemment qu'A3F. Il apparaît que les mutations causées par A3G sur le motif 5'-CCC-3' entraînent plus régulièrement des mutations non-conservatrices inactivantes que les mutations d'A3F sur le motif 5'-TTC-3'. La protéase présente une plus grande flexibilité face aux mutations induites par A3F, les mutations non-conservatrices entraînées n'inactivant pas forcément la protéine [108, 109]. A3G possède donc un potentiel inactivateur plus important qu'A3F, notamment grâce à son motif cible. Les A3 peuvent aussi affecter les régions non codantes constituant des éléments régulateurs essentiels au cycle viral. Notamment, la mutation du motif TAR (*Trans-Activation Response element*) empêche la synthèse efficace de l'ARNg. Sa transcription dépend de la liaison de la protéine Tat avec le complexe transcriptionnel (CDK9 et ARN polymérase II) à TAR, motif présent à l'extrémité 5'des transcrits. Le nombre réduit de génomes produit limite ainsi l'évolution virale [110].

Ces différentes mutations abolissent l'effet des éléments régulateurs ou des protéines virales, ce qui aboutit à l'inhibition ou à l'avortement du cycle réplicatif. Face à ces mutations, un processus de sélection purifiante est observé : les ADN viraux intégrés contiennent plus de mutations que les ARN viraux cellulaires, qui en contiennent eux-mêmes plus que les ARN viraux encapsidés. Les mutations peuvent affecter la transcription de l'ARN viral, puis son métabolisme tel que sa stabilité, sa capacité à être traduit, ou encapsidé, ce qui explique la diminution de la proportion des ARN viraux mutés face à la proportion des provirus mutés [111].

En plus de l'induction de mutations, il a été suggéré que l'activité désaminase des A3 entraîne la dégradation des ADN viraux encore non intégrés *via* la voie de réparation de l'ADN par excision de base (BER ou *Base Excision Repair*) [112]. Les bases endommagées par A3G peuvent en effet être excisées par l'UNG, générant des sites abasiques reconnus par des endonucléases apuriniques/apyrimidiques (APE1 ou APE2) qui clivent l'ADN. L'implication du BER dans la dégradation des ADN viraux est cependant largement contestée [113-115]. L'activité désaminase d'A3G permet d'autre part à la protéine d'interférer avec le clivage de l'ARNt^{lys3}, aboutissant à des ADN complémentaires (ADNc) viraux munis d'extrémités 3'aberrantes après rétrotranscription, perturbant ainsi leur intégration dans le génome cellulaire [114].

Déplacement des A3 sur les acides nucléiques viraux

Pour trouver leurs motifs cibles au sein de l'ADN sb, les A3 n'effectuent pas de déplacement actif et sont soumises à la diffusion facilitée. Le déplacement des enzymes est donc régi par les mouvements browniens en partie canalisés par des interactions électrostatiques entre l'enzyme et son substrat [116]. Les résidus chargés positivement des A3 sont en effet impliqués dans leur mouvement en interagissant avec les régions chargées négativement de l'ADN. Trois types de mouvement sont observés : (i) L'enzyme peut glisser le long du squelette phosphate de l'ADN, à la recherche de son motif cible, ce que l'on nomme « glissement » ou *sliding* (*figure 5A*). Ce type de mouvement sur un nombre limité de nucléotides (< 20) est local, mais est essentiel pour que l'enzyme trouve et catalyse la désamination des cytosines cibles. Ce glissement étant passif, il s'effectue de manière bidirectionnelle. Pour A3G, la désamination survient cependant de manière préférentielle lorsque l'enzyme rencontre son motif cible 5'-CCC-3' dans le sens 3'-5' [117] ; (ii) Des mouvements dans les trois dimensions permettent aux enzymes de se déplacer à plus longue distance sur une molécule d'ADN. Il y a « saut » ou *jumping*, où les enzymes s'associent et se dissocient successivement à l'ADN sans diffuser dans le milieu environnant (*figure 5B*) ; (iii) Enfin, un dernier mode de déplacement est le transfert inter-segmental, où une enzyme ayant deux domaines de liaison à l'ADN (ou un multimère d'enzymes n'ayant qu'un domaine de liaison) va se lier simultanément à deux régions différentes d'un brin d'ADN (*figure 5C*). Un des domaines se dissocie ensuite de l'ADN et permet le déplacement. Un dimère procédant ainsi pourrait se déplacer sous forme dimérique ou se dissocier (*figure 5C*, gauche et droite respectivement). Ces trois types de mouvement ne sont pas exclusifs entre eux, et permettent aux enzymes de désaminer différentes cytosines au sein d'une même molécule d'ADN. A3G se déplace localement par *sliding*, par *jumping* [108, 117] et dans une moindre mesure par transfert inter-segmental [118]. Ces différents modes de déplacement lui permettent de rechercher ses motifs cibles à la fois localement et à longue distance. Cette combinaison et l'équilibre entre ces modes de déplacement semblent être

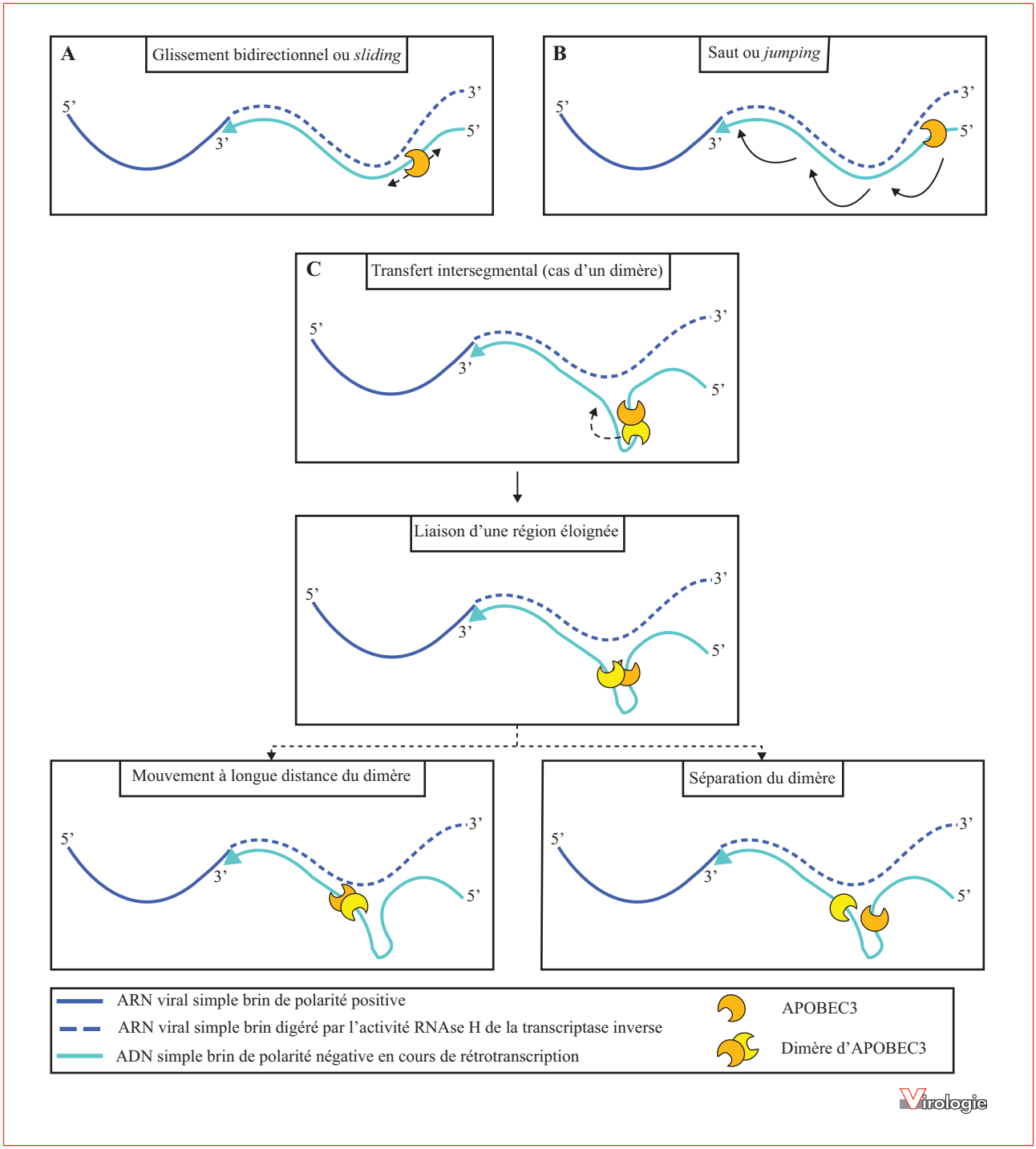


Figure 5. Modes de déplacement des A3 sur un ADN rétroviral en cours de rétrotranscription. La matrice virale ARN est représentée en bleu foncé, l'ADN viral néo-synthétisé est représenté en bleu clair avec leurs extrémités 5' et 3' annotées. Les A3 peuvent se déplacer de différentes manières sur leur substrat : A) par un glissement bidirectionnel sur le substrat ADN en cours de synthèse ; B) par un saut sur des régions éloignées du substrat ADN en cours de synthèse ; C) par transfert intersegmental d'un dimère d'A3 (ou d'une A3 à deux domaines ZDD) permettant le mouvement du dimère, ou d'une des A3 constituant le dimère, sur une région éloignée du substrat ADN en cours de synthèse.

un critère important pour la restriction du virus. En effet, si A3G peut efficacement localiser les cytosines et les désaminer, A3F n'est capable de se déplacer que par *jumping*, ce qui est corrélé avec un taux de mutation réduit [108]. Cette différence pourrait en partie expliquer la plus grande efficacité d'A3G à réduire l'infectiosité d'un virus VIH-1 ΔVif en cycle unique par rapport à A3F. A3H se déplace localement par *sliding*, à distance par transfert intersegmental et dans une moindre mesure par *jumping*. Le *sliding* et le transfert intersegmental sont dépendants de l'efficacité de dimérisation de cette A3 à simple CD [119].

Si les mouvements à distance permettent aux enzymes d'élargir leur zone d'action sur le brin d'ADN, ils sont aussi nécessaires pour franchir les duplexes ARN/ADN subsistant après clivage par la RNase H qui ne peuvent pas être franchis par *sliding*. Au cours de la rétrotranscription, les A3 n'ont accès à l'ADN sb que durant un temps limité. Les enzymes doivent ainsi agir efficacement, on parle de processivité pour la capacité des A3 à détecter et désaminer plusieurs cytidines cibles en une seule rencontre entre le substrat et l'enzyme. Pour A3G et A3F, le NTD est responsable de la processivité de l'enzyme [108]. La fréquence des mutations au sein des ADN viraux suit de plus un gradient dépendant de la durée où le brin d'ADN (-) reste sous forme sb lors de la rétrotranscription [120]. Les régions polypurines (PPT) empêchent néanmoins l'action d'A3G et la PPT centrale offre une protection contre l'hypermutation des nucléotides en aval [120, 121].

Contrairement à A3F et A3G qui possèdent deux domaines, l'un liant l'ARN ou l'ADN sb et l'autre exerçant l'activité catalytique, A3H ne contient qu'un seul domaine avec cette double propriété. A3H présente une région fortement basique qui permet une liaison peu discriminante avec différents acides nucléiques. Cette capacité lui confère un avantage évolutif certain car cela lui permet d'être encapsidée et d'avoir des substrats variés. En effet, contrairement à A3G et A3F, A3H est capable de lier et de désaminer l'ADN d'un hétéroduplex ADN/ARN, substrat que l'on retrouve au cours de la rétrotranscription, suggérant que certaines fonctions antivirales sont non redondantes entre les différents facteurs de restriction [39].

Concernant les autres A3, A3A présente une capacité limitée de *sliding* et *jumping* [122], A3B peut se déplacer par *sliding*, *jumping* et/ou transfert intersegmental [123] et A3C présente des difficultés de déplacement [124].

Synergie entre A3 pour l'activité antivirale

Différentes A3 peuvent être co-encapsidées et exercer leur activité désaminase de manière cumulative. Ces événements ont été observés en système cellulaire et le séquençage de provirus intégrés dans des PBMC de personnes infectées étayent la réalité de ce type d'événements *in vivo* [38]. En plus d'effets cumulatifs, les A3 semblent aussi avoir des effets synergiques dans la restriction. Ainsi, l'activité désaminase d'A3H et d'A3F est augmentée en cas de co-encapsidation avec A3G [38]. A3F semble protégée par A3G d'une dégradation par Vif, lui permettant ainsi d'être plus efficacement encapsidée qu'en absence d'A3G [125]. De plus, A3G et A3F peuvent former des hétéro-oligomères ayant des propriétés distinctes des enzymes individuelles. Le complexe A3G/A3F permet d'une part un *scanning* ou « balayage » processif de l'ADN, avec une activité désaminase augmentée, et d'autre part, réduit efficacement l'activité de la RT de par sa forte affinité pour l'ADN, donnant plus de temps au complexe A3 pour désaminer son substrat [109].

Actions antivirales indépendantes de l'activité désaminase

En plus de l'inactivation des provirus par hypermutation dans les régions codantes, de nombreux travaux ont mis en évidence une inhibition de la synthèse des ADN viraux au cours de la rétrotranscription en présence d'A3G, aboutissant à une diminution de l'infectiosité virale [114, 126-131]. L'importance de ce mécanisme d'action a été confirmée dans un contexte physiologique en LT $CD4^+$ exprimant des niveaux endogènes d'A3 [132]. Certaines études attribuent partiellement [128, 129] ou totalement [114] cette inhibition de la synthèse d'ADNc à l'activité désaminase d'A3G. Cependant, ce phénomène dépend aussi d'actions désaminase-indépendantes d'A3G, qui sont alors complémentaires de son activité mutagène. En effet, des mutants catalytiquement inactifs d'A3G conservent une activité antivirale significative *via* cette inhibition de l'accumulation des ADNc [127-129]. Cette activité antivirale désaminase-indépendante est aussi observée pour A3F [128, 133]. A3F diminue l'efficacité de la synthèse des ADNc, notamment *via* l'inhibition du second transfert de brin au cours de la rétrotranscription, puis inhibe l'étape de maturation en 3' de l'ADN viral, indispensable à l'intégration des provirus formés. L'intégration des ADNc viraux s'en trouve inhibée. Ainsi, A3F possède une activité antivirale désaminase-dépendante moins forte qu'A3G mais une activité désaminase-indépendante plus importante, et réduit l'infectiosité virale principalement par cette dernière [133]. L'inhibition de la synthèse des ADNc est aussi observée en présence d'A3H, également par un mécanisme indépendant de son activité désaminase [39].

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer l'inhibition de la synthèse des ADNc viraux par A3G, basés sur une action directe ou indirecte d'A3G sur la RT.

Action indirecte des A3 sur la rétrotranscriptase, modèle *roadblock*

Le premier modèle, dit « *roadblock* » ou modèle « barrage » suggère qu'A3G impose une gêne stérique et fasse obstacle à la polymérase. Le facteur de restriction présente une affinité plus forte que la RT pour les acides nucléiques viraux, ce qui bloquerait physiquement cette dernière et entraînerait son décrochage de la matrice. *In vitro*, A3G inhibe toutes les réactions d'élongation de l'ADN viral catalysées par la RT [127]. L'hypothèse d'un *roadblock* renforcé ou induit par la multimérisation d'A3G (dimères, tétramères, ou supérieurs) est aussi proposée. La capacité d'A3G à multimériser repose principalement sur son domaine NTD fortement basique [44, 134], bien que le CTD puisse être impliqué [135]. Le NTD constitue la surface primaire de dimérisation d'A3G et le CTD une surface secondaire, permettant la formation des oligomères plus conséquents d'A3G après dimérisation *via* le NTD [136]. La stabilité de la liaison d'A3G à l'ADN sb est augmentée lorsque celle-ci est sous forme dimérique ou multimérique, contrairement à la forme monomérique qui s'associe et se dissocie très rapidement de l'ADN. Cette durée de liaison accrue diminue la mobilité de l'enzyme et fait ainsi chuter son activité enzymatique. En effet, l'essentiel de l'activité catalytique de l'enzyme est observé lorsque celle-ci reste monomérique. Un modèle où les A3G monomériques effectuent des cycles répétés de recherche (*sliding*, *jumping*) et désamination des cytidines cibles, assurant une mutation efficace de l'ADN viral a donc été proposé. Les A3G dimériseraient ensuite lentement, liant stablement l'ADN et exerçant leur action *roadblock*. Quelques dimères pourraient aussi bloquer la RT et permettre une désamination plus efficace par les A3G monomériques restantes [136]. D'une part, le nombre d'A3 au sein des particules virales étant faible (7 +/-4 en absence de Vif) [137], la formation de ces multimères *in viro* et leur capacité à inhiber la RT restent incertaines. D'autre part, cette proposition semble aller à l'encontre de l'observation qu'A3G multimérise *in cellula* afin d'être encapsidée et d'exercer son activité antivirale [134].

Dans la même perspective d'un mécanisme *roadblock*, il est proposé que la plus forte activité désaminase-indépendante d'A3F soit due à sa capacité à lier l'ADN sb avec une plus grande affinité qu'A3G, et à former des multimères plus stables [108, 109]. A3H pourrait inhiber la liaison de la RT à l'ARNt^{lys3} et la synthèse d'ADNc par gêne stérique, la protéine pouvant lier le duplex d'ARN formé entre l'ARNg et l'ARNt ^{lys3} [39]. De même, A3F augmente *in vitro* la fréquence du saut de brin de la RT grâce à sa forte affinité de liaison aux acides nucléiques et/ou à sa capacité à former des multimètres stables. A3G diminue cette fréquence, potentiellement *via* une interaction directe avec la RT. A3H n'a pas d'impact sur ce phénomène. Une dérégulation de la fréquence de saut de brin pourrait être délétère et entraîner des insertions ou délétions dans l'ADN rétrotranscrit, ou au contraire promouvoir l'évolution virale [138].

Action directe d'A3G sur la rétrotranscriptase

Divers travaux sur l'accumulation des ADNc viraux au cours de la rétrotranscription montrent une polarité dans l'inhibition de la synthèse des ADNc : l'accumulation des ADNc précoces est moins inhibée que l'accumulation des ADNc tardifs [129, 132], et il ne semble pas y avoir de point abrupt de terminaison de la rétrotranscription. Pour que le modèle *roadblock* soit compatible avec ces observations, les molécules d'A3G doivent pouvoir s'associer n'importe où sur les acides nucléiques viraux, entraînant une distribution homogène des A3G sur ces molécules au sein d'une population virale et ainsi un blocage aléatoire de la rétrotranscription [129]. Si le modèle *roadblock* n'est pas incompatible avec ce gradient d'inhibition de la synthèse des ADNc viraux en fonction du temps, un second modèle a émergé face à ces observations. Celui-ci propose qu'A3G interagisse directement avec la RT, inhibant ainsi sa processivité et entraînant une diminution globale de la synthèse des ADNc.

Il existe notamment une interaction directe entre A3G et la RT, dépendant des résidus 65 à 132 d'A3G (*figure 2*). Lorsque l'interaction entre les deux protéines est perturbée, l'action inhibitrice d'A3G sur la synthèse des ADNc est amoindrie, tandis que la réplication virale est légèrement augmentée [130]. Cette interaction directe entre les protéines a été confirmée *in vitro* et *in cellula*, impliquant deux domaines d'A3G, les résidus 30 à 42 et les résidus 65 à 132 (*figure 2*) [115]. Le résidu L35 est important car sa substitution abolit partiellement l'interaction d'A3G avec la RT. Ce mutant conserve une activité désaminase similaire à A3G sauvage, tandis que son activité antivirale est diminuée et qu'une hausse de la quantité d'ADNc viral synthétisé au cours de la rétrotranscription est observée [115]. Cette étude souligne l'importance des différents mécanismes d'action d'A3G dans la restriction virale et étaye une action inhibitrice de la production des ADNc viraux *via* une interaction directe d'A3G avec la RT.

Localisation des A3 et rôles dans la voie des microARN

Toutes les A3 peuvent avoir une localisation cytoplasmique, à l'exception d'A3B. A3A, C et H sont également retrouvées dans le noyau [37, 74, 139-141]. Pour A3G, certains résidus du NTD constituent un puissant signal de rétention de la protéine dans le cytoplasme [141, 142]. A3F et A3G sont retrouvées de manière diffuse dans le cytoplasme et également dans des *foci* au sein de comple-

xes ribonucléoprotéiques (RNP) tels que les *Processing bodies* (*P-bodies*) [139, 143, 144] et les granules de stress [143-145]. Ces complexes, formés de protéines et d'ARN cellulaires, jouent des rôles clés dans le métabolisme des ARNm particulièrement en cas de stress en les dégradant (*P-bodies*) ou en les stockant (*P-bodies* et granules de stress) dans l'attente de conditions cellulaires plus propices à leur traduction [146-150]. La majorité des interactions entre A3F/A3G et les protéines de ces RNP sont indirectes et dépendent d'interactions avec des ARNm ou des ARN non codants tels que les ARN Y et 7SL. Ces RNP contiennent également les ARNm d'A3G ou d'A3F, ainsi que les ARN du rétroélément Alu dont la rétrotransposition est inhibée lorsqu'il se retrouve séquestré dans ces RNP par les A3 [144, 151]. Des expériences de chasse après marquage ponctuel en lignée HEK 293T montrent un assemblage rapide (< 30 min) des A3G néosynthétisées en complexes de hauts poids moléculaires (HMM, *High Molecular Mass*) [152]. Ces HMM, qui peuvent correspondre aux différents RNP, sont des complexes de plus de 700 kDa dont la formation est dépendante de l'ARN et contenant de nombreuses protéines A3G [117, 152, 153]. Ainsi, les résidus du ZDD N-terminal et les acides aminés W94 et W127, impliqués dans la liaison d'A3G à l'ARN (*figure 2*), sont importants pour la formation de ces complexes [154, 155]. L'activité désaminase d'A3G est inhibée dans les complexes HMM mais restaurée après traitement par des RNases [117, 153]. A3F est également capable de former des complexes HMM [153]. Ces complexes moduleraient les activités antivirales d'A3G et d'A3F [153]. L'association naturelle d'A3F/A3G avec ces complexes cytoplasmiques et leur redistribution au sein des RNP lors de variations des conditions intracellulaires soulèvent des questions quant à l'action de ces A3 sur le métabolisme des ARN cellulaires.

A3B, A3C, A3G et A3F contrecarrent l'effet inhibiteur de plusieurs microARN (mir-10b, mir-16, mir-25, let-7a), le NTD d'A3G semble être impliqué dans cet effet [156]. La présence d'A3G diminue l'association des ARN cibles aux *P-bodies* d'une part, et augmente leur association aux polysomes d'autre part [156]. De plus, A3G interagit avec différentes protéines participant à la voie de dégradation des ARN impliquant les microARN, notamment Mov10 (*Moloney leukemia virus 10 protein*), Ago1 (*Argonaute1*), Ago2 (*Argonaute2*), GW182 (*Glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) et PABP1 (*Polyadenylate-binding protein 1*) [143, 145, 151, 156]. A3G inhibe l'interaction entre Mov10 et Ago2, impactant directement l'assemblage et/ou l'activité du complexe miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) [157]. En effet, A3G entre en compétition avec Ago2 pour son association à Mov10, l'association d'A3G à Mov10 étant permise en grande majorité par la liaison d'A3G à l'ARN 7SL [157]. L'implication de la liaison d'A3G à l'ARN dans l'interaction avec les autres partenaires d'A3G est controversée, bien que la présence d'ARN soit nécessaire à la formation des HMM contenant A3G et ces protéines [143, 145, 151, 156]. Cependant, A3G peut favoriser la voie des microARN en réduisant l'inhibition exercée par DND1 (*Dead end protein homolog 1*) sur cette dernière [158].

Mécanismes d'incorporation dans les virions

Afin de pouvoir agir au cours de la rétrotranscription, les A3 doivent d'abord être encapsidées au sein des particules virales. Si les protéines A3G résident essentiellement dans des complexes HMM, les A3G encapsidées semblent ne provenir que de protéines néosynthétisées [152, 159]. Bien que le substrat des A3 soit majoritairement l'ADN, ces protéines peuvent aussi lier l'ARN. L'encapsidation des A3 dépend de cette capacité de liaison aux ARN [23, 134, 160-162] et dépend également de leur capacité d'oligomérisation [134]. Il existe une corrélation entre la capacité des A3 à multimériser *in cellula* et leur activité restrictive : A3D/F/G/H ont la capacité d'homo-oligomériser et inhibent le VIH-1 en LT, à l'inverse d'A3A et A3C [163]. Bien qu'A3B ne soit pas encapsidée, elle est capable d'homo-oligomériser [123]. Pour A3G, de nombreux résidus du NTD sont non seulement essentiels pour l'interaction avec l'ARN, mais également pour la multimérisation d'A3G, notamment I26, S28, W94, les résidus Y124 à W127 et les acides aminés basiques R24, R30, et R122 (*figure 2*) [134, 160-162, 164]. La région chargée positivement constituée à l'interface de deux NTD d'A3G au sein d'un dimère accroît l'affinité de ce dimère pour l'ARN [134, 155, 161], comme étayé par les analyses structurales d'une A3G provenant de macaque rhésus (rA3G) (*figure 3B*) [44], soulignant l'interdépendance fonctionnelle entre la dimérisation et l'association à l'ARN. Les résidus du ZDD1 (H65, C97 et C100) ainsi que les résidus F70 et Y91 du NTD sont aussi impliqués dans la liaison d'A3G à l'ARN, son homo-oligomérisation et son encapsidation (*figure 2*) [23]. À noter que l'activité enzymatique d'A3G serait inhibée par sa liaison à l'ARN [152]. Une revue récente décrit l'interaction d'A3G avec les ARN et les conséquences de ces interactions [25]. L'encapsidation d'A3F dépend des acides aminés de ses deux ZDD (H65, E67, C96, C99, H249, E251, C280, C283) [128], du résidu W126 (équivalent du W127 d'A3G) et d'un segment de 15 résidus de la partie C-terminale de la protéine (T300-Y314) (*figure 2*) [165].

Le précurseur Gag du VIH-1, et plus particulièrement son domaine nucléocapside (NC), sont aussi essentiels à l'encapsidation d'A3G [166], l'interaction NC/A3G étant elle-même dépendante de certains ARN [167, 168]. En effet, l'ARNg du VIH-1, l'ARN 7SL et d'autres ARN cel-

lulaires induiraient l'encapsidation d'A3G [154, 169, 170]. L'ARN 7SL, appartenant à un complexe essentiel (SRP, *Signal Recognition Particle*) pour la redirection de protéines au réticulum endoplasmique chez les eucaryotes, est lui-même activement encapsidé dans les virions en excès par rapport à l'ARNg [171]. Des approches à haut débit confirment qu'A3F, A3G et A3H sont capables de lier un large panel d'ARN, avec une certaine préférence pour l'ARNg du VIH-1, l'ARN 7SL et les ARN Y [166, 172]. Comme les A3 sont majoritairement retrouvées associées à des ARN viraux dans les cellules infectées, l'encapsidation des A3 serait au moins en partie dépendante des ARNg rétroviraux [172]. Néanmoins, des quantités équivalentes en A3G et A3F sont détectées dans des virions formés en absence d'ARNg ou en contenant des taux réduits, suggérant une encapsidation *via* d'autres ARN [166]. L'analyse de la composition nucléotidique des sites de fixation des A3 sur les ARN ne révèle pas de motif spécifique mais dévoile une fixation préférentielle pour les ARN riches en G et/ou A ; les ARN ne sont ainsi pas liés de manière totalement aléatoire. Les ARN du VIH-1, comme ceux des autres lentivirus, ont une composition caractéristique riche en A, expliquant la liaison préférentielle des A3 aux ARN viraux par rapport aux ARN cellulaires. De plus, cette spécificité de liaison des A3 mime celle observée pour le domaine NC de Gag [172, 173] qui lie aussi préférentiellement les ARN riches en A et G ; les chances d'encapsidation des A3 s'en trouvent ainsi maximisées. Le fait que les A3 ne reconnaissent pas de sites spécifiques leur permet une plus grande flexibilité de liaison, évitant un mode d'échappement des virus *via* la variation des séquences génomiques virales et permet également leur encapsidation par différents virus [172]. La capacité de liaison à l'ARN est aussi essentielle pour l'encapsidation d'A3H et son activité antivirale. Dans ce cas, son encapsidation dépendrait de la reconnaissance préférentielle de structures secondaires d'ARN en duplex, telles que celles retrouvées sur les ARNg viraux [39].

Les modifications post-traductionnelles des A3 régulent aussi leur encapsidation au sein des particules virales. Notamment, la mono-ubiquitinylation d'A3G par l'ubiquitine ligase E3 Nedd4-1 favorise son encapsidation [174]. En présence des tyrosines kinases Fyn et Hck, les niveaux globaux d'encapsidation d'A3G (formes non phosphorylée et phosphorylées) diminuent, et les formes phosphorylées de la protéine sont alors principalement encapsidées au détriment de la forme non phosphorylée [175].

Propriétés provirales

Si, en règle générale, l'accumulation de mutations dans le génome viral soumis à l'activité désaminase des APOBEC est défavorable au virus, certaines mutations pourraient au contraire être en sa faveur en créant des mutations d'échappement aux antiviraux et/ou à la reconnaissance par la réponse immunitaire adaptative. L'étude de patients séropositifs infectés par des virus capables de neutraliser uniquement A3F ou A3G a suggéré une potentielle activité provirale des A3 [176]. Effectivement, une mutagénèse sublétale des provirus par les A3 pourrait accélérer l'apparition de variants résistants aux antiviraux. Une résistance à la lamivudine, un inhibiteur de la RT, a été observée avant traitement dans le cas de virus exprimant une protéine Vif incapable d'entraîner la dégradation optimale d'A3G [177]. La co-expression d'A3F et d'A3G permet la génération de variants du VIH-1 présentant des mutations qui confèrent une résistance à l'AZT (azidothymidine), un autre inhibiteur de la RT. Cette activité provirale semble néanmoins faible ou négligeable, les variants résistants générés par les A3 étant moins performants en termes de réplication que ceux issus des mutations engendrées uniquement par les erreurs de la RT du VIH-1 [125].

L'activité désaminase d'A3G au sein de LT infectés par le VIH-1 favoriserait leur reconnaissance par les CTL, activation qui serait provoquée par la présence de protéines virales tronquées suite à l'activité d'A3G [178]. Néanmoins, d'autres travaux ont montré que l'activité enzymatique d'A3G/3F est directement impliquée dans la diminution de la reconnaissance des épitopes viraux par les CTL. En effet, certains peptides localisés dans Gag, Pol et Nef constituent des épitopes immunodominants reconnus préférentiellement par les CTL [179, 180]. Or, ces peptides sont codés par des séquences génomiques virales enrichies en motifs 5'-GGG-3' (5'-CCC-3' sur l'ADNc (-) du VIH-1) reconnus par A3G et A3F, permettant la mutation de ces régions et ainsi l'échappement des cellules infectées à l'activité des CTL [181-184].

La protéine Vif du VIH-1, régulateur majeur des APOBEC3

La protéine auxiliaire Vif est exprimée par tous les lentivirus, à l'exception du virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) [185]. Considérée initialement comme protéine secondaire dans l'infection par le VIH-1 [186], Vif est en fait un facteur de virulence. Son absence réduit très fortement l'infectivité des virions aussi bien chez le VIH-1 que le VIH-2 [187, 188]. La protéine A3G, alors nommée CEM15, a été identifiée en 2002 comme cible majeure de Vif dans les cellules dites non permissives [13]. Depuis, la relation entre les protéines A3 et Vif a largement été étudiée et nous savons désormais que Vif inhibe l'expression de cinq des sept A3 (A3C, A3D, A3F, A3G et A3H) [189-194]. Outre cette activité régulatrice des A3, Vif possède d'autres fonc-

tions au cours de la réplication virale. Différents facteurs cellulaires limitent cependant son activité. Ces différents points sont développés ci-après.

Vif : coordinateur de la réplication virale et interactions de Vif avec les composants viraux

Vif est capable de former des multimères, allant jusqu'aux tétramères *in vitro* [195, 196]. La région principale permettant la multimérisation *in cellula* est la région riche en prolines ^{161}PPLP^{164} (*figure 6*) bien que d'autres régions puissent être impliquées [197, 198]. Même si sa capacité à multimériser semble faciliter l'activité de restriction de Vif envers A3G [198], l'impact de ce mécanisme sur la réplication virale reste encore à élucider.

Localisation cellulaire, assemblage et interaction avec Pr55^{Gag}

La protéine Vif est majoritairement retrouvée dans le cytoplasme et notamment au sein de complexes RNP [199, 200]. Vif interagit avec le précurseur Pr55^{Gag} du VIH-1, indépendamment de sa capacité d'oligomérisation, ce qui aboutit à sa relocalisation au niveau de la membrane plasmique [198, 199, 201]. Deux régions de Vif sont importantes pour l'association à Pr55^{Gag}, à savoir le CTD 169-192 [202] et le NTD 2-49 et plus particulièrement les acides aminés Y30 et R33 (*figure 6*) [203]. La localisation membranaire de Vif serait importante pour la production de particules infectieuses du VIH-1. Les deux régions C-terminales de Vif impliquées dans ce mécanisme s'étendent des résidus 157 à 160 et 173 à 184 [204]. D'autres travaux de co-expression en cellules d'insecte Sf9 montrent que Pr55^{Gag} est nécessaire à l'incorporation de Vif dans des VLP (*Virus Like Particles*) aussi bien extracellulaires que cytoplasmiques [205], suggérant que la localisation membranaire de Vif n'est pas indispensable à son encapsidation. Cependant, son encapsidation semble nécessiter une interaction avec l'ARNg du VIH-1, aussi bien dans des cellules permissives que non permissives [206]. Un virion peut contenir des quantités variables de protéines Vif, allant d'une dizaine à une centaine de copies [207, 208]. Étonnamment, Vif inhibe la maturation de Pr55^{Gag} grâce à sa région 78-98 qui inhibe la protéase du VIH-1 *in vitro* en interagissant spécifiquement avec elle (*figure 6*) [205, 209]. La région 4-22 de Vif est essentielle à l'inhibition de la maturation de Pr55^{Gag} et/ou Gag-Pol au site de maturation p2/NC (*figure 6*) [210]. Par ailleurs, Vif interagit également avec des composants du cytosquelette et l'association de Vif à la vimentine conduit à la désorganisation du réseau de filaments intermédiaires et à l'apparition d'agrégats périnucléaires [211, 212]. Toutefois, aucune fonction précise n'a été associée à cette interaction.

Impact sur la rétrotranscription, interaction avec les acides nucléiques et activité chaperon d'ARN

La capacité de Vif à s'associer aux ARN et les régions ou résidus impliqués dans ces interactions ont été largement étudiés. Vif est capable de s'associer à l'ARNg du VIH-1 [200, 213, 214], interaction nécessaire à son encapsidation [206, 215] et assurée par la région N-terminale 1-64 de Vif [200] ; l'interaction Vif-ARNg du VIH-1 s'effectue de manière coopérative et préférentiellement au niveau de la région 5'de ce dernier [213, 216-219]. Vif exerce une activité chaperon sur l'ARN par l'intermédiaire de ses régions N-terminale 1-97 et C-terminale non structurée 95-192 (*figure 6*) [219]. *In vitro*, Vif stimule la rétrotranscription grâce à sa région C-terminale 136-192 en facilitant l'association de l'ARNt^{Lys3} à la matrice ARN et en augmentant la vitesse de polymérisation permettant à la RT d'outrepasser les sites abasiques [220, 221]. Ces différentes activités au niveau de la rétrotranscription sont corrélées à une synergie entre Vif et le domaine NC de Gag [222]. L'activité chaperon d'ARN de Vif favorise la rétrotranscription (hybridation de l'ARNt^{Lys3} à l'ARN, augmentation de la processivité de la RT, stimulation du premier transfert de brin) et la dimérisation de l'ARNg [222]. Vif favorise également la « rétrotranscription tardive », un phénomène normalement réprimé se déroulant au cours de l'assemblage des virions lorsque la NC est mutée. L'action de Vif dans ce contexte reste à élucider [223].

Reconnaissance des A3 et recrutement du complexe E3-ubiquitine ligase

Le mécanisme principal permettant la restriction des A3 est le recrutement par Vif d'un complexe E3-ubiquitine ligase [190, 192, 224-226], composé de la protéine de soutien Cullin 5, des protéines adaptatrices Elongin B et C ainsi que des unités catalytiques RBX2 (*RING-box protein 2*) et ARIH2 (*Ariadne homolog 2*) [227, 228]. Cela permet la poly-ubiquitinylation ^{48}K des A3 et leur redirection vers le protéasome qui assurera leur dégradation. Les paragraphes suivants relatent les travaux effectués sur Vif IIIB (Genebank M19921) et les interactions avec ses partenaires.

Ainsi, Vif s'associe à A3C-3H afin de permettre leur ubiquitinylation et leur dégradation [229, 230]. En ce qui concerne A3A et A3B, Vif entraîne leur relocalisation cytoplasmique (ces deux protéines étant partiellement ou majoritairement nucléaires) qui favorise leur activité antivirale en cellules HEK293T en augmentant leur concentration dans les régions cytoplasmiques de production virale [231], bien qu'A3A puisse ne pas s'associer à Vif [232]. Même si Vif n'entraîne pas l'ubiquitinylation ^{48}K d'A3B, elle induit la poly-ubiquitinylation ^{63}K d'A3B et A3H, dont la fonction précise reste encore à déterminer [230].

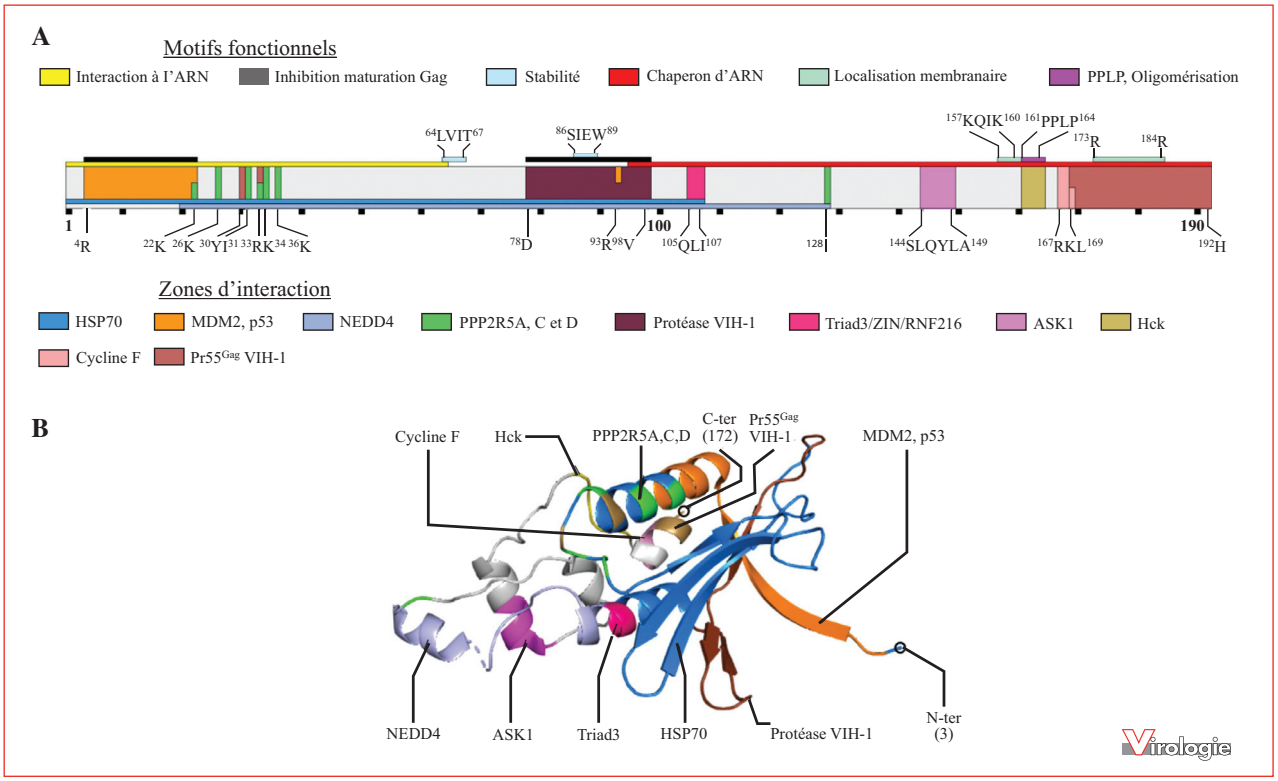


Figure 6. Structure de la protéine Vif du VIH-1 et interaction avec des partenaires cellulaires et viraux. A) La structure monodimensionnelle de Vif (Genbank M19921 ; UniProtKB - P12504 (Vif_HV1N5)) est schématiquement annotée par tranches de 10 acides aminés (carrés noirs en-dessous de la structure). Les motifs fonctionnels sont symbolisés par des rectangles de couleur au-dessus de la structure, tandis que les zones d'interaction aux différents partenaires viraux et cellulaires sont colorées au sein de la structure. B) La structure tridimensionnelle de Vif (PDB : 4N9F ; Positions 3-172) est représentée en rubans, les extrémités N- et C-terminales (respectivement N-ter et C-ter), les zones d'interaction à différents partenaires viraux et cellulaires sont colorées et annotées sur la structure. Les résidus associés à ces régions et mentionnés dans le texte sont indiqués.

Les régions d'interactions avec A3C-3H se trouvent majoritairement dans le NTD de Vif (*figure 7*). En ce qui concerne A3F, les régions/résidus N-terminaux impliqués sont ^{11}WQVDRMR^{17}, ^{74}TGERDWH^{80}, K50 et W70 tandis que la région C-terminale impliquée est ^{171}EDRW^{174} (*figure 7*) [233-238]. La liaison d'A3F à Vif est également renforcée par l'association des résidus R293 et E324 d'A3F à CBF-β (*figure 2*) [238]. Les acides aminés D14, R15 et W79 sont responsables de l'interaction de Vif à A3C et A3D (*figure 7*) [225]. Le motif ^{171}EDRW^{174} de Vif interagirait également avec A3C (*figure 7*) [237]. Vif interagit aussi bien avec le NTD 1-194 que le CTD 195-387 d'A3B, mais aucun résidu crucial n'a encore été identifié [230].

Concernant A3G, plusieurs régions de Vif sont impliquées, notamment les acides aminés K22, K26, Y30, S52, W70, la région ^{40}YRHHY^{44} [233, 236, 239-241] et le motif ^{161}PPLP^{164} (*figure 7*). Enfin, le résidu F39 et la région ^{60}GDAK^{63} constituent les deux régions d'interaction de Vif à A3H (*figure 7*) [102, 242].

Afin de permettre la dégradation des A3 par le protéasome, Vif recrute un complexe E3-ubiquitine ligase. Les différentes régions d'interaction de Vif aux membres de ce complexe sont présentées sur la *figure 7*. Une structure cristallographique du complexe minimal, nommé Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC-CBFβ ou Vif_{VCBCC}, nécessaire à la liaison de Vif aux A3 (et à leur ubiquitinylation) a été résolue en 2014 ([243] PDB : 4N9F). L'extrémité N-terminale de Vif (résidus 6-8) interagit avec CBF-β, un élément structural majeur du complexe E3-ubiquitine ligase [244-246]. En confrontant ces données avec la structure du complexe VCBCC, il est très probable que le feuillet β1 de Vif (résidus 5-12) soit la surface d'interaction principale à CBF-β [45], bien que Vif-W89 soit également important pour l'interaction [247, 248]. Vif présente un domaine HCCH ($\underline{H}_{108}X_5\underline{C}_{114}X_{18}\underline{C}_{133}X_5\underline{H}_{139}$, accession P12504-1 de Vif) constituant un motif à doigt-zinc non-consensus permettant l'association à la Cullin 5 [249]. L'interaction entre la Cullin 5 et Vif est à la fois directe, *via* les résidus R121 - I124 - L125 et R127 de

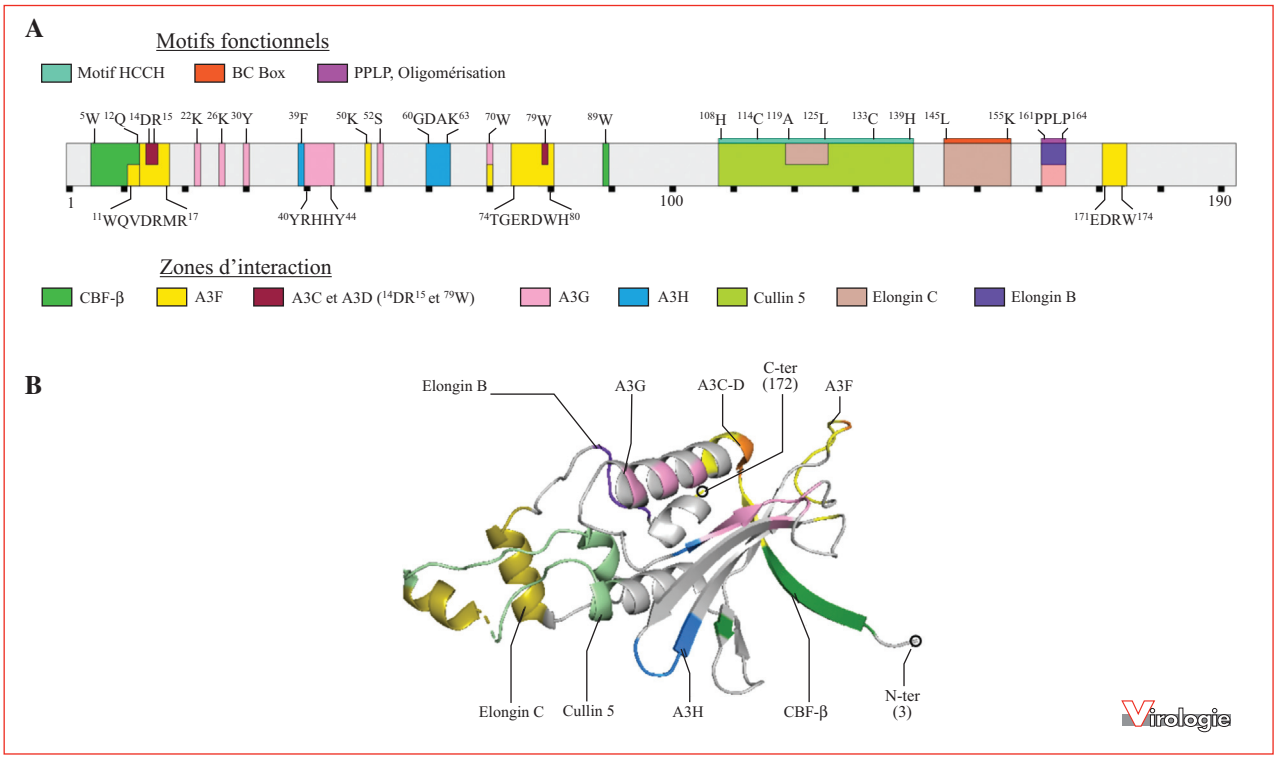


Figure 7. Structures de la protéine Vif du VIH-1 et interaction avec les membres du complexe E3-ubiquitine ligase. A) La structure monodimensionnelle de Vif (Genbank M19921 ; UniProtKB – P12504 (Vif_HV1N5)) est schématiquement annotée par tranches de 10 acides aminés (carrés noirs en-dessous de la structure). Les motifs fonctionnels sont symbolisés par des rectangles de couleur au-dessus de la structure, tandis que les zones d'interaction aux A3 et aux membres du complexe E3-ubiquitine ligase sont colorées au sein de la structure. B) La structure tridimensionnelle de Vif (PDB : 4N9F ; Positions 3-172) est représentée en rubans, les extrémités N- et C-terminales (respectivement N-ter et C-ter) ainsi que les zones d'interaction à différents partenaires sont colorées et annotées sur la structure. Les résidus associés à ces régions et mentionnés dans le texte sont indiqués.

Vif (domaine HCCH), et indirecte *via* le recrutement de l'Elongin C [45]. En effet, Vif s'associe à l'Elongin C grâce à un motif BC Box (résidus 145-155) ainsi qu'un motif ^{144}SLQ^{146}, extrêmement conservé [250]. À noter que la phosphorylation du résidu Vif-S144 diminue drastiquement son association à l'Elongin C [251]. De plus, la mutation S144A (empêchant sa phosphorylation) affecte significativement la réplication virale, ce qui suggère que l'activité de Vif est finement régulée [252]. En outre, la structure du complexe E3-ubiquitine ligase indique que l'hélice α3 de Vif (résidus 119-125) est aussi en contact avec l'Elongin C [243]. Des études complémentaires ont permis de comprendre que les interactions des protéines Elongin C, Vif et Cullin 5 se stabilisent mutuellement [45], et que le motif ^{161}PPLP^{164} de Vif permettrait son interaction avec l'Elongin B [253, 254]. Toutefois, la structure résolue par Guo *et al*. ne permet pas de confirmer ces résultats, laissant une incertitude quant aux régions d'interaction entre ces deux protéines. Bien que RBX1 et RBX2 puissent chacune s'associer à la Cullin 5, la sous-unité catalytique principale pour l'activité inhibitrice de Vif est RBX2. En effet, seule la diminution de l'expression de RBX2 entraîne une réduction de la dégradation d'A3G dans les cellules [227]. Le dernier acteur identifié du complexe E3-ubiquitine ligase recruté par Vif est ARIH2, une E3-ubiquitine ligase de la famille RBR (*RING-BetweenRING-RING*) qui interagit avec la Cullin 5 ; elle est responsable des premières réactions d'ubiquitinylation d'A3G/A3F lors de leur prise en charge par Vif. ARIH2 semble essentielle à l'infection des LT CD4$^+$ par le VIH-1 [228].

Les différentes régions d'interaction des A3 avec Vif ont été largement étudiées, aussi bien par mutagénèse que par des analyses structurales. Ces régions ont été discutées dans deux revues récentes [26, 45] et sont répertoriées sur la *figure* 2.

Autres mécanismes d'inhibition des A3

Le recrutement par Vif du complexe E3-ubiquitine ligase servant à la dégradation des A3 peut avoir un effet indirect supplémentaire sur l'expression de ces protéines. En effet, CBF-β est un co-facteur transcriptionnel de la famille

des facteurs de transcription RUNX (*Runt-related transcription factor*) et sa séquestration par Vif réduit fortement l'expression de certains gènes cibles de RUNX, notamment *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G* et *APOBEC3H* [244, 255].

Par ailleurs, Vif est capable de s'associer *via* son motif ^{161}PPLP^{164} au domaine SH3 des Src tyrosine kinases Hck et Fyn (*figure 6*). L'association de Vif à ces kinases réduit leur activité catalytique (auto- et trans-phosphorylation) et inhibe l'incorporation des formes phosphorylées d'A3G, ce qui favorise la réplication virale [175, 256].

Vif inhibe également l'encapsidation d'A3F et A3G, ainsi que leur activité antivirale, indépendamment de sa capacité à les dégrader *via* le système ubiquitine-protéasome. Le mécanisme permettant cette inhibition est pour le moment inconnu [257]. Enfin, Vif pourrait interférer avec l'activité des A3 au sein même des virions par blocage direct. En effet, certaines régions d'association de Vif à l'ARNg correspondent à des régions préférentiellement ciblées par A3G/A3F [213, 216].

En outre, Vif inhibe la traduction d'A3G [215, 258]. En effet, le blocage spécifique de la voie du protéasome par ajout d'inhibiteurs chimiques ne permet pas de restaurer complètement le niveau d'expression d'A3G en présence de Vif. De plus, Vif présente une forte affinité pour l'ARNm d'A3G *in vitro*, avec une affinité marquée pour les régions non traduites (5'et 3'UTR) [259]. En fait, la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G est cruciale pour son inhibition traductionnelle induite par Vif et les tiges-boucles SL2-SL3 présentes dans cette région ont été identifiées comme étant le motif minimum requis pour cette inhibition [260]. Cette propriété d'inhibition traductionnelle d'A3G par Vif est conservée chez tous les isolats du VIH-1 et est indépendante de sa capacité à dégrader A3G *via* le protéasome. Bien que les domaines (ou résidus) de Vif responsables de cette inhibition traductionnelle n'aient pas encore été identifiés, dégradation et inhibition traductionnelle d'A3G par Vif semblent contribuer de manière équivalente pour préserver l'infectivité virale [260]. Très récemment, un cadre de lecture ouvert (uORF ou *upstream ORF*) a été identifié dans la 5'UTR de l'ARNm d'A3G. Les uORF sont des éléments très répandus chez les eucaryotes et sont souvent impliqués dans les régulations traductionnelles [261, 262]. De façon intéressante, cet uORF est précisément localisé au niveau des motifs SL2-SL3 et code un peptide putatif de 23 acides aminés. L'inactivation de cet uORF augmente significativement l'expression d'A3G, suggérant que l'uORF est fonctionnel et qu'il régule négativement la traduction d'A3G en absence de Vif. Ainsi, A3G serait traduit par un mécanisme original impliquant *leaky-scanning* et réinitiation (Paillart, communication personnelle). Vif serait également capable d'inhiber la traduction d'A3F par le biais d'un uORF au sein de son ARNm (Paillart, communication personnelle). Même si les mécanismes précis restent à élucider, il semblerait que Vif, *via* son interaction avec l'uORF, relocalise l'ARNm d'A3G dans des granules de stress, participant ainsi à la réduction globale de l'expression d'A3G.

En tant qu'inhibiteur majeur des A3, Vif exerce une forte pression de sélection sur cette famille, modulant l'évolution génétique de ses membres [263, 264]. Vif s'adapte néanmoins rapidement aux variants émergents d'A3 résistants à Vif, soulignant une coévolution entre cette dernière et la famille des A3 [265, 266]. Ces interactions et coévolutions tiennent de plus un rôle important dans les transmissions inter-espèces des lentivirus de primates et leur adaptation aux hominidés [267-269].

Par ailleurs, même s'il ne s'agit pas d'une inhibition de l'activité des A3 *stricto sensu*, le VIH-1 peut acquérir une résistance envers les A3 par substitutions de différents résidus de la protéine d'enveloppe. En effet, des virus ΔVif présentant ces mutations (Env A : A58V, A60T, H643Y, M687I et V822I ; Env B : P79L, S143N, M426L, Q442P, H643Y et M687I ; Env C : T626M, K655M et M687I) sont résistants vis-à-vis d'A3G et présentent une accumulation limitée de mutations liées à son activité désaminase. Cela serait dû d'une part à la diminution de la capacité fusogène de l'enveloppe, et d'autre part à l'incorporation accrue de Gag-Pol dans les particules virales, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la concentration en RT, sa processivité et au final de limiter l'accès de l'ADN viral à l'action d'A3G [270].

Impact de Vif sur le cycle cellulaire : MDM2, PPP2R5 et CDK9

Lors d'une infection par le VIH-1, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est principalement assuré par la protéine virale Vpr afin d'optimiser l'expression du génome viral [271-273]. Cependant, Vif est également capable de perturber le cycle cellulaire. Tout d'abord MDM2 (*Murine Double Minute 2*), une E3 ligase responsable de l'ubiquitinylation et de la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 et de Vif, participe à l'inhibition de la réplication du VIH-1 dans les cellules non permissives [274]. Le NTD de Vif (résidus 4 à 22) lui permet de s'associer à la région centrale de MDM2, importante pour la régulation de la stabilité de p53 (*figure 6*). Cette région NTD permet également à Vif de s'associer à p53 et de la stabiliser en bloquant son ubiquitinylation et son export nucléaire par MDM2, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et favorise la réplication virale [275]. Le résidu Vif-R93 est critique pour son association avec MDM2 [276]. Les résidus I31, R33, K36, T47 et K50 de Vif sont importants pour l'arrêt en phase G2, mais ne sont pas liés à la stabilisation de

p53 [275]. Des travaux récents ont identifié les résidus K22, K26, I31, R/K33, K34, K36, et I128 comme surface d'interaction de Vif avec les sous-unités régulatrices de la phosphatase PP2A (*Serine/threonine-Protein Phosphatase 2A*), constituant la famille PPP2R5 (*figure 6*). Ainsi, la dégradation de PPP2R5A, C et D par Vif, très vraisemblablement *via* la voie ubiquitine-protéasome, aboutit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 [277-280]. Par ailleurs, CDK9 (*Cyclin-Dependant Kinase 9*), protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'activation de l'ARN polymérase II, peut s'associer à Vif et entraîner une accélération de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Ce phénomène ne nécessiterait pas d'interaction entre la Cullin 5 et Vif [281].

Réponse de la cellule hôte contre Vif et facteurs protéiques impliqués

Comme mentionné précédemment, la stabilité de Vif est fortement régulée par son ubiquitinylation [251] et sa dégradation par le protéasome. La position Vif-E88 joue un rôle majeur dans la résistance à l'ubiquitinylation [282], et plus largement les régions 64-67 et 86-89 sont essentielles à sa stabilité [282]. Vif interagit avec deux autres E3-ubiquitine ligases à domaine catalytique HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) nommées AIP4 (*Atrophin-1-Interacting Protein 4*) et NEDD4 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4*) [283]. L'association à NEDD4 s'effectue avec la région 20-128 de Vif [283] (*figure 6*). Lorsque Vif est ubiquitinylée, la forme majoritairement retrouvée est la forme mono-ubiquitinylée dans des cellules transfectées [283, 284]. Cependant, la proportion de Vif ubiquitinylée augmente drastiquement en présence d'A3G, avec notamment l'apparition de formes poly-ubiquitinylées et une augmentation de la dégradation de Vif par le protéasome [284], suggérant qu'A3G possède une autre activité de restriction envers le VIH-1 en induisant la dégradation de Vif. De plus, le complexe E3 ligase SCF *via* la Cycline F s'associe à Vif au niveau du motif « CY » ^{167}RKL^{169} pour induire sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation, réduisant ainsi l'infectivité virale (*figure 6*) [285]. Par ailleurs, la MAP3 kinase ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), dont l'expression est stimulée par l'AZT, interfère avec l'ubiquitinylation engendrée par Vif en s'associant à sa région 144-149 (particulièrement ^{144}SLQ^{146}) (*figure 6*). Ainsi, ASK1 inhibe l'interaction de Vif avec l'Elongin C *in cellula*, réduisant l'auto-ubiquitinylation de Vif, l'ubiquitinylation d'A3G et la réplication virale [286].

Une analyse des interactants de Vif par double-hybride en système levure a identifié la protéine Triad3/ZIN/RNF216, une E3-ubiquitine ligase impliquée dans la régulation de la voie de signalisation TLR (*Toll-Like Receptor*) [287], comme partenaire de Vif. Les résidus ^{105}QLI^{107} sont indispensables à l'interaction entre Vif et RNF216 (*figure 6*) [288] entraînant une diminution de l'infectivité virale et un défaut de l'activité de la RT [289]. D'autre part, HDAC6 (*Histone deacetylase 6*) induit la dégradation de Vif par une voie autophagique. Un complexe ternaire Vif-HDAC6-A3G serait formé et HDAC6 protègerait A3G de la dégradation par compétition avec Vif [241]. HSP70 (*Heat-Shock Protein 70*) inhibe quant à elle l'ubiquitinylation et la dégradation protéasomique d'A3G induite par Vif. En effet, HSP70 s'associe à A3G et au NTD de Vif 1-107, région importante pour son interaction avec A3G (*figure 6*), suggérant qu'HSP70 empêche la fixation d'A3G à Vif. La conséquence est une augmentation de l'incorporation d'A3G dans les particules virales [290].

En conclusion, Vif est une protéine virale aux multiples fonctions. Bien que son activité principale soit l'inhibition de l'expression des A3 (A3C, A3D, A3F, A3G et A3H) par l'induction de leur dégradation *via* le protéasome et par l'inhibition de la traduction, transcription ou de leur encapsidation. La pression mutuelle entre les A3 et Vif est notamment responsable de leur coévolution. Outre son activité inhibitrice contre les A3, Vif facilite également la réplication virale lors de la transcription inverse du génome viral grâce à son activité chaperon d'ARN, mais également en entraînant l'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, Vif est régulée par de nombreux facteurs cellulaires impactant son activité et/ou sa stabilité.

Restriction d'autres virus humains par APOBEC3

Dans cette partie, nous nous limiterons à la description des virus pathogènes pour l'homme, sachant que les A3 agissent également contre des virus impactant d'autres espèces [291].

Une partie des travaux recensés ici se base exclusivement sur des systèmes *in vitro* ou sur l'analyse de génomes viraux. Certaines interactions recensées entre virus et A3 ne sont supportées que par un faible nombre d'études, parfois contradictoires. Les observations relatées vis-à-vis des différents organismes d'intérêt ne font ainsi pas toutes consensus.

Virus à ARN simple brin de polarité positive

Les flavivirus : hépatite C (HCV) et zika (ZIKV)

A3G est incorporée dans les virions d'HCV et empêche la réplication virale, sans lien apparent avec son activité désaminase [292]. Par ailleurs, A3G s'associe par sa région

C-terminale 157-384 à la protéine non structurale NS3 d'HCV au sein de la cellule hôte, diminuant ainsi l'activité hélicase de NS3 nécessaire à la réplication virale [293]. Dans le cas de ZIKV, A3C est capable de réduire la quantité d'ARN viral dans les cellules infectées et d'inhiber la réplication virale [294].

Les coronavirus

A3C, A3F et A3H sont également capables d'inhiber l'infection par le coronavirus HCoV-NL63 *in vitro*. La production virale est réduite dans le cas de cellules rénales simienne LLC-Mk2 (*Lilly Laboratories Cell-Monkey kidney 2*) exprimant A3C, A3F ou A3H. De manière intéressante, cette restriction n'est observée que dans le cas d'A3 catalytiquement actives, bien qu'aucun phénotype d'hypermutation n'ait été constaté. A3C, A3F et A3H interagissent avec la protéine N de HCoV-NL63, indépendamment de leur activité désaminase [295]. Par ailleurs, la substitution majoritaire observée dans les génomes de SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*) séquencés durant les 4-5 premiers mois de l'évolution du virus est la transition C→U [296]. Les motifs 5'-A/TC-3' sont préférentiellement affectés ce qui suggère que ces substitutions sont potentiellement générées par les A3 comme A3A, A3F et A3H. En outre, plus de 50 % des substitutions observées qui aboutissent à un changement d'acide aminé proviennent d'une transition C→U, confirmant que ces mutations sont restrictives et non adaptatives [296]. Une étude récente suggère que les A3 sont partiellement responsables de l'édition du génome de SARS-CoV-2, les transitions C→U et G→A constituant le deuxième groupe de mutations majoritaires observé dans des données de séquençage ARN obtenues à partir de liquides de lavage broncho-alvéolaire provenant de patients positifs [297].

Les entérovirus

L'entérovirus 71 (EV71), responsable de la maladie pieds-main-bouche, est inhibé par A3G [298, 299]. A3G est capable de s'associer à la 5'UTR de l'ARN viral *via* ses résidus L123, Y124 et W127, entrant ainsi en compétition avec la protéine cellulaire (PCBP1) (*Poly(rC)-Binding Protein 1*) indispensable à la synthèse des protéines virales [298]. De plus, si A3G interagit avec la polymérase virale, elle interagit surtout avec l'ARNg pour être encapsidée dans les particules virales et diminuer leur infectivité de façon désaminase-indépendante [299]. Cependant, A3G peut être contrecarrée par la protéine 2C d'EV71, qui s'associe à A3G et entraîne sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation par la voie autophagique-lysosomale [298]. A3A, A3D et A3F sont également capables d'inhiber, mais dans une moindre mesure, l'activité de la 5'UTR et la réplication de cet entérovirus. CA16, un autre agent de la maladie pieds-main-bouche, et poliovirus (PV) voient également leur activité traductionnelle fortement réduite par A3G [298].

Virus à ADN simple brin, cas des parvovirus

A3A inhibe la réplication du AAV (*Adeno-Associated Virus*) notamment en empêchant la formation de centres de réplication dans le noyau [300]. Cette inhibition serait indépendante de l'activité désaminase d'A3A. La région ^{60}KNLLCGFY^{67} d'A3A contribue à cette activité antivirale (*figure 2*) [301].

Virus à ADN double brin circulaire, cas du papillomavirus humain (HPV)

Des mutations caractéristiques des A3 ont été constatées dans les génomes de papillomavirus (HPV) issus de verrues plantaires ou de biopsies du col de l'utérus à un stade précancéreux [302]. A3G, et plus modérément A3A, semblent responsables de l'hypermutation du gène viral *E2*, codant un régulateur transcriptionnel viral, dans le cas d'HPV16 (HPV à haut risque cancérigène). L'accumulation de mutations dans le gène *E2* entraînerait des cassures db de l'ADN viral, favorisant son intégration et l'expression des gènes viraux *E6* et *E7* habituellement réprimés par E2, facilitant l'apparition de cancers [303]. L'expression d'A3A et d'A3B est fortement augmentée dans des kératinocytes et tissus cervicaux infectés aux premiers stades de développement cancéreux, mais seule A3A diminue l'infectivité de HPV16 [304]. Par ailleurs, A3A diminue l'encapsidation du génome et l'infectivité de pseudovirions d'HPV16, tandis que l'association d'A3C avec la protéine de capside L1 serait la cause d'une diminution de l'infectivité de ces pseudovirions [305]. D'autres expériences de production de pseudovirions d'HPV16 suggèrent que l'activité inhibitrice d'A3A n'affecte ni la stabilité, ni l'encapsidation du génome viral, mais requiert un domaine catalytique fonctionnel [304], allant à l'encontre des résultats décrits précédemment [305]. Par ailleurs, des cellules contenant le génome d'HPV11 et surexprimant A3A présentent une hypermutation du gène E6, une diminution de l'expression de l'ARNm d'E6 et un arrêt du cycle cellulaire en phase S [306].

La protéine virale E7 d'HPV16 stabilise la protéine A3A par un mécanisme impliquant la Cullin 2, composant essentiel du complexe cullin-RING E3-ubiquitine ligase impliqué dans la dégradation d'A3A par le protéasome [86]. En effet, la Cullin 2 s'associe individuellement aux protéines A3A et E7 et l'interaction de cette dernière avec la Cullin 2 inhibe la dégradation d'A3A.

Virus à ADN double brin linéaire, cas des herpesvirus

Le virus Epstein-Barr (EBV) peut être hypermuté par les A3 [307]. A3B exerce une restriction sur une souche d'EBV n'exprimant plus la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase RR1, produit du gène *BORF2*. Grâce à son activité désaminase induisant une hypermutation du génome viral, A3B entraîne une diminution de l'infectivité et de la charge virale. Cependant, RR1, en s'associant avec le domaine catalytique d'A3B [191–382], inhibe son activité désaminase. Plus particulièrement, la région ^{315}YDPLYK^{320} d'A3B (*figure 2*), responsable de la reconnaissance du substrat contenant un motif 5'-TC-3' [308], apparaît nécessaire à cette interaction. En outre, RR1 entraîne une relocalisation d'A3B du noyau vers des corps périnucléaires [309].

Dans le cas de l'herpes simplex virus-1 (HSV-1), A3C réduit l'infectivité par dix en culture cellulaire. L'impact d'A3C sur l'infectivité est lié à son activité désaminase qui entraîne une hypermutation du génome viral [307]. Par ailleurs, la protéine ICP6, la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase d'HSV-1, est capable d'exclure A3A du noyau, ce qui expliquerait l'absence de restriction d'HSV1 par A3A [310]. D'après d'autres travaux, ICP6 entraîne la relocalisation d'A3B, en plus d'A3A, du noyau vers le cytoplasme [311]. De plus, une souche HSV-1 n'exprimant plus ICP6 est résistante à A3A et A3B malgré une capacité réplicative plus faible, suggérant l'existence d'autres mécanismes de défense contre ces facteurs de restriction [311]. Enfin, A3A assure la restriction du cytomégalovirus humain (HCMV) dans des cellules épithéliales infectées par édition de son génome, aussi bien *ex vivo* au sein d'organes déciduaux qu'*in vivo* lors d'une infection congénitale [312]. A3G aurait exercé une pression évolutive sur HCMV, entraînant une sous-représentation des motifs 5'-CCC-3' et 5'-GGG-3' (site de reconnaissance des A3G) au sein de son génome [313].

Virus à ADN ou ARN utilisant la transcription inverse et rétroéléments

Le virus T-lymphotropique humain (HTLV)

Les études concernant l'impact des A3 sur HTLV-1 ont fourni des résultats partiellement contradictoires [23, 314-316]. HTLV-1 ne serait pas ou très faiblement affecté par A3G malgré son incorporation dans les virions *via* ses résidus F70 et Y91 [23, 314], tandis qu'une forte activité restrictive et désaminase-indépendante d'A3G a été observée [315]. Bien que Pak *et al.* n'aient constaté qu'une faible activité d'A3G envers HTLV-1, les résidus S18, Y19, Y22 et R24 semblent majoritairement responsables de cette activité (*figure 2*) [317]. L'activité limitée d'A3G serait due à la partie C-terminale de la NC d'HTLV-1 qui inhibe fortement l'encapsidation d'A3G, et très probablement celle d'A3F, étant donné que l'absence de cette région rend HTLV-1 plus sensible à l'activité d'A3F [318]. Par ailleurs, A3A, A3B et A3H hapII semblent assurer une très forte restriction d'HTLV-1 alors qu'A3C, A3D, A3F et A3G ne présentent qu'une activité modérée. La restriction serait dépendante de l'activité désaminase d'A3A/A3B et indépendante pour A3H hapII. La faible activité d'A3G s'accompagne d'une édition modérée du génome viral [316]. La restriction d'HTLV-1 par les A3 semble donc multifactorielle et des études complémentaires sont nécessaires afin de préciser les mécanismes sous-jacents.

Le virus de l'hépatite B (HBV)

Les protéines A3A-A3G sont encapsidées dans les particules virales *via* la protéine core antigène d'HBV (HBcAg) [319-323]. L'encapsidation d'A3G semble également nécessiter son association à la protéine NC, processus qui requiert plus particulièrement la présence de la RT et du signal d'empaquetage situé en 5' de l'ARN prégénomique (ARNpg). La région 1-103 d'A3G est nécessaire à cet empaquetage [324]. Par ailleurs, l'interaction A3B-HBcAg nécessite la présence d'ARN (*figure 2*) [323].

Toutes les A3, à l'exception d'A3D, sont capables de désaminer l'ADN viral *in vitro*, A3G préférant les sites 5'-CC-3', et A3H les sites 5'-TC-3' [325]. A3C présente une forte activité mutagène contre HBV [326, 327] en désaminant le brin (-) d'ADN viral, tandis qu'A3B, A3F et A3G peuvent désaminer les deux brins d'ADN viral [319, 323]. Les protéines chaperons Hsp90a/b interagissent avec A3G et stimulent son activité catalytique, notamment en favorisant la reconnaissance des régions 5'-CC-3' de l'ADN d'HBV. Hsp90b stimule également l'activité catalytique d'A3B *via* une interaction avec sa région C-terminale [328].

L'impact des A3 sur l'ADNccc (*covalently closed circular DNA*) d'HBV est largement documenté. A3A et A3B sont essentielles à la désamination et à la dégradation de l'ADNccc [321, 329]. Elles induisent la désamination de l'ADNccc et réduisent sa concentration dans les cellules infectées, alors qu'une diminution de l'expression de ces A3 entraîne une augmentation de la quantité d'ADNccc dans les cellules exprimant HBV de façon stable [330, 331]. Étonnamment, l'expression d'A3B et d'A3G est augmentée dans le cas de patients souffrant d'infection chronique par le HBV mais aucune diminution de la quantité d'ADNccc intracellulaire n'a pu être observée [332].

Des mécanismes d'inhibition désaminase-indépendants ont également été proposés. En effet, A3G diminue la réplication d'HBV en inhibant (i) l'encapsidation de l'ARNpg [333], en activant certaines nucléases lorsqu'il est associé à la protéine core [334] et (ii) sa rétrotranscription (initia-

tion, élongation) ce qui a pour conséquence de diminuer la quantité d'ADN au sein du virus [335, 336]. De plus, A3B inhibe l'association de la RNP K au niveau de la région Enhancer II d'HBV, réprimant ainsi sa réplication [337].

Cependant, l'activité restrictive des A3 envers HBV peut être limitée. A3B, mais pas A3A, est dégradée après ubiquitinylation induite par l'E3-ubiquitine ligase MSL2 (*Male-Specific Lethal 2*), dont l'expression est stimulée par la protéine X d'HBV. Les résidus d'A3B ubiquitinylés sont les lysines K243 et K320 [330]. La protéine X diminue également le niveau intracellulaire d'A3G en favorisant son externalisation par la voie exosomale, indépendamment de sa dégradation par le protéasome ou le lysosome [338]. L'hélicase DHX9 (*DExH-Box Helicase 9*) s'associe à A3B et inhibe son activité restrictive en perturbant la liaison d'A3B à l'ARNpg [339]. De plus, l'ARN long non codant HULC (*Hepatocellular carcinoma Up-regulated Long non-Coding RNA*), fortement exprimé dans le cas de carcinome hépatocellulaire (HCC), favorise l'expression du miARN-539 qui cible la 3'UTR de l'ARNm d'A3B, entraînant la dégradation de la protéine [340]. Enfin, A3D empêche l'incorporation d'A3F et A3G dans les virions et diminue leur activité catalytique sur l'ADN d'HBV. L'activité inhibitrice d'A3D proviendrait de son association avec A3F et A3G [322].

Les rétroéléments

Les rétroéléments sont classés en deux groupes distincts, caractérisés par la présence ou l'absence de LTR (*Long-Terminal Repeat*). Ceux qui ne présentent pas de LTR sont les LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*), les SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*), et les SVA (*SINE-Variable number tandem repeat-Alu elements*). Les rétroéléments présentant des LTR sont les rétrovirus endogènes (ERV), également appelés Rétrotransposons à LTR.

Ces deux groupes de rétroéléments peuvent être régulés par les A3. Concernant les rétroéléments dépourvus de LTR, LINE-1 (L1), l'un des rétroéléments majoritaires chez les mammifères, est régulé par l'ensemble des A3 [341-346]. Les A3 peuvent inhiber L1 indépendamment de leur activité désaminase en séquestrant les complexes RNP L1 dans des compartiments cytoplasmiques. En effet, l'association de dimères d'A3C à L1 co-localise les RNP L1 et A3C au sein de granules de stress et inhibe sa rétrotranscription [344]. Par un mécanisme similaire, l'interaction d'A3D avec les RNP L1, nécessitant l'ARNm L1, entraîne la co-localisation de ces RNP et d'A3D au sein de granules cytoplasmiques dont la nature reste à déterminer et permet l'inhibition de la rétrotranscription de L1 [345]. Toutefois, les mécanismes d'inhibition désaminase-indépendants de LINE-1 par A3B, A3F, A3G et A3H restent à élucider, bien que l'on sache que l'oligomérisation d'A3G est importante pour la restriction de L1 [341-343, 346, 347].

Un exemple de mécanisme désaminase-dépendant de restriction de LINE-1 est fourni par A3A. Durant le processus d'intégration de L1, l'ADNc est exposé transitoirement après dégradation de l'amorce ARN, devenant accessible à l'activité désaminase d'A3A [348]. De manière intéressante, toutes les A3, et plus particulièrement A3A, A3B et A3G, sont capables d'inhiber la rétrotransposition des SINE, comme les éléments Alu. L'oligomérisation d'A3G est importante pour l'inhibition de la rétrotransposition des Alu [343] et A3G séquestre les Alu au sein des complexes HMM [151].

Chez l'humain, les rétrotransposons à LTR peuvent également être régulés par A3A, A3B, A3C, A3F et A3G *via* des mécanismes qui dépendent ou non de l'activité désaminase [349]. Dans le cas du rétroélément IAP (*Intracisternal A-Particle*), A3B et A3G éditent massivement les ADN rétrotranscrits d'IAP. Les mécanismes d'inhibition restent encore inconnus pour A3A, A3C et A3F [349]. L'hypermutation par les A3 d'un rétroélément juste après sa rétrotranscription pourrait altérer la stabilité de l'ADNc généré et entraîner sa dégradation [350], mais il est également possible qu'un rétroélément hypermuté puisse s'insérer au sein du génome ce qui aura pour effet d'accentuer la diversité génétique de la région génomique impliquée [351]. Une forte corrélation positive est retrouvée chez les mammifères entre l'accumulation de mutations G→A au sein des ERV et l'abondance de gènes *APOBEC3* [21]. Ainsi, A3G est très vraisemblablement à l'origine des hypermutations constatées au sein des rétrovirus endogènes humains (HERV) HERV-K60, HERV-KI ainsi qu'au sein de l'élément progéniteur de la famille HERV-K(HML2) [352, 353]. De plus, chez les mammifères l'abondance d'ERV au sein d'un génome semble positivement corrélée au nombre de gènes *APOBEC3*, à l'exception des muridés, du hérisson et de l'opossum. Par ailleurs, l'amplification des gènes *APOBEC3* chez les primates est survenue de manière concomitante à l'invasion majeure de leurs génomes par les ERV, ce qui suggère que les rétrovirus favorisent l'évolution des gènes *APOBEC3* [21].

Un schéma récapitulatif des fonctions des A3 au sein de la cellule est présenté *figure* 8.

APOBEC3 et perspectives thérapeutiques

Dans le cadre des infections par le VIH, les interactions entre Vif et les A3 sont envisagées comme cibles thérapeutiques. L'approche majoritaire vise à prévenir la dégradation des A3 dépendante de Vif pour rétablir leur

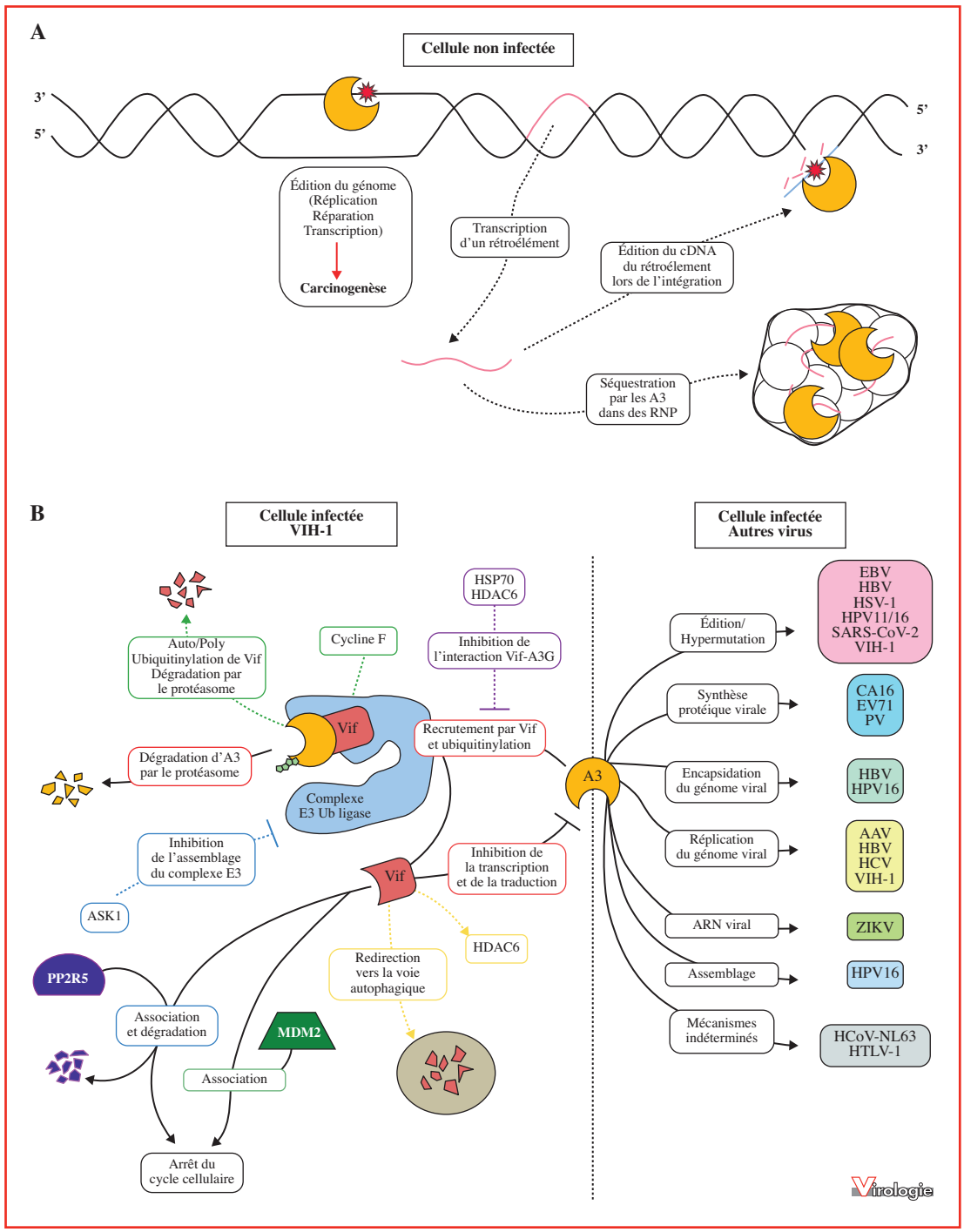


Figure 8. Vue générale des activités des APOBEC3. A) Dans une cellule non infectée, les A3 sont capables d'impacter le génome de la cellule lors des différents mécanismes impliquant l'ADN génomique (réplication, réparation, transcription), pouvant favoriser la carcinogenèse. Les A3 préviennent néanmoins la prolifération anarchique des rétroéléments en inhibant leur expansion. B) Dans le cas d'une infection virale, les A3 présentent de nombreuses activités de restriction (droite). Dans le cas d'une cellule infectée par le VIH-1 (gauche), les A3 sont prises en charge par la protéine Vif du VIH-1 et dégradées par le protéasome. Vif inhibe également la transcription et la traduction de certaines A3, et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en dégradant ou détournant différentes protéines cellulaires (flèches pleines). La cellule répond à la présence de Vif en monopolisant différents facteurs permettant sa dégradation ou l'inhibition de la formation du complexe E3-ubiquitine ligase permettant l'activité de Vif (flèches pointillées).

encapsidation au sein des virions afin qu'elles exercent leur capacité de désamination. Plusieurs études ont eu pour objectif d'identifier des molécules capables d'inhiber (i) la dimérisation de Vif [197, 354, 355] ; (ii) l'interaction directe entre Vif et A3F/G [356-358] ; ou encore (iii) l'interaction de Vif avec les autres composants du VCBCC [359-364].

Une deuxième approche envisagée consiste à augmenter la concentration d'A3G dans les cellules infectées en stimulant son expression ou en augmentant sa stabilité, de façon à favoriser son incorporation dans les particules virales [365-367].

Enfin, une approche de type thérapie génique a récemment été proposée afin de rétablir l'activité antivirale naturelle des A3. Cette approche fait intervenir un vecteur exprimant le mutant A3G-D128K, résistant à la dégradation par Vif, car incapable d'interagir avec cette dernière. Ce vecteur a permis d'empêcher *in vitro* la réplication virale dans des lignées T $CD4^+$ pendant au moins trois mois sans apparition de virus résistants [368].

Parallèlement, l'activité des APOBEC3 peut constituer une piste thérapeutique dans les traitements anti-cancéreux, par exemple dans la voie DDR en cas d'utilisation d'inhibiteurs d'ATR (voir § « Activités des APOBEC3 en absence d'infection et autres propriétés », section « Désamination au cours de la réplication de l'ADN cellulaire », pages 387-8) [59-61].

Conclusion

L'activité des protéines A3 a un rôle majeur dans les infections virales. Indépendamment ou non de leur activité enzymatique, les A3 exercent une restriction vis-à-vis de nombreux virus. Si la désamination du génome viral constitue l'activité principale des A3, l'inhibition de la rétrotranscriptase dans le cas du VIH-1 est un bel exemple de leur multifonctionnalité. Le fait que la protéine Vif du VIH-1 soit capable d'inhiber la quasi-totalité des A3, et pour certaines en affectant divers mécanismes (dégradation, transcription, traduction), dénote l'importance de cette famille de protéines dans la restriction virale. Toutefois, certaines A3 présentent des propriétés provirales révélant la complexité des interactions hôte-pathogène.

Les interactions entre les A3 et leurs inhibiteurs viraux constituent des cibles thérapeutiques de choix contre les infections virales. La valorisation clinique des protéines A3 est d'autant plus importante et intéressante dans le cas de virus tel que le VIH-1 où de nouvelles solutions thérapeutiques sont sans cesse recherchées pour répondre à l'apparition de résistances aux traitements. Enfin, des études récentes mettent en lumière l'implication des A3 dans la réplication de virus émergents (Zika, SARS-CoV-2) ce qui ouvre la possibilité de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'activité des A3 est aussi essentielle dans le contrôle des éléments transposables, chacune d'elles inhibant la réplication de divers rétroéléments et empêchant leur prolifération anarchique préjudiciable à l'intégrité du génome. Cependant, ces diverses propriétés des A3 ont un coût qui se traduit par un rôle plus ou moins prononcé dans l'oncogenèse. En effet, les A3 présentent une activité mutagène constitutive sur le génome de la cellule hôte qui peut contribuer à la variabilité génétique des cellules mais surtout aboutir à l'apparition et/ou au développement de nombreux cancers. En dépit de leur appartenance à la même famille d'enzymes, les A3 présentent des effets différents selon le type de cancer ainsi que des mécanismes d'actions différents dépendant ou non de leur activité catalytique. Les protéines A3A et A3B sont principalement impliquées dans le développement de cancers, même si des études récentes montrent qu'A3G pourrait jouer un rôle majeur dans certains d'entre eux. L'intérêt croissant pour cet axe d'étude devrait nous permettre de connaître précisément les mécanismes d'action des A3 dans la carcinogenèse et de proposer de nouveaux leviers thérapeutiques.

Remerciements. Nous remercions chaleureusement les rapporteurs pour leurs commentaires constructifs. Ce travail est soutenu par l'Agence nationale de recherche contre le sida et les hépatites virales (ANRS) et par Sidaction (JCP). BS a bénéficié d'un contrat de recherche post-doctoral de l'ANRS et Sidaction et CV d'un contrat doctoral du ministère de la Recherche et de l'Éducation supérieure.

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

Références

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 2018 ; 14 : 49.

2. Chemudupati M, Kenney AD, Bonifati S, Zani A, McMichael TM, Wu L, Yount JS. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2019 ; 1866 : 382-94.

3. Seissler T, Marquet R, Paillart JC. Hijacking of the ubiquitin/proteasome pathway by the hiv auxiliary proteins. *Viruses* 2017 ; 9 : 1-3.

4. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987 ; 50 : 831-40.

5. Teng B, Burant C, Davidson N. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 1993 ; 260 : 1816-9.

6. Lau PP, Zhu HJ, Baldini A, Charnsangavej C, Chan L. Dimeric structure of a human apolipoprotein B mRNA editing protein and cloning and chromosomal localization of its gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 ; 91 : 8522-6.

7. Liao W, Hong SH, Chan BHJ, Rudolph FB, Clark SC, Chan L. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 260 : 398-404.

8. Sato Y, Probst HC, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Neuberger MS, Rada C. Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 7111-8.

9. Sato Y, Ohtsubo H, Nihei N, Kaneko T, Sato Y, Adachi SI, *et al*. Apobec2 deficiency causes mitochondrial defects and mitophagy in skeletal muscle. *FASEB J* 2018 ; 32 : 1428-39.

10. Ohtsubo H, Sato Y, Suzuki T, Mizunoya W, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y. APOBEC2 negatively regulates myoblast differentiation in muscle regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 2017 ; 85 : 91-101.

11. Li A, Wu J, Zhai A, Qian J, Wang X, Qaria MA, *et al*. HBV triggers APOBEC2 expression through miR-122 regulation and affects the proliferation of liver cancer cells. *Int J Oncol* 2019 ; 55 : 1137-48.

12. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 2002 ; 79 : 285-96.

13. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002 ; 418 : 646-50.

14. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000 ; 102 : 553-63.

15. Arakawa H, HauschiLd J, Buerstedde JM. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 2002 ; 295 : 1301-6.

16. Choudhary M, Tamrakar A, Singh AK, Jain M, Jaiswal A, Kodgire P. AID Biology: A pathological and clinical perspective. *Int Rev Immunol* 2018 ; 37 : 37-56.

17. Rogozin IB, Basu MK, Jordan IK, Pavlov YI, Koonin EV. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 2005 ; 4 : 1281-5.

18. Marino D, Perković M, Hain A, Jaguva Vasudevan AA, Hofmann H, *et al*. APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0155422.

19. Conticello SG, Thomas CJF, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 2005 ; 22 : 367-77.

20. LaRue RS, Jónsson SR, Silverstein KAT, Lajoie M, Bertrand D, El-Mabrouk N, *et al*. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol* 2008 ; 9 : 104.

21. Ito J, Gifford RJ, Sato K. Retroviruses drive the rapid evolution of mammalian APOBEC3 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020 ; 117 : 610-8.

22. LaRue RS, Andrésdóttir V, Blanchard Y, Conticello SG, Derse D, Emerman M, Greene WC, Jónsson SR, Landau NR, Löchelt M, Malik HS, Malim MH, Münk C, O'Brien SJ, Pathak VK, Strebel K, Wain-Hobson S, Yu X-F, Yuhki N, Harris RS. Guidelines for Naming Nonprimate APOBEC3 Genes and Proteins. *J Virol* 2009 ; 83 : 494-7.

23. Navarro F, Bollman B, Chen H, König R, Yu Q, Chiles K, Landau NR. Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 2005 ; 333 : 374-86.

24. Morse M, Naufer MN, Feng Y, Chelico L, Rouzina I, Williams MC. HIV restriction factor APOBEC3G binds in multiple steps and conformations to search and deaminate single-stranded DNA. *Elife* 2019 ; 8 : e52649.

25. Salter JD, Polevoda B, Bennett RP, Smith HC. Regulation of Antiviral Innate Immunity Through APOBEC Ribonucleoprotein Complexes. In : Harris JR, Marles-Wright J (eds). *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function*. Cham : Springer Nature Switzerland AG, 2019. pp. 193-220.

26. Delviks-Frankenberry KA, Desimmie BA, Pathak VK. Structural insights into APOBEC3-mediated lentiviral restriction. *Viruses* 2020 ; 12 : 587.

27. Holden LG, Prochnow C, Chang YP, Bransteitter R, Chelico L, Sen U, *et al*. Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* 2008 ; 456 : 121-4.

28. Shi K, Carpenter MA, Kurahashi K, Harris RS, Aihara H. Crystal structure of the DNA deaminase APOBEC3B catalytic domain. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 28120-30.

29. Rathore A, Carpenter MA, Demir Ö, Ikeda T, Li M, Shaban NM, *et al*. The local dinucleotide preference of APOBEC3G can be altered from 5'-CC to 5'-TC by a single amino acid substitution. *J Mol Biol* 2013 ; 425 : 4442-54.

30. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci* 2016 ; 41 : 578-94.

31. Sharma S, Patnaik SK, Thomas Taggart R, Kannisto ED, Enriquez SM, Gollnick P, Baysal BE. APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 6881.

32. Sharma S, Patnaik SK, Taggart RT, Baysal BE. The double-domain cytidine deaminase APOBEC3G is a cellular site-specific RNA editing enzyme. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 39100.

33. Sharma S, Wang J, Alqassim E, Portwood S, Cortes Gomez E, Maguire O, *et al*. Mitochondrial hypoxic stress induces widespread RNA editing by APOBEC3G in natural killer cells. *Genome Biol* 2019 ; 20 : 37.

34. Harjes E, Gross PJ, Chen KM, Lu Y, Shindo K, Nowarski R, *et al*. An Extended Structure of the APOBEC3G Catalytic Domain Suggests a Unique Holoenzyme Model. *J Mol Biol* 2009 ; 389 : 819-32.

35. Shandilya SMD, Nalam MNL, Nalivaika EA, Gross PJ, Valesano JC, Shindo K, *et al*. Crystal Structure of the APOBEC3G Catalytic Domain Reveals Potential Oligomerization Interfaces. *Structure* 2010 ; 18 : 28-38.

36. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, *et al*. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003 ; 113 : 803-9.

37. Hultquist JF, Lengyel JA, Refsland EW, LaRue RS, Lackey L, Brown WL, Harris RS. Human and Rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H Demonstrate a Conserved Capacity To Restrict Vif-Deficient HIV-1. *J Virol* 2011 ; 85 : 11220-34.

38. Desimmie BA, Burdick RC, Izumi T, Doi H, Shao W, Alvord WG, *et al*. APOBEC3 proteins can copackage and comutate HIV-1 genomes. *Nucleic Acids Res* 2016 ; 44 : 7848-65.

39. Bohn JA, DaSilva J, Kharytonchyk S, Mercedes M, Vosters J, Telesnitsky A, *et al*. Flexibility in Nucleic Acid Binding Is Central to APOBEC3H Antiviral Activity. *J Virol* 2019 ; 93 : e01275-1319.

40. Kohli RM, Abrams SR, Gajula KS, Maul RW, Gearhart PJ, Stivers JT. A portable hot spot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 22898-904.

41. Carpenter MA, Rajagurubandara E, Wijesinghe P, Bhagwat AS. Determinants of sequence-specificity within human AID and APOBEC3G. *DNA Repair (Amst)* 2010 ; 9 : 579-87.

42. Holtz CM, Sadler HA, Mansky LM. APOBEC3G cytosine deamination hotspots are defined by both sequence context and single-stranded DNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 6139-48.

43. McDaniel YZ, Wang D, Love RP, Adolph MB, Mohammadzadeh N, Chelico L, Mansky LM. Deamination hotspots among APOBEC3 family members are defined by both target site sequence context and ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 2020 ; 48 : 1353-71.

44. Yang H, Ito F, Wolfe AD, Li S, Mohammadzadeh N, Love RP, *et al*. Understanding the structural basis of HIV-1 restriction by the full length double-domain APOBEC3G. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 632.

45. Azimi FC, Lee JE. Structural perspectives on HIV-1 Vif and APOBEC3 restriction factor interactions. *Protein Sci* 2020 ; 29 : 391-406.

46. Koning FA, Newman ENC, Kim E-Y, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Malim MH. Defining APOBEC3 Expression Patterns in Human Tissues and Hematopoietic Cell Subsets. *J Virol* 2009 ; 83 : 9474-85.

47. Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, Harris RS. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: Implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 4274-84.

48. Seplyarskiy VB, Soldatov RA, Popadin KY, Antonarakis SE, Bazykin GA, Nikolaev SI. APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication. *Genome Res* 2016 ; 26 : 174-82.

49. Suspène R, Aynaud MM, Vartanian JP, Wain-Hobson S. Efficient Deamination of 5-Methylcytidine and 5-Substituted Cytidine Residues in DNA by Human APOBEC3A Cytidine Deaminase. *PLoS One* 2013 ; 8 : e63461.

50. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, *et al*. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 2012 ; 149 : 979-93.

51. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, *et al*. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 970-6.

52. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 977-83.

53. Roberts SA, Sterling J, Thompson C, Harris S, Mav D, Shah R, *et al*. Clustered Mutations in Yeast and in Human Cancers Can Arise from Damaged Long Single-Strand DNA Regions. *Mol Cell* 2012 ; 46 : 424-35.

54. Taylor BJM, Nik-Zainal S, Wu YL, Stebbings LA, Raine K, Campbell PJ, *et al*. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *Elife* 2013 ; 2 : e00534.

55. Bhagwat AS, Hao W, Townes JP, Lee H, Tang H, Foster PL. Strand-biased cytosine deamination at the replication fork causes cytosine to thymine mutations in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113 : 2176-81.

56. Hoopes JI, Cortez LM, Mertz TM, Malc EP, Mieczkowski PA, Roberts SA. APOBEC3A and APOBEC3B Preferentially Deaminate the Lagging Strand Template during DNA Replication. *Cell Rep* 2016 ; 14 : 1273-82.

57. Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, Covington KR, Shinbrot E, Hess JM, *et al*. Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. *Cell* 2016 ; 164 : 538-49.

58. Green AM, Landry S, Budagyan K, Avgousti DC, Shalhout S, Bhagwat AS, Weitzman MD. APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication. *Cell Cycle* 2016 ; 15 : 998-1008.

59. Green AM, Budagyan K, Hayer KE, Reed MA, Savani MR, Wertheim GB, Weitzman MD. Cytosine deaminase APOBEC3A sensitizes leukemia cells to inhibition of the DNA replication checkpoint. *Cancer Res* 2017 ; 77 : 4579-88.

60. Buisson R, Lawrence MS, Benes CH, Zou L. APOBEC3A and APOBEC3B activities render cancer cells susceptible to ATR inhibition. *Cancer Res* 2017 ; 77 : 4567-78.

61. Nikkilä J, Kumar R, Campbell J, Brandsma I, Pemberton HN, Wallberg F, *et al*. Elevated APOBEC3B expression drives a kataegic-like mutation signature and replication stress-related therapeutic vulnerabilities in p53-defective cells. *Br J Cancer* 2017 ; 117 : 113-23.

62. Elango R, Osia B, Harcy V, Malc E, Mieczkowski PA, Roberts SA, Malkova A. Repair of base damage within break-induced replication intermediates promotes kataegis associated with chromosome rearrangements. *Nucleic Acids Res* 2019 ; 47 : 9666-84.

63. Lei L, Chen H, Xue W, Yang B, Hu B, Wei J, *et al*. APOBEC3 induces mutations during repair of CRISPR-Cas9-generated DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 2018 ; 25 : 45-52.

64. Taylor BJ, Wu YL, Rada C. Active RNAP pre-initiation sites are highly mutated by cytidine deaminases in yeast, with AID targeting small RNA genes. *Elife* 2014 ; 3 : e03553.

65. Saini N, Roberts SA, Sterling JF, Malc EP, Mieczkowski PA, Gordenin DA. APOBEC3B cytidine deaminase targets the non-transcribed strand of tRNA genes in yeast. *DNA Repair (Amst)* 2017 ; 53 : 4-14.

66. Sharma S, Patnaik SK, Kemer Z, Baysal BE. Transient overexpression of exogenous APOBEC3A causes C-to-U RNA editing of thousands of genes. *RNA Biol* 2017 ; 14 : 603-10.

67. Sharma S, Baysal BE. Stem-loop structure preference for site-specific RNA editing by APOBEC3A and APOBEC3G. *PeerJ* 2017 ; 5 : e4136.

68. Ng JCF, Quist J, Grigoriadis A, Malim MH, Fraternali F. Pan-cancer transcriptomic analysis dissects immune and proliferative functions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Nucleic Acids Res* 2019 ; 47 : 1178-94.

69. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, *et al*. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013 ; 500 : 415-21.

70. Chan K, Roberts SA, Klimczak LJ, Sterling JF, Saini N, Malc EP, Kim J, Kwiatkowski DJ, Fargo DC, Mieczkowski PA, Getz G, Gordenin DA. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1067-72.

71. Kidd JM, Newman TL, Tuzun E, Kaul R, Eichler EE. Population Stratification of a Common APOBEC Gene Deletion Polymorphism. *PLoS Genet* 2007 ; 3 : e63.

72. Xuan D, Li G, Cai Q, Deming-Halverson S, Shrubsole MJ, Shu XO, *et al*. APOBEC3 deletion polymorphism is associated with breast cancer risk among women of European ancestry. *Carcinogenesis* 2013 ; 34 : 2240-3.

73. Qi G, Xiong H, Zhou C. APOBEC3 deletion polymorphism is associated with epithelial ovarian cancer risk among Chinese women. *Tumor Biol* 2014 ; 35 : 5723-6.

74. Starrett GJ, Luengas EM, McCann JL, Ebrahimi D, Temiz NA, Love RP, *et al*. The DNA cytosine deaminase APOBEC3H haplotype i likely contributes to breast and lung cancer mutagenesis. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 12918.

75. Jalili P, Bowen D, Langenbucher A, Park S, Aguirre K, Corcoran RB, *et al*. Quantification of ongoing APOBEC3A activity in tumor cells by monitoring RNA editing at hotspots. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 2971.

76. Cortez LM, Brown AL, Dennis MA, Collins CD, Brown AJ, Mitchell D, *et al*. APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer. *PLOS Genet* 2019 ; 15 : e1008545.

77. Kim Y, Sun DS, Yoon J, Ko YH, Won HS, Kim JS. Clinical implications of APOBEC3A and 3B expression in patients with breast cancer. *PLoS One* 2020 ; 15 : e0230261.

78. Menendez D, Nguyen TA, Snipe J, Resnick MA. The cytidine deaminase APOBEC3 family is subject to transcriptional regulation by p53. *Mol Cancer Res* 2017 ; 15 : 735-43.

79. Periyasamy M, Singh AK, Gemma C, Kranjec C, Farzan R, Leach DA, *et al*. P53 controls expression of the DNA deaminase APOBEC3B to limit its potential mutagenic activity in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 11056-69.

80. Ma W, Ho DWH, Sze KMF, Tsui YM, Chan LK, Lee JMF, Ng IOL. APOBEC3B promotes hepatocarcinogenesis and metastasis through novel deaminase-independent activity. *Mol Carcinog* 2019 ; 58 : 643-53.

81. Wang D, Li X, Li J, Lu Y, Zhao S, Tang X, *et al*. APOBEC3B interaction with PRC2 modulates microenvironment to promote HCC progression. *Gut* 2019 ; 68 : 1846-57.

82. Wu J, Pan TH, Xu S, Jia LT, Zhu LL, Mao JS, *et al*. The virus-induced protein APOBEC3G inhibits anoikis by activation of Akt kinase in pancreatic cancer cells. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 12230.

83. Vieira VC, Leonard B, White EA, Starrett GJ, Temiz NA, Lorenz LD, *et al*. Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *MBio* 2014 ; 5 : e02234-2314.

84. Argyris PP, Wilkinson PE, Jarvis MC, Magliocca KR, Patel MR, Vogel RI, *et al*. Endogenous APOBEC3B overexpression characterizes HPV-positive and HPV-negative oral epithelial dysplasias and head and neck cancers. *Mod Pathol* 2020. https://doi.org/10.1038/s41379-020-0617-x.

85. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Yugawa T, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I. Human Papillomavirus 16 E6 Upregulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J Virol* 2017 ; 91 : e02413-2416.

86. Westrich JA, Warren CJ, Klausner MJ, Guo K, Liu C-W, Santiago ML, Pyeon D. Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. *J Virol* 2018 ; 92 : e01318-1417.

87. Serebrenik AA, Starrett GJ, Leenen S, Jarvis MC, Shaban NM, Salamango DJ, *et al*. The deaminase APOBEC3B triggers the death of cells lacking uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019 ; 116 : 22158-63.

88. Serebrenik AA, Argyris PP, Jarvis MC, Brown WL, Bazzaro M, Vogel RI, *et al*. The DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B is a Molecular Determinant of Platinum Responsiveness in Clear Cell Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2020 ; 26 : 3397-407.

89. Sieuwerts AM, Willis S, Burns MB, Look MP, Gelder MEM, Van MEM, Schlicker A, *et al*. Elevated APOBEC3B Correlates with Poor Outcomes for Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancers. *Horm Cancer* 2014 ; 5 : 405-13.

90. Udquim K-I, Zettelmeyer C, Banday AR, Lin SH-Y, Prokunina-Olsson L. APOBEC3B expression in breast cancer cell lines and tumors depends on the estrogen receptor status. *Carcinogenesis* 2020 ; bgaa002.

91. Periyasamy M, Patel H, Lai CF, Nguyen VTM, Nevedomskaya E, Harrod A, *et al*. APOBEC3B-Mediated Cytidine Deamination Is Required for Estrogen Receptor Action in Breast Cancer. *Cell Rep* 2015 ; 13 : 108-21.

92. Wang K, Li L, Fu L, Yuan Y, Dai H, Zhu T, Zhou Y, Yuan F. Integrated Bioinformatics Analysis the Function of RNA Binding Proteins (RBPs) and Their Prognostic Value in Breast Cancer. *Front Pharmacol* 2019 ; 10 : 140.

93. Tao L, Jiang Z, Xu M, Xu T, Liu Y. Induction of APOBEC3C Facilitates the Genotoxic Stress-Mediated Cytotoxicity of Artesunate. *Chem Res Toxicol* 2019 ; 32 : 2526-37.

94. Yang Z, Lu Y, Xu Q, Zhuang L, Tang B, Chen X. Correlation of APOBEC3 in tumor tissues with clinico-pathological features and survival from hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Int J Clin Exp Med* 2015 ; 8 : 7762-9.

95. Jais JP, Haioun C, Molina TJ, Rickman DS, de Reynies A, Berger F, *et al*. The expression of 16 genes related to the cell of origin and immune response predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP and rituximab. *Leukemia* 2008 ; 22 : 1917-24.

96. Nowarski R, Wilner OI, Cheshin O, Shahar OD, Kenig E, Baraz L, *et al*. APOBEC3G enhances lymphoma cell radioresistance by promoting cytidine deaminase-dependent DNA repair. *Blood* 2012 ; 120 : 366-75.

97. Wang Y, Wu S, Zheng S, Wang S, Wali A, Ezhilarasan R, *et al*. APOBEC3G acts as a therapeutic target in mesenchymal gliomas by sensitizing cells to radiation-induced cell death. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 54285-96.

98. Leonard B, Starrett GJ, Maurer MJ, Oberg AL, Van Bockstal M, Van Dorpe J, *et al*. APOBEC3G expression correlates with T-cell infiltration and improved clinical outcomes in high-grade serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2016 ; 22 : 4746-55.

99. Browne EP, Allers C, Landau NR. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology* 2009 ; 387 : 313-21.

100. Kijak GH, Janini LM, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Arroyo MA, Robb ML, *et al*. Variable contexts and levels of hypermutation in HIV-1 proviral genomes recovered from primary peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 2008 ; 376 : 101-11.

101. Piantadosi A, Humes D, Chohan B, McClelland RS, Overbaugh J. Analysis of the Percentage of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Sequences That Are Hypermutated and Markers of Disease Progression in a Longitudinal Cohort, Including One Individual with a Partially Defective Vif. *J Virol* 2009 ; 83 : 7805-14.

102. Binka M, Ooms M, Steward M, Simon V. The Activity Spectrum of Vif from Multiple HIV-1 Subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. *J Virol* 2012 ; 86 : 49-59.

103. Chaipan C, Smith JL, Hu W-S, Pathak VK. APOBEC3G Restricts HIV-1 to a Greater Extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in Human Primary CD4+ T Cells and Macrophages. *J Virol* 2013 ; 87 : 444-53.

104. Ebrahimi D, Richards CM, Carpenter MA, Wang J, Ikeda T, Becker JT, *et al*. Genetic and mechanistic basis for APOBEC3H alternative splicing, retrovirus restriction, and counteraction by HIV-1 protease. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 4137.

105. Wang X, Abudu A, Son S, Dang Y, Venta PJ, Zheng Y-H. Analysis of Human APOBEC3H Haplotypes and Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *J Virol* 2011 ; 85 : 3142-52.

106. Takei H, Fukuda H, Pan G, Yamazaki H, Matsumoto T, Kazuma Y, *et al*. Alternative splicing of APOBEC3D generates functional diversity and its role as a DNA mutator. *Int J Hematol* 2020 ; https://doi.org/10.1007/s12185-020-02904-y.

107. Villanova F, Barreiros M, Leal É. Is the tryptophan codon of gene vif the Achilles' heel of HIV-1? *PLoS One* 2020 ; 15 : e0225563.

108. Ara A, Love RP, Chelico L. Different Mutagenic Potential of HIV-1 Restriction Factors APOBEC3G and APOBEC3F Is Determined by Distinct Single-Stranded DNA Scanning Mechanisms. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1004024.

109. Ara A, Love RP, Follack TB, Ahmed KA, Adolph MB, Chelico L. Mechanism of Enhanced HIV Restriction by Virion Coencapsidated Cytidine Deaminases APOBEC3F and APOBEC3G. *J Virol* 2017 ; 91 : e02230-2316.

110. Nowarski R, Prabhu P, Kenig E, Smith Y, Britan-Rosich E, Kotler M. APOBEC3G inhibits HIV-1 RNA elongation by inactivating the viral trans-activation response element. *J Mol Biol* 2014 ; 426 : 2840-53.

111. Russell RA, Moore MD, Hu WS, Pathak VK. APOBEC3G induces a hypermutation gradient: Purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology* 2009 ; 6 : 16.

112. Yang B, Chen K, Zhang C, Huang S, Zhang H. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 11667-75.

113. Kaiser SM, Emerman M. Uracil DNA Glycosylase Is Dispensable for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication and Does Not Contribute to the Antiviral Effects of the Cytidine Deaminase Apobec3G. *J Virol* 2006 ; 80 : 875-82.

114. Mbisa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweiler IJ, Svarovskaia ES, *et al*. Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNAs Produced in the Presence of APOBEC3G Exhibit Defects in Plus-Strand DNA Transfer and Integration. *J Virol* 2007 ; 81 : 7099-110.

115. Pollpeter D, Parsons M, Sobala AE, Coxhead S, Lang RD, Bruns AM, *et al*. Deep sequencing of HIV-1 reverse transcripts reveals the multifaceted antiviral functions of APOBEC3G. *Nat Microbiol* 2018 ; 3 : 220-33.

116. Von Hippel PH, Berg OG. Facilitated target location in biological systems. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 675-8.

117. Chelico L, Pham P, Calabrese P, Goodman MF. APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' → 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 2006 ; 13 : 392-9.

118. Nowarski R, Britan-Rosich E, Shiloach T, Kotler M. Hypermutation by intersegmental transfer of APOBEC3G cytidine deaminase. *Nat Struct Mol Biol* 2008 ; 15 : 1059-66.

119. Feng Y, Love RP, Ara A, Baig TT, Adolph MB, Chelico L. Natural polymorphisms and Oligomerization of Human APOBEC3H contribute to single-stranded DNA scanning ability. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 27188-203.

120. Suspène R, Rusniok C, Vartanian JP, Wain-Hobson S. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res* 2006 ; 34 : 4677-84.

121. Wurtzer S, Goubard A, Mammano F, Saragosti S, Lecossier D, Hance AJ, Clavel F. Functional Central Polypurine Tract Provides Downstream Protection of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome from Editing by APOBEC3G and APOBEC3B. *J Virol* 2006 ; 80 : 3679-83.

122. Love RP, Xu H, Chelico L. Biochemical analysis of hypermutation by the deoxycytidine deaminase APOBEC3A. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 30812-22.

123. Adolph MB, Love RP, Feng Y, Chelico L. Enzyme cycling contributes to efficient induction of genome mutagenesis by the cytidine deaminase APOBEC3B. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 11925-40.

124. Adolph MB, Ara A, Feng Y, Wittkopp CJ, Emerman M, Fraser JS, Chelico L. Cytidine deaminase efficiency of the lentiviral viral restriction factor APOBEC3C correlates with dimerization. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 3378-94.

125. Mohammadzadeh N, Love RP, Gibson R, Arts EJ, Poon AFY, Chelico L. Role of co-expressed APOBEC3F and APOBEC3G in inducing HIV-1 drug resistance. *Heliyon* 2019 ; 5 : e01498.

126. Bishop KN, Holmes RK, Malim MH. Antiviral Potency of APOBEC Proteins Does Not Correlate with Cytidine Deamination. *J Virol* 2006 ; 80 : 8450-8.

127. Iwatani Y, Chan DSB, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, *et al*. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 7096-108.

128. Holmes RK, Koning FA, Bishop KN, Malim MH. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation: Comparisons with APOBEC3G. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 2587-95.

129. Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 2008 ; 4 : e1000231.

130. Wang X, Ao Z, Chen L, Kobinger G, Peng J, Yao X. The Cellular Antiviral Protein APOBEC3G Interacts with HIV-1 Reverse Transcriptase and Inhibits Its Function during Viral Replication. *J Virol* 2012 ; 86 : 3777-86.

131. Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart J-C, Marquet R. Tumultuous Relationship between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Infectivity Factor (Vif) and the Human APOBEC-3G and APOBEC-3F Restriction Factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009 ; 73 : 211-32.

132. Gillick K, Pollpeter D, Phalora P, Kim E-Y, Wolinsky SM, Malim MH. Suppression of HIV-1 Infection by APOBEC3 Proteins in Primary Human CD4 + T Cells Is Associated with Inhibition of Processive Reverse Transcription as Well as Excessive Cytidine Deamination. *J Virol* 2013 ; 87 : 1508-17.

133. Mbisa JL, Bu W, Pathak VK. APOBEC3F and APOBEC3G Inhibit HIV-1 DNA Integration by Different Mechanisms. *J Virol* 2010 ; 84 : 5250-9.

134. Huthoff H, Autore F, Gallois-Montbrun S, Fraternali F, Malim MH. RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G Is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000330.

135. Bennett RP, Salter JD, Liu X, Wedekind JE, Smith HC. APOBEC3G subunits self-associate via the C-terminal deaminase domain. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 33329-36.

136. Morse M, Huo R, Feng Y, Rouzina I, Chelico L, Williams MC. Dimerization regulates both deaminase-dependent and deaminase-independent HIV-1 restriction by APOBEC3G. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 597.

137. Xu H, Chertova E, Chen J, Ott DE, Roser JD, Hu WS, Pathak VK. Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* 2007 ; 360 : 247-56.

138. Adolph MB, Ara A, Chelico L. APOBEC3 Host Restriction Factors of HIV-1 Can Change the Template Switching Frequency of Reverse Transcriptase. *J Mol Biol* 2019 ; 431 : 1339-52.

139. Wichroski MJ, Robb GB, Rana TM. Human Retroviral Host Restriction Factors APOBEC3G and APOBEC3F Localize to mRNA Processing Bodies. *PLoS Pathog* 2006 ; 2 : e41.

140. Muckenfuss H, Hamdorf M, Held U, Perkovic M, Löwer J, Cichutek K, *et al*. APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 22161-72.

141. Stenglein MD, Matsuo H, Harris RS. Two Regions within the Amino-Terminal Half of APOBEC3G Cooperate To Determine Cytoplasmic Localization. *J Virol* 2008 ; 82 : 9591-9.

142. Bennett RP, Presnyak V, Wedekind JE, Smith HC. Nuclear exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 7320-7.

143. Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH. Antiviral Protein APOBEC3G Localizes to Ribonucleoprotein Complexes Found in P Bodies and Stress Granules. *J Virol* 2007 ; 81 : 2165-78.

144. Gallois-Montbrun S, Holmes RK, Swanson CM, Fernández-Ocaña M, Byers HL, Ward MA, *et al*. Comparison of Cellular Ribonucleoprotein Complexes Associated with the APOBEC3F and APOBEC3G Antiviral Proteins. *J Virol* 2008 ; 82 : 5636-42.

145. Kozak SL, Marin M, Rose KM, Bystrom C, Kabat D. The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 29105-19.

146. Cougot N, Babajko S, Séraphin B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 2004 ; 165 : 31-40.

147. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fitzler MJ, *et al*. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 2005 ; 169 : 871-84.

148. Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 ; 4 : a012286.

149. Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol* 2016 ; 26 : 668-79.

150. Standart N, Weil D. P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends Genet* 2018 ; 34 : 612-26.

151. Chiu YL, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, *et al*. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 15588-93.

152. Soros VB, Yonemoto W, Greene WC. Newly Synthesized APOBEC3G Is Incorporated into HIV Virions, Inhibited by HIV RNA, and Subsequently Activated by RNase H. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e15.

153. Wang X, Dolan PT, Dang Y, Zheng YH. Biochemical differentiation of APOBEC3F and APOBEC3G proteins associated with HIV-1 life cycle. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 1585-94.

154. Wang T, Tian C, Zhang W, Luo K, Sarkis PTN, Yu L, *et al*. 7SL RNA Mediates Virion Packaging of the Antiviral Cytidine Deaminase APOBEC3G. *J Virol* 2007 ; 81 : 13112-24.

155. Bélanger K, Savoie M, Rosales Gerpe MC, Couture JF, Langlois MA. Binding of RNA by APOBEC3G controls deamination-independent restriction of retroviruses. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 7438-52.

156. Huang J, Liang Z, Yang B, Tian H, Ma J, Zhang H. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 33632-40.

157. Liu C, Zhang X, Huang F, Yang B, Li J, Liu B, *et al*. APOBEC3G inhibits microRNA-mediated repression of translation by interfering with the interaction between Argonaute-2 and MOV10. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 29373-83.

158. Ali S, Karki N, Bhattacharya C, Zhu R, MacDuff DA, Stenglein MD, *et al*. APOBEC3 inhibits DEAD-END function to regulate microRNA activity. *BMC Mol Biol* 2013 ; 14 : 16.

159. Ma J, Li X, Xu J, Zhang Q, Liu Z, Jia P, *et al*. The Roles of APOBEC3G Complexes in the Incorporation of APOBEC3G into HIV-1. *PLoS One* 2013 ; 8 : e74892.

160. Huthoff H, Malim MH. Identification of Amino Acid Residues in APOBEC3G Required for Regulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif and Virion Encapsidation. *J Virol* 2007 ; 81 : 3807-15.

161. Bulliard Y, Turelli P, Röhrig UF, Zoete V, Mangeat B, Michielin O, Trono D. Functional Analysis and Structural Modeling of Human APOBEC3G Reveal the Role of Evolutionarily Conserved Elements in the Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Alu Transposition. *J Virol* 2009 ; 83 : 12611-21.

162. Zhang W, Du J, Yu K, Wang T, Yong X, Yu X-F. Association of Potent Human Antiviral Cytidine Deaminases with 7SL RNA and Viral RNP in HIV-1 Virions. *J Virol* 2010 ; 84 : 12903-13.

163. Li J, Chen Y, Li M, Carpenter MA, McDougle RM, Luengas EM, *et al*. APOBEC3 multimerization correlates with HIV-1 packaging and restriction activity in living cells. *J Mol Biol* 2014 ; 426 : 1296-307.

164. Fukuda H, Li S, Sardo L, Smith JL, Yamashita K, Sarca AD, *et al*. Structural determinants of the APOBEC3G N-terminal domain for HIV-1 RNA association. *Front Cell Infect Microbiol* 2019 ; 9 : 129.

165. Song C, Sutton L, Johnson ME, D'Aquila RT, Donahue JP. Signals in APOBEC3F N-terminal and C-terminal deaminase domains each contribute to encapsidation in HIV-1 virions and are both required for HIV-1 restriction. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 16965-74.

166. Apolonia L, Schulz R, Curk T, Rocha P, Swanson CM, Schaller T, *et al*. Promiscuous RNA Binding Ensures Effective Encapsidation of APOBEC3 Proteins by HIV-1. *PLOS Pathog* 2015 ; 11 : e1004609.

167. Zennou V, Perez-Caballero D, Göttlinger H, Bieniasz PD. APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J Virol* 2004 ; 78 : 12058-61.

168. Schäfer A, Bogerd HP, Cullen BR. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* 2004 ; 328 : 163-8.

169. Svarovskaia ES, Xu H, Mbisa JL, Barr R, Gorelick RJ, Ono A, *et al*. Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 35822-8.

170. Khan MA, Kao S, Miyagi E, Takeuchi H, Goila-Gaur R, Opi S, *et al*. Viral RNA Is Required for the Association of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleoprotein Complexes. *J Virol* 2005 ; 79 : 5870-4.

171. Itano MS, Arnion H, Wolin SL, Simon SM. Recruitment of 7SL RNA to assembling HIV-1 virus-like particles. *Traffic* 2018 ; 19 : 36-43.

172. York A, Kutluay SB, Errando M, Bieniasz PD. The RNA Binding Specificity of Human APOBEC3 Proteins Resembles That of HIV-1 Nucleocapsid. *PLOS Pathog* 2016 ; 12 : e1005833.

173. Kutluay SB, Zang T, Blanco-Melo D, Powell C, Jannain D, Errando M, *et al*. Global changes in the RNA binding specificity of HIV-1 gag regulate virion genesis. *Cell* 2014 ; 159 : 1096-109.

174. Dussart S, Douaisi M, Courcoul M, Bessou G, Vigne R, Decroly E. APOBEC3G ubiquitination by Nedd4-1 favors its packaging into HIV-1 particles. *J Mol Biol* 2005 ; 345 : 547-58.

175. Douaisi M, Dussart S, Courcoul M, Bessou G, Lerner EC, Decroly E, *et al*. The tyrosine kinases Fyn and Hck favor the recruitment of tyrosine-phosphorylated APOBEC3G into vif-defective HIV-1 particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 329 : 917-24.

176. Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD, Bieniasz PD. Natural Variation in Vif: Differential Impact on APOBEC3G/3F and a Potential Role in HIV-1 Diversification. *PLoS Pathog* 2005 ; 1 : e6.

177. Mulder LCF, Harari A, Simon V. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 5501-6.

178. Casartelli N, Guivel-Benhassine F, Bouziat R, Brandler S, Schwartz O, Moris A. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 39-49.

179. Brumme ZL, John M, Carlson JM, Brumme CJ, Chan D, Brockman MA, *et al*. HLA-Associated Immune Escape Pathways in HIV-1 Subtype B Gag. *Pol and Nef Proteins. PLoS One* 2009 ; 4 : e6687.

180. Novitsky V, Cao H, Rybak N, Gilbert P, McLane MF, Gaolekwe S, *et al*. Magnitude and Frequency of Cytotoxic T-Lymphocyte Responses: Identification of Immunodominant Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C. *J Virol* 2002 ; 76 : 10155-68.

181. Monajemi M, Woodworth CF, Zipperlen K, Gallant M, Grant MD, Larijani M. Positioning of APOBEC3G/F Mutational Hotspots in the Human Immunodeficiency Virus Genome Favors Reduced Recognition by CD8+ T Cells. *PLoS One* 2014 ; 9 : e93428.

182. Squires KD, Monajemi M, Woodworth CF, Grant MD, Larijani M. Impact of APOBEC mutations on CD8+ T cell recognition of HIV epitopes varies depending on the restricting HLA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015 ; 70 : 172-8.

183. Grant M, Larijani M. Evasion of adaptive immunity by HIV through the action of host APOBEC3G/F enzymes. *AIDS Res Ther* 2017 ; 14 : 44.

184. Kim EY, Lorenzo-Redondo R, Little SJ, Chung YS, Phalora PK, Maljkovic Berry I, *et al*. Human APOBEC3 Induced Mutation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Contributes to Adaptation and Evolution in Natural Infection. *PLoS Pathog* 2014 ; 10.

185. Nakano Y, Aso H, Soper A, Yamada E, Moriwaki M, Juarez-Fernandez G, *et al*. A conflict of interest: The evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology* 2017 ; 14 : 31.

186. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 1986 ; 321 : 412-7.

187. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 1988 ; 328 : 728-30.

188. Michaels FH, Hattori N, Gallo RC, Franchini G. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vif Protein Is Located in the Cytoplasm of Infected Cells and Its Effect on Viral Replication Is Equivalent in HIV-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993 ; 9 : 1025-30.

189. Smith JL, Pathak VK. Identification of Specific Determinants of Human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African Green Monkey APOBEC3F That Interact with HIV-1 Vif. *J Virol* 2010 ; 84 : 12599-608.

190. Dang Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng YH. Identification of APOBEC3DE as Another Antiretroviral Factor from the Human APOBEC Family. *J Virol* 2006 ; 80 : 10522-33.

191. Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 2004 ; 23 : 2451-8.

192. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1404-7.

193. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, *et al*. Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science* 2003 ; 302 : 1056-60.

194. Li MMH, Wu LI, Emerman M. The Range of Human APOBEC3H Sensitivity to Lentiviral Vif Proteins. *J Virol* 2010 ; 84 : 88-95.

195. Yang S, Sun Y, Zhang H. The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: A requirement for Vif function in the viral life cycle. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 4889-93.

196. Auclair JR, Green KM, Shandilya S, Evans JE, Somasundaran M, Schiffer CA. Mass spectrometry analysis of HIV-1 Vif reveals an increase in ordered structure upon oligomerization in regions necessary for viral infectivity. *Proteins Struct Funct Genet* 2007 ; 69 : 270-84.

197. Yang B, Gao L, Li L, Lu Z, Fan X, Patel CA, Pomerantz RJ, DuBois GC, Zhang H. Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 6596-602.

198. Batisse J, Guerrero SX, Bernacchi S, Richert L, Godet J, Goldschmidt V, *et al*. APOBEC3G Impairs the Multimerization of the HIV-1 Vif Protein in Living Cells. *J Virol* 2013 ; 87 : 6492-506.

199. Simon JHM, Carpenter EA, Fouchier RAM, Malim MH. Vif and the p55Gag Polyprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Are Present in Colocalizing Membrane-Free Cytoplasmic Complexes. *J Virol* 1999 ; 73 : 2667-74.

200. Zhang H, Pomerantz RJ, Dornadula G, Sun Y. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is an Integral Component of an mRNP Complex of Viral RNA and Could Be Involved in the Viral RNA Folding and Packaging Process. *J Virol* 2000 ; 74 : 8252-61.

201. Simon JH, Fouchier RA, Southerling TE, Guerra CB, Grant CK, Malim MH. The Vif and Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 colocalize in infected human T cells. *J Virol* 1997 ; 71 : 5259-67.

202. Bouyac M, Courcoul M, Bertoia G, Baudat Y, Gabuzda D, Blanc D, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J Virol* 1997 ; 71 : 9358-65.

203. Zheng W, Ling L, Li Z, Wang H, Rui Y, Gao W, *et al*. Conserved Interaction of Lentiviral Vif Molecules with HIV-1 Gag and Differential Effects of Species-Specific Vif on Virus Production. *J Virol* 2017 ; 91 : e00064-17.

204. Goncalves J, Shi B, Yang X, Gabuzda D. Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains. *J Virol* 1995 ; 69 : 7196-204.

205. Bardy M, Gay B, Pébernard S, Chazal N, Courcoul M, Vigne R, *et al*. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol Precursors: Co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 2719-33.

206. Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, *et al*. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is Packaged into the Nucleoprotein Complex through an Interaction with Viral Genomic RNA. *J Virol* 2001 ; 75 : 7252-65.

207. Liu H, Wu X, Newman M, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol* 1995 ; 69 : 7630-8.

208. Camaur D, Trono D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* 1996 ; 70 : 6106-11.

209. Baraz L, Hutoran M, Blumenzweig I, Katzenellenbogen M, Friedler A, Gilon C, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 Vif binds the viral protease by interaction with its N-terminal region. *J Gen Virol* 2002 ; 83 : 2225-30.

210. Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, *et al*. High Level Expression of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vif Inhibits Viral Infectivity by Modulating Proteolytic Processing of the Gag Precursor at the p2/Nucleocapsid Processing Site. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 12355-62.

211. Karczewski MK, Strebel K. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol* 1996 ; 70 : 494-507.

212. Henzler T, Harmache A, Herrmann H, Spring H, Suzan M, Audoly G, *et al*. Fully functional, naturally occurring and C-terminally truncated variant human immunodeficiency virus (HIV) Vif does not bind to HIV Gag but influences intermediate filament structure. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 561-73.

213. Henriet S, Richer D, Bernacchi S, Decroly E, Vigne R, Ehresmann B, Ehresmann C, Paillart JC, Marquet R. Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* 2005 ; 354 : 55-72.

214. Dettenhofer M, Cen S, Carlson BA, Kleiman L, Yu X-F. Association of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif with RNA and Its Role in Reverse Transcription. *J Virol* 2000 ; 74 : 8938-45.

215. Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strebel K. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity. *J Virol* 2003 ; 77 : 11398-407.

216. Bernacchi S, Henriet S, Dumas P, Paillart JC, Marquet R. RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: A fluorescence study. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 26361-8.

217. Bernacchi S, Mercenne G, Tournaire C, Marquet R, Paillart JC. Importance of the proline-rich multimerization domain on the oligomerization and nucleic acid binding properties of HIV-1 Vif. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 2404-15.

218. Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix JL, *et al*. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res* 2012 ; 169 : 361-76.

219. Sleiman D, Bernacchi S, Guerrero SX, Brachet F, Larue V, Paillart JC, Tisné C. Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA Biol* 2014 ; 11 : 906-20.

220. Goncalves J, Korin Y, Zack J, Gabuzda D. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* 1996 ; 70 : 8701-9.

221. Cancio R, Spadari S, Maga G. Vif is an auxiliary factor of the HIV-1 reverse transcriptase and facilitates abasic site bypass. *Biochem J* 2004 ; 383 : 475-82.

222. Henriet S, Sinck L, Bec G, Gorelick RJ, Marquet R, Paillart JC. Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 5141-53.

223. Racine PJ, Chamontin C, De Rocquigny H, Bernacchi S, Paillart JC, Mougel M. Requirements for nucleocapsid-mediated regulation of reverse transcription during the late steps of HIV-1 assembly. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 27536.

224. Liu B, Sarkis PTN, Luo K, Yu Y, Yu X-F. Regulation of Apobec3F and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 Ubiquitin Ligase. *J Virol* 2005 ; 79 : 9579-87.

225. Zhang W, Chen G, Niewiadomska AM, Xu R, Yu X-F. Distinct Determinants in HIV-1 Vif and Human APOBEC3 Proteins Are Required for the Suppression of Diverse Host Anti-Viral Proteins. *PLoS One* 2008 ; 3 : e3963.

226. Zhen A, Wang T, Zhao K, Xiong Y, Yu X-F. A Single Amino Acid Difference in Human APOBEC3H Variants Determines HIV-1 Vif Sensitivity. *J Virol* 2010 ; 84 : 1902-11.

227. Wang X, Wang X, Wang W, Zhang J, Wang J, Wang C, *et al*. Both Rbx1 and Rbx2 exhibit a functional role in the HIV-1 Vif-Cullin5 E3 ligase complex in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 461 : 624-9.

228. Hüttenhain R, Xu J, Burton LA, Gordon DE, Hultquist JF, Johnson JR, *et al*. ARIH2 Is a Vif-Dependent Regulator of CUL5-Mediated APOBEC3G Degradation in HIV Infection. *Cell Host Microbe* 2019 ; 26 : 86-99.e7.

229. Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, Larue RS, Kwon E, *et al*. Vif hijacks CBF-β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 2012 ; 481 : 371-5.

230. Baig TT, Feng Y, Chelico L. Determinants of Efficient Degradation of APOBEC3 Restriction Factors by HIV-1 Vif. *J Virol* 2014 ; 88 : 14380-95.

231. Marin M, Golem S, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Functionally Interacts with Diverse APOBEC3 Cytidine Deaminases and Moves with Them between Cytoplasmic Sites of mRNA Metabolism. *J Virol* 2008 ; 82 : 987-98.

232. Gooch BD, Cullen BR. Functional domain organization of human APOBEC3G. *Virology* 2008 ; 379 : 118-24.

233. Russell RA, Pathak VK. Identification of Two Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Determinants Critical for Interactions with Human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 2007 ; 81 : 8201-10.

234. He Z, Zhang W, Chen G, Xu R, Yu XF. Characterization of Conserved Motifs in HIV-1 Vif Required for APOBEC3G and APOBEC3F Interaction. *J Mol Biol* 2008 ; 381 : 1000-11.

235. Dang Y, Davis RW, York IA, Zheng YH. Identification of 81LGxGxxIxW89 and 171EDRW174 Domains from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif That Regulate APOBEC3G and APOBEC3F Neutralizing Activity. *J Virol* 2010 ; 84 : 5741-50.

236. Letko M, Booiman T, Kootstra N, Simon V, Ooms M. Identification of the HIV-1 Vif and Human APOBEC3G Protein Interface. *Cell Rep* 2015 ; 13 : 1789-99.

237. Nakashima M, Ode H, Kawamura T, Kitamura S, Naganawa Y, Awazu H, *et al*. Structural Insights into HIV-1 Vif-APOBEC3F Interaction. *J Virol* 2016 ; 90 : 1034-47.

238. Hu Y, Desimmie BA, Nguyen HC, Ziegler SJ, Cheng TC, Chen J, *et al*. Structural basis of antagonism of human APOBEC3F by HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol* 2019 ; 26 : 1176-83.

239. Donahue JP, Vetter ML, Mukhtar NA, D'Aquila RT. The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology* 2008 ; 377 : 49-53.

240. Chen G, He Z, Wang T, Xu R, Yu X-F. A Patch of Positively Charged Amino Acids Surrounding the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif SLVx4Yx9Y Motif Influences Its Interaction with APOBEC3G. *J Virol* 2009 ; 83 : 8674-82.

241. Valera MS, de Armas-Rillo L, Barroso-González J, Ziglio S, Batisse J, Dubois N, *et al*. The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology* 2015 ; 12 : 53.

242. Refsland EW, Hultquist JF, Luengas EM, Ikeda T, Shaban NM, Law EK, *et al*. Natural Polymorphisms in Human APOBEC3H and HIV-1 Vif Combine in Primary T Lymphocytes to Affect Viral G-to-A Mutation Levels and Infectivity. *PLoS Genet* 2014 ; 10 : e1004761.

243. Guo Y, Dong L, Qiu X, Wang Y, Zhang B, Liu H, *et al*. Structural basis for hijacking CBF-β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature* 2014 ; 505 : 229-33.

244. Kim DY, Kwon E, Hartley PD, Crosby DC, Mann S, Krogan NJ, *et al*. CBFβ Stabilizes HIV Vif to Counteract APOBEC3 at the Expense of RUNX1 Target Gene Expression. *Mol Cell* 2013 ; 49 : 632-44.

245. Zhou X, Han X, Zhao K, Du J, Evans SL, Wang H, *et al*. Dispersed and Conserved Hydrophobic Residues of HIV-1 Vif Are Essential for CBF Recruitment and A3G Suppression. *J Virol* 2014 ; 88 : 2555-63.

246. Miyagi E, Welbourn S, Sukegawa S, Fabryova H, Kao S, Strebel K. Inhibition of Vif-Mediated Degradation of APOBEC3G through Competitive Binding of Core-Binding Factor Beta. *J Virol* 2020 ; 94 : e01708-19.

247. Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Io K, Tada K, Iwai F, *et al*. Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBFβ by site-directed mutagenesis. *Virology* 2014 ; 449 : 82-7.

248. Wang H, Liu B, Liu X, Li Z, Yu X-F, Zhang W. Identification of HIV-1 Vif Regions Required for CBF-β Interaction and APOBEC3 Suppression. *PLoS One* 2014 ; 9 : e95738.

249. Mehle A, Thomas ER, Rajendran KS, Gabuzda D. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 17259-65.

250. Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X, Yu XF. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2867-72.

251. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2861-6.

252. Yang X, Goncalves J, Gabuzda D. Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 10121-9.

253. Bergeron JRC, Huthoff H, Veselkov DA, Beavil RL, Simpson PJ, Matthews SJ, *et al*. The SOCS-Box of HIV-1 Vif Interacts with ElonginBC by Induced-Folding to Recruit Its Cul5-Containing Ubiquitin Ligase Complex. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000925.

254. Lu Z, Bergeron JRC, Atkinson RA, Schaller T, Veselkov DA, Oregioni A, *et al*. Insight into the HIV-1 Vif SOCS-box-ElonginBC interaction. *Open Biol* 2013 ; 3 : 130100.

255. Anderson BD, Harris RS. Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF-b/RUNX axis. *Sci Adv* 2015 ; 1 : e1500296.

256. Hassaïne G, Courcoul M, Bessou G, Barthalay Y, Picard C, Olive D, *et al*. The Tyrosine Kinase Hck Is an Inhibitor of HIV-1 Replication Counteracted by the Viral Vif Protein. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 16885-93.

257. Binning JM, Smith AM, Hultquist JF, Craik CS, Caretta Cartozo N, Campbell MG, *et al*. Fab-based inhibitors reveal ubiquitin independent functions for HIV Vif neutralization of APOBEC3 restriction factors. *PLOS Pathog* 2018 ; 14 : e1006830.

258. Stopak K, De Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 591-601.

259. Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriet S, Paillart JC, *et al*. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 38 : 633-46.

260. Guerrero S, Libre C, Batisse J, Mercenne G, Richer D, Laumond G, *et al*. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 39507.

261. Bazzini AA, Johnstone TG, Christiano R, MacKowiak SD, Obermayer B, Fleming ES, *et al*. Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *EMBO J* 2014 ; 33 : 981-93.

262. Johnstone TG, Bazzini AA, Giraldez AJ. Upstream ORF s are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J* 2016 ; 35 : 706-23.

263. Sawyer SL, Emerman M, Malik HS. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* 2004 ; 2 : e275.

264. Duggal NK, Emerman M. Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat Rev Immunol* 2012.

265. Compton AA, Hirsch VM, Emerman M. The host restriction factor APOBEC3G and retroviral Vif protein coevolve due to ongoing genetic conflict. *Cell Host Microbe* 2012 ; 11 : 91-8.

266. Compton AA, Emerman M. Convergence and Divergence in the Evolution of the APOBEC3G-Vif Interaction Reveal Ancient Origins of Simian Immunodeficiency Viruses. *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003135.

267. Etienne L, Hahn BH, Sharp PM, Matsen FA, Emerman M. Gene loss and adaptation to hominids underlie the ancient origin of HIV-1. *Cell Host Microbe* 2013 ; 14 : 85-92.

268. Etienne L, Bibollet-Ruche F, Sudmant PH, Wu LI, Hahn BH, Emerman M. The Role of the Antiviral APOBEC3 Gene Family in Protecting Chimpanzees against Lentiviruses from Monkeys. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1005149.

269. Binning JM, Chesarino NM, Emerman M, Gross JD. Structural Basis for a Species-Specific Determinant of an SIV Vif Protein toward Hominid APOBEC3G Antagonism. *Cell Host Microbe* 2019 ; 26 : 739-747.e4.

270. Ikeda T, Symeonides M, Albin JS, Li M, Thali M, Harris RS. HIV-1 adaptation studies reveal a novel Env-mediated homeostasis mechanism for evading lethal hypermutation by APOBEC3G. *PLOS Pathog* 2018 ; 14 : e1007010.

271. Laguette N, Brégnard C, Hue P, Basbous J, Yatim A, Larroque M, *et al*. Premature activation of the slx4 complex by vpr promotes g2/m arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* 2014 ; 156 : 134-45.

272. Fregoso OI, Emerman M. Activation of the DNA damage response is a conserved function of HIV-1 and HIV-2 Vpr that is independent of SLX4 recruitment. *MBio* 2016 ; 7 : e01433-16.

273. Zhang F, Bieniasz PD. HIV-1 Vpr induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137. *Elife* 2020 ; 9 : e55806.

274. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, *et al*. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 2009 ; 6 : 1.

275. Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, *et al*. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 20798-803.

276. Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Shirakawa K, Kobayashi M, *et al*. Core binding factor β protects HIV, type 1 accessory protein viral infectivity factor from MDM2-mediated degradation. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 24892-9.

277. Salamango DJ, Ikeda T, Moghadasi SA, Wang J, McCann JL, Serebrenik AA, *et al*. HIV-1 Vif Triggers Cell Cycle Arrest by Degrading Cellular PPP2R5 Phospho-regulators. *Cell Rep* 2019 ; 29 : 1057-1065.e4.

278. Naamati A, Williamson JC, Greenwood EJD, Marelli S, Lehner PJ, Matheson NJ. Functional proteomic atlas of HIV infection in primary human CD4+ T cells. *Elife* 2019 ; 8 : e41431.

279. Marelli S, Williamson JC, Protasio AV, Naamati A, Greenwood EJD, Deane JE, *et al*. Antagonism of PP2A is an independent and conserved function of HIV-1 Vif and causes cell cycle arrest. *Elife* 2020 ; 9 : e53036.

280. Nagata K, Shindo K, Matsui Y, Shirakawa K, Takaori-Kondo A. Critical role of PP2A-B56 family protein degradation in HIV-1 Vif mediated G2 cell cycle arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 2020 ; 527 : 257-63.

281. Wang J, Reuschel EL, Shackelford JM, Jeang L, Shivers DK, Diehl JA, *et al*. HIV-1 Vif promotes the G1- to S-phase cell-cycle transition. *Blood* 2011 ; 117 : 1260-9.

282. Fujita M, Akari H, Sakurai A, Yoshida A, Chiba T, Tanaka K, *et al*. Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome degradation. *Microbes Infect* 2004 ; 6 : 791-8.

283. Dussart S, Courcoul M, Bessou G, Douaisi M, Duverger Y, Vigne R, Decroly E. The Vif protein of human immunodeficiency virus type 1 is posttranslationally modified by ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 315 : 66-72.

284. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D. Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 7792-8.

285. Augustine T, Chaudhary P, Gupta K, Islam S, Ghosh P, Kumar Santra M, *et al*. Cyclin F/FBXO1 interacts with HIV-1 viral infectivity factor (Vif) and restricts progeny virion infectivity by ubiquitination and proteasomal degradation of vif protein through SCFcyclin F E3 ligase machinery. *J Biol Chem* 2017 ; 292 : 5349-63.

286. Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A, *et al*. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 6945.

287. Nakhaei P, Mesplede T, Solis M, Sun Q, Zhao T, Yang L, *et al*. The E3 Ubiquitin Ligase Triad3A Negatively Regulates the RIG-I/MAVS Signaling Pathway by Targeting TRAF3 for Degradation. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000650.

288. Lake JA, Carr J, Feng F, Mundy L, Burrell C, Li P. The role of Vif during HIV-1 infection: Interaction with novel host cellular factors. *J Clin Virol* 2003 ; 26 : 143-52.

289. Feng F, Davis A, Lake JA, Carr J, Xia W, Burrell C, Li P. Ring Finger Protein ZIN Interacts with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif. *J Virol* 2004 ; 78 : 10574-81.

290. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, *et al*. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 10051-7.

291. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology* 2015 ; 479-480 : 131-145.

292. Peng ZG, Zhao ZY, Li YP, Wang YP, Hao LH, Fan B, *et al*. Host apolipoprotein b messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G is an innate defensive factor and drug target against hepatitis C virus. *Hepatology* 2011 ; 53 : 1080-9.

293. Zhu YP, Peng ZG, Wu ZY, Li JR, Huang MH, Si SY, *et al*. Host APOBEC3G Protein Inhibits HCV Replication through Direct Binding at NS3. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0121608.

294. Michalski D, Gustavo Ontiveros J, Russo J, Charley PA, Anderson JR, Heck AM, *et al*. Zika virus noncoding sfRNAs sequester multiple host-derived RNA-binding proteins and modulate mRNA decay and splicing during infection. *J Biol Chem* 2019 ; 294 : 16282-96.

295. Milewska A, Kindler E, Vkovski P, Zeglen S, Ochman M, Thiel V, *et al*. APOBEC3-mediated restriction of RNA virus replication. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 5960.

296. Simmonds P. Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: Causes and Consequences for Their Short- and Long-Term Evolutionary Trajectories. *mSphere* 2020 ; 5 : e00408-20.

297. Giorgio S, Di Martignano F, Torcia M G, Mattiuz G, Conticello S G. Evidence for host-dependent RNA editing in the transcriptome of SARS-CoV-2. *Sci Adv* 2020 ; 6 : eabb5813.

298. Li Z, Ning S, Su X, Liu X, Wang H, Liu Y, *et al*. Enterovirus 71 antagonizes the inhibition of the host intrinsic antiviral factor A3G. *Nucleic Acids Res* 2018 ; 46 : 11514-27.

299. Wang H, Zhong M, Li Y, Li K, Wu S, Guo T, *et al*. APOBEC3G is a restriction factor of EV71 and mediator of IMB-Z antiviral activity. *Antiviral Res* 2019 ; 165 : 23-33.

300. Chen H, Lilley CE, Yu Q, Lee DV, Chou J, Narvaiza I, *et al*. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* 2006 ; 16 : 480-5.

301. Narvaiza I, Linfesty DC, Greener BN, Hakata Y, Pintel DJ, Logue E, *et al*. Deaminase-Independent Inhibition of Parvoviruses by the APOBEC3A Cytidine Deaminase. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000439.

302. Vartanian JP, Guétard D, Henry M, Wain-Hobson S. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* 2008 ; 320 : 230-3.

303. Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, *et al*. APOBEC3 Deaminases Induce Hypermutation in Human Papillomavirus 16 DNA upon Beta Interferon Stimulation. *J Virol* 2014 ; 88 : 1308-17.

304. Warren CJ, Xu T, Guo K, Griffin LM, Westrich JA, Lee D, *et al*. APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus. *J Virol* 2015 ; 89 : 688-702.

305. Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, *et al*. APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 457 : 295-9.

306. Wang Y, Li X, Song S, Sun Y, Zhang J, Yu C, *et al*. HPV11 E6 mutation by overexpression of APOBEC3A and effects of interferon-ω on APOBEC3s and HPV11 E6 expression in HPV11.HaCaT cells. *Virol J* 2017 ; 14 : 211.

307. Suspene R, Aynaud MM, Koch S, Pasdeloup D, Labetoulle M, Gaertner B, *et al*. Genetic Editing of Herpes Simplex Virus 1 and Epstein-Barr Herpesvirus Genomes by Human APOBEC3 Cytidine Deaminases in Culture and In Vivo. *J Virol* 2011 ; 85 : 7594-602.

308. Shi K, Carpenter MA, Banerjee S, Shaban NM, Kurahashi K, Salamango DJ, *et al*. Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B. *Nat Struct Mol Biol* 2017 ; 24 : 131-9.

309. Cheng AZ, Yockteng-Melgar J, Jarvis MC, Malik-Soni N, Borozan I, Carpenter MA, *et al*. Epstein-Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nat Microbiol* 2019 ; 4 : 78-88.

310. Stewart JA, Holland TC, Bhagwat AS. Human Herpes Simplex Virus-1 depletes APOBEC3A from nuclei. *Virology* 2019 ; 537 : 104-9.

311. Cheng AZ, Moraes SN, Attarian C, Yockteng-Melgar J, Jarvis MC, Biolatti M, Galitska G, Dell'Oste V, Frappier L, Bierle CJ, Rice SA, Harris RS. A Conserved Mechanism of APOBEC3 Relocalization by Herpesviral Ribonucleotide Reductase Large Subunits. *J Virol* 2019 ; 93 : e01539-19.

312. Weisblum Y, Oiknine-Djian E, Zakay-Rones Z, Vorontsov O, Haimov-Kochman R, Nevo Y, *et al*. APOBEC3A Is Upregulated by Human Cytomegalovirus (HCMV) in the Maternal-Fetal Interface, Acting as an Innate Anti-HCMV Effector. *J Virol* 2017 ; 91 : e01296-17.

313. Pautasso S, Galitska G, Dell'Oste V, Biolatti M, Cagliani R, Forni D, *et al*. Strategy of Human Cytomegalovirus To Escape Interferon Beta-Induced APOBEC3G Editing Activity. *J Virol* 2018 ; 92 : e01224-18.

314. Ohsugi T, Koito A. Human T cell leukemia virus type I is resistant to the antiviral effects of APOBEC3. *J Virol Methods* 2007 ; 139 : 93-6.

315. Sasada A, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Kobayashi M, Abudu A, Hishizawa M, *et al*. APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* 2005 ; 2 : 32.

316. Ooms M, Krikoni A, Kress AK, Simon V, Munk C. APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H Haplotype 2 Restrict Human T-Lymphotropic Virus Type 1. *J Virol* 2012 ; 86 : 6097-108.

317. Pak V, Heidecker G, Pathak VK, Derse D. The Role of Amino-Terminal Sequences in Cellular Localization and Antiviral Activity of APOBEC3B. *J Virol* 2011 ; 85 : 8538-47.

318. Derse D, Hill SA, Princler G, Lloyd P, Heidecker G. Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 2915-20.

319. Suspène R, Guétard D, Henry M, Sommer P, Wain-Hobson S, Vartanian JP. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 8321-6.

320. Zhao D, Wang X, Lou G, Peng G, Li J, Zhu H, Chen F, Li S, Liu D, Chen Z, Yang Z. APOBEC3G directly binds Hepatitis B virus core protein in cell and cell free systems. *Virus Res* 2010 ; 151 : 213-9.

321. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, *et al*. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014 ; 343 : 1221-28.

322. Bouzidi MS, Caval V, Suspène R, Hallez C, Pineau P, Wain-Hobson S, *et al*. APOBEC3DE Antagonizes Hepatitis B Virus Restriction Factors APOBEC3F and APOBEC3G. *J Mol Biol* 2016 ; 428 : 3514-28.

323. Chen Y, Hu J, Cai X, Huang Y, Zhou X, Tu Z, *et al*. APOBEC3B edits HBV DNA and inhibits HBV replication during reverse transcription. *Antiviral Res* 2018 ; 149 : 16-25.

324. Nguyen DH, Hu J. Reverse Transcriptase- and RNA Packaging Signal-Dependent Incorporation of APOBEC3G into Hepatitis B Virus Nucleocapsids. *J Virol* 2008 ; 82 : 6852-61.

325. Henry M, Guétard D, Suspène R, Rusniok C, Wain-Hobson S, Vartanian J-P. Genetic Editing of HBV DNA by Monodomain Human APOBEC3 Cytidine Deaminases and the Recombinant Nature of APOBEC3G. *PLoS One* 2009 ; 4 : e4277.

326. Baumert TF, Rösler C, Malim MH, Von Weizsäcker F. Hepatitis B virus DNA is subject to extensive editing by the human deaminase AP0BEC3C. *Hepatology* 2007 ; 46 : 682-9.

327. Köck J, Blum HE. Hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G, APOBEC3C and APOBEC3H. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 1184-91.

328. Chen Z, Eggerman TL, Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Kurlander R, *et al*. Heat shock proteins stimulate APOBEC-3-mediated cytidine deamination in the hepatitis B virus. *J Biol Chem* 2017 ; 292 : 13459-79.

329. Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hösel M, *et al*. Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 194-205.

330. Gao Y, Feng J, Yang G, Zhang S, Liu Y, Bu Y, *et al*. Hepatitis B virus X protein–elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2017 ; 66 : 1413-29.

331. Brezgin S, Kostyusheva A, Bayurova E, Gordeychuk I, Isaguliants M, Goptar I, *et al*. Replenishment of hepatitis B virus cccDNA pool is restricted by baseline expression of host restriction factors in vitro. *Microorganisms* 2019 ; 7 : 533.

332. Meier MA, Suslov A, Ketterer S, Heim MH, Wieland SF. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA homeostasis is independent of the lymphotoxin pathway during chronic HBV infection. *J Viral Hepat* 2017 ; 24 : 662-71.

333. Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, Trono D. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G. *Science* 2004 ; 303 : 1829.

334. Rösler C, Köck J, Kann M, Malim MH, Blum HE, Baumert TF, *et al*. APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology* 2005 ; 42 : 301-9.

335. Nguyen DH, Gummuluru S, Hu J. Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *J Virol* 2007 ; 81 : 4465-72.

336. Nair S, Zlotnick A. Asymmetric Modification of Hepatitis B Virus (HBV) Genomes by an Endogenous Cytidine Deaminase inside HBV Cores Informs a Model of Reverse Transcription. *J Virol* 2018 ; 92 : e02190-17.

337. Zhang W, Zhang X, Tian C, Wang T, Sarkis PTN, Fang Y, *et al*. Cytidine deaminase APOBEC3B interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and suppresses hepatitis B virus expression. *Cell Microbiol* 2008 ; 10 : 112-21.

338. Chen R, Zhao X, Wang Y, Xie Y, Liu J. Hepatitis B virus X protein is capable of down-regulating protein level of host antiviral protein APOBEC3G. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 40783.

339. Chen Y, Shen B, Zheng X, Long Q, Xia J, Huang Y, Cai X, Wang D, Chen J, Tang N, Huang A, Hu Y. DHX9 interacts with APOBEC3B and attenuates the anti-HBV effect of APOBEC3B. *Emerg Microbes Infect* 2020 ; 9 : 366-77.

340. Liu Y, Feng J, Sun M, Yang G, Yuan H, Wang Y, *et al*. Long non-coding RNA HULC activates HBV by modulating HBx/STAT3/miR-539/APOBEC3B signaling in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2019 ; 454 : 158-70.

341. Stenglein MD, Harris RS. APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 16837-41.

342. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, *et al*. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 2955-64.

343. Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, *et al*. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS One* 2013 ; 8 : e84228.

344. Horn AV, Klawitter S, Held U, Berger A, Jaguva Vasudevan AA, Bock A, *et al*. Human LINE-1 restriction by APOBEC3C is deaminase independent and mediated by an ORF1p interaction that affects LINE reverse transcriptase activity. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 396-416.

345. Liang W, Xu J, Yuan W, Song X, Zhang J, Wei W, *et al*. APOBEC3DE Inhibits LINE-1 Retrotransposition by Interacting with ORF1p and Influencing LINE Reverse Transcriptase Activity. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0157220.

346. Feng Y, Goubran MH, Follack TB, Chelico L. Deamination-independent restriction of LINE-1 retrotransposition by APOBEC3H. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 10881.

347. Macduff DA, Demorest ZL, Harris RS. AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 37 : 1854-67.

348. Richardson SR, Narvaiza I, Planegger RA, Weitzman MD, Moran JV. APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *Elife* 2014 ; 3 : e02008.

349. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 2006 ; 34 : 89-95.

350. Schumacher AJ, Haché G, MacDuff DA, Brown WL, Harris RS. The DNA Deaminase Activity of Human APOBEC3G Is Required for Ty1, MusD, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Restriction. *J Virol* 2008 ; 82 : 2652-60.

351. Carmi S, Church GM, Levanon EY. Large-scale DNA editing of retrotransposons accelerates mammalian genome evolution. *Nat Commun* 2011 ; 2 : 519.

352. Lee YN, Malim MH, Bieniasz PD. Hypermutation of an Ancient Human Retrovirus by APOBEC3G. *J Virol* 2008 ; 82 : 8762-70.

353. Esnault C, Priet S, Ribet D, Heidmann O, Heidmann T. Restriction by APOBEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cycle: Ex vivo effects and in vivo "traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. *Retrovirology* 2008 ; 5.

354. Miller JH, Presnyak V, Smith HC. The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block virion incorporation of APOBEC3G. *Retrovirology* 2007 ; 4 : 81.

355. Bennett RP, Stewart RA, Hogan PA, Ptak RG, Mankowski MK, Hartman TL, *et al*. An analog of camptothecin inactive against Topoisomerase I is broadly neutralizing of HIV-1 through inhibition of Vif-dependent APOBEC3G degradation. *Antiviral Res* 2016 ; 136 : 51-9.

356. Cen S, Peng ZG, Li XY, Li ZR, Ma J, Wang YM, *et al*. Small molecular compounds inhibit HIV-1 replication through specifically stabilizing APOBEC3G. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 16546-52.

357. Pery E, Sheehy A, Nebane NM, Brazier AJ, Misra V, Rajendran KS, *et al*. Identification of a novel HIV-1 inhibitor targeting Vif-dependent degradation of human APOBEC3G protein. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 10504-17.

358. Pan T, He X, Chen B, Chen H, Geng G, Luo H, *et al*. Development of benzimidazole derivatives to inhibit HIV-1 replication through protecting APOBEC3G protein. *Eur J Med Chem* 2015 ; 95 : 500-13.

359. Zhang S, Zhong L, Chen B, Pan T, Zhang X, Liang L, *et al*. Identification of an HIV-1 replication inhibitor which rescues host restriction factor APOBEC3G in Vif-APOBEC3G complex. *Antiviral Res* 2015 ; 122 : 20-7.

360. Zuo T, Liu D, Lv W, Wang X, Wang J, Lv M, *et al*. Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Targeting the Interaction between Vif and ElonginC. *J Virol* 2012 ; 86 : 5497-507.

361. Nathans R, Cao H, Sharova N, Ali A, Sharkey M, Stranska R, *et al*. Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif. *Nat Biotechnol* 2008 ; 26 : 1187-92.

362. Zhou M, Luo RH, Hou XY, Wang RR, Yan GY, Chen H, *et al*. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of N-(2-methoxyphenyl)-6-((4-nitrophenyl)sulfonyl)benzamide derivatives as potent HIV-1 Vif antagonists. *Eur J Med Chem* 2017 ; 129 : 310-24.

363. Pu C, Luo RH, Zhang M, Hou X, Yan G, Luo J, *et al*. Design, synthesis and biological evaluation of indole derivatives as Vif inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* 2017 ; 27 : 4150-5.

364. Xiao Z, Ehrlich E, Luo K, Xiong Y, Yu X. Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *FASEB J* 2007 ; 21 : 217-22.

365. Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, *et al*. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virol J* 2014 ; 11 : 122.

366. Pery E, Sheehy A, Miranda Nebane N, Misra V, Mankowski MK, Rasmussen L, *et al*. Redoxal, an inhibitor of de novo pyrimidine biosynthesis, augments APOBEC3G antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 2015 ; 484 : 276-87.

367. Chen H, Zhang R, Luo RH, Yang LM, Wang RR, Hao XJ, Zheng YT. Anti-HIV activities and mechanism of 12-O-tricosanoylphorbol-20-acetate, a novel phorbol ester from Ostodes katharinae. *Molecules* 2017 ; 22 : 1498.

368. Delviks-Frankenberry KA, Ackerman D, Timberlake ND, Hamscher M, Nikolaitchik OA, *et al*. Development of Lentiviral Vectors for HIV-1 Gene Therapy with Vif-Resistant APOBEC3G. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2019 ; 18 : 1023-38.

Éléments de valorisation

Liste des publications :

Revues

1. Verriez, C., Marquet, R., Paillart, J.-C. & Stupfler, B (2020) Les APOBEC : histoire d'une famille de protéines antivirales et mutagènes. *Virologie,* **24**, 381-418

2. Stupfler, B, Verriez, C., Gallois-Montbrun, S., Marquet, R. & Paillart, J.-C. (2021) Degradation-independent inhibition of APOBEC3G by HIV-1 Vif protein. *Viruses*, **13**, 617

Articles originaux

3. Libre, C., Seissler, T., Guerrero, S., Batisse, J., Verriez, C., Stupfler, B., Gilmer, O., Cabrera- Rodriguez, R., Weber, M., Valenzuela-Fernandez, A., Cimarelli, A., Etienne, L., Marquet, R. & Paillart, J.-C. (2022) A conserved uORF regulates APOBEC3G translation and is targeted by HIV-1 Vif protein to repress the antiviral factor. *Biomedicines*, **10**, 13

4. Verriez, C.#, Seissler#, T., Streicher, A., Petrova, A., Kuhn, L., Chicher, J. Hammann, P., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R., Gallois-Montbrun, S., & Paillart, J.-C. (En préparation) CHIP/STUB1: a new regulator of the APOBEC3G antiviral factor expression involved in HIV-1 replication.

Liste des communications scientifiques :

1. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification of cellular partners involved in APOBEC3G translational inhibition mediated by the HIV-1 Vif protein. Communication par affiche présentée aux « Doctoral School Days - Strasbourg », Strasbourg (France), 21/04/21-22/04/21

2. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1. Communication par affiche présentée aux « Journées Francophones de Virologie », Visio Montpellier (France), 26/04/21-27/04/21

3. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification of cellular partners involved in APOBEC3G translational inhibition mediated by the HIV-1 Vif protein. Communication par affiche présentée au virtual « Riboclub meeting », Sherbrooke (Canada), 25/09/21-28/09/21

4. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification des protéines impliquées dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1. Communication par affiche présentée aux « Journées Scientifique du Sidaction 2022 », Paris (France), 29/03/22

5. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1. Communication par affiche présentée aux « Journées Francophones de Virologie », Strasbourg (France), 11/04/22-12/04/22

6. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1. Communication par affiche présentée aux « Universités des jeunes chercheurs du Sidaction 2022 », Carry-le-Rouet (France), 05/11/22-11/11/22

7. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Identification des protéines impliquées dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1. Présentation orale aux « Universités des jeunes chercheurs du Sidaction 2022 », Paris (France), 09/12/22

8. Verriez, C., Seissler, T., Stupfler, B., Chane-Woon-Ming, B., Marquet, R. & Paillart, J.-C. CHIP, un nouvel acteur impliqué dans la régulation du facteur de restriction APOBEC3G ? Présentation orale aux « Journées Scientifique du Sidaction 2023 », Paris (France), 31/03/22

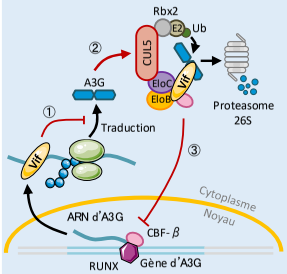
Identification des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1

P132

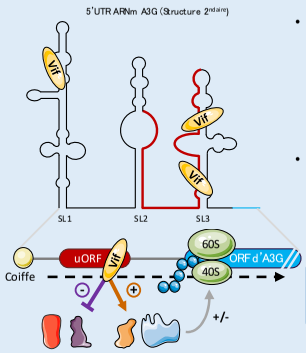
Cédric Verriez[1], Tanja Seissler, Benjamin Stupfler, Béatrice Chane-Woon-Ming, Roland Marquet & Jean-Christophe Paillart ;
Université de Strasbourg, CNRS-UPR 9002, Architecture & Réactivité de l'ARN, IBMC, F-Strasbourg ; [1] : cverriez@unistra.fr

Introduction

- Facteurs de restrictions : Mécanismes de défense antivirale intracellulaire ; protéines inhibant la réplication de certains virus, souvent contrecarrées par des protéines virales.



Cas du VIH-1 :
- APOBECG (A3G) désamine les cytosines (C U) dans l'ADN viral durant la transcription inverse Hyper-mutations létales.
- VIH-1 contrecarre A3G grâce à sa protéine auxiliaire Vif qui :
  - **(1) Inhibe la traduction de l'ARNm d'A3G ;**
  - (2) Induit la dégradation d'A3G par le protéasome ;
  - (3) Inhibe la transcription de l'ARNm d'A3G.



- Inhibition traductionnelle d'A3G : Mécanisme peu connu dépendant de la région **5'UTR** de l'ARNm, et plus particulièrement d'une région **uORF** (*upstream* ORF) située en amont de l'ORF d'A3G (1,2). Vif peut lier cette 5'UTR (3).
- Hypothèse : Vif interagit avec la région uORF et **recrute** ou **exclut** à l'ARNm d'A3G des protéines cellulaires régulant sa traduction.

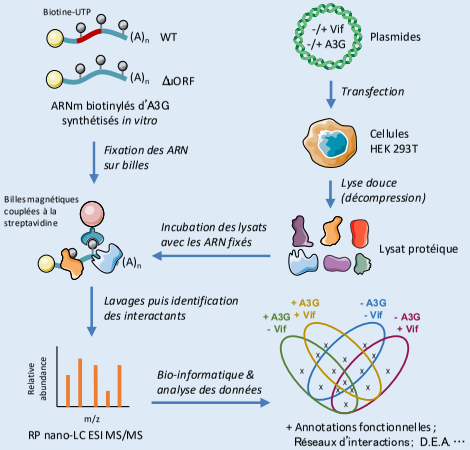
Etude du protéome de l'ARNm d'A3G par MS/MS dans différentes conditions

Méthodes

- *Pull-down* (Capture de l'ARN) & spectrométrie de masse (Identification des protéines associées) mis en œuvre pour élucider les protéomes (voir schéma plus bas).
- A3G, en interagissant avec Vif, pourrait être impliquée dans l'inhibition traductionnelle de son propre ARNm (résultats préliminaires).
  Protéomes étudiés en présence ou absence de ces deux protéines pour déterminer leurs effets respectifs (conditions récapitulées en tableau).

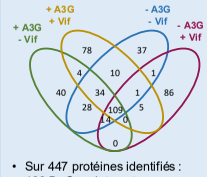
+ A3G - Vif	+ A3G + Vif	- A3G - Vif	- A3G + Vif

+ Etude de deux ARN : **WT** et **ΔuORF** (mutant délété de la région uORF)
Analyses différentielles des protéomes obtenus et caractérisation du rôle de l'uORF dans le mécanisme d'intérêt.



Résultats - Perspectives

- Objectif : Caractériser les rôles de chaque partenaires d'intérêt : région **uORF**, protéine Vif Vif, protéine A3G … dans la régulation du protéome de l'ARNm d'A3G, et identifier des protéines importantes dans le mécanisme de régulation traductionnelle.
- Résultats obtenus pour ARNm **WT** dans les conditions d'intérêt :



Clustering des annotations fonctionnelles associées aux protéines identifiées et valeurs d'enrichissement (comparaisons billes seules VS billes + ARN)

Clusters communs	+ A3G ; - Vif	+ A3G ; + Vif	- A3G ; - Vif	- A3G ; + Vif
Nucleic acid binding	38,17	39,67	42,38	29,55
Splicing	28,51	20,39	31,21	13,67
RNA degradation	18,28	11,71	15,33	9,82
RNP	14,67	16,36	19,05	9,39
Translation initiation	10,33	9,18	10,49	6,04
Clusters individuels	dsRNA binding 7,54	Keratin 22,51	mRNA processing 9,19	Cell-cell adhesion 24,88
	RNA helicase 7,52	mRNA processing 9,24	Zinc finger 6,45	Actin 4,52

Les 7 clusters les plus enrichis sont indiqués. Beaucoup des protéines enrichies sur l'ARNm interagissent avec les ARN et/ou régulent leur métabolisme.

- Sur 447 protéines identifiées : 109 Core interactome ; ¾ restants Présence régulée par Vif ou A3G.
- 60% des protéines régulées par Vif sont des phosphoprotéines. Vif est connue pour moduler le phosphoprotéome. **Régulation de ces protéines *via* leur état de phosphorylation ?**
- Interaction à Vif validée par Co-IP pour deux candidats : CHIP, RENT1.
- Résultats préliminaires obtenus avec ARNm **ΔuORF** dans les conditions d'intérêt : 60 protéines des 147 régulées par Vif pour l'ARN WT le sont aussi pour ce mutant.
  87 protéines dont la régulation par Vif serait dépendante de la région uORF ?

Perspectives

- Confirmation des protéomes de l'ARN mutant et comparaisons des protéomes entre ARN.
- Etude des candidats identifiés :
  (1) Validation d'interaction par Co-IP et RIP *in vitro*, et/ou IF + FISH *in cellula ;*
  (2) Etude du rôle du candidat dans l'inhibition traductionnelle d'A3G en cellules HEK 293T puis (3) en système infectieux (cellules lymphocytaires ; clone moléculaire).

Références - Remerciements

1. Libre, C. et al. A conserved uORF impacts APOBEC3G translation and is essential for translational inhibition by the HIV-1 Vif protein. *bioRxiv* 2021.01.13.426487 (2021).
2. Guerrero, S. et al., *Sci. Rep.* **6**, 39507 (2016). ; **3.** Mercenne, G. et al., *NAR.* **38**, 633–646 (2010).

Remerciements à la Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade pour la spectrométrie de masse.

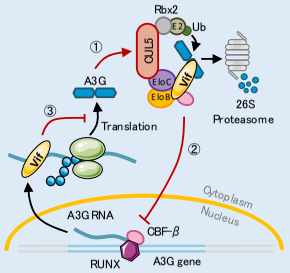
Identification of cellular partners involved in APOBEC3G translational inhibition mediated by HIV-1 Vif protein

Riboclub 2021

Cédric Verriez[1], Tanja Seissler, Benjamin Stupfler, Béatrice Chane-Woon-Ming, Roland Marquet & Jean-Christophe Paillart ;
Université de Strasbourg, CNRS-UPR 9002, Architecture & Réactivité de l'ARN, IBMC, F-Strasbourg ; [1]: cverriez@unistra.fr

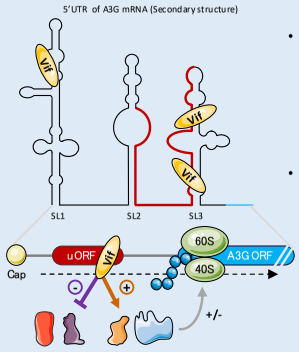
Introduction

- Restriction factors: Proteins involved in intracellular antiviral defenses which inhibit viruses replication and which are often counteracted by viral proteins.



HIV-1 example:

- APOBEC3G (A3G) deaminates cytosines (C→U) in viral DNA during reverse transcription step
  ➔ Lethal hyper-mutation.
- HIV-1 counters A3G through its Vif auxiliary protein, which:
  (1) Induces A3G degradation through the proteasome;
  (2) Inhibits A3G mRNA transcription;
  (3) Inhibits A3G mRNA translation.



A3G translational inhibition:

- Unsolved mechanism, depending on A3G mRNA **5'UTR** region, and more specifically on an **uORF** (*upstream* ORF) located upstream A3G ORF (1,2).
  Vif can bind this 5'UTR (3).

Hypothesis:

- Vif interacts with this uORF and **recruits** or **excludes** cellular proteins to A3G mRNA involved in translational regulation of the latter

A3G mRNA proteome study through MS/MS under different conditions

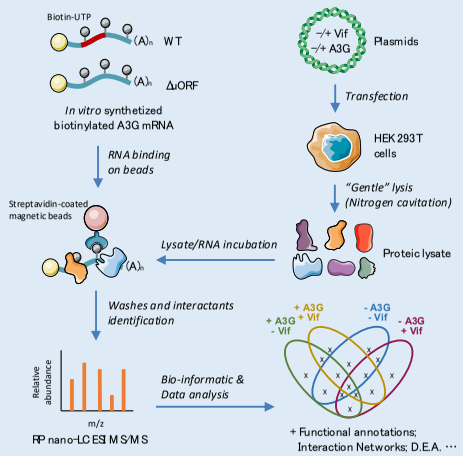
Methods

- A3G protein, by interacting with Vif, could be involved in its own translational regulation (Lab preliminary results).
  ➔ Proteomes studied with or without these two proteins to determine their respective impacts. Conditions of interest sum up:

+ A3G - Vif	+ A3G + Vif	- A3G - Vif	- A3G + Vif

+ Two RNA studied: **WT** and **ΔuORF** (mutant deleted of uORF region)
➔ Differential analyses of solved proteomes to characterize uORF precise role in cellular factor recruitment and in A3G translational inhibition.

- *Pull-down* (RNA capture) & mass spectrometry (mRNA-associated protein identification) carried out to characterize proteomes of interest:



Results - Perspectives

- Goal : Characterize the role of each partners of interest (**uORF region**, Vif protein, A3G protein…) in A3G mRNA proteome regulation, and identify important protein involved in the translational inhibition mechanism.
- Results for **WT** mRNA within the different conditions:

Clustering of the functional annotations associated to the identified proteins and their enrichment values (comparison of beads only VS beads+RNA)

Common clusters	+ A3G ; - Vif	+ A3G ; + Vif	- A3G ; - Vif	- A3G ; + Vif
Nucleic acid binding	38,17	39,67	42,38	29,55
Splicing	28,51	20,39	31,21	13,67
RNA degradation	18,28	11,71	15,33	9,82
RNP	14,67	16,36	19,05	9,39
Translation initiation	10,33	9,18	10,49	6,04
Individual clusters	dsRNA binding 7,54	Keratin 22,51	mRNA processing 9,19	Cell-cell adhesion 24,88
	RNA helicase 7,52	mRNA processing 9,24	Zinc finger 6,45	Actin 4,52

→ The 7 most enriched clusters are listed. A lot of the enriched proteins on the RNA can interact with RNAs and/or are involved in their metabolism.

- 447 identified proteins amongst which: 109 → Core interactome; ¾ remaining → Presence regulated by Vif or A3G.
- 60% of the Vif-regulated proteins are phosphoproteins. Vif is known to modulate the phosphoproteome ➔ **Regulation of these proteins through their phosphorylation state ?**
- Co-IP experiments confirmed a Vif-interaction for 2 proteins, CHIP and UPF1.
- Early results for **ΔuORF** mRNA within the different conditions:
  60 out of 147 Vif-regulated proteins for WT RNA are also regulated for this mutant.
  ➔ **87 Vif-regulated proteins for which Vif action rely upon the uORF region ?**

Perspectives

- Preliminary results confirmation for mutant RNA proteomes and detailed comparison with WT RNA solved proteomes to identify proteins of interest.
- Proteins of interest analysis: (1) Interaction(s) validation through Co-IP and RIP experiments (*in vitro*), and/or IF + FISH experiments (*in cellula*);
  (2) Protein effect study (silencing/over-expression) on A3G translational inhibition in HEK 293T cells (3) then in infectious system (lymphoid cells + HIV-1 molecular clone).

Reference - Acknowledgments

1. Libre, C. et al. A conserved uORF impacts APOBEC3G translation and is essential for translational inhibition by the HIV-1 Vif protein. *bioRxiv* 2021.01.13.426487 (2021).
2. Guerrero, S. et al., *Sci. Rep.* **6**, 39507 (2016). 3. Mercenne, G. et al., *NAR.* **38**, 633–646 (2010).

Thanks to the « Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade » for mass spectrometry experiments.

Affiche présentée au Riboclub Annual Meeting 2021 (Visio ; 25/09/21-28/09/21)

Affiche présentée aux Journées Scientifique du Sidaction 2022, (Paris, France, 29/03/22), aux Journées Francophones de Virologie 2022 (Strasbourg, France, 11/04/22-12/04/221) et aux Universités des jeunes chercheurs du Sidaction 2022 (Carry-le-Rouet, France, 05/11/22-11/11/22)

Identification des protéines impliquées dans la régulation traductionnelle du facteur de restriction APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1

Cédric Verriez[(1)], Tanja Seissler, Benjamin Stupfler, Béatrice Chane-Woon-Ming, Roland Marquet & Jean-Christophe Paillart

Architecture & Réactivité de l'ARN, CNRS – UPR9002, IBMC, Université de Strasbourg, Strasbourg, France ; [(1)] : c.verriez@ibmc-cnrs.unistra.fr

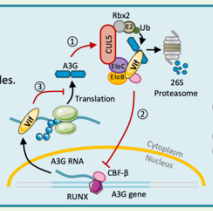
Introduction

Facteurs de restriction :

- Protéines de défense intracellulaires inhibant la réplication des virus.
- Souvent **contrecarrées** par des protéines virales.

Exemple du VIH-1 : Restriction

- La protéine APOBEC3G (A3G) désamine les cytosines (C→U) de l'ADN viral au cours de la retro transcription
  → **Hypermutations létales.**



Exemple du VIH-1 : Contre-défense

- La protéine Vif du VIH-1 contrecarre A3G en :

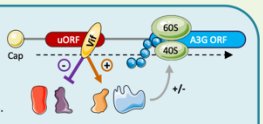
(1) Induisant sa dégradation par le protéasome ;
(2) Inhibant sa transcription ;
(3) Inhibant sa **traduction.**

Inhibition traductionnelle d'A3G :

- Dépend d'un **uORF** (*upstream* ORF) situé dans la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G (1, 2).
- Vif interagit avec cette 5'UTR.
- Vif redirige l'ARNm vers les granules de stress en cas de stress, de façon uORF-dépendante (1).

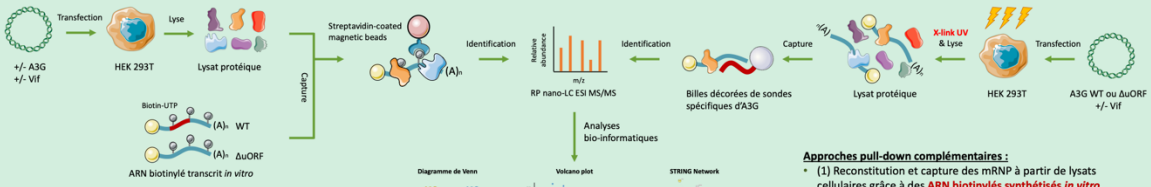
Hypothèse :

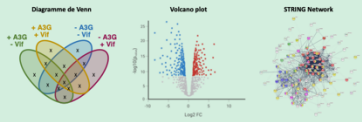
- Vif interagit avec cet uORF et **exclut** ou **recrute** à l'ARNm d'A3G des protéines impliquées dans la régulation traductionnelle de ce dernier.



Etude du protéome de l'ARNm d'A3G par pull-down & MS/MS sous différentes conditions

Méthodes





Objectif & conditions d'étude :

- La protéine A3G pourrait être impliquée dans la régulation traductionnelle de son propre ARN (résultats préliminaires).
  → Combinaison de conditions pour caractériser le **rôle des protéines Vif, A3G et de l'uORF sur les protéomes** de l'ARNm.

Approches pull-down complémentaires :

- (1) Reconstitution et capture des mRNP à partir de lysats cellulaires grâce à des **ARN biotinylés synthétisés *in vitro*.**
  → Première approche employée ; plus facile à mettre en œuvre.
- (2) Capture des **mRNP natives** grâce à un **pontage UV des interactants** et une **hybridation spécifique des ARN.**
  → En cours pour identifier des partenaires physiologiques plus pertinents.

Résultats – Pull-down « *in vitro* »

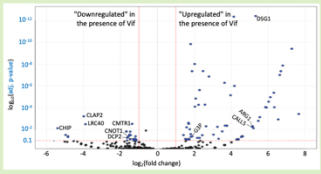
Protéomes de l'ARN WT : Analyses descriptives globales

Clustering des annotations fonctionnelles des protéines Identifiées et valeurs d'enrichissement associées (comparaison condition contrôle billes seule VS billes + ARN)				
Clusters communs	**+ A3G ; - Vif**	**+ A3G ; + Vif**	**- A3G ; - Vif**	**- A3G ; + Vif**
Nucleic acid binding	38,17	39,67	42,38	29,55
Splicing	28,51	20,39	31,21	13,67
RNA degradation	18,28	11,71	15,33	9,82
RNP	14,67	16,36	19,05	9,39
Translation initiation	10,33	9,18	10,49	6,04
Clusters individuels	dsRNA binding 7,54	Keratin 22,51	mRNA processing 9,19	Cell-cell adhesion 24,88
	RNA helicase 7,52	mRNA processing 9,24	Zinc finger 6,45	Actin 4,52

Les 7 clusters les plus enrichis pour chaque protéomes sont indiqués.

Digramme de Venn représentant la répartition des protéines identifiées selon les conditions

- Une grande partie des **protéines enrichies interagissent avec les ARN** et/ou sont impliquées dans leur métabolisme.
- Sur 447 protéines identifiées : 109 constituent un core interactome ;
  Les ¾ restants voient leur présence dans les mRNP régulée par Vif et/ou A3G.

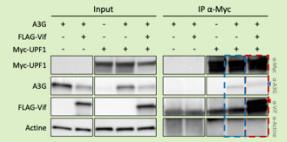


Volcano plot représentant les protéines sur l'ARNm d'A3G en présence de Vif par rapport aux protéines identifiées en absence de Vif

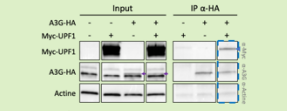
- Comparaisons des protéomes pour déterminer le rôle de Vif ou A3G
  → **Protéines enrichies** sur l'ARNm en fonction des conditions = **candidats.**
- Confirmation des candidats par Co-IP
  → **2 candidats confirmés** actuellement, **UPF1 et CHIP** ; voir partie droite du panel.
- 60% des protéines régulées par Vif sont des phosphoprotéines. Vif est un modulateur des phosphorotéomes
  → Régulation de protéines par Vif via leur état de phosphorylation ?
- ARNm ΔuORF (résultats préliminaires) : Parmi les 147 protéines régulées par Vif sur l'ARNm WT, 60 le sont aussi sur cet ARN → 87 Protéines dont la régulation par Vif dépend de l'uORF ?

Co-IP de candidats : UPF1/RENT1

✓ **Interaction entre Vif et UPF1**

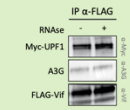


✓ Interaction entre Vif et UPF1 et A3G



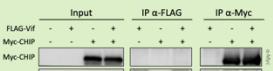
✓ **Interaction entre UPF1 et A3G**

Co-IP + traitement RNase :

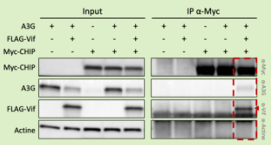


✗ Interactions Vif/UPF1 **indépendantes de l'ARN**

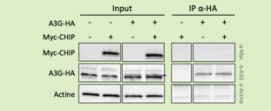
Co-IP de candidats : CHIP/STUB1



✗ Pas d'interaction directe entre Vif et CHIP ?

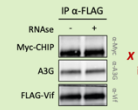


✓ **Interaction entre Vif et CHIP et A3G**



✗ Pas d'interaction directe entre CHIP et A3G

Co-IP + traitement RNase :



✗ Interactions Vif/A3G/CHIP **indépendantes de l'ARN**

Conclusion - Perspectives

- Pull-down in-cellula : mise au point en cours, résultats préliminaires encourageants (Protéines RBP identifiées sur l'ARNm impliquées dans la régulation traductionnelles).
- ✓ Poursuite des expériences de pull-down avec l'ARNm ΔuORF d'A3G et comparaisons détaillées avec les protéomes déjà identifiés → Nouveaux candidats d'intérêt

✓ **Etude des candidats d'intérêt selon les étapes suivantes :**

- Confirmation d'interaction : Expériences de RIP et Co-IP (FLAG-VIF ; A3G-HA ; ...).
- Etude du rôle dans la régulation traductionnelle d'A3G : Sur-expression ou silencing (siRNA) en cellules HEK 293T, +/- Vif, et +/- inhibiteur du protéasome (suivi spécifique de l'effet traductionnel de Vif sur A3G) ; suivi de l'expression des protéines, dont A3G, par western-blot et suivi des niveaux d'ARN par RT-qPCR.
- Etude du rôle dans la réplication virale : Approches de sur-expression et silencing utilisant des clones moléculaires en cellules HEK 293T et suivi de l'impact des candidats sur les virions et leur infectiosité. En parallèle, approche CRISPR/Cas9 sur des LT CD4+ (lignée Jurkat) pour inhiber l'expression des candidats et étudier les effets sur les virions (Collaboration S. Gallois-Montbrun).

Références :
1. Libre, C. et al. A Conserved uORF Regulates APOBEC3G Translation and Is Targeted by HIV-1 Vif Protein to Repress the Antiviral Factor. Biomedicines 10, 13 (2022).
2. Guerrero, S. et al. Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity. Sci Rep 6, 39507 (2016)

Remerciements :
Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade pour les analyses de spectrométrie de masse.
Sidaction et ANRS qui soutiennent ces travaux.

Université de Strasbourg

Cédric VERRIEZ

École doctorale Sciences de la vie et de la santé | ED 414
Université de Strasbourg

Identification et étude des partenaires cellulaires impliqués dans la régulation du facteur antiviral APOBEC3G par la protéine Vif du VIH-1 : l'E3 ubiquitine-ligase CHIP, un nouvel acteur de ces mécanismes ?

Résumé

Le facteur de restriction APOBEC3G (A3G) inhibe l'infection de divers virus, dont le VIH-1. Celui-ci réprime en retour l'expression d'A3G grâce à sa protéine Vif. Une des actions de Vif, encore peu caractérisée, est l'inhibition de la traduction d'A3G. Ma thèse a contribué à l'étude d'un uORF situé dans la 5'UTR de l'ARNm d'A3G. Ce motif est apparu comme un inhibiteur intrinsèque de la traduction d'A3G. Il est de surcroit indispensable à l'action de Vif. J'ai ensuite identifié le premier protéome cellulaire associée à l'ARNm d'A3G en fonction de Vif, grâce à une approche de pull-down à l'aide d'un ARN transcrit in vitro, couplé à l'analyse des protéines par spectrométrie de masse en tandem. Ces protéines sont potentiellement impliquées dans la régulation d'A3G. Parmi les candidats, j'ai montré que CHIP/STUB1, une E3-ubiquitine ligase et co-chaperonne, régule négativement l'expression d'A3G. CHIP semble néanmoins jouer un rôle antiviral vis-à-vis du VIH-1. L'action complexe de CHIP dans notre contexte d'étude est à approfondir, mais ses implications à la fois sur le VIH et A3G en font une cible thérapeutique potentielle face au VIH-1 et aux cancers.

Mots clés : APOBEC3G, VIH, Vif, uORF, traduction, interaction ARN-protéine, pull-down, CHIP/STUB1

Résumé en anglais

The restriction factor APOBEC3G (A3G) inhibits the infection of various viruses, including HIV-1. In response, HIV-1 suppresses the expression of A3G through its Vif protein. One of Vif action is to inhibit A3G translation by un unknown mechanism. My thesis contributed to the study of an uORF located in the 5'UTR of A3G mRNA. This motif emerged as an intrinsic inhibitor of A3G translation. Moreover, it is essential for Vif action. I then identified the first cellular proteome associated with the A3G mRNA in the presence of Vif, through a mass spectrometry-coupled pull-down analysis to identify proteins retained on an in vitro transcribed RNA. These proteins are potentially involved in the regulation of A3G. Among the candidates, I showed that CHIP/STUB1, an E3-ubiquitin ligase and co-chaperone, negatively regulates A3G expression. However, CHIP appears to play an antiviral role against HIV-1. The complex relationship of CHIP in our study needs further investigations, but its implications in both HIV and A3G context make it a potential therapeutic target for HIV-1 and cancers.

Keywords: APOBEC3G, HIV, Vif, uORF, translation, RNA-protein interaction, pull-down, CHIP/STUB1