

UNIVERSITE DE STRASBOURG
ÉCOLE DOCTORALE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
THÈSE DE DOCTORAT

présentée par :

Camille LIBRE

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

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Contrôle traductionnel des facteurs de
restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du
VIH-1**

Soutenue le 30 septembre 2016 devant le jury composé de :

Dr. Jean-Christophe PAILLART	IBMC, Strasbourg	Directeur de thèse
Dr. Théophile OHLMANN	ENS, Lyon	Rapporteur externe
Dr. Sarah GALLOIS-MONTBRUN	Institut Cochin, Paris	Rapporteur externe
Dr. Maria DIMITROVA	IBMP, Strasbourg	Examineur interne

REMERCIEMENTS

Je tenais d'abord à remercier les membres de mon jury Théophile Ohlmann, Sarah Gallois-Montbrun et Maria Dimitrova pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également l'ANRS et le CNRS qui ont permis à ce projet de se réaliser.

Merci à Roland et JC pour m'avoir accueillie dès le stage de master dans un laboratoire où j'ai appris énormément de choses indispensables pour la réussite de ce doctorat.

Je tiens également à remercier JC. Je ne pourrais pas lister toutes les raisons pour lesquelles je te remercie car il me faudrait de nombreuses pages, mais je te remercie pour m'avoir guidée dans ce projet, pour ta présence continue ainsi que pour ta rigueur scientifique.

Un grand merci à Santiago et Juju pour votre soutien, vos conseils scientifiques et votre bonne humeur. Merci pour m'avoir transmis l'intérêt porté à ce projet et votre contribution à la réussite de ce doctorat. La joie que vous avez apportée au labo a beaucoup contribué à l'excellente ambiance du labo.

Merci beaucoup à tous les membres de l'équipe : Elodie, ma voisine de bureau et de paillasse, qui a partagé les meilleurs moments comme les plus difficiles avec moi (je retiendrai surtout nos nombreux fous rires), Marie qui m'a écoutée tout au long de la thèse et qui m'a accompagnée dans la rédaction du manuscrit, Red qui m'a donné de nombreux conseils, qui est toujours de bonne humeur et qui n'a jamais hésité à me remonter le moral dès qu'il sentait que ce n'était pas la forme. Tu vas énormément me manquer quand je serai loin de Strasbourg mais j'espère qu'un jour nous aurons l'occasion de mener un projet ensemble. Je remercie également Serena, Valérie, Anne et Catherine pour votre enthousiasme et votre bonne humeur tout au long de mon parcours dans ce laboratoire. Merci à Jérémy pour ta folie, ton esprit festif, tes encouragements et l'ambiance que tu as apportée depuis que tu es arrivé. Merci à Noé, Damien et Maud pour votre bonne humeur, votre aide et votre amitié, je vous souhaite beaucoup de réussite dans la suite de votre projet. Merci à Ema, Léa, Laura et Tanja pour m'avoir accompagnée pendant quelques mois dans ce projet avec votre sourire, votre volonté et les bons moments que nous avons passés ensemble.

Je souhaite remercier ma Safi (oups pardon : M^{elle} Tata Gniré Safiatou Coulibaly) pour tout : ton soutien, ta disponibilité, ta générosité, ta bonne humeur, tes encouragements, tes conseils et ton amitié sans quoi la thèse aurait été beaucoup plus difficile pour moi.

Merci à toute l'équipe du laboratoire 337 : Matteo, Marine, Pierre, Romain, Vijay, Megha, Flore et Daniela pour tous les moments agréables que nous avons partagés ainsi que les pauses café indispensables à ma survie.

Merci à Géraldine, Thomas, Christiane, Sylvie, Jérôme et Camille pour m'avoir très bien accueillie à l'institut de virologie et pour votre enthousiasme.

Je souhaite remercier les autres équipes de l'unité : celle de Pascale, d'Eric, de Magali, de Marie, d'Alain, de Sébastien et de Mr le Comte. Je remercie en particulier Mélo, Delphine B,

Arnaud, Guigui Bec, Philippe, Benoît, Emma, Joëlle, Jana, Delphine K, Caroline, Marta, Look o look, Elena, Tina, Mathieu, Semih, Olivier et Crapouillaud pour chacun des moments passés en votre compagnie.

Merci à tous mes amis hors IBMC et en particulier ma picarde préférée Popo et Sandra : c'est grâce à vous si j'en suis à ce stade maintenant et je ne l'oublierai jamais. Merci également à Rudy et Jessica pour m'avoir fait découvrir Strasbourg et pour tous les moments inoubliables passés ensemble. Je voudrais dire merci à Rebecca et Doriane pour les soirées, les fêtes, tous les bons moments passés ensemble. J'espère qu'il y en aura plein d'autres.

Je voudrais enfin remercier ma famille. Merci à mes parents, mes sœurs et mes petits loulous Noé et Elio pour votre soutien, votre confiance et votre grande patience avec moi. Je sais que l'éloignement a été dur autant de votre côté que du mien mais nos conversations quotidiennes et vos visites à Strasbourg m'ont redonné la motivation et l'énergie pour réaliser les objectifs que je m'étais fixés. Encore merci pour tout.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....1

I. GENERALITES SUR LE VIH-1.....1

1) Histoire du VIH-1.....1

2) Classification du VIH-1.....2

3) Organisation génétique du VIH-1.....2

4) Cycle de réplication du VIH-1.....3

- Entrée virale3

- Transcription inverse.....4

- Décapsidation.....5

- Import nucléaire du PIC et intégration du génome viral.....5

- Transcription et épissage.....7

- Export et traduction.....8

- Assemblage.....9

- Bourgeonnement et maturation.....10

II. IMMUNITE ANTIVIRALE.....12

1) Immunité innée et adaptative.....12

2) Cellules de l'immunité innée.....12

3) Cellules de l'immunité adaptative.....13

4) Cytokines induites par le VIH-1.....13

5) Voies de signalisation des IFN de type I.....15

5) 1. Les PRR membranaires.....15

- Les Toll-Like Receptors (TLR)15

- Les récepteurs de type lectine C.....18

5) 2. Les PRR cytoplasmiques.....18

- Les RIG-I-Like Receptors (RLR)18

• Les NOD-Like Receptors (NLR)	19
• Cyclic GMP/AMP Synthase (cGAS) et IFI16.....	20
5) 3. L'autophagie.....	20
III. FACTEURS DE RESTRICTION ANTI-VIH ET PROTEINES VIRALES.....	22
1) Les facteurs de restriction.....	23
A. TRIM5 α (Tripartite motif-containing 5 α).....	23
B. BST2/Tetherin et Vpu.....	24
C. SAMHD1 et Vpx.....	26
2) Les protéines antivirales.....	28
A. Schlafen 11 (SLF11)	28
B. MxB/2 (Myxovirus resistance B/2)	29
C. MOV10 (Moloney Leukemia Virus 10 inactivated gene)	31
D. SERINC3 et SERINC5 (Serine incorporator 3 et 5)	32
E. MARCH8 (Membrane-associated RING-CH 8)	32
F. Autres protéines antivirales.....	33
3) APOBEC3F/G et Vif.....	33
Revue n°1: APOBEC3F/G and Vif: action and counteractions.....	34
• APOBEC3.....	47
• Vif.....	49
• Dégradation d'A3F/G par Vif.....	50
• Regulation de la transcription d'A3F/G par Vif.....	50
• Inhibition de la traduction d'A3F/G par Vif.....	50
IV. LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES ET LE VIH-1.....	51
Revue n°2: HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus.....	52
• Traduction des facteurs APOBEC3F/G.....	73
OBJECTIFS.....	79

RESULTATS80

**I. IMPORTANCE DE LA 5'UTR DANS L'INHIBITION DE LA TRADUCTION
DU FACTEUR DE RESTRICTION APOBEC3G.....80**

**Article n°1: Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and
contributes to restoring HIV-1 infectivity.....80**

**II. UN PETIT CADRE DE LECTURE OUVERT (uORF) PRESENT DANS LA 5'UTR DES
ARNm D'A3F/G EST ESSENTIEL POUR L'INHIBITION TRADUCTIONNELLE
INDUITE PAR VIF.....111**

**Article n°2: A conserved uORF in APOBEC3F and APOBEC3G mRNAs is essential to
their translational inhibition by Vif.....111**

**III. DOMAINES DE VIF IMPLIQUES DANS L'INHIBITION
TRADUCTIONNELLE.....140**

**IV. UNE INTERACTION A3G-VIF EST-ELLE NECESSAIRE POUR
L'INHIBITION TRADUCTIONNELLE ?145**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....149

I. TRADUCTION DES PROTEINES A3G ET A3F.....149

**II. MECANISME D'INHIBITION TRADUCTIONNELLE D'A3G ET D'A3F PAR
VIF.....151**

1) La 5'UTR des ARNm d'A3G/F est essentielle pour leur inhibition
traductionnelle.....151

2) Rôle de l'uORF dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle.....151

**III. IDENTIFICATION DES DOMAINES DE VIF IMPLIQUES DANS CE
MECANISME.....152**

1) Domaines de Vif à identifier.....152

2) Identification des protéines cellulaires impliquées dans l'inhibition
traductionnelle.....153

IV. OUVERTURE VERS DE NOUVELLES VOIES DE STRATEGIES THERAPEUTIQUES?.....	153
1) Infectivité virale.....	153
2) Molécules inhibitrices de l'action de Vif.....	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155

ABREVIATIONS

A	Adénine
A1	APOBEC1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AID	activation-induced deaminase
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALIX	ALG-2-interacting protein X
ALLN	N-Acétyle-Leucine-Leucine-Norleucine-CHO
AMD1	Adenosyl Methionine Decarboxylase
ApoB	Apolipoprotéine B
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide
ARN	Acide Ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNv	ARN viral
BACE1	beta-site beta-amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1
BIR	Baculovirus inhibitor repeat
BSA	Bovine Serum Albumine
BST2	Bone marrow Stromal antigen 2
C	Cytosine
CA	Capside
CARD	Caspase-Recruitment Domain
CBF β	Core Binding Factor beta
CC domain	Coiled-Coil domain
CCR5	C-C chemokine Receptor type 5
CD	Catalytic Domain
CD4	Cluster of Differentiation 4
CDA domain	Cytidine Deaminase domain
cGAS	cyclic GMP/AMP Synthase
CLR	C Lectin Receptor
CNP	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRF	Circulating Recombinant Form
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CTD	C-terminal domain
Cul	Cullin
CXCR4	C-X-C chemokine Receptor type 4
CypA	Cyclophiline A
Da	Dalton
DC	Dendritic Cell
DCAF1	DDB1-CUL4-Associated Factor
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grapping Non-integrin

DDB1	DNA Damage-Binding protein 1
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléotide Tri-Phosphate
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus
eIF	eukaryotic initiation factor
Elo B	Elongin B
Elo C	Elongin C
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
Env	Envelope
eRF	eukaryotic translation termination factor
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
G	Guanine
Gag	Group Antigen specific
GCN4	General Control protein
GPI	GlycoPhosphatidyl Inositol
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293 cell
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMG	High Mobility Group
HSPG	Héparanes Sulfates Potéoglycanes
IFI16	gamma-Interferon-Inducible protein 16
IFITM	Interferon Induced Transmembrane protein
IFN	Interféron
IKK	Inhibitor κ B kinase
IL	Interleukine
IN	Integrase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISG	Interferon-Stimulated Gene
LEDGF/p75	Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated antigen-1
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LRR	Leucine-Rich Repeat
LT	Lymphocyte T
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MARCH8	Membrane-associated RING-CH 8
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling protein
MDA5	Melanoma Differentiation Associated gene 5
MLV	Murine Leukemia Virus
MOV10	Moloney leukemia Virus 10
MVB	Multivesicular endosomes
Mx	Myxovirus resistance

Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
N	Noyau
NACHT	NAIP, CIAA, HET-E et TP1
NC	Nucléocapside
Nef	Negative Factor
NES	Nuclear Export Signal
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NLR	NOD-like receptor
NLS	Nuclear Localization Signal
NMD	Nonsense Mediated Decay
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NTD	N-terminal domain
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Primer Binding Site
PCAF	P300/CREB Binding protein-Associated Factor
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell
PIC	Pre-Integration Complex
Pol	Polymerase
PPT	PolyPurine Tract
Pr	Précurseur
Pr55 ^{Gag}	Precursor 55 Gag
Pr160 ^{GagPol}	Precursor 160 GagPol
PR	Protease
PRR	Pattern Recognition Receptor
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
PYD	Pyrin Domain
Rev	Regulator of expression of viral proteins
RIG-I	Retinoic acid-Inducible gene I
RING	Really Interesting New Gene
RLR	(RIG-I)-like receptor
RNase	Ribonucléase
RRE	Rev Responsive Element
RT	Rétrotranscriptase
RTC	Reverse Transcription Complex
SAM	Sterile alpha Motif
SAMHD1	Sterile alpha Motif and HD-domain containing protein 1
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERINC3/5	Serine incorporator 3 et 5
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SIVcpz	chimpanzee SIV
SIVmac	rhesus macaque SIV
SLFN	Schlafen
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling

SPRY	SPLa and the RYanodine Receptor
SRP	Signal Recognition Particle
T	Thymine
TAK1	TGF-activated kinase
TAR	Trans-Acting Responsive Element
Tat	Transcriptional transactivator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TGN	Trans-Golgi Network
TIF	Transcript isoform
TIP47	Tann-Interacting protein of 47 kDa
TLR	Toll-like Receptor
TM	Trans-Membranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOP	Terminal OligoPyrimidine
TRBP	TAR RNA Binding Protein
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRIM	Tripartite Motif
TRIM5 α	Tripartite Motif 5 alpha
tRNA ^{Lys3}	transfer RNA lysine 3
Tsg101	Tumor Susceptibility Gene 101
U	Uracile
uAUG	upstream AUG
uORF	upstream Open Reading Frame
UTR	UnTranslated Region
uUGA	upstream UGA
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vpr	Viral protein r
Vpu	Viral protein u
Vpx	Viral protein x
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
ZAP	Zinc-finger Antiviral Protein
β TrCP	β Transducing repeat-containing protein

INTRODUCTION

I. GENERALITES SUR LE VIH-1

1) Histoire du VIH-1

Au début des années 1980, le monde fut confronté à une nouvelle épidémie dévastatrice se manifestant par une recrudescence de pneumonies et de sarcomes de Kaposi associés à un affaiblissement du système immunitaire. Cette maladie prend alors le nom de SIDA ou AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). Le virus responsable de ce fléau est identifié en 1983 par l'équipe du professeur Montagnier à l'Institut Pasteur de Paris qui trouva une activité de rétrotranscription dans un échantillon prélevé sur un patient atteint de cette maladie (Barré-Sinoussi et al 1983). Ce n'est qu'en 1986 qu'une commission de nomenclature attribue à ce virus le nom de VIH-1 pour Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1. Un deuxième type de VIH a alors pris le nom de VIH-2. Depuis cette découverte, 30 ans de recherches se sont écoulés avec de nombreuses découvertes telles que les premiers traitements antirétroviraux, la caractérisation du virus de plus en plus précise ou encore l'existence de nombreux facteurs produits par l'hôte capables de contrecarrer certaines étapes du cycle viral (figure 1).

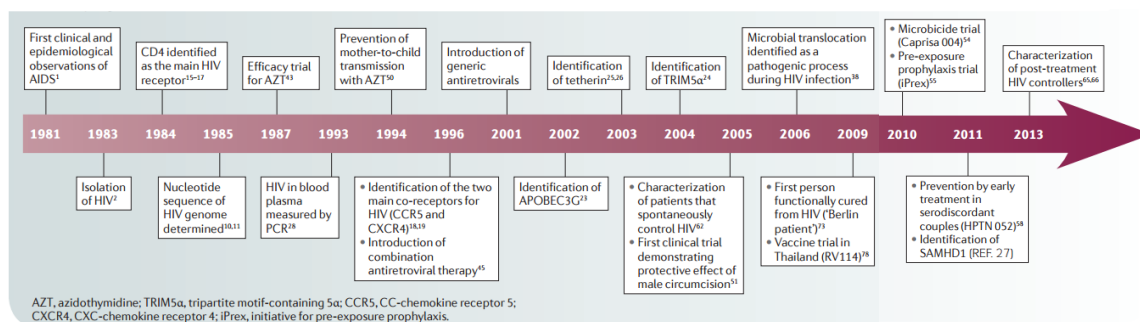


Figure 1 : Représentation des étapes clés de l'histoire du VIH (Barré-Sinoussi et al 2013)

De nos jours, la pandémie de SIDA progresse encore dans le monde avec de nombreuses disparités géographiques et une grande hétérogénéité des épidémies. Depuis le début de la pandémie, environ 39 millions de personnes sont décédées de maladies liées au SIDA et 78 millions de personnes ont été infectées par le VIH. Selon les données mondiales de l'ONUSIDA, 35 millions de personnes vivent encore avec le VIH en 2013, la majorité des infections étant localisée en Afrique subsaharienne. En France, le bulletin épidémiologique de l'Institut de veille sanitaire de 2015 estime

que plus de 150 000 personnes vivent avec le VIH-1 dont 30 000 qui ne le savent pas. De plus, plus de 6500 personnes découvrent leur séropositivité chaque année dans notre pays.

2) Classification du VIH-1

L'origine du VIH-1 est certainement liée à une infection d'un virus simien à l'homme. Les arbres phylogénétiques ont permis de montrer que ce virus est le lentivirus le plus apparenté au SIVcpz (Simian Immunodeficiency Virus) du chimpanzé (Sharp et al 2005). Le VIH-1 est classé en quatre groupes : M (Main), O (Outlier) identifié en 1990, N (Non M non O) découvert en 1998 et P identifié en 2009. Le groupe M est le groupe le plus répandu au monde et comporte neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) ainsi que plusieurs formes recombinantes appelées CRF (Circulating Recombinant Form) (figure 2).

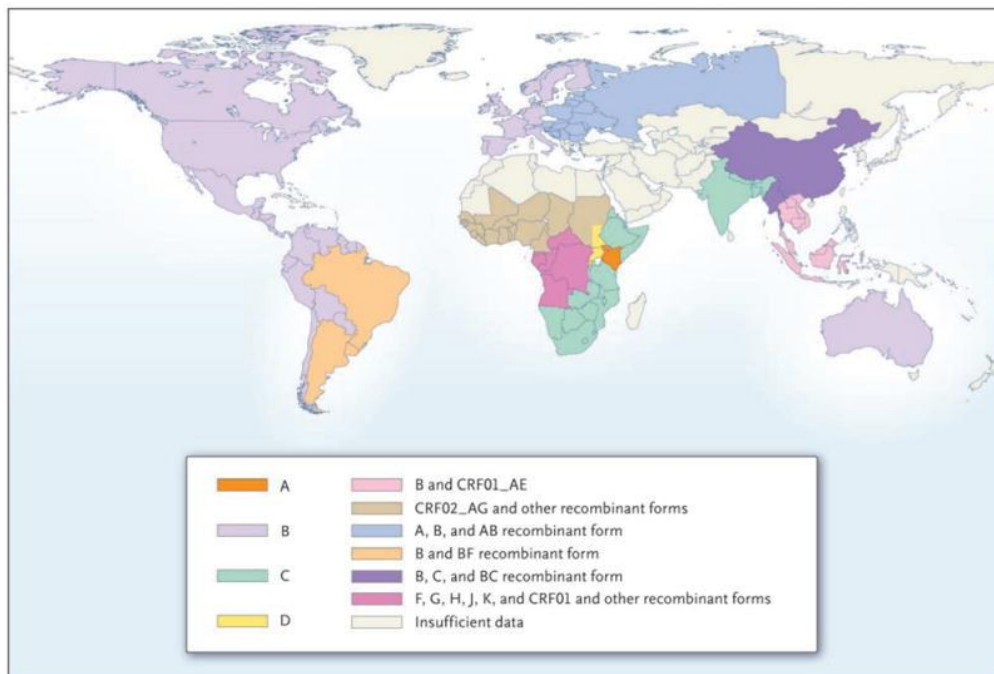


Figure 2 : Distribution régionale des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 (aideinfosida.be)

3) Organisation génétique du VIH-1

Le VIH-1 est un rétrovirus complexe qui possède en plus des gènes *gag*, *pol* et *env* exprimant respectivement les protéines de structure (Matrice : MA, Capside : CA et Nucléocapside : NC), enzymatiques (Protéase : PR, Transcriptase inverse : RT et Intégrase : IN) et d'enveloppe (TMgp41 et SUgp120) des phases ouvertes de lecture exprimant des protéines régulatrices et auxiliaires (Vif, Vpr, Tat, Vpu, Rev et Nef). L'ADN proviral possède également des séquences dupliquées appelées LTR (Long Terminal Repeat) à ses extrémités (figure 3).

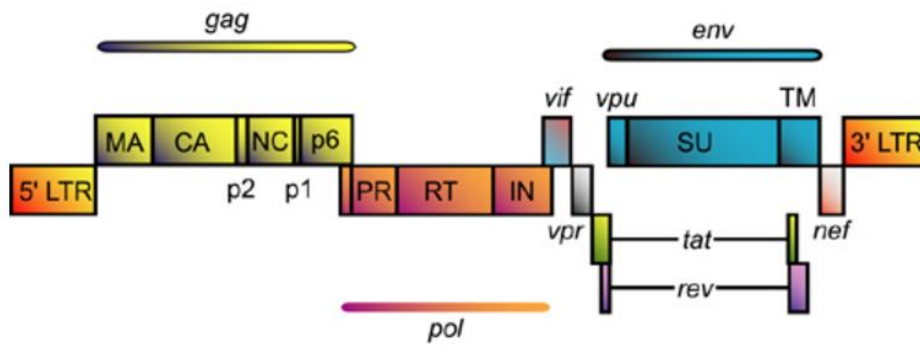


Figure 3 : Organisation génétique du VIH-1

4) Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle réplcatif du VIH-1 se segmente en deux grandes phases, la phase précoce commençant par la fixation du virus sur la cellule et se terminant par l'intégration de son génome (figure 4) et la phase tardive post-intégrative qui comprend toutes les étapes de la transcription du provirus jusqu'à la maturation de la nouvelle particule virale.

- Entrée virale

La première étape du cycle viral est l'attachement d'une particule virale à la surface de la cellule cible. Le virus reconnaît le récepteur CD4 (principal récepteur de l'entrée) ainsi qu'un corécepteur CCR5 ou CXCR4. Ces corécepteurs, membres de la famille des récepteurs aux chimiokines, vont définir le tropisme des différentes souches de VIH-1. Plusieurs protéines cellulaires peuvent également être impliquées dans l'attachement telles que les HSPG (Héparanes Sulfates ProtéoGlycanes), la nucléoline ou le LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated antigen-1). La fixation entre la SUgp120 et les récepteurs CD4 va induire la dissociation du complexe SUgp120-TMgp41 ce qui va provoquer l'exposition de la TMgp41 au corécepteur. Cette association va entraîner la fusion des membranes cellulaire et virale.

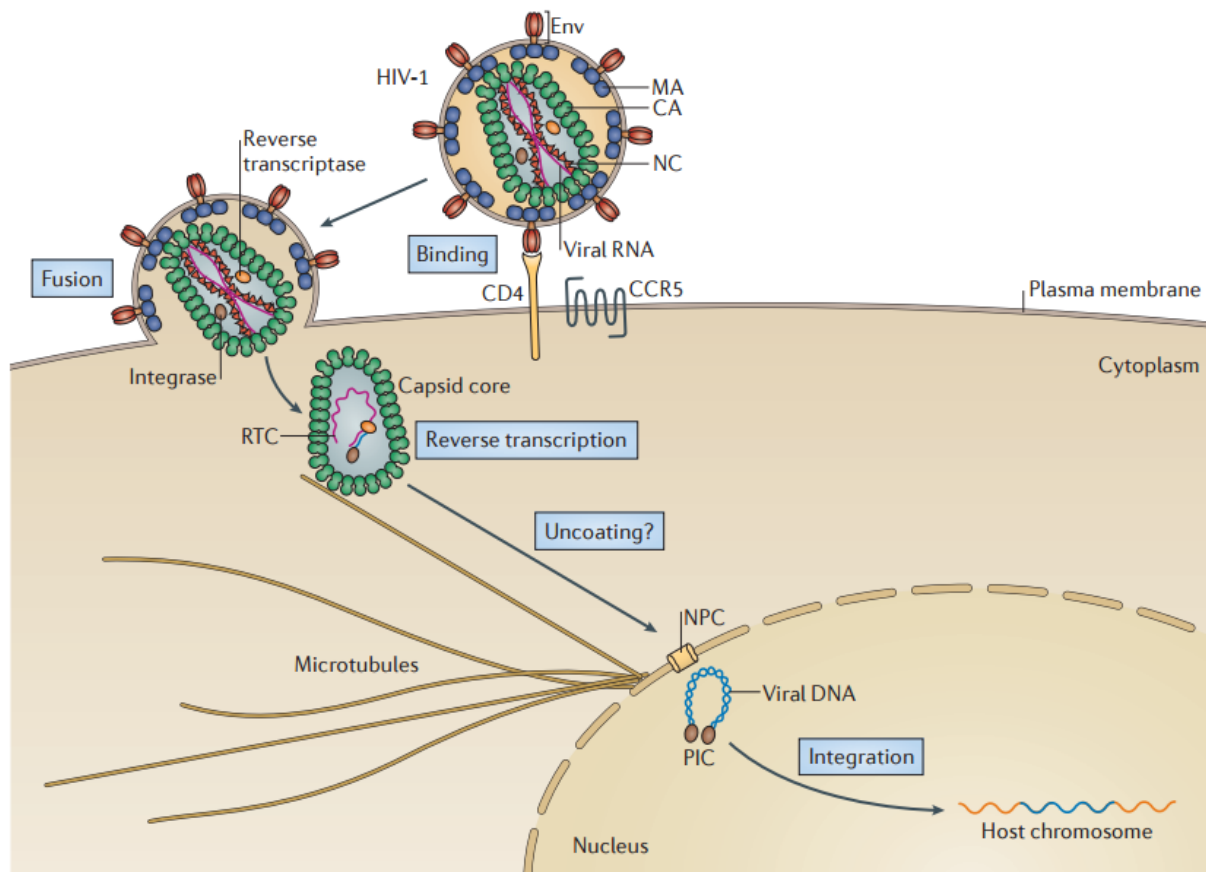


Figure 4 : Phase précoce du cycle de réplication du VIH-1 (Campbell et Hope 2015)

La phase précoce commence par la fusion des membranes virale et cellulaire ou l'endocytose, il y a ensuite rétrotranscription de l'ARN viral puis décapsidation avant l'export de l'ADN viral dans le noyau pour son intégration dans le génome de la cellule.

Le VIH-1 peut également entrer dans la cellule cible par endocytose. La Dynamine est impliquée dans ce mécanisme d'endocytose en provoquant la formation de vésicules. Elle va remodeler les filaments d'actine et favoriser la courbure de la bicouche lipidique. Dans le cas de l'endocytose, la protéine gp120 va interagir avec une molécule d'adhésion spécifique des cellules DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grapping Non-integrin). Cette liaison va permettre l'internalisation du virus dans les vésicules (Melikyan 2014).

- Transcription inverse

Après entrée du virus dans la cellule cible, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme. L'ARN viral est ensuite rétrotranscrit pour former l'ADN double brin viral qui s'intégrera dans le génome de la cellule hôte. La protéine majeure de cette étape est la rétrotranscriptase (RT), enzyme dimérique composée de deux sous-unités p66 et p51 possédant des activités ADN polymérase ARN et ADN dépendante, ainsi qu'une activité RNase H.

La RT débute la synthèse de l'ADN viral à partir de l'extrémité 3' de l'ARNt^{lys3} hybridé au PBS (Primer Binding Site) et termine la synthèse à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Parallèlement à cette synthèse d'ADN de polarité négative, l'ARN génomique est dégradé par l'activité RNase H de la RT. Cette étape est suivie d'un premier transfert de brin durant lequel le brin d'ADN nouvellement synthétisé s'hybride à l'extrémité 3' du génome pour permettre la synthèse du brin d'ADN (-) jusqu'au PBS. L'ARN viral est ensuite dégradé sauf deux séquences PPT (PolyPurine Tract) localisées dans la partie centrale du génome (PPTc) et en 5' de la région U3 qui sont résistantes à la RNase H. Ces PPT vont servir d'amorces pour l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) qui va se poursuivre jusqu'à la transcription inverse d'une partie de l'ARNt^{lys3}. L'activité RNase de la RT va libérer le PBS en clivant l'ARNt^{lys3} et les séquences PPT. Les deux séquences PBS s'hybrident ce qui permet le second transfert de brin au cours duquel l'ADN (+) simple brin est transféré à l'extrémité 3' de l'ADN (-) ce qui forme un ADN intermédiaire circulaire. Le résultat de cette étape donne un ADN double brin linéaire possédant une ou deux longues répétitions terminales identiques (LTR) (Basu et al 2008) (figure 5).

- Décapsidation

De nombreuses études montrent que la décapsidation a lieu après la synthèse de l'ADN proviral, au niveau des pores nucléaires (Arhel et al 2007). En effet, la capsid étant plus large que les pores nucléaires, une décapsidation est donc nécessaire à l'entrée du génome viral dans le noyau de la cellule. L'étape de décapsidation va permettre la maturation du complexe de transcription inverse en complexe de pré-intégration (PIC) capable de traverser les pores nucléaires.

- Import nucléaire du PIC et intégration du génome viral

Le complexe de pré-intégration est composé de l'ADN double brin associé aux protéines virales MA, RT, IN, Vpr ainsi que certaines protéines cellulaires (LEDGF, BAF, HMG...) (Arhel 2010). Ce PIC préserve l'ADN viral de la dégradation et permet son intégration dans le génome. Il ne peut entrer dans le noyau que par un transport actif assuré par la machinerie d'import nucléaire de la cellule. Pour cela, la plupart des protéines composant le PIC possèdent un NLS leur permettant d'être importées dans le noyau.

Dès l'entrée dans le noyau, IN va permettre l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome. Cette intégration a lieu de préférence dans des zones où il y a une forte transcription des gènes par l'ARN polymérase II (Wang et al 2007).

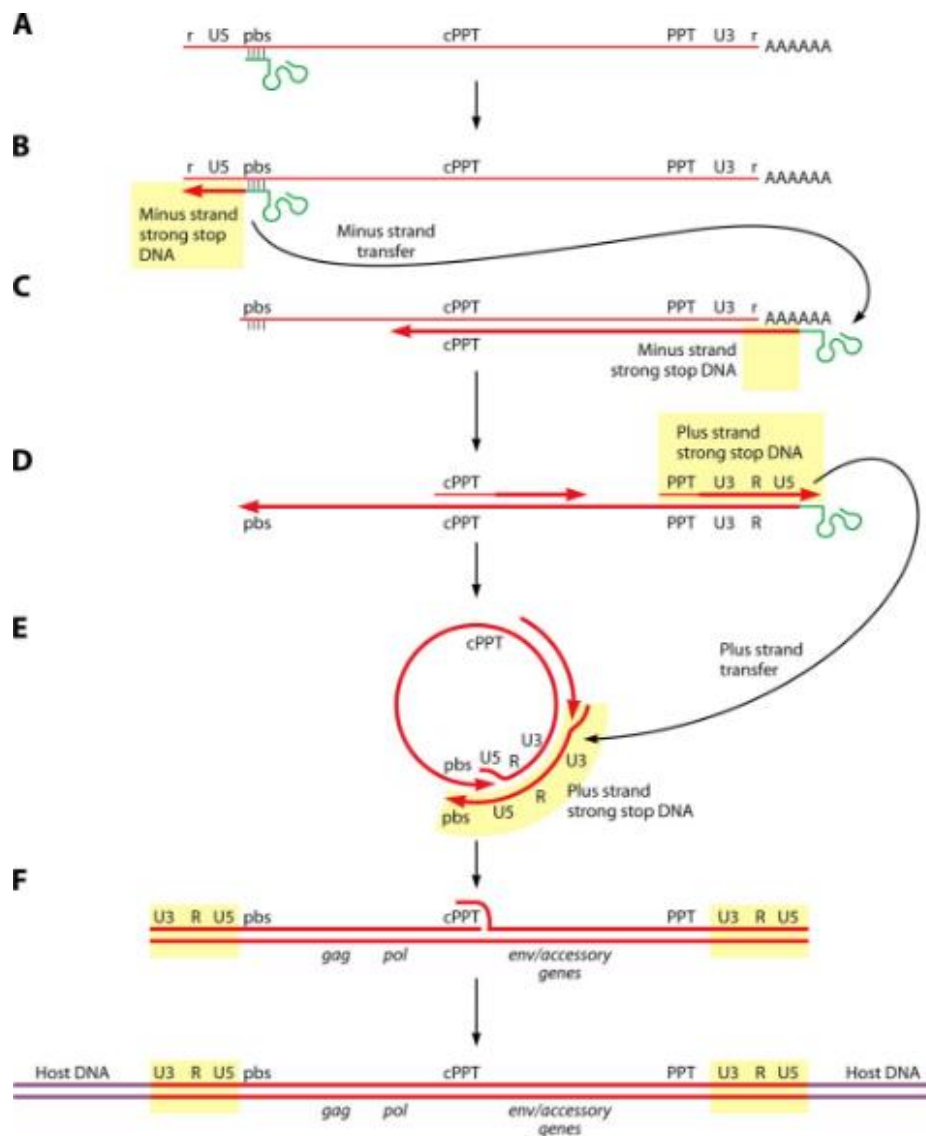


Figure 5 : Transcription inverse de l'ARN génomique du VIH-1 (Onafuwa-Nuga et Telesnitsky 2009)

Dès l'entrée dans le noyau, IN va permettre l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome. Cette intégration a lieu de préférence dans des zones où il y a une forte transcription des gènes par l'ARN polymérase II (Wang et al 2007).

Cependant, l'étape d'intégration est très rare et tous les PIC ne provoquent pas d'infection productive. Le taux d'ADN viral non intégré est d'environ 99% de l'ADN viral total (Chun et al 1997). Lors de la non-intégration de l'ADN dans le génome cellulaire, l'ADN viral peut former un cercle contenant les deux LTR, un seul LTR ou peut rester linéaire. Aucune de ces trois formes ne permet la production de virus infectieux mais elles peuvent servir de matrice pour la synthèse de protéines virales comme Tat, Rev et Nef (Kelly et al 2008). L'intégration de l'ADN marque la fin de la phase précoce et le début de la phase tardive (figure 6).

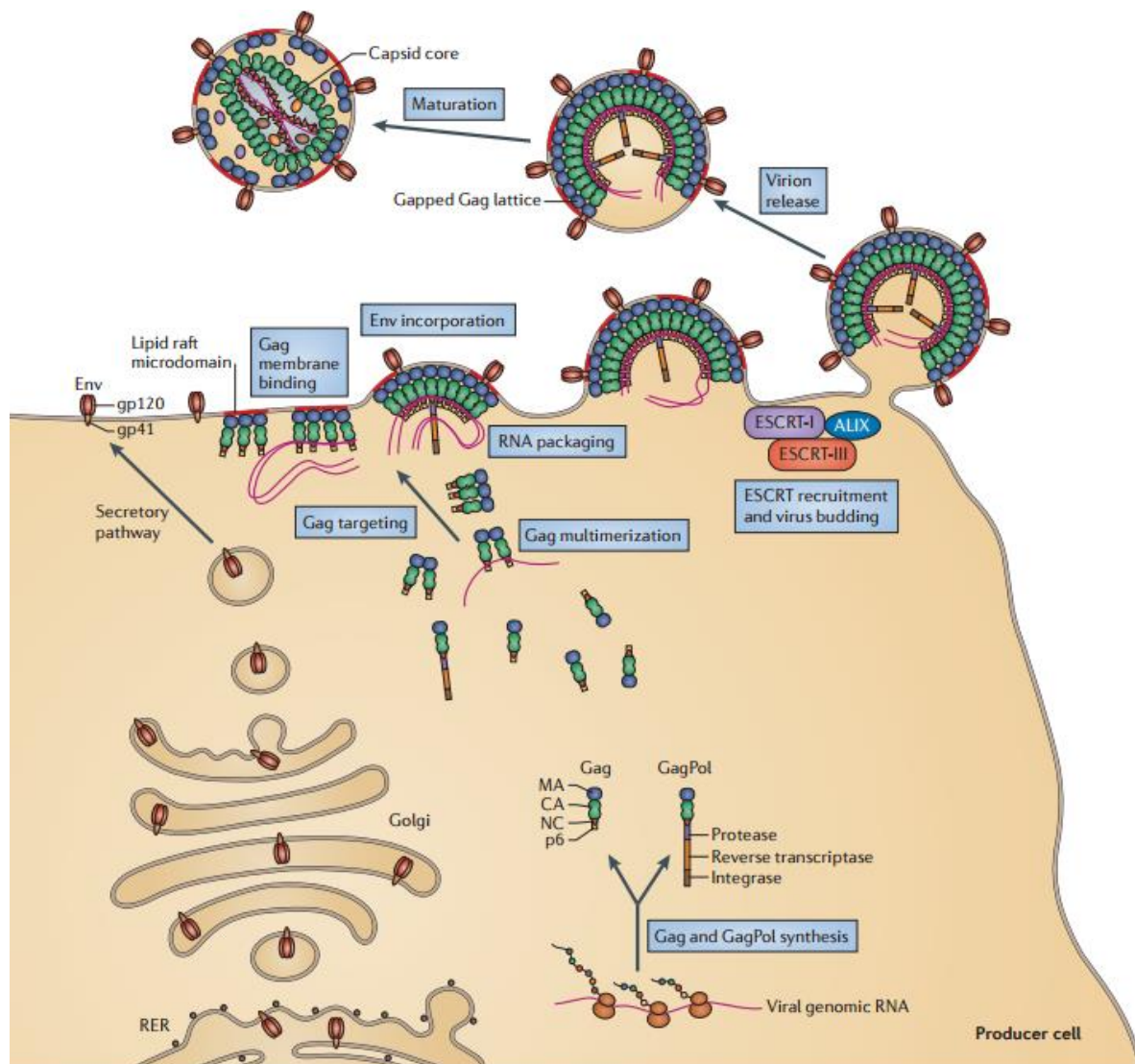


Figure 6 : Phase tardive du cycle de réplication du VIH-1 (Freed 2015)

La phase tardive débute par la transcription et l'épissage du génome viral puis par l'export des ARNm vers le cytoplasme et leur traduction en protéines virales. Enfin, l'étape d'assemblage initie le bourgeonnement puis la maturation des nouvelles particules virales.

- Transcription et épissage

Après intégration, l'ADN viral intégré dans le génome est appelé provirus. Celui-ci sert de matrice pour la transcription des ARN viraux à l'origine des protéines structurales, enzymatiques, régulatrices et auxiliaires. La région LTR en 5' composée de trois domaines fonctionnels (U3, R et U5) permet l'initiation de la transcription (Tripathy et al 2011). En effet, cette région contient le promoteur de l'ARN polymérase II (région U3) ainsi que plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires tels que SP1 ou NF- κ B (Swingler et al 1994). La transcription est composée de deux étapes principales : l'étape précoce dépendante des facteurs cellulaires et l'étape tardive dépendante de la protéine virale Tat et du facteur d'élongation P-TEFb (Barboric et al 2001).

Lors de la première étape, le provirus est transcrit par l'ARN polymérase II. Les ARN produits sont multi-épissés et vont être traduits afin de produire les protéines Tat, Rev et Nef. De plus, ces ARN contiennent une tige-boucle stable nommée TAR (Trans-Acting Responsive element) où va se fixer la protéine Tat (Kao et al 1987 ; Chen et al 2012). Le facteur NF- κ B va se fixer sur le domaine activateur de la région LTR et induire un remodelage de la chromatine permettant une augmentation du taux d'initiation et d'élongation de la transcription. Une partie de l'ARN viral va être exportée du noyau puis les protéines Tat, Rev et Nef vont être traduites. Tat et Rev sont réimportées dans le noyau, Tat active la transcription et Rev permet le transport des ARN génomiques et mono-épissés dans le cytoplasme (Fernandes et al 2012).

Durant la deuxième phase, la protéine Tat augmente de façon importante la transcription. Elle reconnaît la tige-boucle TAR et recrute le facteur d'élongation P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor) qui va phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II lui conférant une activité plus processive. Après élongation de la transcription, le complexe formé de Tat, TAR et P-TEFb se dissocie après acétylation de Tat et interaction avec la protéine PCAF (p300/ CREB Binding protein-Associated Factor) (Mujtaba et al 2002 ; Pumfery et al 2003).

Les ARN viraux contiennent quatre sites donneurs et huit sites accepteurs d'épissage ce qui conduit à la production de plus de 100 ARNm viraux différents (Ocwieja et al 2012). Il existe trois classes d'ARNm viraux : l'ARN non épissé (9,2 kb) qui représente l'ARN génomique ainsi que l'ARNm exprimant les protéines structurales et enzymatiques, les ARN mono-épissés (4 kb) codant les protéines Vif, Vpr et Vpu/Env et les ARN multi-épissés (2 kb) permettant la synthèse de Tat, Rev et Nef (Leblanc et al 2013).

- Export et traduction

L'export des ARN viraux multi-épissés s'effectue par la voie classique utilisée par les ARNm cellulaires faisant intervenir le complexe NXT1/TAP (Pocock et al 2016). Les ARN mono et non épissés nécessitent la protéine Rev pour être exportés. Rev possède un signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un signal de localisation cytoplasmique (NES) afin de jouer le rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme. Cette protéine se fixe sur une séquence tige-boucle stable présente dans le gène *env* nommée RRE pour Rev Responsive Element ce qui induit l'exposition du signal NES (Cullen 2003). Rev interagit avec les protéines de la machinerie d'export CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1 ou exportine 1) et la GTPase Ran (Ras-related nuclear protein) afin de transporter les ARN mono et non épissés. Dans le cytoplasme, le complexe ARN/Rev/CRM1/Ran va se dissocier

grâce à l'hydrolyse du GTP et Rev va retourner dans le noyau (Purcell et Martin 1993 ; Tazi et al 2010).

Les ARN viraux sont ensuite traduits par la machinerie cellulaire. Les protéines Tat, Rev, et Nef sont synthétisées à partir de l'ARN multi-épissé grâce au mode de traduction classique. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-pol sont produits à partir de l'ARN non épissé alors que les protéines d'enveloppe, Vpu, Vif, et Vpr sont synthétisées à partir de l'ARN mono-épissé. Dans ces deux cas, la traduction a lieu à partir du même transcrit mais sa régulation n'est pas identique suivant ces deux cas. En effet, les protéines Env et Vpu sont produites à partir d'un ARN bicistronique possédant deux ORF qui se chevauchent. En effet, la partie 3' du gène *vpu* chevauche le début du gène *env*. Env est synthétisée par « leaky-scanning » car le contexte Kozak faible du codon d'initiation de Vpu permet la poursuite du balayage du ribosome jusqu'au codon d'initiation de Env (Schwartz et al 1990). En ce qui concerne la polyprotéine Gag-pol, sa traduction est dépendante d'un décalage du cadre de lecture ou « frameshift ». Une séquence de glissement associée à une tige-boucle permet le décalage d'un nucléotide vers le 5' du cadre de lecture ce qui prolonge la traduction au-delà du premier codon stop situé sur l'ORF de *gag* (Bidou et al 1997). Cependant, le mécanisme de frameshift est plus rare, la traduction de Gag seule est 20 fois plus fréquente que celle de Gag-pol.

La traduction des ARN viraux peut également être initiée par des régions spécifiques appelées IRES (Internal Ribosome Entry Sites). Dans ce cas, le ribosome est recruté près ou sur le codon d'initiation AUG sans avoir besoin de balayage du ribosome (Balvay et al 2009 ; Chamond et al 2010). Deux IRES ont été identifiés chez le VIH-1, un situé dans la 5'UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm et le deuxième localisé dans la région codante de Gag (Brasey et al 2003 ; Weill et al 2010).

- Assemblage

L'assemblage de la particule virale a lieu à la membrane plasmique et/ou à la membrane des endosomes tardifs (MVB : Multivesicular body). Le choix entre la membrane plasmique et les endosomes tardifs dépend du type cellulaire et peut résulter d'un réseau complexe de signaux d'adressage. Dans les LT4 et les macrophages chroniquement infectés par le VIH-1, l'assemblage s'effectue dans les endosomes tardifs alors que dans d'autres cellules telles que les cellules HEK293T il s'observe à la fois à la membrane plasmique et dans les MVB (Corbin et al 2008). L'acteur principal de l'assemblage est le précurseur Gag, Pr55^{Gag}. Il exprime les protéines MA, CA, NC, p6 et les peptides intermédiaires p1 et p2.

La protéine Gag possède trois domaines impliqués dans l'assemblage de la particule virale :

- Le domaine M (Membrane binding domain) situé en N-terminal est myristylé au niveau de la protéine MA ce qui permet son ancrage à la membrane plasmique (Göttlinger et al 1989).

- Le domaine d'interaction I composé des futures protéines NC et CA et permet la multimérisation de Gag

- Le domaine L (Late domain) situé en C-terminal contenant p6 impliqué dans l'encapsidation de Vpr ainsi que le relargage des particules virales par le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Kondo et al 1995).

Deux copies homologues de l'ARN génomique sont encapsidées sous forme dimérique. Lors de l'assemblage, le précurseur Pr55^{Gag} doit sélectionner l'ARN génomique à partir d'ARN viraux et cellulaires épissés. Cette sélection de l'ARN génomique s'effectue grâce à SL1, une tige-boucle contenue dans la région 5'UTR de l'ARN génomique (Abd el Wahab et al 2014). L'interaction entre le domaine NC de Gag et le signal d'encapsidation Psi en 5' de l'ARN génomique (Paillart et al 2004) est suivie par l'encapsidation de l'ARN. De plus, cette interaction permet la multimérisation de Gag provoquant un changement de conformation de MA qui va exposer son domaine N-terminal myristylé (Paillart et Göttlinger 1999 ; Ono et al 2004). Cela permet l'ancrage de Gag dans la bicouche lipidique de la membrane, l'interaction d'une région basique de MA avec le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate permettant de stabiliser cette liaison. L'ancrage de Gag induit une courbure de la membrane au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol, sphingolipides et protéines membranaires ce qui favorise le bourgeonnement (Ono et Freed 2001).

La glycoprotéine Env qui est constituée d'un domaine de surface gp120 et d'un domaine transmembranaire gp41, va s'associer en trimères et devenir mature suite au clivage de ses deux sous-unités par une protéase cellulaire nommée furine (Hallenberger et al 1992). Une protéine cellulaire TIP47 (Tail-Interacting Protein of 47 kDa) joue le rôle d'adaptateur entre les glycoprotéines d'enveloppe et Gag. Ainsi, TIP47 favorise la liaison entre gp41 et la MA pour induire l'incorporation des protéines d'enveloppe dans les particules virales (Lopez-Verges et al 2006).

- Bourgeonnement et maturation

La protéine Gag recrute les protéines cellulaires nécessaires au bourgeonnement dans les endosomes tardifs et les redirige vers la membrane plasmique. Ces protéines sont regroupées sous forme de complexes ESCRT-1, 2 et 3 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Une protéine du complexe ESCRT-1 appelée Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) interagit avec le motif PTAP du domaine p6 de Gag permettant l'initiation du bourgeonnement (Pornillos et al 2003).

Le recrutement d'autres facteurs du complexe ESCRT-3 ainsi que VPS4 par la protéine ALIX aux sites de bourgeonnement permet la déformation de la membrane ainsi que la scission (Votteler et Sundquist 2013). Parmi les protéines du complexe ESCRT-3, CHMP4 (Charged Multivesicular body protein 4) et CHMP2 sont essentielles pour le bourgeonnement du VIH-1 (Morita et al 2011).

La maturation des particules virales débute immédiatement après le bourgeonnement. Les interactions entre précurseurs Gag-Pol induisent le rapprochement des domaines correspondant à la protéase qui dimérisent pour former une protéase active. PR clive Pr55^{Gag} au niveau des jonctions p2 et NC libérant les protéines MA/CA/p2 et NC/p1/p6. Des coupures intermédiaires entre p1/p6 et MA/CA sont suivies par des clivages CA/p2 et NC/p1 permettant la libération de NC et sa condensation avec l'ARN génomique ainsi que la formation du core par la protéine de capsid. Ces étapes sont nécessaires pour l'infectivité des particules virales matures (Dordor et al 2011).

II. IMMUNITE ANTIVIRALE

1) Immunité innée et adaptative

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les pathogènes. Cette réponse immunitaire est très rapide et existe dans tous les organismes animaux et végétaux. Elle constitue une barrière physique et chimique de premier ordre et permet la détection immédiate des agents infectieux pour le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection (Medzhitov et al 2012). De plus, la réponse immunitaire innée est capable d'induire la cascade du complément qui est constituée d'un ensemble de 35 protéines impliquées dans le mécanisme d'élimination des pathogènes (Harboe et Mollnes 2008). Enfin, le système immunitaire inné permet l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

Le système immunitaire adaptatif n'est présent que chez les vertébrés contrairement au système immunitaire inné (Janeway 1992). Cette réponse adaptative est spécifique du pathogène et permet la mise en place d'une réponse immunitaire dite mémoire. Il existe deux types de réponse adaptative : l'immunité à médiation humorale et à médiation cellulaire.

2) Cellules de l'immunité innée

Le système immunitaire inné est constitué à la fois de cellules (monocytes, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, NK Natural Killer) (Nauseef 2007) et de molécules (système du complément, interférons, cytokines). Les monocytes, cellules phagocytaires capables d'ingérer des particules étrangères, font partie de la famille des leucocytes, globules blancs circulant dans le sang. Ces cellules sont capables de se différencier en macrophages, cellules dendritiques ou encore ostéoclastes (Shi et Pamer 2011). Les macrophages qui sont aussi des cellules phagocytaires, participent à la réponse immunitaire en éliminant les pathogènes et les débris cellulaires de l'organisme. De plus, elles produisent des molécules appelées chimiokines qui vont permettre le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Les macrophages sont aussi capables de jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques. Celles-ci sont présentes au niveau des muqueuses et font donc partie des premières cellules impliquées dans la défense immunitaire (Davies et al 2013). Elles sont présentes dans les poumons, l'épiderme et dans l'intestin. Les cellules NK ou Natural Killer éliminent sélectivement les cellules anormales comme les cellules tumorales ou infectées par des virus. Elles sécrètent des cytokines qui vont orienter la voie de la réponse immunitaire adaptative (Waggoner et al 2016).

3) Cellules de l'immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale est induite par les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B viennent de la moelle osseuse où ils vont acquérir leur maturité (Ma et Staudt 2001). Leur rôle principal est de produire des anticorps dirigés spécifiquement contre les pathogènes grâce à la présentation d'antigènes par les macrophages, ces cellules activées sont alors dites plasmocytes. Il existe également des lymphocytes B à mémoire qui vont permettre une réponse immunitaire plus rapide lors d'une deuxième exposition à leur antigène spécifique (Tangye et Tarlinton 2009). Les lymphocytes T (LT), responsables de la réponse adaptative à médiation cellulaire, se développent et acquièrent leur maturation dans le thymus. On distingue trois principaux types de LT : les LT cytotoxiques, les LT auxiliaires et les LT suppresseurs. Les LT cytotoxiques sont responsables de la destruction des cellules infectées exprimant à leur surface des antigènes spécifiquement reconnus issus de pathogènes (Price et al 1999). Les LT auxiliaires reconnaissent spécifiquement un antigène à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène avant de proliférer et d'activer plusieurs autres cellules immunitaires (Fietta et Delsante 2009). Les LT₄, cibles du VIH, permettent la prolifération clonale ainsi que la différenciation des LT₈ en LT cytotoxiques et des lymphocytes B en plasmocytes. Après élimination du pathogène, une partie des LT auxiliaires va constituer une population de LT mémoires. Enfin, les LT suppresseurs sont capables de supprimer les lymphocytes s'attaquant aux cellules de leur propre organisme (Sakaguchi et al 2010).

4) Cytokines induites par le VIH-1

Lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH, on observe une forte production de cytokines pro et anti-inflammatoires. Ces cytokines sont produites pour la plupart par les cellules dendritiques et les cellules phagocytaires (monocytes/macrophages). Durant la phase chronique de l'infection, la forte activation du système immunitaire va mener à une inflammation chronique ayant pour conséquence la dérégulation du réseau de cytokines et l'affaiblissement du système immunitaire. On observe dès la phase précoce une augmentation rapide de la production d'IFN α , d'IL-15, de TNF α , d'IL-10 ainsi qu'une plus lente production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et l'INF γ) (figure 7).

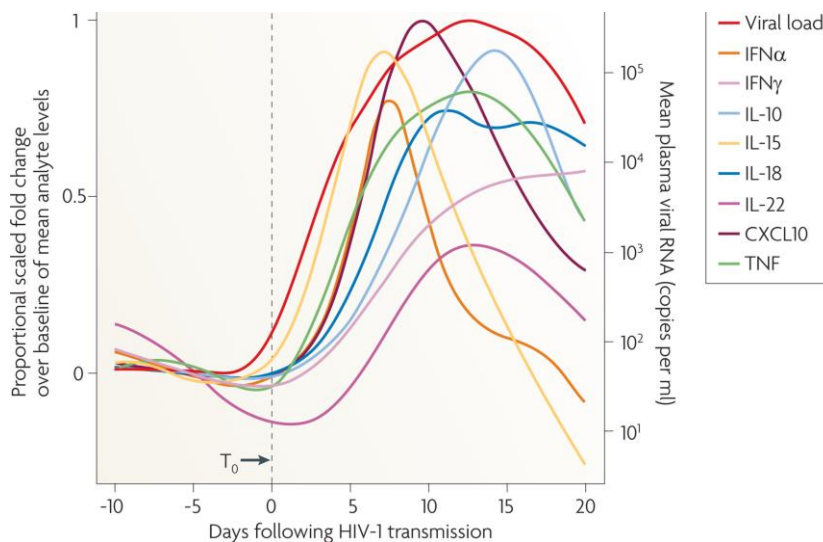


Figure 7 : Cinétique de la production de cytokines et de chimiokines pendant la phase aiguë de l'infection par le VIH-1 (McMichael et al 2010)

Le $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine pro-inflammatoire provenant des NK, lymphocytes B, lymphocytes T ainsi que des cellules phagocytaires. Il peut induire plusieurs voies de signalisation dont la voie $NF\kappa B$ (Nuclear Factor-kappa B), l'apoptose ou encore la nécrose programmée. Lors d'une infection par le VIH-1, le $TNF\alpha$ est capable de bloquer l'entrée du virus dans les macrophages en permettant la synthèse de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) grâce à sa fixation sur son récepteur TNFR2 (Herbein et al 1996). Cependant, cette cytokine est capable d'induire l'apoptose des LT ce qui va avoir pour conséquence la progression de l'immunodéficience. Le $TNF\alpha$ agit en coopération avec des interleukines telles que l'IL-6. Cette interleukine produite par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B et T est aussi pro-inflammatoire. Elle permet l'augmentation de la production de $TNF\alpha$ et donc le blocage de la réplication virale dans les macrophages (Poli et Fauci 1992).

Parmi les cytokines anti-inflammatoires essentielles lors de l'infection, il existe l'IL-10. Cette interleukine permet l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et contribue à l'activation des cellules NK et des LT CD8. Cependant, cette protéine est capable de favoriser l'expression des CCR1, CCR2 et CCR5 ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'infection des monocytes par le VIH (Sozzani et al 1998) Enfin, l'IL-10 est impliquée dans la formation de réservoirs viraux et la persistance du VIH.

Parmi les cytokines induites par le VIH-1, il y a également les interférons (IFN). Ces protéines issues de l'immunité innée sont naturellement produites par les cellules du système immunitaire et permettent l'activation d'autres cellules telles que les NK et les macrophages ainsi que la

présentation antigénique aux LT. L'IFN α joue un rôle clé dans la défense immunitaire contre le VIH : il inhibe la réplication du virus dès les premières étapes, l'expression des gènes viraux ainsi que les étapes d'assemblage et de bourgeonnement des nouvelles particules virales. De plus, l'IFN α permet l'activation de l'expression de plusieurs gènes induits par les IFN (ISG : Interferon-Stimulated Gene).

5) Voies de signalisation des IFN de type I

Parmi les IFN de type I, seuls les IFN α , β , κ , ω et ϵ sont exprimés chez l'homme. Les IFN α sont exclusivement sécrétés par les leucocytes tandis que les IFN β sont également produits par les fibroblastes. Les IFN de type I sont produits à partir de plusieurs voies de signalisation activées par des récepteurs spécifiques appelés PRR pour Pattern Recognition Receptors (Silvin et Manel 2013). Ces récepteurs reconnaissent des signaux de danger issus de cellules infectées ou de pathogènes eux-mêmes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) conduisant à l'activation de cascades de signalisation aboutissant notamment à la production de cytokines dont les IFN α/β . Il existe de nombreux PRR dont les Toll-Like Receptors, les NOD-Like Receptors et les RIG-I-Like Receptors (Carrington et Alter 2012). Lors d'une infection par le VIH-1, le virus est d'abord détecté par les PRR membranaires (TLR et récepteurs de type lectine C) puis par les PRR cytosoliques (NLR, RIG-I et cGAS) et enfin la réponse IFN intervient.

5) 1. Les PRR membranaires

- Les Toll-Like Receptors (TLR)

Les TLR sont les premiers PRR identifiés à la fin des années 1990. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la détection d'une infection et le déclenchement de la réponse immunitaire (figure 8). D'abord découverts chez la drosophile, ces récepteurs ont montré un rôle important pour les défenses immunitaires de l'hôte contre les infections fongiques (Lemaitre et al. 1996). Actuellement, il a été découvert 10 TLR chez l'homme (TLR1-TLR10) exprimés par de nombreuses cellules dont les cellules phagocytaires. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires de type I possédant un domaine extracellulaire riche en leucines permettant la détection des PAMP ainsi qu'un domaine intracellulaire TIR (Toll-Interleukin-1 receptor) responsable de l'activation des signaux de transduction (Akira et al 2004). Les TLR agissent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et leur activation dépend à la fois de la fixation du PAMP au TLR mais également du changement de conformation permettant la liaison du TIR avec le premier adaptateur des voies de signalisation (Gay et al 2006). Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés à la membrane plasmique tandis que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont retrouvés à la membrane endosomale. Les TLR associés aux endosomes

sont les TLR liés à l'immunité antivirale car ils détectent plusieurs formes d'acides nucléiques viraux alors que les TLR 2 et 4 sont impliqués dans la reconnaissance de protéines virales menant à la production de cytokines pro-inflammatoires (Lester et Li 2014).

Le TLR3 exprimé principalement dans les cellules dendritiques, les macrophages, les NK mais également dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, reconnaît l'ARN double brin. Il a été montré que le TLR3 assure la protection contre de nombreux virus à ARN tels que les poliovirus, EMCV ou encore les Coxsackievirus B3 et B4 (Abe 2012, Hardarsson 2007, Richer 2009). De plus, une étude utilisant des agonistes du TLR3 pour son activation a récemment montré que le TLR3 joue un rôle critique anti-VIH dans les macrophages (Zhou et al 2010). L'activation du TLR3 par l'ARN double brin déclenche la cascade de signalisation dépendante de TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) conduisant à la production d'IFN.

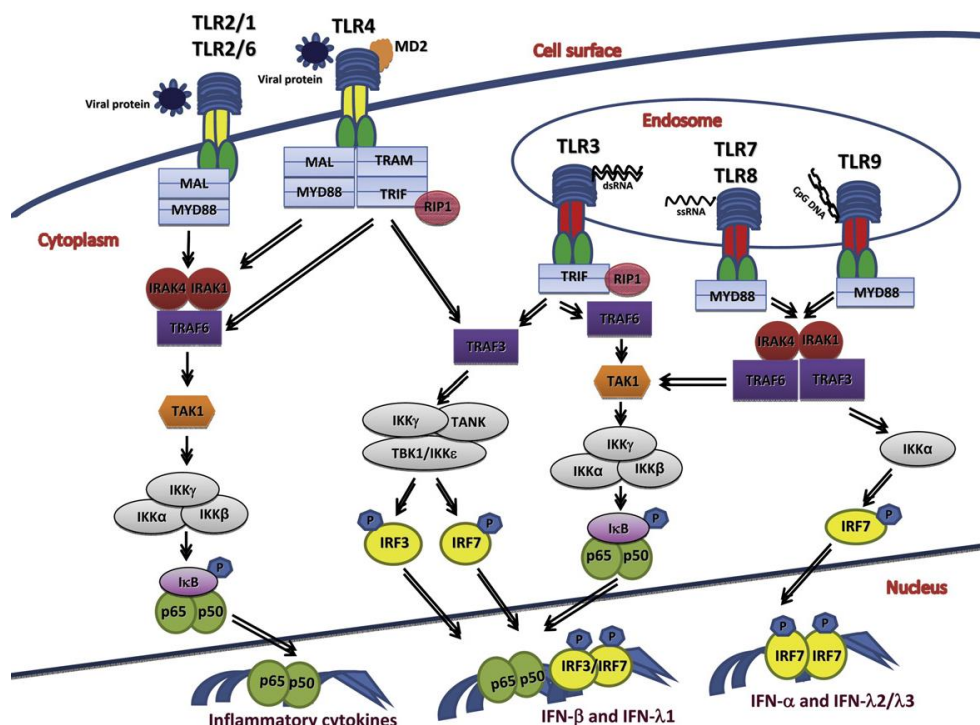


Figure 8 : Voies de signalisation induites par les différents TLR (Lester et Li 2014)

Les TLR7 et 8 reconnaissent principalement les ARN simple brin. La reconnaissance des ARN viraux à la surface des endosomes est dépendante de l'acidification des vésicules endosomales (Lund et al 2004). Les TLR 7/8 sont capables de détecter les séquences virales riches en GU et en AU (Heil 2004) et vont induire la voie de signalisation dépendante de Myd88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) aboutissant à la production d'IFN. De plus, il a été démontré que l'activation du TLR8 par les ARN simple brin dans les macrophages stimule l'autophagie induite par la vitamine D résultant par une inhibition de l'action du VIH-1 (Campbell 2012).

Les TLR9 détectent les motifs CpG non méthylés principalement présents chez les bactéries et les virus à ADN (Lund et al 2003). Comme les TLR7/8, les TLR9 sont localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique, des endosomes et des lysosomes. Ils sont exprimés principalement dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes et leur activation dépend également de l'acidification des compartiments endosomaux. La reconnaissance de l'ADN viral sur le TLR9 va activer la voie NF- κ B dépendante de Myd88 menant à la production d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 ainsi que l'IL-12.

Etant donné le rôle primordial des TLR dans la réponse immunitaire antivirale, chaque étape des voies de signalisation va être la cible de nombreux virus. En effet, les virus vont induire la dégradation de certains composants des TLR, inhiber l'assemblage de complexes de signalisation, interférer avec l'activation de certains facteurs de transcription, agir comme des leurres de protéines cellulaires ou encore déubiquitiner certaines molécules impliquées dans les voies de signalisation (Table 1).

défenses virales	cibles	mécanismes	virus
Dégradation des éléments de la voie des TLR	TRIF	la protéase 3C clive TRIF	coxsackievirus B, EV71
		la protéase NS3/4 clive TRIF	HCV
		RTA dégrade TRIF via le protéasome	KSHV
	Myd88	ICP0 dégrade Myd88 via le protéasome	HSV-1
	IRF3	Npro dégrade IRF3 via le protéasome	BVDV, CSFV
		NSP1 dégrade IRF3 via le protéasome	Rotavirus
	IRF7	la protéase 3C cible IRF7	EV71
RTA dégrade IRF7 via le protéasome		KSHV	
inhibition de la formation des complexes de signalisation	adaptateurs de TIR	A46R s'associe à Myd88, TRIF, TRAM et MAL via leur domaine TIR	virus de la vaccine
	TRAF6 et IRAK2	A52R s'associe à TRAF6 et à IRAK2	virus de la vaccine
	TRAF3, TBK1, IKK ϵ	la protéine M s'associe à TRAF3, TBK1 et IKK ϵ	SARS coronavirus
interférence avec l'activité transcriptionnelle	IRF3	NSP3 P _{pro} se lie à IRF3 pour empêcher sa phosphorylation	SARS coronavirus
		NS1 et ICP0 se lient à IRF3 et CBP pour empêcher leur liaison au promoteur IFN- β	RSV, HSV-1
leurres moléculaires	leurre I κ B α	A49 peut s'associer à β -TrCP pour inhiber son activité	virus de la vaccine
	leurre IRF7	la protéine V s'associe à IKK α	virus de la rougeole
	leurre IRF3	la protéine V s'associe à TBK1 et IKK ϵ	HPIV-2 et HPIV-5
molécules qui déubiquitinent	TRAF3, 6 et TBK1	la protéine L _{pro} des FMDV et SARS déubiquitine les molécules induites par les TLR	FMDV, SARS

Table 1 : Etapes de la voie de signalisation des TLR ciblées par les virus (Adapté de Lester et Li 2014)

- Les récepteurs de type lectine C

Les récepteurs de type lectine C sont exprimés par de nombreux types cellulaires dont les macrophages et les cellules dendritiques. Ces récepteurs font partie intégrante de l'immunité innée car ils reconnaissent les signaux de nombreux pathogènes tels que les virus, les champignons et les bactéries (Sancho et Reis E Sousa 2012). Ils font partie d'une large famille de récepteurs qui fixent les carbohydrates d'une manière calcium-dépendante. Il existe deux types de récepteurs de type lectine C suivant le nombre de domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD) : les CLR de type I tels que DEC-205 (DC205) et les récepteurs au mannose possèdent plusieurs CRD alors que les CLR de type II comme la Dectine, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ne possèdent qu'un seul CRD (den Dunnen et al 2009).

5) 2. Les PRR cytoplasmiques

- Les RIG-I-Like Receptors (RLR)

Les récepteurs RLR sont exprimés dans presque toutes les cellules dont les macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes et les cellules épithéliales (Kato et al 2006). La famille des RLR compte trois membres: RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1), MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated gene 5) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2). Ces protéines sont des hélicases à ARN qui reconnaissent spécifiquement les ARN viraux dans le cytoplasme. RIG-I distingue les ARN cellulaires des ARN viraux en reconnaissant les ARN ayant un triphosphate à leur extrémité 5', une modification que les ARN cellulaires ne possèdent pas (Solis et al 2011). Cette protéine est capable de reconnaître à la fois les ARN viraux simple brin et des ARN double brin alors que MDA5 ne reconnaît que les ARN double brin. RIG-I et MDA5 possèdent deux domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) leur permettant de se fixer à une protéine MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling protein) conduisant à l'assemblage d'un complexe de signalisation qui va activer une protéine adaptatrice STING (Stimulator of Interferon genes) responsable de la stimulation de la production des IFN. Le récepteur LGP2 qui ne possède pas de domaine CARD est incapable d'agir seul mais a une fonction régulatrice des récepteurs RIG-I et MDA5 (Sato et al 2010) (figure 9).

Lors d'une infection par le VIH-1, RIG-I et MDA5 détectent l'ARN génomique dans le cytoplasme de la cellule amenant à l'induction de kinases TBK1 et IKKε et à l'activation d'IRF3 et d'IRF7 (Interferon Regulatory factors) (Schmidt et al 2012) (figure 9). Cette voie de signalisation se termine par la production d'INFα/β (Eisenächer et Krug 2012). Cependant, le VIH-1 peut dégrader

IRF3 et bloquer l'activation des gènes de l'immunité innée. Effectivement, Okumura et al ont montré que les protéines virales Vif et Vpr contribuent à la dégradation d'IRF3 (Okumura et al 2008). De plus, la protéase du VIH-1 est capable de réduire le taux de RIG-I dans les lysosomes (Solis et al 2011).

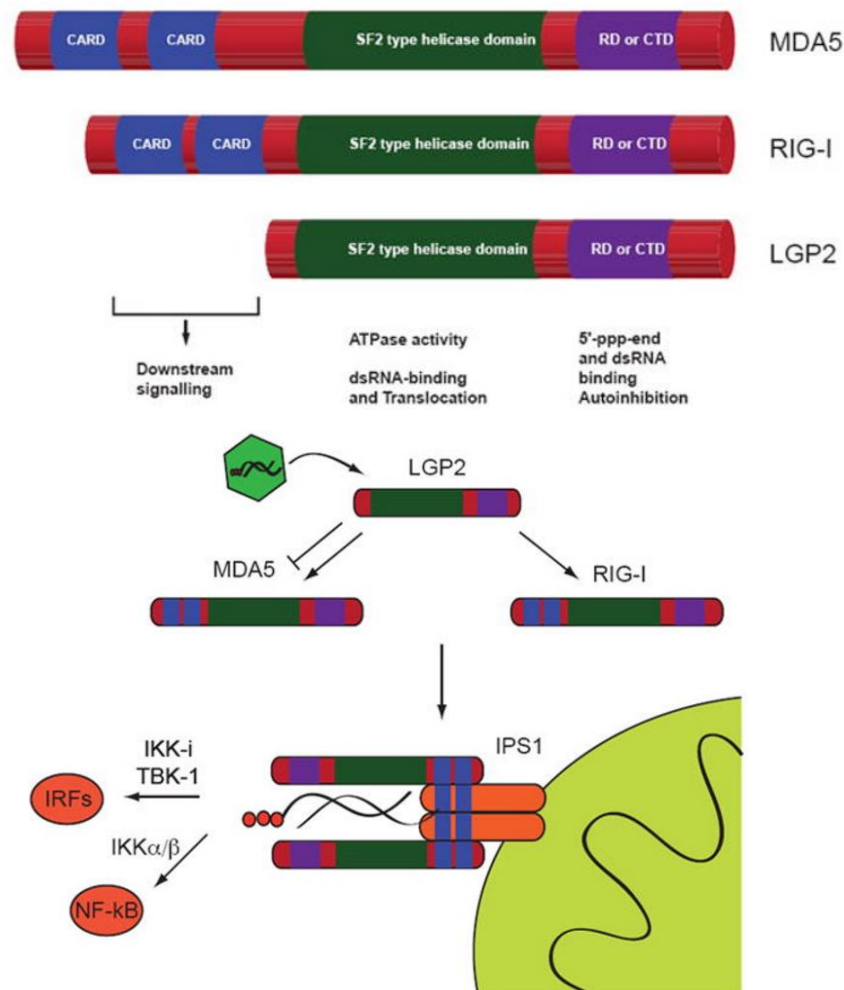


Figure 9 : Structure des RLR et les voies de signalisation induites par ces récepteurs (Schmidt et al 2012)

- Les NOD-Like Receptors (NLR)

Les NLR (Nucleotide binding oligomerization domain receptors) sont principalement exprimés dans le cytosol d'un grand nombre de cellules incluant les cellules épithéliales, les cellules présentatrices d'antigène ainsi que les cellules de l'immunité adaptative (Michallet et al 2013). Ces récepteurs reconnaissent à la fois les signaux de type bactérien et viraux (Le Bourthis et al 2007 ; Jacobs et Damania 2012). Actuellement, on dénombre 22 NLR classés selon le domaine présent dans leur partie N-terminale en 5 sous-familles telles que les NLRA, NLRB, NLRC, NLRP ou encore NLRX (Saxena et Yeretssian 2014). La majorité des signaux de transduction activateurs des NLR entraînent l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires *via* NF-κB et de l'autophagie (Travassos et al 2010). Lors de l'infection par le VIH-1, la protéine NLRP3 (NLR family PYD-containing 3) semble la

seule impliquée dans la susceptibilité au virus (Pontillo et al 2012). Cependant, le mécanisme par lequel cette protéine fonctionne n'est pas encore clairement établi.

- Cyclic GMP/AMP Synthase (cGAS) et IFI16

L'ADN double brin issu de la transcription inverse du VIH-1 peut être reconnu par des senseurs à ADN tels que cGAS (Gao et al 2013). cGAS est un membre de la famille des nucléotidyltransférases dont les substrats sont l'ATP et l'ADP (Civril et al 2013). Cette enzyme détecte l'ADN cytoplasmique et catalyse la formation de 2'3'GAMP qui va se lier à la protéine STING et induire la synthèse d'IFN de type I *via* les voies de signalisation dépendantes d'IRF3 et de NF- κ B.

La protéine IFI16 est aussi capable de reconnaître l'ADN viral ainsi que des transcrits abortifs du VIH-1 afin d'induire la production d'IFN de type I *via* la protéine STING (Jakobsen et al 2013). Cependant, IFI16 est également capable d'induire la mort cellulaire en permettant la formation d'un complexe protéique appelé inflammasome (Martinon et al 2002).

5) 3. L'autophagie

L'autophagie joue également un rôle clé dans l'immunité en participant à la dégradation de pathogènes intracellulaires ainsi qu'en activant les réponses immunitaire innée et adaptative. Elle est capable de promouvoir la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques en réponse à une infection par le VIH-1 (Zhou et al 2012). De plus, l'autophagie permet également d'induire l'activation de la voie dépendante de NF- κ B. En effet, il a été montré qu'un traitement à la rapamycine ou la privation de nutriment conduit à l'activation du facteur IKK et à la dégradation d'I κ B dans les fibroblastes embryonnaires murins. Enfin, l'autophagie intervient directement sur le développement et la survie des LT. Elle participe à la sélection positive des LT dans le thymus et est à la base du répertoire des LT (Kuballa et al 2012 ; Randow et Münz 2012).

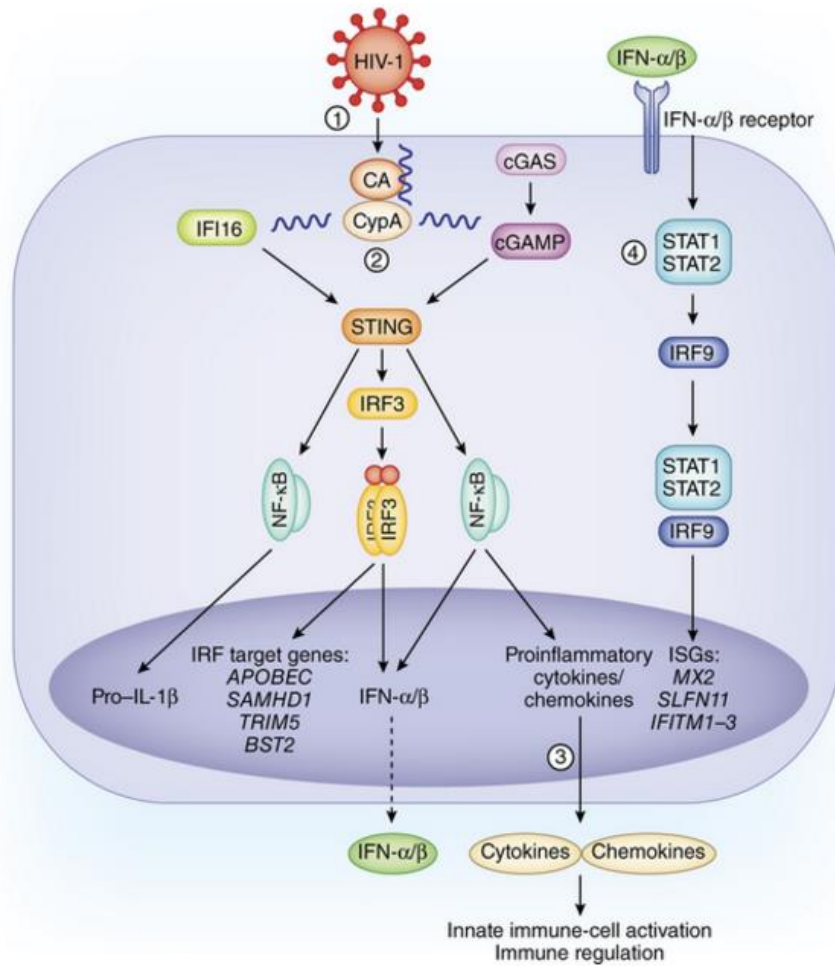


Figure 10 : Schéma des principaux PRR impliqués dans la reconnaissance des PAMP du VIH-1 (Altfeld et Gale 2015)

III. FACTEURS DE RESTRICTION ANTI-VIH ET PROTEINES ANTIVIRALES

Les facteurs de restriction sont des protéines cellulaires antivirales exprimées par les gènes induits par les IFN de type I (ISG). Leur définition repose sur quatre grandes caractéristiques : ils sont activés par les IFN, ils doivent induire une forte réduction de l'infectivité, ils sont souvent contrés par des protéines virales car les virus ont co-évolué avec ces facteurs, ils portent un effet de sélection positive due aux interactions protéines-protéines durant les étapes de co-évolution (Harris et al 2012). Les facteurs de restriction sont la plupart du temps exprimés dans des cellules non-permissives cibles du VIH-1 qui empêchent la réplication virale. Des expériences de fusion cellulaire ont permis de découvrir les facteurs de restriction inhibant l'action des protéines Vif et Vpu (Sheehy et al 2002 ; Varthakavi et al 2003). Les facteurs de restriction anti-VIH-1 vont agir à différentes étapes du cycle viral (figure 11).

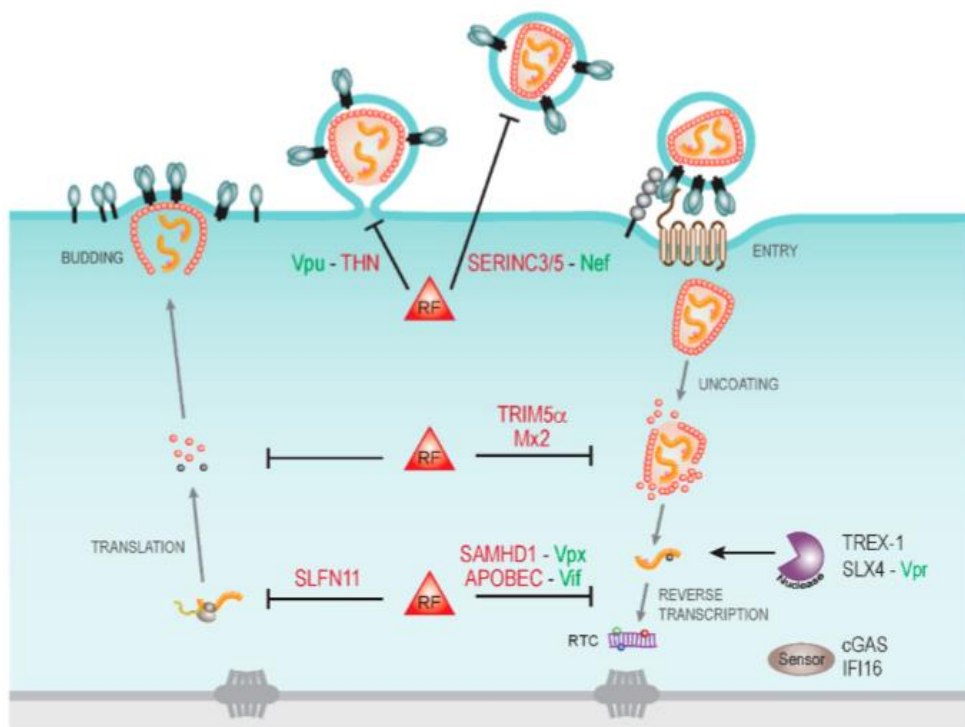


Figure 11 : Représentation des principaux facteurs de restriction (RF) du VIH-1 et les protéines qui les contiennent (Fackler 2015)

Les facteurs de restriction sont représentés en rouge, les protéines qui les contiennent sont indiquées en vert.

1) Les facteurs de restriction

A. TRIM5 α (Tripartite motif-containing 5 α)

En 2004, TRIM5 α a été identifié comme un facteur de restriction clé inhibant la réplication d'un grand nombre de virus dont le VIH-1 (Stremlau et al 2004). A ce jour, plus de 72 protéines de cette famille ont été identifiées chez l'homme et la souris (Kajaste-Rudnitski et al 2010). Les protéines de la famille TRIM sont caractérisées par trois domaines distincts : un domaine RING finger en partie N-terminale, un à deux domaines B-box ainsi qu'un domaine coiled-coil (CC). Certaines protéines issues de cette famille possèdent également un domaine cyclophiline A ou encore un domaine B30.2/SPRY contenant les motifs essentiels à l'interaction avec la capsid du VIH-1 (figure 12).

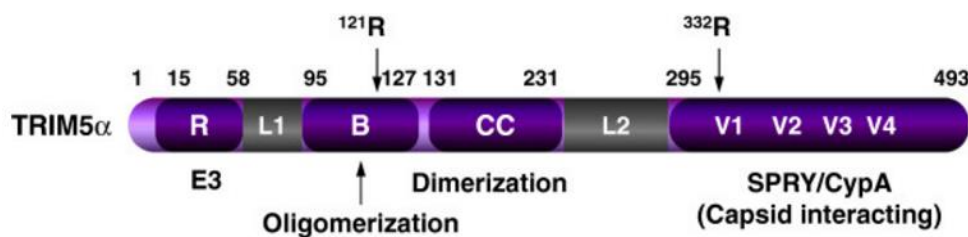


Figure 12 : Représentation schématique des domaines de TRIM5 α (Zheng et al 2012)

Les protéines de la famille TRIM sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la régulation immunitaire, l'oncogenèse, la signalisation cellulaire ou encore la prolifération cellulaire. Avec TRIM5, seules quelques TRIM possèdent des activités antivirales telles que TRIM1, TRIM11, TRIM15, TRIM 22, TRIM28 et TRIM31 (Yap et al 2004 ; Uchil et al 2008 ; Allouch et al 2011). En ce qui concerne le VIH-1, TRIM5 α possède la meilleure activité antivirale. Cette protéine possède trois activités différentes : elle a une activité E3 ubiquitine ligase induite par son domaine RING, elle est capable de s'oligomériser grâce à ses domaines B-box et coiled coil mais elle est surtout capable de se lier *via* son domaine SPRY à la capsid du VIH-1 situé dans la région C-terminale (Grutter et Luban 2012).

TRIM5 α est un gène induit par les interférons de type I (ISG) qui interagit avec la capsid pour bloquer la réplication du VIH-1 dès que le virus entre dans le cytoplasme de la cellule infectée. Bien que le mécanisme précis par lequel TRIM5 α inhibe la réplication du VIH-1 ne soit pas encore identifié, il apparaît clairement deux hypothèses pour expliquer ce phénomène. Premièrement, la reconnaissance de la protéine de capsid par TRIM5 α entraînerait une décapsidation précoce ayant pour conséquence un blocage du cycle au niveau de l'entrée de la capsid dans le cytoplasme (Ganser-Pornillos et al 2011 ; Johnson et al 2009 ; Diaz-Griffero et al 2011) (figure 13).

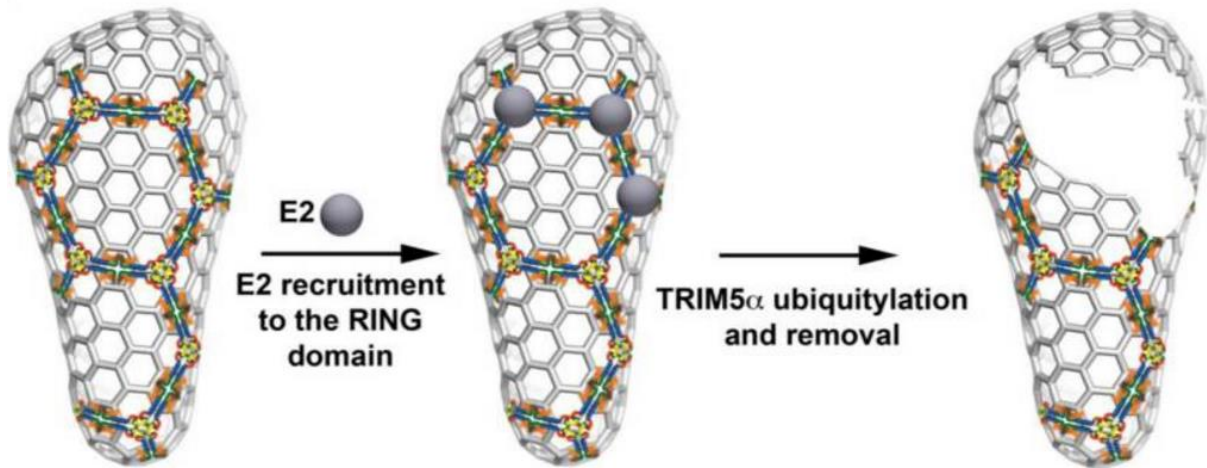


Figure 13 : Représentation de l'action de TRIM5 dans la décapsidation précoce (Diaz-Griffero et al 2011)

De plus, la Cyclophiline A joue un rôle important dans la réplication virale en stabilisant la capsid. Deux protéines de fusion entre TRIM5 α et la CypA ont été découvertes chez les primates (Nisole et al 2004). Deuxièmement, grâce à son domaine RING, TRIM5 α est capable de recruter le complexe E3 ubiquitine ligase qui va avoir pour conséquence l'activation des voies de signalisation de la réponse immunitaire innée et notamment NF- κ B (Pertel et al 2011). En effet, TRIM5 α va s'associer avec les enzymes UBC13 et UEV1A afin de produire une chaîne d'ubiquitines reliées entre elles par un résidu K63 provoquant la phosphorylation de TAK1 (TGF-activated kinase 1) qui induit l'activation de NF- κ B.

Bien que TRIM5 α soit une protéine induite par les IFN de type I qui diminue significativement l'infectivité des virus, elle n'est pas contrecarrée par une protéine virale. Ceci la distingue de la définition classique des facteurs de restriction et peut remettre en question son statut de facteur de restriction.

B. BST2/Tetherin et Vpu

La Tetherin, auparavant nommée BST2 (Bone marrow STromal antigen 2), a été identifiée comme facteur de restriction contre le VIH-1 en absence de la protéine Vpu (Neil et al 2008). Des études précédentes montrent effectivement que la délétion du gène *vpu* provoque une diminution de la libération des particules virales jusqu'à 10 fois inférieure à celle issue de cellules contenant Vpu (Strebel et al 1988). Elle est exprimée dans plusieurs lignées cellulaires et son expression est induite par les interférons de type I et II. Cette protéine effectue la navette entre la membrane plasmique et les membranes cellulaires des compartiments internes (appareil de Golgi et endosomes). Elle est connue pour interférer avec la libération et le bourgeonnement des nouvelles particules virales

matures issues des cellules infectées par le VIH-1 (Neil et al 2007). Etant une glycoprotéine transmembranaire, la Tetherin possède un domaine N-terminal cytoplasmique (CT) relativement court suivi d'un domaine transmembranaire (TM) permettant la liaison à la protéine Vpu, un domaine extracellulaire coiled-coil flexible ainsi qu'un domaine C-terminal composé d'un ancrage GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) permettant sa liaison à la membrane (figure 14).

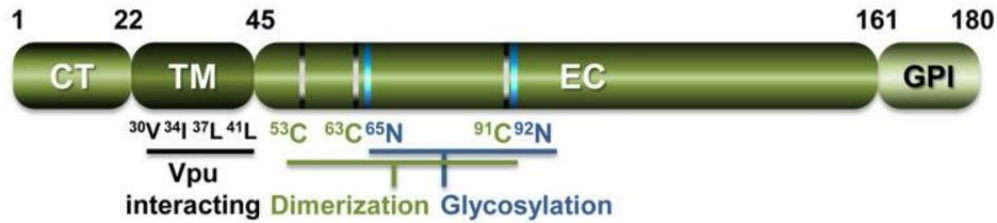


Figure 14 : Représentation schématique des différents domaines de la Tetherin (Zheng et al 2012)

La restriction du VIH-1 par la Tetherin consiste en la rétention des particules virales bourgeonnantes à la surface des cellules cibles en absence de Vpu. Ainsi, les virions néosynthétisés s'accumulent à la membrane plasmique et une partie va être dégradée à travers l'endocytose *via* un mécanisme dépendant de la clathrine. Il existe deux modèles permettant d'expliquer ce mécanisme : les monomères de Tetherin interagissent entre eux par leur domaine extracellulaire et sont ancrés grâce aux domaines TM et GPI (EC self-interaction model) (figure 15A) ou les dimères de Tetherin sont ancrés dans des sens contraires entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale avec une configuration parallèle ou antiparallèle (membrane-spanning model) (figure 15 B).

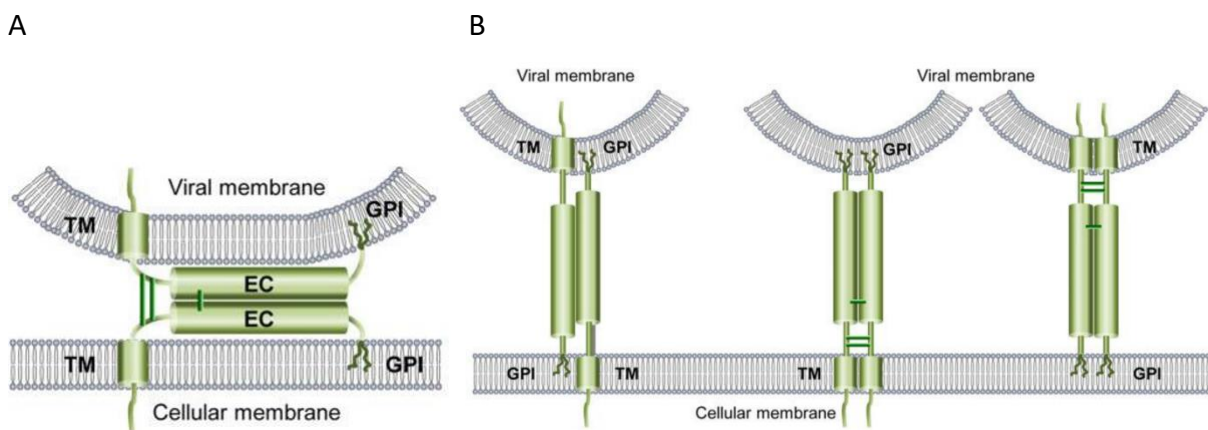


Figure 15 : Représentation schématique des modèles d'action de la Tetherin (Zheng et al 2012)

Cependant, l'action de la Tetherin est contrée par la protéine Vpu. Cette phosphoprotéine de 16 kDa est exprimée lors de la phase tardive du cycle du VIH-1. Vpu est une protéine transmembranaire localisée à la membrane plasmique, dans les endosomes, le réticulum endoplasmique ainsi que l'appareil de Golgi. Elle est exprimée par le VIH-1 et quelques virus simiens alors qu'elle est absente chez le VIH-2, l'activité anti-Tetherin étant portée par Env chez le VIH-2 et

par Nef chez le SIV (Jia et al 2009). Vpu est composée d'un domaine TM et CT formé de deux hélices α reliées par une boucle flexible (figure 16).

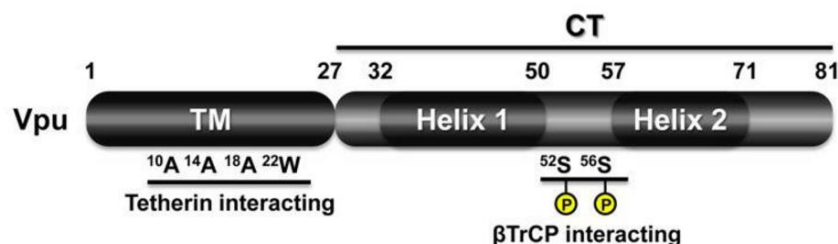


Figure 16 : Représentation schématique des différents domaines de Vpu (Zheng et al 2012)

De nombreuses études ont montré que Vpu est capable d'induire la dégradation des récepteurs CD4 dans le réticulum endoplasmique. Vpu recrute la protéine β TrCP (β Transducing repeat-containing protein), une sous-unité du complexe E3 ubiquitine ligase, et entraîne l'ubiquitination de CD4 et sa dégradation par la voie du protéasome (Bour et al 1995 ; Margottin et al 1998). Vpu est capable d'utiliser le même mécanisme de dégradation afin d'inhiber l'activité de la Tetherin. L'ubiquitination de résidus situés dans le domaine C-terminal de Vpu va induire la voie de dégradation lysosomale dépendante des ESCRT (Janvier et al 2011).

Vpu est également capable de détourner la Tetherin de sa voie d'acheminement normale du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi en la séquestrant (Dubé et al 2010). En effet, en absence de Vpu, la Tetherin débute son transport dans le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, est acheminée à la membrane plasmique et va être dégradée dans les compartiments de recyclage. La séquestration de la Tetherin par Vpu dans le compartiment intracellulaire est suivie de sa dégradation lysosomale.

C. SAMHD1 et Vpx

La protéine SAMHD1 (Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartate-Domain-containing protein 1) est une triphosphohydrolase qui contrôle la concentration intracellulaire de dNTP et joue un rôle essentiel dans l'immunité innée et les maladies auto-immunes (Ballana et Esté 2015). SAMHD1 a ainsi été identifié grâce à Vpx dans les macrophages à travers des expériences d'immuno-précipitation (Hrecka et al 2011 ; Laguette et al 2011). Ce facteur de restriction contre le VIH-1 est exprimé dans les cellules dendritiques, myéloïdes et les LB et LT (Baldauf et al 2012 ; Descours et al 2012). SAMHD1 est composée d'un domaine N-terminal possédant un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine SAM responsable des interactions protéine-protéine mais pouvant aussi

lier l'ARN ainsi qu'un domaine HD portant l'activité phosphohydrolase dans la partie C-terminale (figure 17).

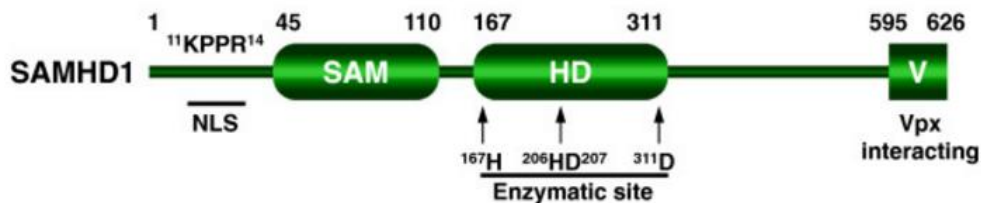


Figure 17 : Représentation schématique des différents domaines de SAMHD1 (Zheng et al 2012)

SAMHD1 agit pendant l'étape précoce du cycle viral. Il a été observé qu'une déplétion de SAMHD1 provoque une accumulation de l'ADN viral ce qui suggère l'implication de cette protéine durant l'étape de transcription inverse (Laguet et al 2011). La fonction antivirale de SAMHD1 est due à son activité phosphohydrolase car elle hydrolyse les dNTP en désoxynucléosides et triphosphate inorganique de manière GTP-dépendante. Ce phénomène induit une diminution de la concentration cellulaire des dNTP dont le taux devient trop faible pour effectuer la transcription inverse correctement conduisant au blocage de la synthèse d'ADN viral (St Gelais et al 2012). SAMHD1 inhibe la réplication du VIH-1 dans les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et les LT CD4. Cependant, l'induction de SAMHD1 par les IFN est très discutée (Berger et al 2011 ; St Gelais et al 2012 ; Dragin et al 2013).

Contrairement aux autres facteurs de restriction, le VIH-1 ne possède pas de protéine virale capable de contrecarrer SAMHD1. Certaines souches de lentivirus telles que le VIH-2 ou le SIV qui codent une protéine Vpx sont les seules capables de résister à ce facteur de restriction dans les cellules myéloïdes (Sharova et al 2008 ; Goujon et al 2008). La protéine Vpx est composée de deux domaines N- et C-terminaux non structurés et de trois hélices α reliées par des boucles flexibles ainsi que deux NLS et un domaine d'interaction à SAMHD1 (figure 18).

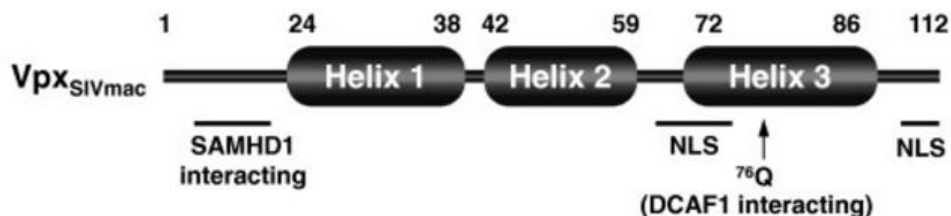


Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines de Vpx (Zheng et al 2012)

Vpx est capable de contrer l'action de SAMHD1 en induisant sa dégradation par le protéasome. Cette protéine est impliquée dans la formation d'un complexe E3 ubiquitine ligase

constitué de DDB1 (DNA Damage-Binding protein 1), DCAF1 (DDB1-CUL4-Associated Factor) et la Culline 4. Le complexe ainsi formé induit la polyubiquitination de SAMHD1 qui a pour conséquence sa dégradation par le protéasome (Laguet et al 2011 ; Hrecka et al 2011) (figure 19).

Bien que le VIH-1 n'exprime pas la protéine Vpx, il exprime Vpr qui est très proche au niveau structural et fonctionnel de Vpx. En effet, ces deux protéines montrent une forte homologie de séquences ainsi qu'une structure tridimensionnelle très similaire. Vpr se lie également aux sous-unités du complexe E3 ubiquitine ligase mais n'est pas capable d'induire la dégradation de SAMHD1 par le protéasome. Même si Vpr ne conduit pas à la dégradation de SAMHD1, une étude a observé que la protéine ancestrale de Vpr était efficace contre ce facteur de restriction avant son évolution en Vpx chez le VIH-2 (Lim et al 2012). L'activité de dégradation de Vpr a donc été perdue au cours de l'évolution du VIH-1.

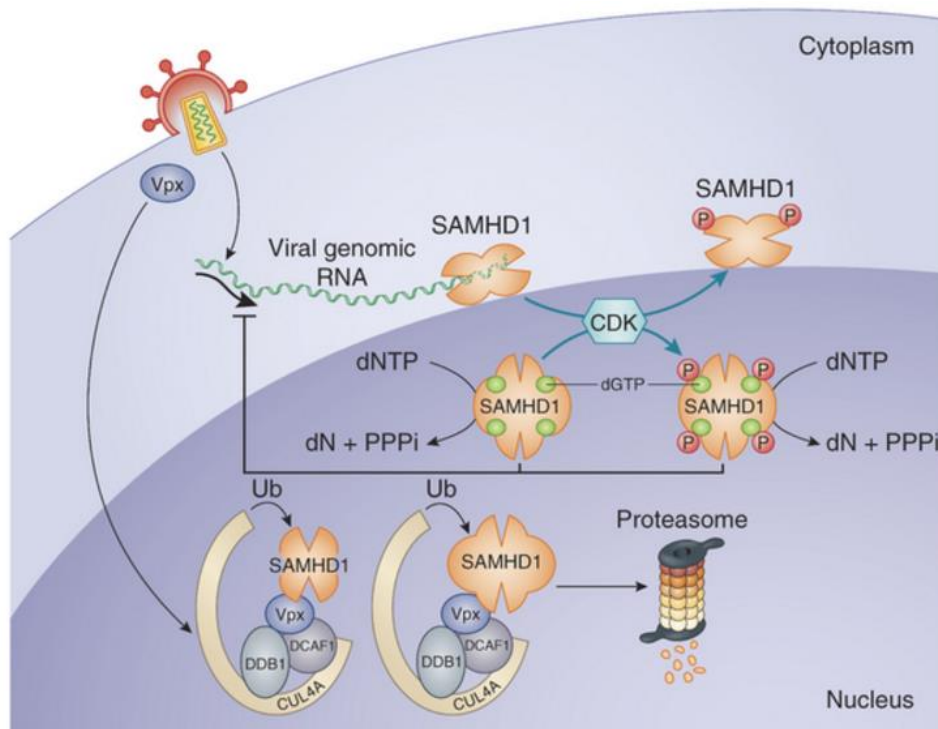


Figure 19 : Modèle de la restriction du VIH-1 par SAMHD1 et contremesure de Vpx (Simon et al 2015)

2) Les protéines antivirales

A. Schlafen 11 (SLF11)

La protéine Schlafen 11 est une protéine antivirale induite par les IFN de type I. Son nom vient de l'allemand qui signifie « dormir » car les protéines de cette famille induisent un arrêt du cycle cellulaire (Schwarz et al 1998). Chez l'homme, cinq SLF ont été identifiées à ce jour (SLF5, 11, 12, 13 et 14) (Bustos et al 2009) alors qu'il en existe au moins 10 chez la souris (Mavrommatis et al

2013). Les protéines de cette famille sont généralement classées en trois groupes en fonction de leur taille, le premier groupe comprend les protéines de 37 à 42 kDa, le deuxième groupe est constitué de protéines de 58 à 68 kDa et le troisième groupe contient les protéines de 100 à 104 kDa (Geserick et al 2004). Toutes les protéines Schlafen possèdent un domaine Slfn retrouvé que chez cette famille de protéines et dont la fonction est encore inconnue (Neumann et al 2008). Cette famille contient un domaine AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) dans leur partie N-terminale qui serait impliqué dans l'interaction GTP/ATP (Brady et al 2005). Les Schlafen des groupes II et III possèdent également un domaine SWADL spécifique défini par sa séquence Ser-Trp-Ala-Asp-Leu (Geserick et al 2004 ; Neumann et al 2008). De plus, une extension C-terminale contenant un NLS et caractérisée par une homologie de séquence avec la famille des ARN hélicases existe uniquement chez les protéines du groupe III. Cette séquence suggère que les protéines Schlafen sont impliquées dans le métabolisme des ARN, dans le repliement des structures ARN ou encore dans des mécanismes se déroulant dans le noyau (Geserick et al 2004 ; Neumann et al 2008).

Toutes les protéines Schlafen humaines font partie du groupe III excepté SLFN12 qui ne présente pas de domaine C-terminal homologue à celui des ARN hélicases et qui est cytoplasmique, elle appartient au groupe II. Parmi ces 5 protéines, seules les fonctions de SLFN5 et SLFN11 ont été identifiées. SLFN5 est impliquée dans la régulation de la croissance et l'invasion de cellules de mélanome et de carcinome (Sassano et al 2015). En présence de cette protéine, les cellules tumorales ne peuvent se disperser et coloniser le collagène (Katsoulidis et al 2010). SLFN11 a été identifiée récemment pour avoir un effet anti-VIH-1 (Li et al 2012) en bloquant spécifiquement l'expression de protéines virales. Des cellules HEK293T dans lesquelles SLFN11 était absente ont montré une augmentation significative de la production des particules virales ainsi qu'une hausse de la concentration en ARNt (Weringh et al 2011) suggérant fortement une implication de SLFN11 dans le blocage de la synthèse des protéines virales. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de savoir si ce mécanisme est inhibé ou non par le VIH-1.

B. MxB/2 (Myxovirus resistance B/2)

Les protéines de la famille Mx sont des dynamin-like Guanosine TriPhosphatases (GTPases) induites par les IFN de type I et III (Colomer-Lluch et al 2016). Contrairement aux autres ISG, les gènes Mx ne sont pas exprimés constitutivement et ne sont pas directement induits par les virus, mais dépendent directement des IFN. Ces facteurs très conservés parmi les vertébrés peuvent être classés en 5 groupes en fonction de leurs séquences. La plupart des mammifères possèdent deux gènes Mx provenant d'un événement de duplication : MxA (Mx1) et MxB (Mx2). La protéine MxB

semble impliquée dans la régulation du transport cytoplasmique et du cycle cellulaire (King et al 2004). Comme les dynamines, les protéines Mx sont caractérisées par un domaine N-terminal GTPase, un domaine central et un domaine effecteur GTPase en C-terminal (figure 20), ces trois domaines étant essentiels pour l'activité antivirale (Colomer-Lluch et al 2016 ; Pitossi et al 1993).

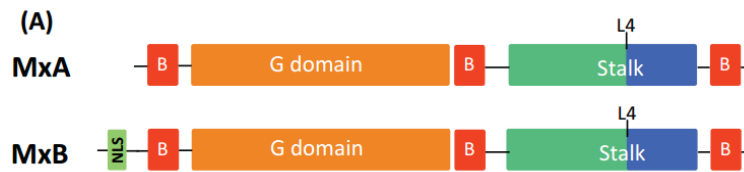


Figure 20 : Structure des protéines Mx humaines (Haller et al 2015)

Le rôle antiviral des protéines Mx est influencé par leur localisation subcellulaire. Elles sont associées à différents compartiments intracellulaires du cytoplasme et du noyau. Par exemple, Mx1 des rongeurs inhibe la réplication nucléaire des virus tels que le virus influenza (Pavlovic et al 1992) tandis que Mx2 bloque le cycle de réplication des virus dans le cytoplasme (VSV, bunyavirus) (Zurcher et al 1992 ; Jin et al 2001). La protéine humaine MxA est capable d'inhiber la réplication de nombreux virus à ADN et ARN tels que le VSV, HBV et les réovirus (Staehele et Pavlovic 1991 ; Li et al 2012) alors que MxB permet l'inhibition de l'import du complexe de pré-intégration du VIH-1 dans le noyau.

Bien que MxA et MxB partagent 63% d'homologie de séquences, MxB existe sous deux isoformes localisées dans différents compartiments cellulaires et possédant des activités antivirales différentes. Ces deux isoformes sont synthétisées à partir de codons d'initiation alternatifs donnant des protéines de 78 kDa et 76 kDa. La forme la plus longue contient un signal de localisation nucléaire dans sa partie N-terminale alors qu'il est absent dans l'isoforme la plus courte, cette dernière étant cytoplasmique (Melén et al 1996 ; King et al 2004). Cependant, seule l'isoforme de 78 kDa est capable de contrecarrer la réplication du VIH-1. De façon intéressante, une étude utilisant des chimères avec le domaine N-terminal de MxB dans MxA a montré une activité antivirale contre le VIH-1 démontrant que la partie N-terminale contenant le NLS de MxB est suffisante pour l'activité antivirale (Fribourgh et al 2014). Une analyse de MxB a permis d'identifier les résidus situés dans la région N-terminale nécessaires à l'activité antivirale contre le VIH-1 (acides aminés 37-44) (Busnadiego et al 2014). La région N-terminale de MxB est donc essentielle à la fois pour sa localisation nucléaire (NLS) et pour l'activité antivirale spécifique.

Il a été reporté plusieurs rôles antiviraux pour la protéine MxB. Liu et al (2013) ont observé que l'expression de MxB bloque la réplication du VIH-1 dans les LT CD4 alors que son absence inhibe l'action antivirale des IFN α . De plus, il semble que MxB est capable d'interagir avec la cyclophiline et les protéines contenant un domaine semblable à la cyclophiline ce qui suggère que MxB cible la

capside du VIH-1 pour empêcher la décapsidation (Fricke et al 2014). Goujon et al (2013) ont également reporté que MxB bloque l'entrée des complexes de réplication du VIH-1 ou perturbe sa stabilité. Enfin, une autre étude a montré que MxB inhibe l'import nucléaire dépendant de la capsid (Kane et al 2013). D'autres études sont encore nécessaires afin d'élucider quelles étapes, seule ou en combinaison, sont ciblées par MxB.

C. MOV10 (Moloney Leukemia Virus 10 inactivated gene)

MOV10 a d'abord été découvert chez la souris ayant le Moloney murine leukemia virus (MoMuLV). Les protéines de cette famille sont classifiées en trois super familles (SF1 à 3) et deux petites familles (F4, F5) (Caruthers et McKay 2002). Ce facteur est constitué de sept motifs hélicases qui possèdent une activité ATPase ou GTPase catalysant la séparation de duplex ADN ou ARN en simple brin de manière ATP-dépendante (Lorgeoux et al 2012) (figure 21). Le motif I se fixe aux phosphates tandis que le motif II permet la liaison au magnésium. Ces deux premiers motifs catalysent l'hydrolyse de l'ATP ou GTP donnant de l'énergie pour l'activité hélicase. Les autres motifs ont des fonctions plus diverses, ils contribuent aux interactions à l'ADN et à l'ARN (Caruthers et McKay 2002). Toutes les hélicases possèdent les motifs I et II mais seules les familles SF1 et SF2 ont les sept motifs (Chen et al 2013). MOV10 possède les sept motifs hélicases ainsi qu'un domaine structuré riche en Cys-His (CH) responsable des interactions protéines-protéines et fait partie de la superfamille SF1.



Figure 21 : Représentation schématique des domaines de la protéine MOV10 (Zheng et al 2012)

La fonction de MOV10 a été identifiée grâce à un gène orthologue chez *Arabidopsis* : SDE3 (Silencing defective gene 3) qui est impliqué dans la voie du RNA silencing (Dalmy et al 2001). MOV10 interagit avec la voie du RNA silencing à travers la protéine Argonaute 2 (Ago2) dans les cellules de mammifères (Meister et al 2005). Etant donné le caractère antiviral des RNAi chez les plantes et les vertébrés, plusieurs composants des voies du RNA silencing dont MOV10 ont été testés pour leur activité anti-VIH-1 (Burdick et al 2010 ; Furtak et al 2010).

Cette protéine a montré une forte activité anti-VIH-1 lorsqu'elle est exprimée de façon ectopique (Wang et al 2010) et possède également une activité antivirale contre les SIV, MLV, EIAV, HCV et le VSV (Schoggins et al 2011). MOV10 diminue la quantité et la qualité des nouvelles particules virales dans les cellules productrices. Ce facteur réduit la production du VIH-1

probablement en induisant la baisse d'expression de la protéine Gag. Cependant, le mécanisme par lequel MOV10 agit est encore non élucidé (Burdick et al 2010). De plus, MOV10 est encapsidé dans les particules virales *via* son interaction avec Gag et inhibe la réplication du VIH-1 au cycle viral suivant en interférant avec la transcription inverse (Furtak et al 2010). L'encapsidation de MOV10 nécessite à la fois son domaine CH responsable de l'interaction avec Gag mais aussi ses motifs hélicases en région C-terminale (Abudu et al 2012). La réduction de l'infectivité virale induite par MOV10 est environ 100 fois plus importante que la baisse de production virale (Zheng et al 2012).

D. SERINC3 et SERINC5 (Serine incorporator 3 et 5)

Deux études récentes utilisant des approches expérimentales différentes (études protéomiques des particules du VIH-1 +/- Nef ; profils d'expression de cellules sensibles et résistantes à Nef) ont identifié les protéines SERINC3 et SERINC5 comme de nouvelles protéines antivirales contrecarrées par la protéine Nef (Rosa et al 2015 ; Usami et al 2015).

Les SERINC3 et SERINC5 sont les membres d'une famille de 5 protéines conservées allant des levures aux mammifères. Ces protéines contiennent entre 10 et 12 domaines transmembranaires (Inuzuka et al 2005). La fonction de ces protéines n'a pas encore été étudiée en détail et repose essentiellement sur les études d'Inuzuka et al qui montrent que ces facteurs facilitent l'incorporation des sérines dans la synthèse des sphingolipides et des phosphatidylsérines dans les membranes. Parmi cette famille, seules les SERINC3 et SERINC5 montrent une activité antivirale contre le VIH-1 et son contrecarrées par Nef. De plus, SERINC5 semble inhiber la fusion des particules du VIH-1 lors de son entrée dans la cellule cible, mais d'autres étapes post-entrée pourraient également être ciblées. Enfin, en présence de Nef, l'encapsidation des SERINC3/5 dans les nouvelles particules virales est considérablement réduite. Ce phénomène est lié à la redistribution subcellulaire de ces facteurs de restriction de la membrane plasmique vers les membranes des compartiments intracellulaires (Matheson et al 2015). Ces résultats suggèrent que la présence des SERINC3/5 dans les particules virales du VIH-1 limite leur fusion avec la membrane des cellules cibles et que Nef contrecarre l'activité de ces facteurs en les relocalisant vers les membranes endosomales afin d'inhiber leur incorporation.

E. MARCH8 (Membrane-associated RING-CH 8)

MARCH8 a récemment été identifiée comme une autre protéine antivirale exprimée dans les cellules myéloïdes, les macrophages et les cellules dendritiques (Tada et al 2015). Cette protéine est

un des 11 membres de la famille MARCH qui sont des RING-finger E3 ubiquitine ligases. Leur structure comprend un domaine C4HC3 RING-finger (RING-CH finger) en N-terminal qui permet l'interaction avec une enzyme E2 ainsi que deux ou plusieurs domaines transmembranaires (excepté MARCH7 et 10). MARCH8 est une protéine connue pour réguler négativement l'activité d'un grand nombre de protéines transmembranaires. Il a été démontré que ce facteur réduit drastiquement l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans les nouvelles particules afin d'inhiber leur infectivité (Fujita 2016). De plus, les mêmes effets ont été observés chez d'autres virus tels que le SIV, VIH-2, MLV ou le VSV. MARCH8 semble interagir avec les protéines Env du VIH-1 afin de réduire leur expression à la surface de la membrane plasmique des cellules cibles.

F. Autres protéines antivirales

Tous ces facteurs de restriction et ces protéines antivirales inhibent des étapes diverses du cycle du VIH-1 (figure 10). Cependant, d'autres facteurs autres que ceux mentionnés ci-dessus ont également été découverts. En effet, les IFITM (Interferon induced transmembrane protein) inhibent l'étape de fusion (Lu et al 2011), la CNP (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) cible l'assemblage des particules virales (Wilson et al 2012), la vipérine est capable d'empêcher le bourgeonnement des virions (Duschene et Broderick 2012) et la protéine ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein) inhibe la synthèse des ARNm viraux multi-épissés (Zhu et al 2011). Cependant, les mécanismes par lesquels le VIH-1 les contrecarre sont encore inconnus.

3) APOBEC3F/G et Vif

Les protéines APOBEC3F/G font partie de la famille des désaminases de cytidines et induisent des mutations dans le génome du VIH-1 lors de la transcription inverse. Cependant le virus exprime la protéine Vif capable de contrecarrer ces deux protéines *via* différents mécanismes. La revue suivante présente les propriétés générales des protéines A3F et A3G, leurs activités dépendante et indépendante de la désamination. Elle décrit également Vif et les mécanismes permettant de diminuer l'expression d'A3F/G dans les nouvelles particules virales. En effet, Vif recrute un complexe E3 ubiquitine ligase (Culline5-ElongineB-ElongineC-CBF- β) pour dégrader A3F/G par la voie du protéasome mais cette protéine est également capable d'inhiber directement la traduction de l'ARNm d'A3G/F. Enfin, la revue propose différentes perspectives thérapeutiques ciblant Vif et son action sur A3F/G.

APOBEC3F/G and Vif: action and counteractions

Camille LIBRE, Julien BATISSE, Santiago GUERRERO, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART

Les cellules cibles du VIH-1 (lymphocytes T, macrophages et monocytes) sont capables de limiter la réplication virale en exprimant des facteurs de restriction APOBEC3F et APOBEC3G (A3F/G). Ces deux protéines ont une activité désaminase de cytidine et induisent des mutations lors de la transcription inverse de l'ARN génomique qui peuvent être létales pour le virus. A3F/G interfèrent également avec les étapes de transcription inverse et d'intégration indépendamment de leur activité désaminase. Pour contrecarrer cette restriction, le VIH-1 code pour le facteur d'infectivité virale (Vif), une protéine multifonctionnelle capable de réduire l'expression des protéines A3F/G à travers deux mécanismes : (1) Vif induit la dégradation d'A3F/G par le protéasome en recrutant un complexe E3 ubiquitine ligase et (2) Vif inhibe la traduction d'A3F/G en interagissant avec la région 5' non traduite (5'UTR) de leurs ARNm. Ces deux mécanismes réduisent l'encapsidation d'A3F/G dans les virions. La relation entre Vif et A3F/G laisse envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, et plusieurs propriétés de Vif telles que la dimérisation, le recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase et l'interaction Vif-A3F/G pourraient être ciblées par des molécules.

APOBEC3F/G and Vif: Action and Counteractions

Camille Libre^a, Julien Batisse^{a,b}, Santiago Guerrero^{a,c}, Roland Marquet^a and Jean-Christophe Paillart^{a,*}

^aArchitecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002 CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^bIGBMC, CNRS UMR 7104, Illkirch, France

^cCentre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain

Definition

The primary targets of HIV-1 (T lymphocytes, macrophages, and monocytes) are able to limit HIV-1 replication by expressing the restriction factors APOBEC3F and APOBEC3G (A3F/G). These two proteins have cytidine deaminase activity and induce mutations during reverse transcription of the genomic RNA that could be lethal for the virus. A3F/G also interfere with the reverse transcription and integration processes independently from this deaminase activity. To counteract this restriction, HIV-1 has evolved the viral infectivity factor (Vif), a multifunctional protein that is able to reduce the cellular A3F/G expression level through two major mechanisms: (1) Vif induces degradation of A3F/G by the proteasome by recruiting an E3 ubiquitin ligase complex, and (2) Vif inhibits A3F/G translation by interacting with the 5' untranslated region (UTR) of their mRNAs. These two mechanisms ultimately reduce the packaging of A3F/G into virions. The intimate relationship between Vif and A3F/G provides new therapeutic targets, and several functional properties of Vif, such as Vif dimerization, the recruitment of the Vif-E3 ubiquitin ligase complex, and the Vif-A3F/G interaction, could be targeted by drugs.

Introduction

In addition to the three essential protein precursors (structural Pr55^{Gag}, enzymatic Pr160^{Gag-Pol}, and envelope Pr160^{Env}), the HIV-1 genome encodes six auxiliary proteins: Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpu, and Vif. Vif (viral infectivity factor) is essential for the infection of the HIV-1 natural targets cells, such as T lymphocytes. Indeed, a vif-deleted HIV-1 mutant (HIV-1Dvif) does not replicate in such cells, which are thus termed nonpermissive. Despite this information, the role of Vif remained unclear for a long time, until the identification of CEM15 (Sheehy et al. 2002), a natural cellular antiviral factor counteracted by Vif which has since been renamed APOBEC3G (A3G). A3G belongs to a large family of cytidine deaminases and needs to be packaged into viral particles in order to perturb the next HIV-1 replication cycle. In the first part of this review, A3G and A3F proteins and the processes by which these proteins inactivate HIV-1 replication are described. In the second part, the focus is on Vif and the mechanisms by which Vif counteracts the A3F/G restriction activities. To conclude, the importance of the relationship between A3F/G and Vif is underlined and how it could be used in new therapeutic approaches is indicated.

HIV-1 Restriction by APOBEC3 Enzymes

The APOBEC3 Proteins: A Potent Army Against HIV

The APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 or A3) family is exclusively present in vertebrates; in humans, it comprises seven members (A3A to A3H), all encoded by

*Email: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr

genes located on chromosome 22 (Fig. 1a). This family of proteins plays an important role in innate antiviral immunity against retroviruses, most notably HIV-1. Each A3 protein harbors at least one active catalytic domain (CD) constituted by a zinc finger motif sharing the consensus sequence H-X-E-X₂₃₋₂₈-P-C-X₂₋₄-C (where X is any one of the 20 amino acids). A3A, A3C, and A3H have only one zinc finger domain and hence one catalytically active domain. A3D/E, A3F, and A3G have two zinc finger motifs, but only one is catalytically active. A3B is the exception as it has two zinc finger motifs, both of which may be catalytically active. All of these enzymes are involved in the restriction of several viruses/ retrotransposons. Among the A3 proteins, A3F and A3G are the most efficient in restricting HIV-1, although A3A, A3D/E, and A3H are also able to affect HIV-1 infectivity to some extent. In A3F and A3G, the active cytidine deaminase domain is located in the C-terminal zinc finger motif (Fig. 1a). The inactive N-terminal zinc finger motif is involved in different functions such as RNA binding, multimerization, or packaging into virions. A3F and A3G are both able to bind Vif, even though the binding sites do not seem to be conserved between the two proteins: the residues involved in Vif binding are located in the N-terminal CD between positions 126–132 of A3G and positions 289–294 in the C-terminal CD of A3F, respectively. Interestingly, both sites of interaction could be disrupted by a single amino acid mutation: D128K and E289K in A3G and A3F, respectively. These mutations alter the ability of the respective protein to reduce HIV-1 infectivity.

Structural information is available for the C-terminal domain of A3F (PDB: 4IOU) and A3G (PDB: 3IQS) revealing highly conserved structures between the two proteins. Both are composed of five β -sheets (β 1– β 5) with six α -helices (α 1– α 6) including a coordinated zinc ion. Models of the N-terminal domains have recently been established using the SWISS-MODEL program (Feng et al. 2014). When the two domains are combined (Fig. 1b), A3F/G appear as symmetric proteins exposing a positively charged platform on both domains, allowing binding to negatively charged DNA.

To achieve their restriction activity on HIV-1, A3F/G proteins need to be encapsidated into nascent virions to act during the next round of replication (Fig. 1c). Indeed, despite their cytoplasmic localization in target cells, A3F/G proteins are not able to access the neosynthesized (-) single-stranded (ss) DNA intermediate during reverse transcription of incoming viruses. This is most likely due to the protection of the reverse transcription complex by the HIV-1 capsid and/or sequestration of the A3F/G proteins in storage granules, such as stress granules or processing bodies (P-bodies). A3F/G packaging is mediated by interactions with the nucleocapsid (NC) domain of the Pr55^{Gag} precursor (Alce and Popik 2004). This interaction is also stabilized by the presence of the HIV-1 genomic RNA. Efficient binding of A3G to the HIV-1 genomic RNA requires its oligomerization. Interestingly, both RNA binding and A3G oligomerization are mediated by the N-terminal domain of A3G. Additionally, A3G packaging is favored by the co-encapsidation of 7SL RNA, which is also mediated by the NC domain of HIV-1 Pr55^{Gag}. Once packaged, A3F/G remain associated with the reverse transcription complex after virus entry in target cells where they are able to perform their antiviral activities.

Deamination-Dependent Mechanisms

Once in the cytoplasm of infected cells, A3F/G proteins interfere with reverse transcription by inducing numerous deoxycytidine to deoxyuridine mutations during the synthesis of the (-) ssDNA in a 3'–5' processive manner (Fig. 1c; Harris et al. 2003). This process ultimately results in dG to dA hypermutations in the (+) strand proviral DNA and in the production of aberrant viral proteins, thus reducing the replicative capacities of the virus. A3F and A3G preferentially deaminate different

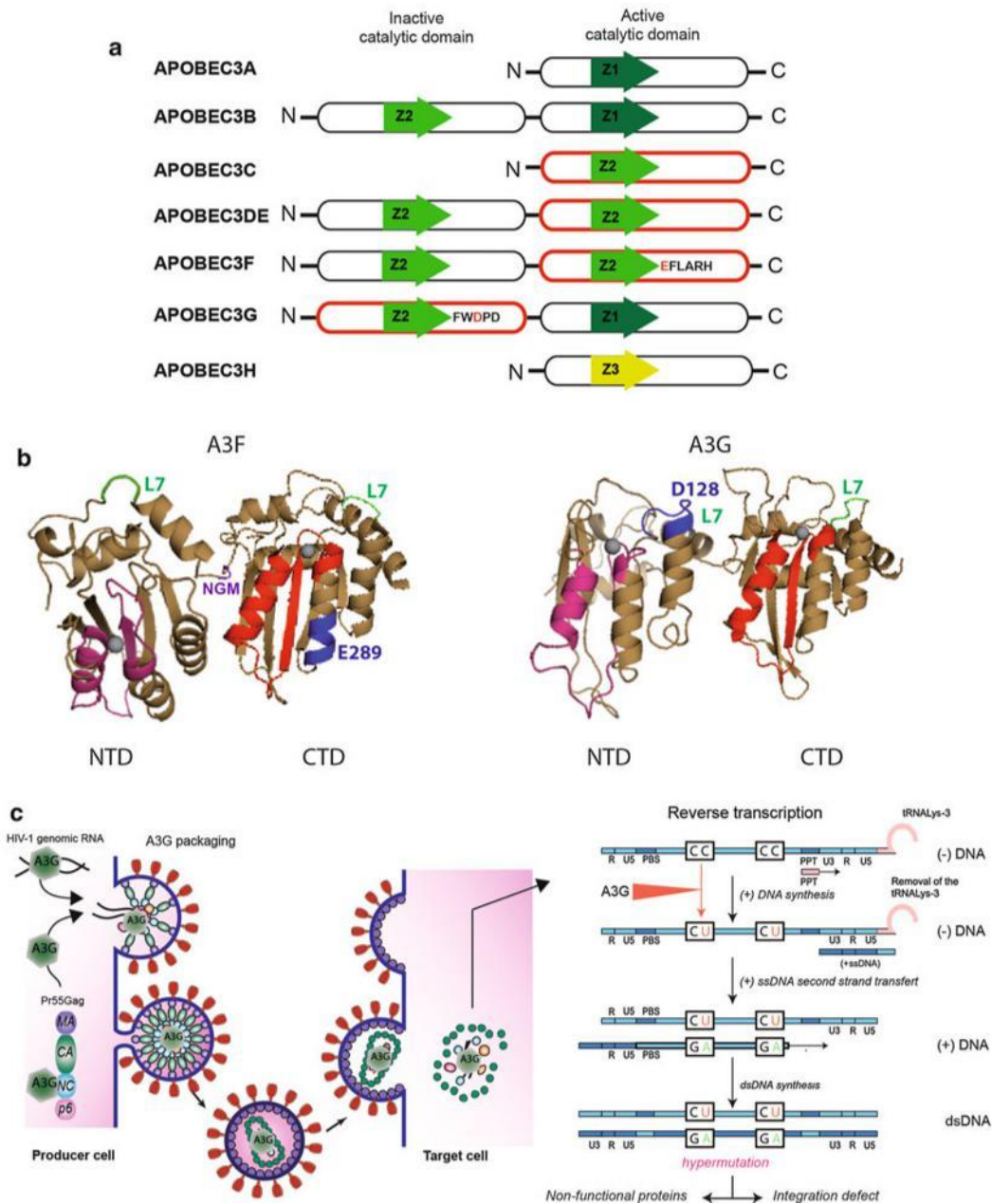


Fig. 1 APOBEC3 family: domains, structure of A3F/G, and restriction mechanisms. (a) Schematic representation of the seven APOBEC3 members. The conserved zinc (Z)-coordinating DNA cytosine deaminase motif Z1, Z2, and Z3 (phylogenetic clusters containing a SW-S/T-C-x₂-4-C motif for Z1 and Z2, whereas Z3 proteins have a TW-S-C-x₂-C motif) are shown in dark green, green, and yellow, respectively. The Vif binding domains are indicated by red ovals. For A3F/G, the Vif binding sequence is indicated including the crucial residues in red (see text for details). (b) A3F/G structure/models: while the structures of the C-terminal domain of A3F and A3G have both been determined experimentally (PDB: 4IOU and 3IQS), experimental structures of the N-terminal domains are still missing and therefore correspond to models calculated by Feng et al. (2014). The catalytic inactive domain is depicted in pink, whereas the active one is in red. Residues in blue interact with Vif. Loop seven (L7) involved in the processivity and in the recognition of the target sequence to deaminate is depicted in green in each domain, whereas A3F NGM residues are in purple, at the interface of the two domains (see text for details). Figures were drawn with the PyMOL software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0, Schrodinger, LLC). (c) Restriction mechanisms of A3G: to exert its restriction activity, A3F/G needs to be encapsidated into viral particles and released in infected cells (left panel). Restriction of HIV-1 replication by A3F/G involves the deaminase activity (right panel) and deaminase-independent pathways (not shown)

sequencings in the (-) ssDNA: A3G preferentially deaminates the last cytidine of 5'-CC or 5'-CCC motifs, thus inducing 5'-AG or 5'-AGG mutations on the (+) strand DNA, whereas A3F deaminates 5'-TC or 5'-TTC motifs. Interestingly, the A3G target sequence is part of the unique tryptophan codon (ACC in (-) DNA; TGG in (+) DNA), and its deamination results in the introduction of stop codons (UGA) in the viral coding sequence. In contrast, A3F mainly induces missense mutations that may or may not allow the expression of the corresponding protein. This could explain why A3G has a more drastic effect on HIV-1 infectivity than A3F. Another explanation might reside in the mechanism that the two proteins use to find their target sequence on the (-) ssDNA: while A3G is able to slide very efficiently along the (-) ssDNA substrate to find its target sequence in a processive manner, A3F jumps from one (-) ssDNA substrate to another one in a distributive manner (Ara et al. 2014). The processivity determinants of A3G have been mapped in the loop 7 and helix 6 of the N-terminal non-catalytic domain, which therefore indirectly participate in the deamination activity of A3G. In A3F, the linker between the N- and C-terminal domains (¹⁹⁰NGM¹⁹²) (Fig. 1b) seems to be responsible for its inability to translocate on (-) ssDNA.

Such deamination-induced mutations in the viral genome are lethal to the virus and could lead to the degradation of the hypermutated viral DNA, the production of truncated or nonfunctional viral proteins, and the impairment of the integration process. Moreover, mutated/truncated proteins expressed from the viral genome may, after processing by the proteasome, serve as HIV antigens and facilitate the immune recognition of HIV-1 (Casartelli et al. 2010).

Deamination-Independent Mechanisms

Several studies using inactive mutants of the CD showed that A3F/G still have residual restriction activity and impair HIV-1 infectivity, indicating that cytidine deaminase activities are not solely responsible for their antiviral activities. Deaminase-independent activities target mainly two steps of the HIV-1 replication cycle: reverse transcription and integration. A3F/G are able to interact with reverse transcriptase and limit its efficiency, resulting in diminished viral cDNA levels (Wang et al. 2012), and can also bind HIV-1 integrase and decrease the integration efficiency by 5- to 50-fold (Luo et al. 2007). Such deamination-independent activities might be due to interactions of A3F/G with the viral genome, leading to competition and/or steric hindrance with reverse transcriptase and integrase enzymes. Although this deaminase-independent mechanism seems to contribute less than 1 % to the overall restriction capability of A3F/3G, it has nevertheless been observed in primary cells (Gillick et al. 2013).

Overview and Properties of HIV-1 Vif

To counteract the restriction mediated by A3F/G, all lentiviruses except equine infectious anemia virus (EIAV) encode the viral infectivity factor (Vif), which is essential for HIV-1 replication in primary target cells (lymphocytes, macrophages/monocytes, dendritic cells). In these so-called nonpermissive cells, deletion of vif from the HIV-1 genome has been associated with a strong reduction of viral infectivity (100- to 1,000-fold) (Strebel et al. 1987). The nonpermissive phenotype is due to the expression of A3F/G proteins in these cell types (Sheehy et al. 2002).

Functional Domains of Vif

Vif is a highly basic protein (pI = 10.7) composed of 192 amino acids (23 kDa). Alignments of lentiviral Vif sequences highlighted several conserved domains suggestive of a multifunctional protein.

– The N-terminal domain, enriched in tryptophan residues, is important for the binding of A3 proteins (Fig. 2a). Although A3F and A3G share common interacting motifs with Vif (²¹WKSLVK²⁶, ⁵⁵VxIPLx4L⁶⁴, ⁶⁹YWxL⁷², and ⁸⁵VSIEW⁸⁹), some domains are specific to A3G (⁴⁰YRHHY⁴⁴ and

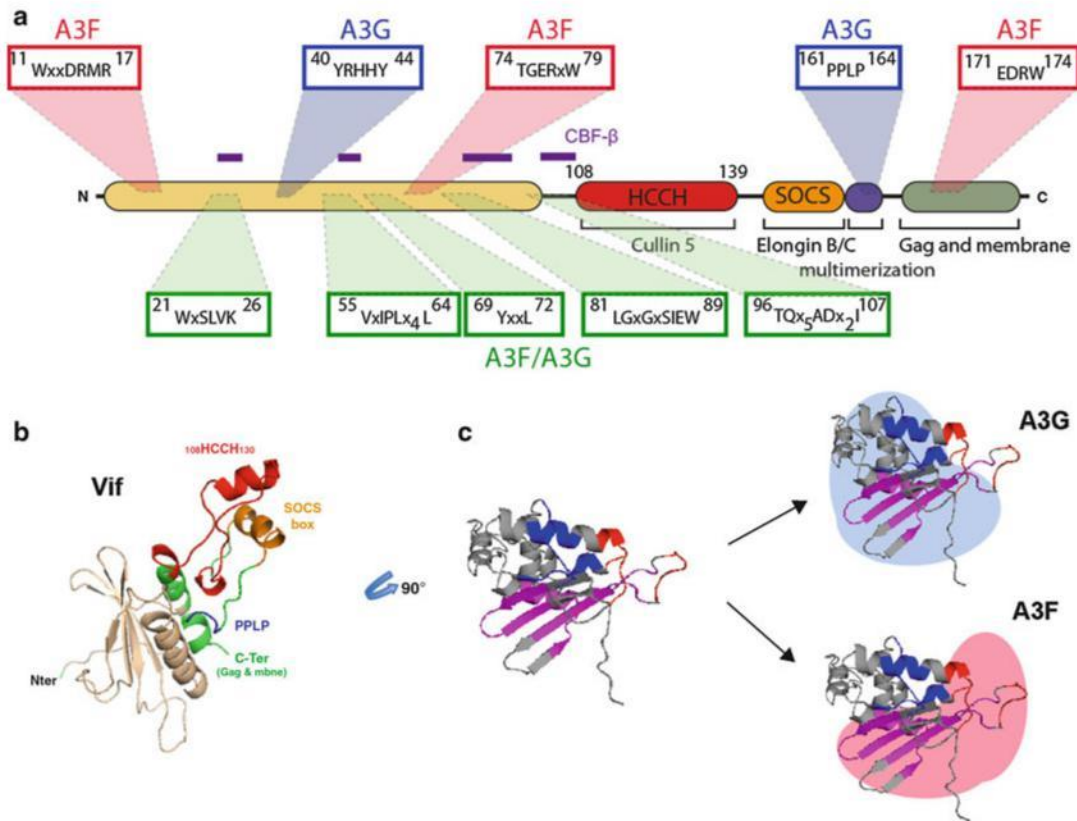


Fig. 2 Vif: domains, structure, and interactions with A3F/G. (a) Schematic representation of the Vif functional domains together with the interaction map with A3G, A3F, and other Vif partners. (b) Structure of the Vif protein extracted from the structure of the Vif-E3 ubiquitin ligase complex solved by Guo et al. (2014) (PDB: 4N9F). Colors correspond to the domains described in (a). (c) Vif structure with A3F (red) and A3G (blue) binding domains. The Vif structure has been rotated to highlight the specific (blue/red) or the common (magenta) interaction areas. The possible orientation of A3G (in light blue) and A3F (pink) proteins is depicted on the Vif structure. Figures were drawn with the PyMOL software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0, Schrodinger, LLC)

¹⁶¹PPLP¹⁶⁴) and A3F (¹¹WQxDRMR¹⁷, ⁷⁴TGERxW⁷⁹, and ¹⁷¹EDRW¹⁷⁴). Other domains in the C-terminal domain have been described to be important for A3G and A3F binding, such as the ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ and ¹⁷¹EDRW¹⁷⁴ motifs, respectively (Fig. 2a, b). Such discontinuous interacting sites suggest that the correct folding of Vif is crucial to create the binding platform for A3 proteins. Moreover, Vif residues important for the interaction with A3H, A3C, and A3DE have been identified in the N-terminal region. The N-terminal region of Vif also interacts with the HIV-1 genomic RNA

(residues 1–64 and 75–114) both in vitro and in infected cells. Finally, residues W₂₁, W₃₈, ⁸⁴GxSIEW⁸⁹, and ¹⁰²LADQI¹⁰⁷ are involved in the binding of CBF-β (core binding factor β).

– The central region of Vif constitutes a platform for the recruitment of an E3 ubiquitin ligase complex composed of Elongin B, Elongin C, CBF-β, Cullin 5, and Rbx2 proteins that targets A3 proteins for degradation by the proteasome. Residues 108–139 constitute a non-consensus HCCH zinc finger motif that binds zinc and Cullin 5; they are followed by a SOCS (suppressor of cytokine signaling) box motif (¹⁴⁴SLQYLA¹⁴⁹). This region promotes the interaction with the Elongin C/Elongin B (BC box) heterodimer through a hydrophobic platform on both proteins involving the SLQ residues and the A₁₄₉ residue of the SOCS box and a helices 3 and 4 of Elongin C. Very recently, the Cullin 5 box and the ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ motif have also been shown to participate to Vif-Elongin C/B binding.

– The C-terminal region of Vif starts with a putative Cullin 5 box (residues 159–173) that recruits the Cullin 5 with a lower efficiency than the HCCH zinc finger domain. This region covers the ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ motif involved in Vif multimerization. This PPLP motif is also involved in the binding with various partners such as A3G, Elongin B/Cullin 5, and the cellular kinase Hck. The last 25 residues of Vif are important for its interaction with Pr55^{Gag} and cytoplasmic membranes and interfere with the reverse transcriptase activity. In contrast to other regions of Vif, the C-terminal appears to be intrinsically disordered. This property is characteristic of proteins carrying RNA and/or protein chaperone activities: such proteins catalyze the folding of both the chaperone and the target molecules upon binding, reconstituting an active complex. Chaperone activities have been extensively described for several HIV-1 proteins such as NC and Tat and more recently for Vif (Sleiman et al. 2014). The Vif RNA chaperone activity may modulate viral activities such as the structural maturation of the HIV-1 genomic RNA and initiation of its reverse transcription to optimize viral infection and propagation.

Due to its intrinsic biochemical properties, the determination of the 3D structure of Vif has been a real challenge and a matter of intensive research. It is only very recently that the Huang Group successfully crystallized Vif in a pentameric complex (Fig. 3a) including the subunits of the E3 ubiquitin ligase complex: CBF- β , Elongin C/Elongin B, and Cullin 5 (Guo et al. 2014). The crystal structure of Vif has been solved at 3.3 Å resolution (PDB: 4N9F) and showed an elongated conical structure constituting two binding platforms involved in the recruitment of the E3 ubiquitin ligase complex and of A3 proteins (Fig. 2b). This is consistent with previous mutational analyses showing that both Cullin 5 and Elongin C interact with the C-terminal domain of Vif, whereas A3F/G and CBF- β bind to the N-terminal domain. Interestingly, while the A3F/G binding motifs appear discontinuous in the linear Vif sequence (Fig. 2a), the Vif structure highlights how the different residues are organized in two different binding domains that overlap in the central part of Vif (Fig. 2c). Of note, the extreme C-terminal part of Vif does not harbor any defined structures, consistent with an intrinsically disordered region and compatible with the RNA chaperone activity of this region.

Vif Hijacks an E3 Ubiquitin Ligase Complex to Degrade A3 Proteins (Vif/A3 Interactions)

Several mechanisms have been proposed to explain how Vif limits the antiviral activity of A3F/G by preventing its encapsidation. The first and more documented mechanism so far is the polyubiquitination and proteasomal degradation of A3F/G by Vif (Marin et al. 2003; Sheehy et al. 2003). Proteasomal degradation results in a strong reduction of the intracellular levels of A3F/G. As described above, Vif is able to bind A3F/G through various domains and to recruit an E3 ubiquitin ligase complex, leading to the polyubiquitination and degradation of A3F/G. Vif therefore connects the E3 ubiquitin ligase complex (Elongin B/C, Cullin 5, CBF- β) to its A3G substrate (Fig. 3a). Then, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme interacts with Rbx2 and allows the polyubiquitination (⁴⁸K-linked ubiquitins) of A3G that is targeted to the 26S proteasome for degradation. Recently, the transcription cofactor CBF- β has been shown to be an integral component of the ubiquitin ligase complex and required for the Vif-mediated degradation of A3G. Therefore, Vif binds the E3 ubiquitin ligase complex through at least 3 binding domains: the SOCS box allows the interaction with Elongin B/C, the HCCH zinc finger mediates binding to Cullin 5, and, finally, the N-terminal domain binds to CBF- β .

The A3G lysine residues targeted by the E3 ubiquitin ligase complex are not clearly defined: if one study identified four critical lysines in the C-terminal region of A3G (K₂₉₇, K₃₀₁, K₃₀₃, and K₃₃₄) (Iwatani et al. 2009), others showed that A3G lysines are randomly susceptible to ubiquitination.

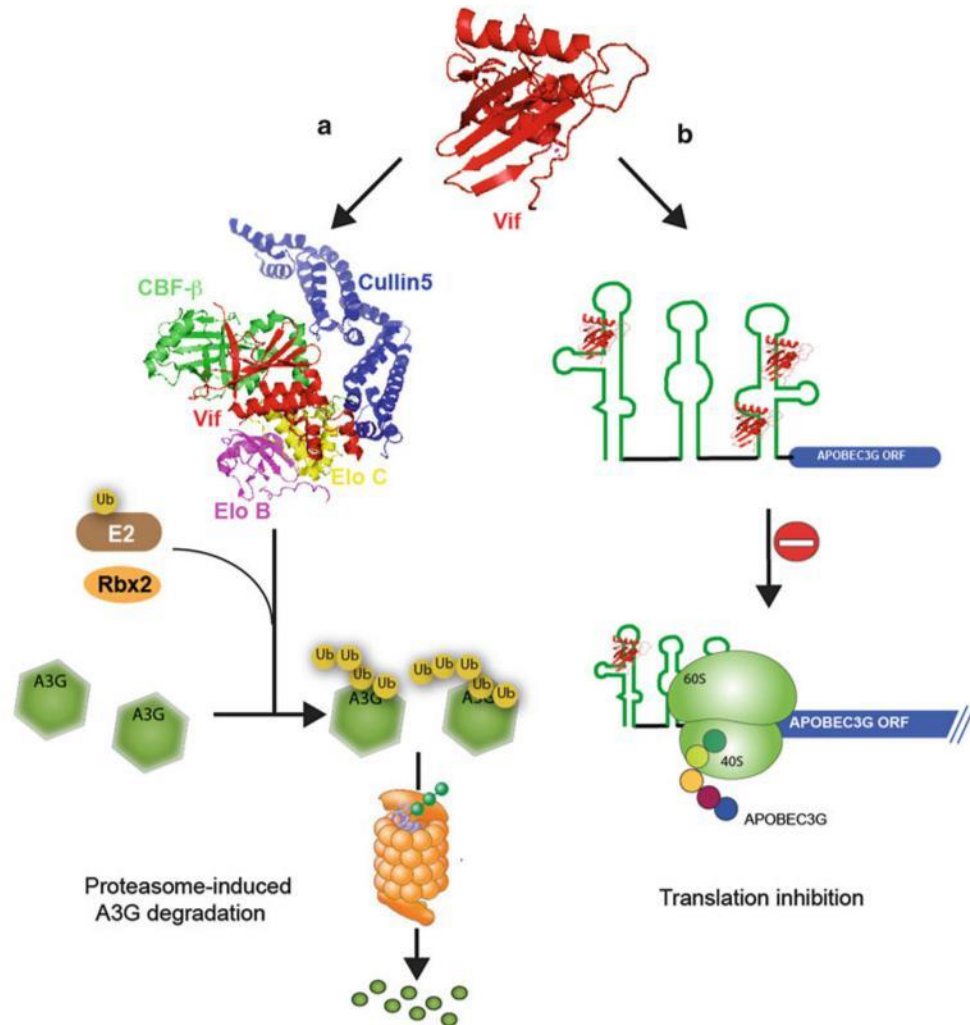


Fig. 3 Schematic representation of the mechanisms by which Vif reduces the A3G cellular level. (a) Vif binds to A3G and recruits an E3 ubiquitin ligase, leading to the polyubiquitination of A3G and its degradation by the 26S proteasome. (b) Vif impairs the translation of A3G mRNA through an mRNA-binding mechanism, involving the highly structured 5' UTR of A3G mRNA. These different activities of Vif on translation and degradation not only deplete A3G from virus-producing cells but also prevent A3G from being incorporated into virions

Degradation-Independent Inhibition of A3 Proteins

Translation

Although the Vif-induced degradation of A3F and A3G by the 26S proteasome has been well studied, it is not the only mechanism by which Vif counteracts A3 proteins. Indeed, Vif decreases the steady-state levels of A3F/G in the presence of proteasome inhibitors in rabbit reticulocyte lysates and cell cultures, suggesting that A3G translation is affected by Vif (Mariani et al. 2003; Stopak et al. 2003). Recently, binding of Vif to the highly structured 5' untranslated region (5' UTR) of A3G mRNA has been shown to be responsible for the inhibition of A3G translation by Vif (Mercenne et al. 2010; Fig. 3b). Although the exact mechanism is not understood yet, it is possible that Vif relocates A3G mRNA to specialized compartments such as P-Bodies or stress granules where translation is stopped. Indeed, Vif has been shown by immunofluorescence to co-localize with A3 proteins in P-Bodies (Wichroski et al. 2006).

Virion Encapsidation

As discussed above, Vif can reduce the expression of A3F/G proteins through the proteasome/degradation pathway and by inhibiting its mRNA translation, ultimately leading to a strong reduction of A3F/G encapsidation into new budding particles. One estimate indicates that 1–2 to 3–11 A3G proteins are encapsidated per virion in the presence or absence of Vif, respectively (Xu et al. 2007). Interestingly, the use of an A3G C97A mutant suggested that degradation and packaging of A3G are independent properties of Vif (Opi et al. 2007). Indeed, although this A3G mutant is resistant to Vif-mediated degradation, less protein is found in virion in the presence of Vif. The molecular mechanism is still not understood but a competition between Vif and A3G toward their specific binding sites, such as the HIV-1 genomic RNA or Pr55^{Gag}, is possible (see also section “[The APOBEC3 Proteins: A Potent Army Against HIV](#)”).

Intravirion Deamination

Despite the fact that a few A3G molecules (1–2) are packaged into virions in the presence of Vif, deamination activity per protein is less potent in these viral particles (Britan-Rosich et al. 2011). Several studies have shown that Vif is able to decrease the deaminase-specific activity of A3G and this effect requires Vif binding to the ssDNA that is the substrate of A3G (Feng et al. 2013). The Vif-mediated inhibition of A3G deaminase activity is the consequence of the reduction of A3G processivity. Indeed, A3G performs deaminations on ssDNA using both sliding and jumping mechanisms (see also section “[Deamination-Dependent Mechanisms](#)”). Interestingly, a study reported that Vif from two different HIV-1 isolates (HXB2 and IIB) does not have the same effect on A3G deaminase activity (Feng et al. 2013). While Vif_{HXB2} inhibits the jumping of A3G, Vif_{IIB} alters the sliding movements. Moreover, the intravirion deaminase activity of the A3G D128K mutant is unaffected, suggesting that inhibition of this activity requires the interaction between Vif and A3G.

Inhibition of APOBEC3G Degradation: A Therapeutic Perspective

The relationship between Vif and members of the A3 family offers perspectives for developing novel therapeutics. High-throughput screening studies have identified several families of molecules that can restore the A3G intracellular concentration despite the presence of Vif. Some compounds are antagonists of Vif and restore the A3G enzymatic activity (and thus its antiviral property), whereas others block the A3G catalytic activity (Li et al. 2012) and are proposed to decrease the resistance to antivirals due to the reduction of viral quasiespecies. There are at least five interfaces that can potentially be targeted to inhibit Vif functions: A3 proteins, CBF- β , Elongin C, Cullin 5, and its dimerization domain (Salter et al. 2014; Fig. 4).

Targeting the interface between Vif and A3 proteins is a real challenge. Indeed, Vif interacts with each of A3 proteins (A3D/F/G/H) through distinct and unique interfaces, and the development of a specific drug targeting each A3 protein is time consuming and thus unlikely. Moreover, another hurdle for the development of such inhibitors is the overlapping of binding sites for different A3 ligands: e.g., the Vif/A3G interface coincides with amino acids required for A3G encapsidation, oligomerization, and processivity (Huthoff et al. 2009). Nevertheless, different classes of compounds have been identified that potentially interfere either directly with the Vif/A3G interaction through binding to the N-terminus of A3G (IMB-26/35) (Cen et al. 2010) or indirectly by stabilizing A3G during the polyubiquitination steps (MM-1/2) (Matsui et al. 2014) or by decreasing Vif expression in the presence of A3F/G (RN-18) (Nathans et al. 2008; Fig. 4). Another strategy to restore the deaminase/antiviral activity would be to block the Vif/E3 ubiquitin ligase complex and CBF- β interactions. For instance, a zinc chelator named TPEN (N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine) has been shown to specifically inhibit the Vif-Cullin 5 interaction and to inhibit Vif functions (Xiao et al. 2007).

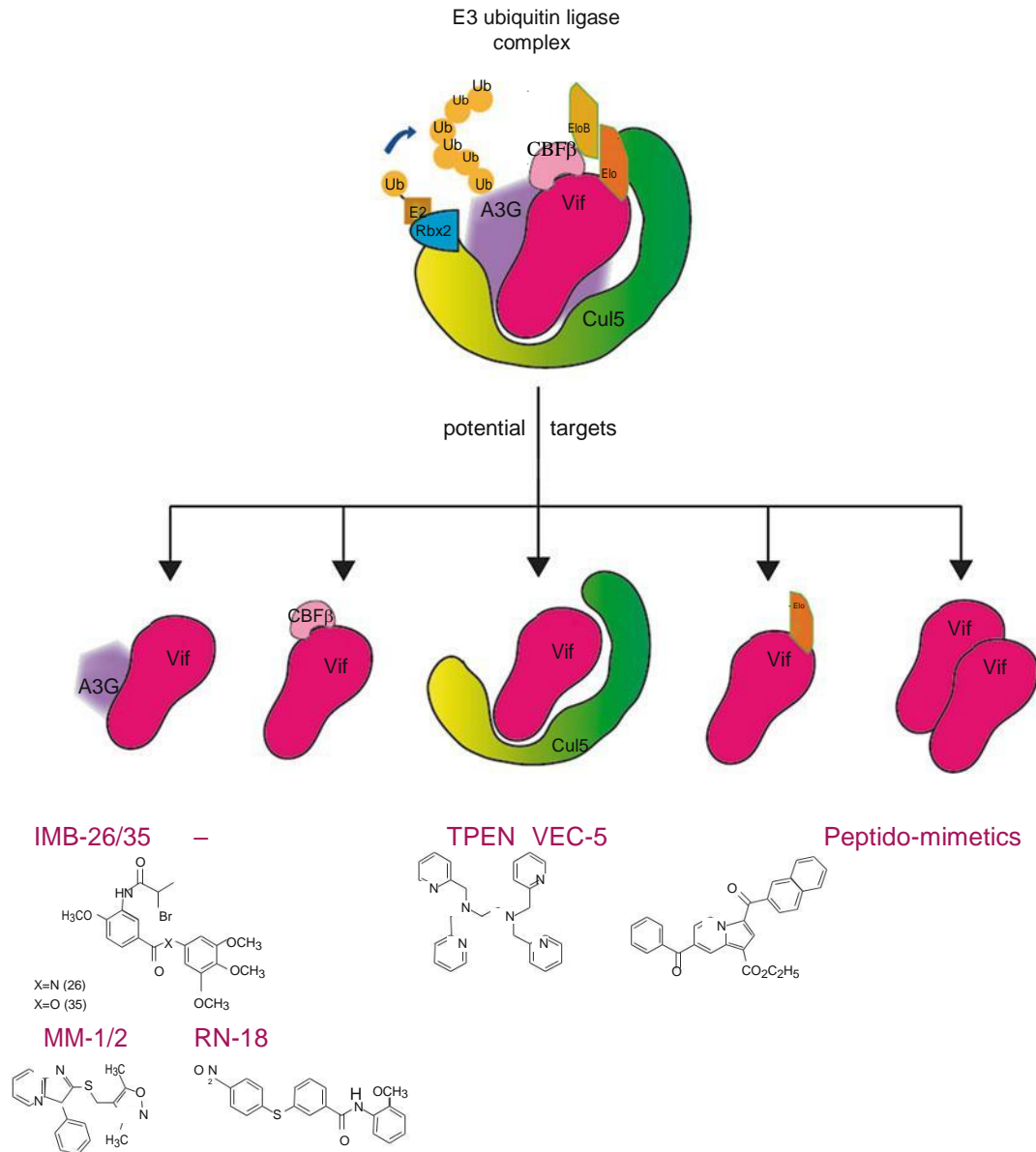


Fig. 4 Potential therapeutic strategies and targets to inhibit Vif functions. Targeting one interaction between two partners can be sufficient to prevent the formation of the E3 ubiquitin ligase complex and to inhibit Vif activity. The Vif/A3G interaction can be targeted by IMB-26/35, MM-1/2, and RN-18. The Vif/CBF- β interaction is a potential target site but no molecules have been identified yet. The Vif/Cul5 and the Vif/EloC interactions can be inhibited by TPEN and VEC-5, respectively. Finally, the dimerization domain can be counteracted by peptido-mimetics

The Vif-Elongin C interaction can also be affected by targeting the Vif SLQ motif with a small molecule (VEC-5) (Zuo et al. 2012). Interestingly, this compound does not only protect A3G but also A3C and A3F from Vif-induced proteasomal degradation, and it enhances A3G incorporation into the progeny virions. Finally, it may be possible to directly target Vif or CBF- β . In the case of Vif, its oligomerization domain provides an attractive target (Fig. 4). Although the molecular mechanism of Vif oligomerization is not clearly defined (Batisse et al. 2013), targeting the ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ motif with peptido-mimetics has been shown to block Vif-Vif interaction in vitro and lead to a decrease of virus replication in nonpermissive cells (Miller et al. 2007).

The recent resolution of the Vif/E3 ubiquitin ligase complex structure (Vif/CBF- β /Cul5/ EloC/EloB) (Guo et al. 2014) together with in silico screening of small molecules should enhance the number of lead compounds aimed at inhibiting the functions of Vif.

Conclusion

The innate immune system encodes several editing A3 proteins that are involved in the restriction of various retroviruses, viruses, and retrotransposons. Among these deaminases, A3F and A3G are the most potent against HIV-1 replication. These proteins need to be incorporated into new viral particles to induce DNA hypermutation. To prevent the antiretroviral activity of A3F/G, HIV-1 encodes Vif that targets A3F/G and reduces their intracellular concentrations by recruiting an E3 ubiquitin ligase complex to direct them to the proteasome, by inhibiting the A3F/G translation through binding to the 5' UTR of their mRNAs or by competing with A3F/G binding sites to avoid their incorporation into new viral particles. Vif also inhibits intravirion A3F/G deamination. Thanks to the recent resolution of the structure of the Vif-E3 ubiquitin ligase complex, new potential therapeutic target sites may be discovered to inhibit Vif functions and restore antiviral activities of A3 proteins. However, additional studies will be required to make sure the targeted interactions are not involved in essential cellular functions.

Cross-References

- ▶ [APOBEC Family and Viral Restriction](#) ▶ [APOBEC3G](#)
- ▶ [Cellular Restriction Factors](#)

References

- Alce TM, Popik W. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem.* 2004;279:34083–6.
- 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.
- Batisse J, Guerrero SX, Bernacchi S, Richert L, Godet J, Goldschmidt V, Mély 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;87:6492–506.
- Britan-Rosich E, Nowarski R, Kotler M. Multifaceted counter-APOBEC3G mechanisms employed by HIV-1 Vif. *J Mol Biol.* 2011;410:1065–76.
- 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.
- Cen S, Peng ZG, Li XY, Li ZR, Ma J, Wang YM, Fan B, You XF, Wang YP, Liu F, et al. Small molecular compounds inhibit HIV-1 replication through specifically stabilizing APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2010;285:16546–52.
- Feng Y, Love RP, Chelico L. HIV-1 viral infectivity factor (Vif) alters processive single-stranded DNA scanning of the retroviral restriction factor APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2013;288:6083–94.

- Feng Y, Baig TT, Love RP, Chelico L. Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif. *Front Microbiol.* 2014;5:450.
- 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.
- 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-b and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature.* 2014;505:229–33.
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell.* 2003;113:803–9.
- 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.
- Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:19539–44.
- Li M, Shandilya SMD, Carpenter MA, Rathore A, Brown WL, Perkins AL, Harki DA, Solberg J, Hook DJ, Pandey KK, et al. First-in-class small molecule inhibitors of the single-strand DNA cytosine deaminase APOBEC3G. *ACS Chem Biol.* 2012;7:506–17.
- Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J, Yu XF. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol.* 2007;81:7238–48.
- Mariani R, Chen D, Schrefelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.* 2003;114:21–31.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med.* 2003;9:1398–403.
- Matsui M, Shindo K, Izumi T, Io K, Shinohara M, Komano J, Kobayashi M, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virol J.* 2014;11:122.
- Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriot S, Paillart JC, Marquet R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:633–46.
- 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.
- Nathans R, Cao H, Sharova N, Ali A, Sharkey M, Stranska R, Stevenson M, Rana TM. Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1187–92.
- Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan MA, 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;81:8236–46.
- Salter JD, Morales GA, Smith HC. Structural insights for HIV-1 therapeutic strategies targeting Vif. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:373–80.
- 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.
- 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.
- Sleiman D, Bernacchi S, Xavier Guerrero S, Brachet F, Larue V, Paillart J-C, Tisne 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.

- 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.
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV “A” (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328:728–30.
- 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.
- Wichroski MJ, Robb GB, Rana TM. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog*. 2006;2:e41.
- Xiao Z, Ehrlich E, Luo K, Xiong Y, Yu X-F. Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *FASEB J*. 2007;21:217–22.
- 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.
- Zuo T, Liu D, Lv W, Wang X, Wang J, Lv M, Huang W, Wu J, Zhang H, Jin H, 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.

Bien que cette revue présente les principales caractéristiques des protéines A3F, A3G et Vif, certaines caractéristiques n'ont pas été mentionnées. La partie suivante revient donc sur quelques précisions concernant ces trois protéines.

- APOBEC3

Les protéines APOBEC (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like) font partie d'une famille de désaminases comptant 11 membres situés sur les chromosomes 1 (A4), 12 (AID et A1), 6 (A2) et 22 (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G et A3H) (Swanton et al 2015 ; figure 22). AID (Activation-Induced Deaminase) est exprimée dans le centre germinatif des lymphocytes B et induit la désamination des cytidines des gènes codant pour les immunoglobulines résultant de la diversification du système immunitaire (Wang et al 2012). A1 est impliquée dans le métabolisme lipidique du foie et de l'intestin (Ashur-Fabian et al 2010) et est impliquée dans l'édition de l'enzyme ApoB induisant la production d'une forme courte d'ApoB appelée ApoB48 qui diminue la production de lipoprotéines. A2 est exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques et est importante pour le développement des fibres musculaires (Sato et al 2010). Chez les mammifères, A4 est exprimée principalement dans les testicules suggérant son implication dans la spermatogenèse (Rogozin et al 2005) et semble jouer un rôle dans la réplication du VIH-1 (Marino et al 2016).

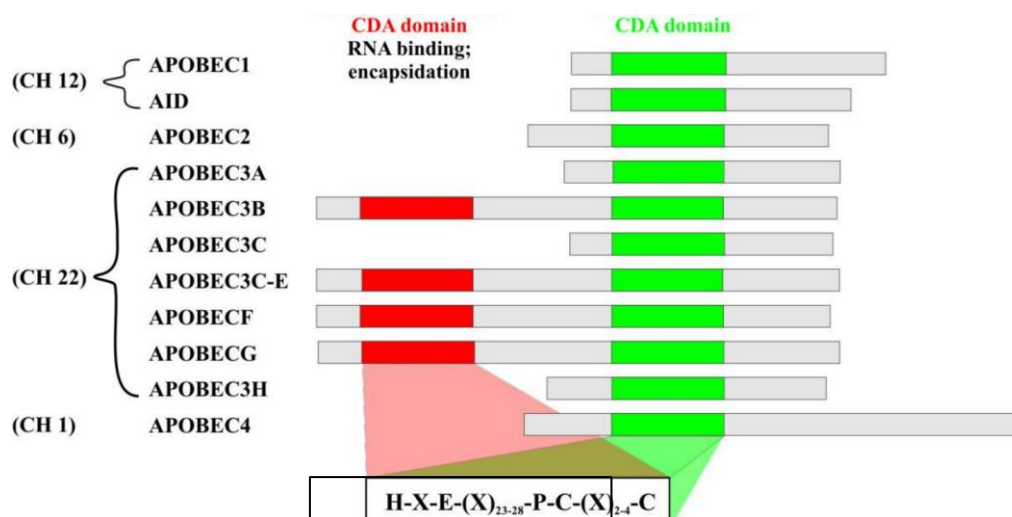


Figure 22 : Représentation schématique des membres de la famille APOBEC chez l'humain (Goila-Gaur et Strebel 2008)

La protéine A3G est exprimée dans le cytoplasme des cellules hématopoïétiques (LT4, monocytes, macrophages, cellules dendritiques), le foie, la rate, les poumons, les ovaires, les testicules ou encore dans certaines lignées cancéreuses (Jarmuz et al 2002). Cette protéine de 384 acides aminés compte deux domaines principaux : le NTD impliqué dans la liaison aux ARN et dans l'incorporation dans les particules virales et le CTD portant l'activité catalytique. De plus, A3G est capable de former des homodimères de manière dépendante de l'ARN (Bennett et al 2008 ; Chelico et al 2008 ; Huthoff et al 2009), et il a été montré par RMN (Harjes et al 2009) et par cristallographie aux rayons X (Shandilya et al 2010) que la région C-terminale du domaine catalytique actif d'A3G est composée de 5 feuillets β (β 1- β 5) et de six hélices α (α 1- α 6) entourant un ion zinc (figure 23).

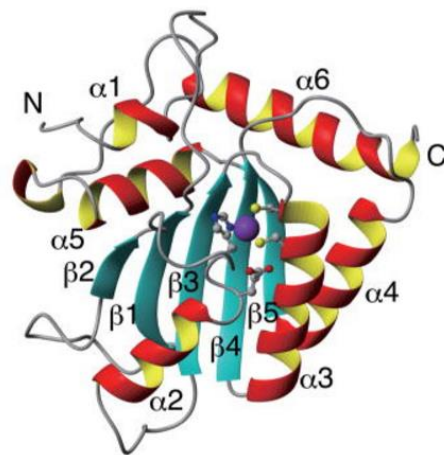


Figure 23 : Structure du domaine catalytique actif d'APOBEC3G (Kouno et al 2015)

A3G a été identifiée par le laboratoire de Michael Malim grâce à l'analyse soustractive de banques d'ADNc provenant de cellules non permissives (CEM) et de cellules permissives (CEM-SS) (Sheehy et al 2002). L'identification d'A3G comme facteur de restriction a été suivie très tôt par la caractérisation d'A3F qui est également une protéine antivirale contrée par Vif (Zheng et al 2004). A3F peut agir indépendamment d'A3G et est exprimée dans les mêmes cellules qu'A3G. Cependant, A3G a une activité anti-VIH-1 plus importante qu'A3F (Chaipan et al 2013).

Après encapsidation, A3G et A3F entrent dans la nouvelle cellule cible et induisent un fort taux de mutations dG vers dA sur l'ADN viral. Récemment, il a été montré que les sites ciblés par la désamination d'A3G sont dépendants du contexte entourant les deux CC ainsi que de la structure secondaire de l'ADN (Holtz et al 2013). A3G permet la mutation de 5'-CC en 5'-CU alors qu'A3F induit la mutation de 5'-TC en 5'-TU sur le brin d'ADN (-). L'activité d'A3G est plus importante lorsqu'il y a un A, C ou T flanquant le dinucléotide alors que la présence d'un G diminue son activité. Enfin, il a été montré que la région 5'UTR de son ARNm est importante pour le mécanisme d'inhibition traductionnelle d'A3G par Vif *in vitro* (Mercenne et al 2010).

- Vif

La protéine virale Vif (Virion infectivity factor) est une petite protéine de 23 kDa essentielle pour la réplication du VIH-1 dans les cellules cibles du VIH-1. En plus de son activité contre les facteurs de restriction A3, Vif est également impliquée à plusieurs niveaux dans la phase tardive du cycle de réplication du virus (Batisse et al 2012). En effet, Vif peut interagir avec les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} permettant son association à Gag dans le cytoplasme (Akari et al 2004). De plus, Vif est également capable de contrer l'effet d'un inhibiteur de l'assemblage de Gag nommé DSB (3-O-(3',3-dimethylsuccinyl) betulinic acid) (Dafonseca et al 2008).

Par ailleurs, Vif interagit avec l'ARN génomique du VIH-1 afin d'être encapsidée dans les nouvelles particules virales (Khan et al 2001). De plus, Vif est aussi requise pour la stabilité du core ainsi que pour la bonne morphologie des virions. En effet, les protéines NC et RT sont faiblement associées à la capsid dans les particules HIV-1ΔVif (Hoglund et al 1994) et le clivage du précurseur Pr55^{Gag} est altéré aux jonctions MA-CA et CA-NC (Akari et al 2004). Enfin, Vif fait partie intégrante de la machinerie responsable de l'étape de transcription inverse en interagissant avec la reverse transcriptase (Kataroploulou et al 2009).

La protéine Vif joue également un rôle de chaperon ARN *via* son domaine C-terminal (Sleiman et al 2014). Elle est capable de contrôler les activités chaperons de la NC afin de réguler la dimérisation de l'ARN génomique ainsi que la maturation des particules virales. Cette protéine permet de promouvoir la liaison de l'ARNt^{lys3} au PBS lors de la transcription inverse générant un complexe ARNt^{lys3}/ARN stable permettant l'initiation de cette étape du cycle viral (Henriet et al 2007). De plus, Vif est également capable de stimuler le premier transfert de brin lors de la transcription inverse, de réduire les pauses de la transcriptase inverse et d'améliorer la processivité de cette enzyme (Henriet et al 2007). Vif, comme Vpr, joue également un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 ainsi que dans la transition G1 vers S (Wang et al 2011). Racine et al (2016) ont également montré que Vif pouvait aussi être un activateur potentiel de la transcription inverse lorsque l'un des deux domaines en doigt de zinc de la NC est absent. Enfin, il a été montré que Vif est la cible d'un complexe HDAC6/APOBEC3G qui induit sa dégradation *via* l'autophagie (Valera et al 2015). Cependant, Vif peut inhiber l'autophagie grâce à son interaction avec LC3B (microtubule associated protein light chain 3B) (Borel et al 2015).

- Dégradation d'A3F/G par Vif

Plusieurs études ont été réalisées afin de connaître les mécanismes employés par Vif pour contrer l'activité d'A3F/G. Tout d'abord, Vif induit la dégradation d'A3F/G par la voie du protéasome à travers le recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase composé de la culline 5, elongine B, elongine C et CBF- β (Core Binding Factor β) (Marin et al 2003 ; Sheehy et al 2003 ; Jäger et al 2011). Cette voie d'inhibition d'A3F/G par Vif a été très étudiée et la structure du complexe E3 ubiquitine ligase en absence d'A3G a récemment été publiée (Guo et al 2014). La dégradation protéasomale d'A3F/G induit une forte diminution de leur concentration dans le cytoplasme ce qui a pour conséquence une baisse d'encapsidation dans les particules virales. Vif est capable d'interagir avec le complexe E3 ubiquitine ligase grâce à trois domaines : le domaine SOCS box se lie avec les élongines B/C, le domaine en doigt de zinc HCCH interagit avec la culline 5 et le domaine N-terminal se lie avec CBF- β .

- Régulation de la transcription d'A3G/G par Vif

Vif régule également de façon indirecte la transcription d'A3G (Anderson et al 2015). En effet, Vif interagit avec le facteur de transcription CBF β afin de former un complexe stable. Cependant, cette protéine agit comme un régulateur positif de la transcription des gènes A3. Ce facteur s'associe aux protéines RUNX (Runt-related transcription factors) afin de transcrire les protéines A3.

- Inhibition de la traduction d'A3F/G par Vif

Cette partie sur l'inhibition de la traduction d'A3F/G par Vif sera développée dans la partie « traduction des facteurs APOBEC3F/G » du chapitre IV : « La traduction chez les eucaryotes et le VIH-1 ».

IV. LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES ET LE VIH-1

La traduction des protéines est principalement régulée lors de leur initiation permettant le contrôle rapide et réversible de l'expression des gènes. Récemment, de nombreux progrès ont été accomplis afin de connaître les structures et les interactions des différents facteurs de la traduction avec les complexes ribosomiques. La revue suivante décrit en détail l'étape d'initiation de la traduction ainsi que les étapes d'élongation et de terminaison. L'article illustre par des exemples le détournement de la machinerie cellulaire impliquée dans la traduction du VIH-1 afin de synthétiser ses propres protéines. Les différentes parties décrites dans la revue ne seront pas détaillées ultérieurement. Cependant, d'autres aspects de la traduction eucaryote essentiels au projet de ma thèse seront abordés après cet article.

HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus

Santiago GUERRERO, Julien BATISSE, Camille LIBRE, Serena BERNACCHI, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART

La traduction eucaryote est un processus complexe composé de trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors d'infections par des virus à ARN et à ADN, la traduction eucaryote est utilisée afin d'assurer la synthèse optimale des protéines virales. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) utilise plusieurs voies non canoniques pour traduire ses propres protéines, telles que le leaky-scanning, le frameshift, le shunt et des mécanismes indépendants de la coiffe. De plus, le VIH-1 se sert de la machinerie de la traduction en ciblant des facteurs clés et surmonte les obstacles affectant la traduction. Dans cette revue, nous décrivons comment les protéines du VIH-1 ciblent plusieurs composants de la machinerie de la traduction eucaryote ce qui favorise la traduction virale et la réplication.

Review

HIV-1 Replication and the Cellular Eukaryotic Translation Apparatus

Santiago Guerrero [†], Julien Batisse, Camille Libre, Serena Bernacchi, Roland Marquet and Jean-Christophe Paillart *

Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Université de Strasbourg,

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue RenéDescartes, 67084 Strasbourg cedex, France; E-Mails: santiago.guerrero@crg.eu (S.G.); j.batisse@ibmc-cnrs.unistra.fr (J.B.); c.libre@ibmc-cnrs.unistra.fr (C.L.); s.bernacchi@ibmc-cnrs.unistra.fr (S.B.); r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr (R.M.)

[†] Present Address: Centre for Genomic Regulation, Dr. Aiguader, 88, PRBB Building, 08003 Barcelona, Spain

[†]

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jc.paillart@ibmc-cnrs.unistra.fr; Tel.: +33-3-8841-7035; Fax: +33-3-8860-2218.

*

Academic Editor: David Boehr

Received: 4 November 2014 / Accepted: 12 January 2015 / Published: 19 January 2015

Abstract: Eukaryotic translation is a complex process composed of three main steps: initiation, elongation, and termination. During infections by RNA- and DNA-viruses, the eukaryotic translation machinery is used to assure optimal viral protein synthesis. Human immunodeficiency virus type I (HIV-1) uses several non-canonical pathways to translate its own proteins, such as leaky scanning, frameshifting, shunt, and cap-independent mechanisms. Moreover, HIV-1 modulates the host translation machinery by targeting key translation factors and overcomes different cellular obstacles that affect protein translation. In this review, we describe how HIV-1 proteins target several components of the eukaryotic translation machinery, which consequently improves viral translation and replication.

Keywords: HIV-1; translation; auxiliary proteins; IRES; leaky-scanning; frameshift; ribosome shunting

1. Introduction

Eukaryotic translation is a complex process orchestrated by a wide range of players, including several protein factors and three classes of RNA (ribosomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), and messenger RNA (mRNA)). This process is comprised of three main steps: initiation, elongation and termination. Immediately after transcription, mRNAs are matured and exported through the nuclear pores to the cytoplasm. Once in the cytoplasm, cap-dependent translation is initiated by the recruitment of the small ribosomal subunit (40S), which scans along the mRNA until it finds an initiation codon. At this point, the large ribosomal subunit (60S) is engaged to decode the mRNA and assembles amino acids to synthesize proteins. The elongation step is completed when the ribosome reaches a stop codon that triggers the termination step. Finally, the components of the translational machinery are recycled for further protein translation.

Optimal viral protein synthesis often occurs at the expense of cellular proteins and many viruses have evolved mechanisms that redirect and control the eukaryotic translational machinery. In these cases, viral factors can target the initiation, elongation and termination steps through interactions with key translation factors and mechanisms, which interfere with or disrupt the host translation machinery.

The HIV-1 proteins are mainly synthesized by a cap-dependent mechanism. Nonetheless, different pathways such as leaky scanning, frameshifting, ribosome shunting, and cap-independent mechanisms are used to complete translation of the viral proteome. Moreover, HIV-1 has evolved sophisticated strategies to overcome cellular barriers that affect viral protein translation. This is the case of ribosomal scanning inhibition due to highly structured RNA elements and cap-dependent translation inhibition triggered by host immune responses. In this review, we focus on the HIV-1 functions that are essential to control the cellular translation apparatus in order to improve translation of viral proteins at the expense of cellular factors.

2. Overview of Eukaryotic Translation

2.1 Translation Initiation

2.1.1. Pre-Initiation Complex Assembly and mRNA Activation

Prior to translation initiation, the 5'-end of nascent mRNAs are capped with a 7-methylguanosine (m^7G) and subsequently polyadenylated at their 3'-end immediately after transcription. The m^7G cap is then recognized by the cap-binding complex (CBC), which is composed by the cap-binding proteins 80 and 20 (CBP80/20) [1]. Messenger RNA export effectors (exon-exon junction complex (EJC) and SR proteins) are then loaded on mature mRNA molecules during the splicing events. These adaptor molecules allow the recruitment of the NXF1/NXT1 heterodimer, which mediates the export of the messenger ribonucleoprotein (mRNP) from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores via interactions with nucleoporins [2,3] (Figure 1, steps 1–2).

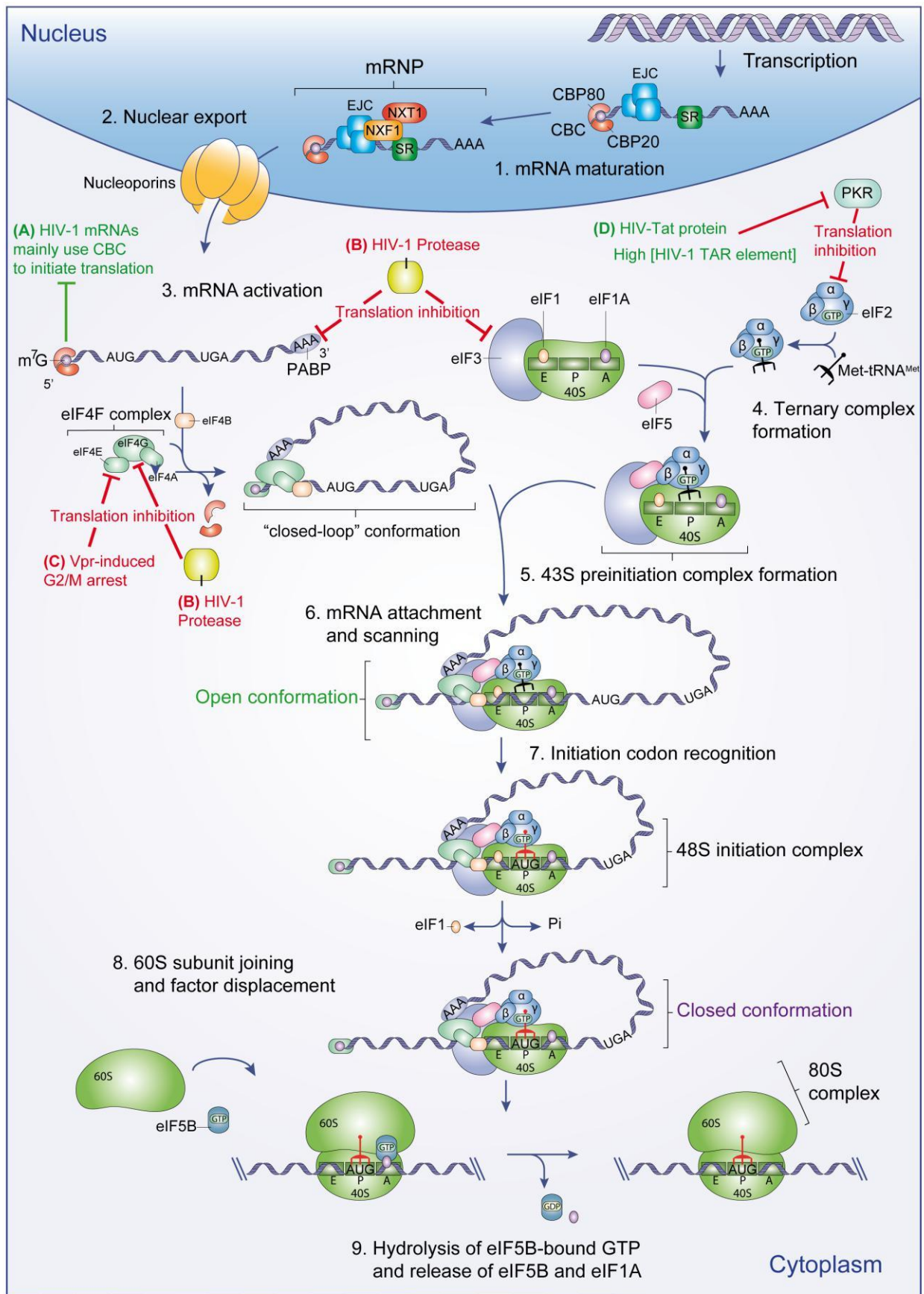


Figure 1. Eukaryotic translation initiation. mRNA maturation and nuclear export precede translation initiation (steps 1 and 2). Once in the cytoplasm, mRNA is activated (step 3) and

43S PIC formation takes place (step 4 to 5). The mRNA recruits the 43S PIC and scanning begins until an initiation codon is detected (step 6). At this point, the 48S initiation complex is formed and the 60S subunit is recruited to form the ribosome 80S complex (step 7 to 9). HIV-1 viral functions important to control the eukaryotic translation initiation are shown. **(A)** Unspliced and singly-spliced viral mRNAs could be translated due to the ability of the CBC to activate mRNA during translation initiation (green line); **(B)** HIV-1 protease partially inhibits translation initiation by targeting PABP, eIF3 and eIF4G (red lines); **(C)** Vpr-induced G2/M arrest indirectly inhibits host protein translation by targeting eIF4E activity (red line); **(D)** HIV-Tat protein and high concentration of HIV-1 TAR element indirectly promote viral translation by blocking PKR activity (red line). PKR phosphorylates eIF2 α to block its recycling for ongoing translation, resulting in a potent translation inhibition of cellular and viral mRNA.

Once in the cytoplasm, mRNAs undergo a CBC-mediated pioneer round of translation, which is important for the quality control of the transcript [4]. CBC is then displaced from the m⁷G and mRNAs are activated by the eukaryotic initiation factor 4F complex (composed of eIF4E, eIF4G and eIF4A) and eIF4B (Figure 1, step 3). Thus, mRNA acquires a “closed-loop” structure, required for an optimal mRNA recruitment into the 43S pre-initiation complex (PIC) (Figure 1, step 6). This conformation is achieved by the simultaneous binding of PABP (Poly(A)-binding protein) and eIF4E to eIF4G [5].

In parallel, ternary complex (TC) formation occurs through the assembly of the initiator methionyl-tRNA (Met-tRNA_i^{Met}), eIF2 and a GTP molecule (Figure 1, step 4). The TC is then recruited to the ribosomal subunit 40S to assemble the 43S PIC (Figure 1, step 5). In this process, other eIFs (eIF1, 1A, 3 and 5) are required to promote TC binding to the 40S subunit [6].

2.1.2. Initiation Codon Recognition and 80S Complex Formation

Once the mRNA has been loaded on the 43S PIC, this complex scans the 5' untranslated region (5'UTR) until it recognizes a start codon (AUG) by complementarity with the anticodon of the Met-tRNA_i. To prevent incorrect base pairing of the Met-tRNA_i to a non-AUG codon and to promote recognition of the correct start codon, 43S PIC employs a discriminatory sequence-based mechanism. This permissive sequence (GCC(A/G)CCAUGG) surrounding the start codon is termed Kozak consensus sequence and is principally composed of a purine at position -3 and a G at position +4 (the A of the AUG codon is designated as +1) [7–9]. Once the AUG start codon has been recognized and the 48S complex formation has been accomplished, eIF1 is ejected from the scanning complex (Figure 1, step 7) [10]. This in turn triggers hydrolysis of eIF2-bound GTP and Pi release by the eIF5 GTPase activity.

These events cause the transition from an “open” to a “closed” conformation of the scanning complex, which stabilizes the binding of the Met-tRNA_i with the AUG start codon [11]. At this point, the remaining factors are dissociated to allow the joining of the 60S subunit and 80S complex formation (Figure 1, step 8). This process is mediated by eIF5B which causes the dissociation of eIF3, eIF4B, eIF4F and eIF5, and eIF5B self-dissociates from the assembled 80S ribosome by its GTPase activity [12]. This reaction also triggers the release of eIF1A to finally forms an elongation competent 80S ribosome (Figure 1, step 9) [13].

2.2. Translation Elongation and Termination

After the AUG start codon has been identified and the formation of the 80S ribosome has been achieved, translation elongation begins [13]. 80S ribosome decodes the mRNA sequence and mediates the addition of amino acids to elongate the growing polypeptide chain. Elongation is accomplished by the eukaryotic elongation factors eEF1 (composed of eEF1A and eEF1B) and eEF2 (Figure 2) [14,15]. The eEF1A-GTP complex carries each aminoacylated tRNA to the 80S ribosome A site where it builds codon-anticodon interactions (Figure 2, step 1). After 80S ribosome-catalyzed peptide bond formation (Figure 2, step 2), eEF2 mediates 80S ribosome translocation through GTP hydrolysis (Figure 2, step 3) and the next round of amino acid incorporation begins (Figure 2, step 4).

Polypeptide elongation continues until a stop codon triggers the translation termination step. This process is mediated by the eukaryotic translation termination factors eRF1 and eRF3 [16]. The eRF1 factor mediates stop codon recognition, while eRF3 potently stimulates peptide release. After protein release, eRF1 remains bound to the post-termination complex (post-TC), and in conjunction with the ATP-binding cassette protein ABCE1, dissociates the post-TC into the 60S subunit, and the tRNA- and mRNA-bound 40S subunit [17].

3. HIV-1 Takes Advantage of the Host Translation Machinery

3.1. Overcoming Ribosome Scanning Barriers

All spliced and unspliced HIV-1 transcripts possess the same 289 nt long 5'UTR. Because this region presents several highly structured motifs such as the trans-activation responsive (TAR) RNA element, the unwinding step of the ribosomal scanning process is expected to be inefficient [18]. Soto-Rifo *et al.* [19] have shown that RNA helicase DDX3 is required in order to overcome this constraint. DDX3 directly binds to the HIV-1 5'UTR and interacts with eIF4G and PABP to promote translation initiation of HIV-1 genomic RNA [19], and mediates pre-initiation complex assembly in an ATP-dependent manner. In this process, the HIV-1 genomic RNA seems to be located in large cytoplasmic RNA granules alongside with DDX3, eIF4G and PABP, but not with CBP20/80 and eIF4E [20].

In vitro experiments revealed that cytoplasmic DDX3 is able to bind the m⁷G cap independently of eIF4E, showing that DDX3 could promote the formation of a pre-initiation complex in the absence of eIF4E. Thus, DDX3 substitutes for eIF4E to stimulate compartmentalized translation initiation of HIV-1 unspliced mRNA [20]. Groom *et al.* [21], by using an *in vitro* transcription/translation assay from rabbit reticulocyte lysates, have demonstrated that Rev, which interacts with DDX3, stimulates translation of HIV-1 mRNAs at low concentration. This stimulation is dependent on a Rev binding site, in addition to the RRE, present in the internal loop B of stem-loop 1 (SL1) of HIV-1 RNA packaging signal [22]. On the contrary, at a high concentration, Rev inhibits mRNA translation in a non-specific manner. In this process, Rev may bind mRNAs and block ribosomal scanning by a mechanism that remains to be elucidated [21]. Lai *et al.* [23] have shown that DDX3 is recruited to the TAR region through the interaction with the Tat protein in order to promote HIV-1 mRNA translation.

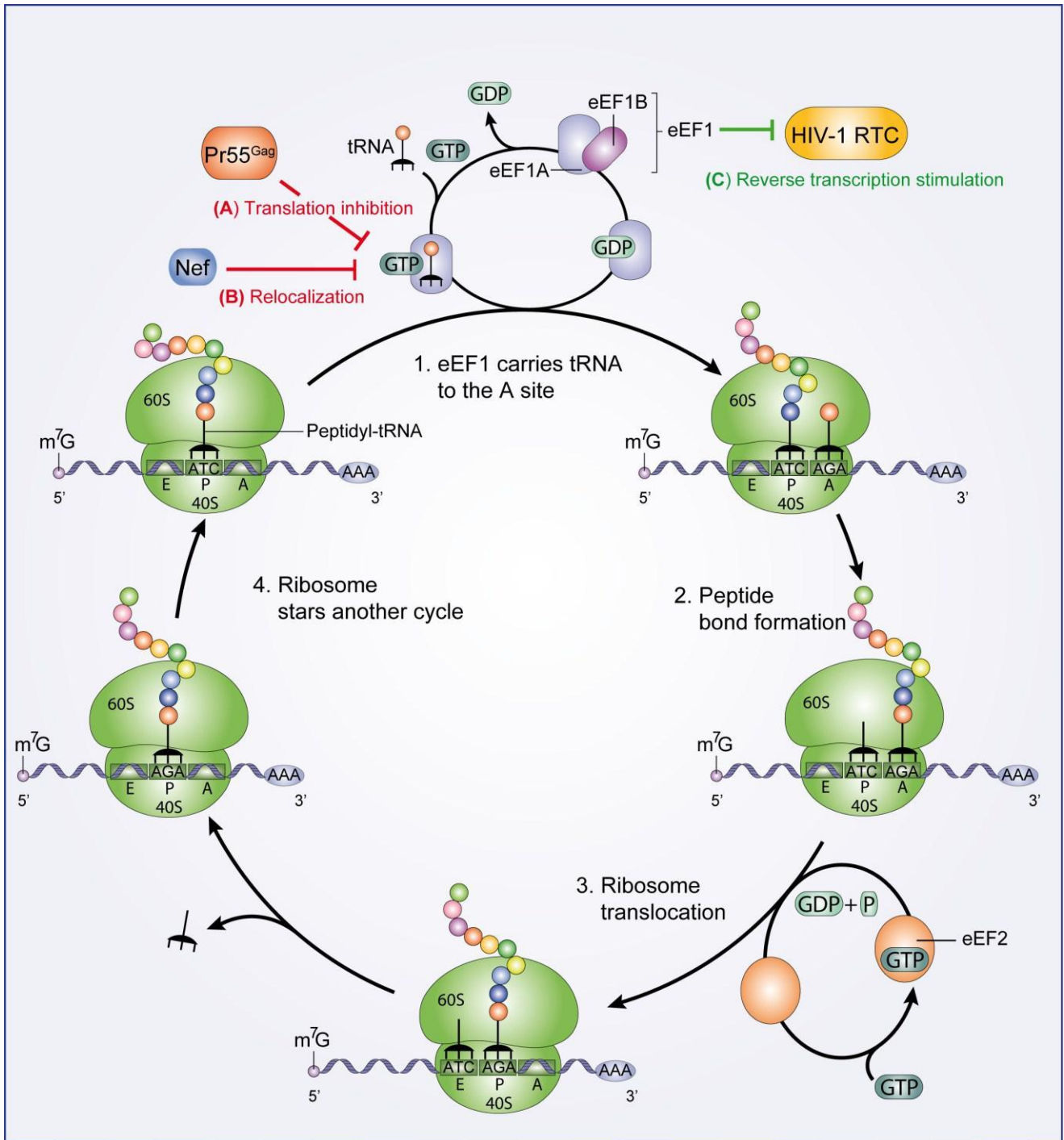


Figure 2. Eukaryotic translation elongation. eEF1A-GTP transports the aminoacylated tRNAs into the A site of the 80S ribosome and eEF1A-GDP is re-activated by eEF1B (step 1). The 80S ribosome-mediated peptide bond formation (step 2) precedes ribosome translocation mediated by eEF2 (step 3). Finally, the ribosome begins another cycle of peptide elongation (step 4). HIV-1 viral functions important to control the eukaryotic translation elongation are shown. (A) HIV-1 Pr55^{Gag} interacts with eEF1A and induces translation inhibition (red line); (B) HIV-1 Nef protein also interacts with eEF1A and mediates a nucleocytoplasmic relocation of eEF1A (red line); (C) The HIV-1 RTC recruits eEF1A to stimulate late steps of the HIV-1 reverse transcription process (green line).

Other cellular proteins also bind the TAR element and promote viral translation. RNA Helicase A (RHA) binds to the TAR region *in vitro* and *in vivo* enhancing HIV-1 LTR-directed gene expression and viral production [24]. Dorin *et al.* [25] showed that the TAR RNA-binding Protein (TRBP) promotes translation of TAR-bearing RNAs independently of its ability to inhibit protein kinase RNA-activated (PKR). Other RNA-binding proteins have been shown to stimulate HIV-1 translation. This is the case with Staufen [26] and La autoantigen [27]. Both proteins stimulate translation of TAR-containing reporter transcripts.

3.2. The Vpu-Env Bicistronic mRNA: Modulation of Ribosome Scanning Process

As many other viruses, HIV-1 optimizes its genome coding capacity by translating different proteins from a common mRNA. This is the case of the bicistronic vpu-env mRNA which encodes both Vpu and Env proteins [28,29]. The coding sequences of Vpu and Env proteins are arranged so that the Vpu Open Reading Frame (ORF) precedes the Env coding sequence (Figure 3). Schwartz *et al.* [28,29] showed that the Env protein is synthesized by a leaky scanning mechanism in which the 43S PIC passes through the Vpu start codon. According to these authors, this modulation of the 43S PIC scanning process is achieved because the Vpu initiation codon is surrounded by a weak Kozak context [28,29]. As a result, mutations of the Vpu initiation codon that improve its Kozak context inhibit Env translation from the bicistronic vpu-env mRNA [28,29].

In contrast, by studying the 5'UTR of 16 alternatively spliced Env mRNAs, some of which also including the extra upstream Rev initiation codon, Anderson *et al.* [30] demonstrated that mutations in the upstream AUG codons of the Env ORF had little effect on Env synthesis. This suggests that Env translation is achieved via a discontinuous scanning mechanism such as ribosome shunting, a process in which the ribosome bypasses parts of the 5'UTR to reach a start codon. Indeed, Krummheuer *et al.* [31] reported that translation of Env protein was inconsistent with the leaky scanning model. Instead, Env translation is stimulated by a six-nucleotide upstream ORF (uORF) (Figure 3), which is located in the vpu start codon region. uORFs are short open reading frames located within the 5'UTR of a mRNA. Mutations of the start and stop codons of this uORF reduced Env protein translation five-fold [31]. The authors suggest that this uORF acts as a ribosome pausing site supporting the ribosome shunting model [31].

3.3. The Fate of Unspliced HIV-1 mRNA

3.3.1. Cap- and IRES-Dependent Translation Initiation

The HIV-1 unspliced mRNA can initiate translation of Gag and Gag-Pol polyproteins either by a classical cap-dependent mechanism or by Internal Ribosome Entry Sites (IRES) [32–35]. Cap-dependent translation of HIV-1 unspliced mRNA has been observed *in vitro* [35] and *ex vivo* [33,36]. As described above, cap-dependent translation initiation relies on the recognition of the 5'UTR cap structure by the eIF4F complex to promote the recruitment of 43S PIC (Figure 1).

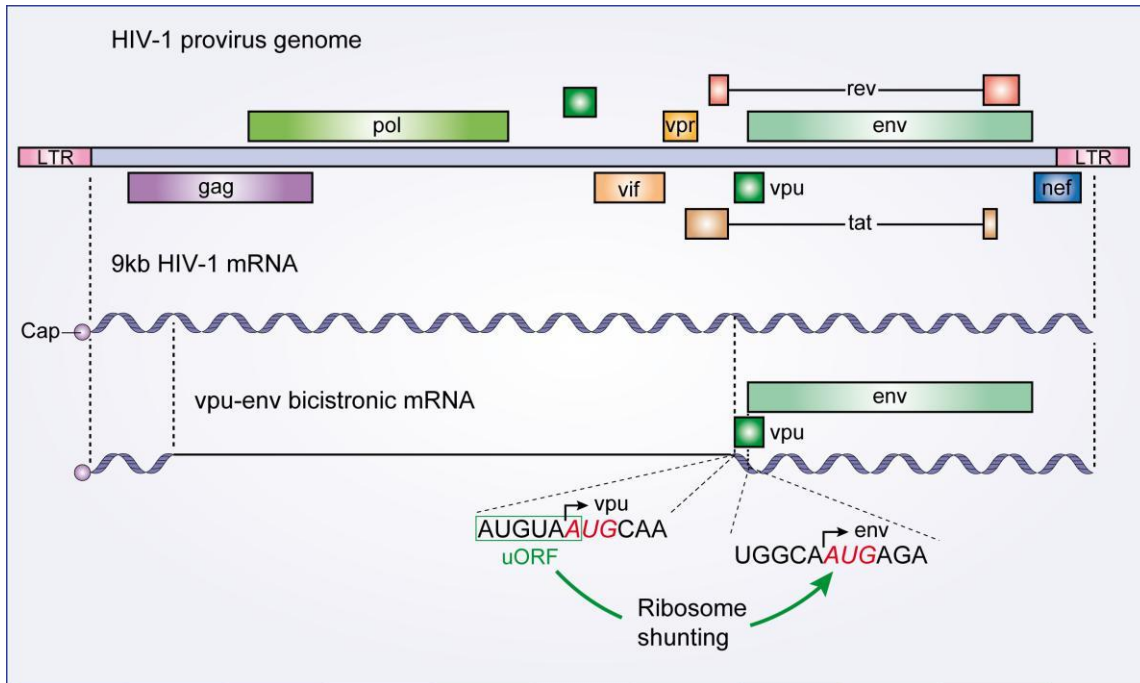


Figure 3. The HIV-1 vpu-env bicistronic mRNA. A schematic diagram of the HIV-1 provirus genome is presented along with its primary 9 kb mRNA transcript. The vpu-env bicistronic mRNA is formed after splicing of the 9 kb mRNA. Start codon sequences of both vpu and env ORFs are presented and the upstream ORF that stimulates Env translation is boxed in green.

IRESs present in several viral mRNAs (mainly picornaviruses and Hepatitis C virus) overcome a global translation down-regulation established by the cell during viral infection. The HIV-1 genomic mRNA presents two IRESs: one in the viral 5'UTR, named HIV-1 IRES [32] and a second within the *gag* coding region, known as HIV-1 Gag IRES [37] (Figure 4). The HIV-1 IRES has been characterized in a proviral wild-type HIV-1 clone (pNL4.3) [32], but also in the CXCR4 (X4)-tropic primary isolate HIV-LAI [38], and in viral RNA isolated from clinical samples [39], demonstrating the importance of these elements in HIV-1 replication. The cap structure and the HIV-1 IRES both drive translation of pr55^{Gag} and $\text{pr160}^{\text{Gag/Pol}}$. The minimal active HIV-1 IRES is harbored within the region spanning nucleotides 104 to 336 [32]. This region also contains several RNA motifs involved in different functions of the HIV-1 life cycle (Figure 4).

The HIV-1 IRES has been shown to be implicated in different cellular states in which cap-dependent translation initiation is inhibited [18]. Monette *et al.* [34], by using *in vitro* artificial systems and HIV-1-expressing cells, reported that Pr55^{Gag} translation was preserved at 70% when eIF4G and PABP, two main components of the cap-dependent translation initiation, were targeted by picornavirus proteases. Using a similar system, Amorim *et al.* [40] showed that HIV-1 protein synthesis is highly dependent on cap-initiation the first 24–48 h of viral replication, while at later time points IRES-dependent translation is needed to ensure viral particles production. HIV-1 IRES also drives viral structural protein synthesis during the G2/M cell cycle transition [32,41] and is stimulated by oxidative stress [38].

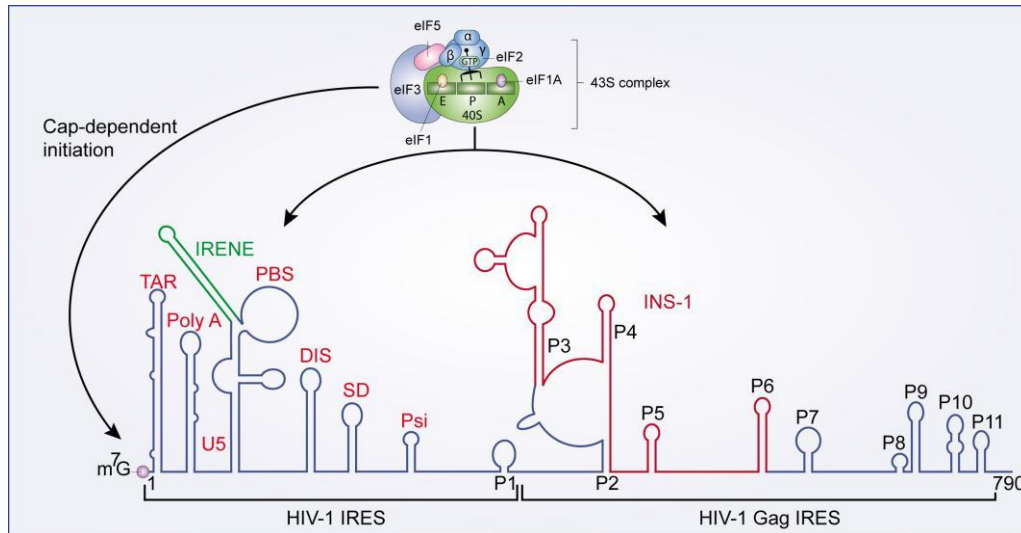


Figure 4. HIV-1 IRESs. HIV-1 IRES and HIV-1 Gag IRESs are represented. The 43S pre-initiation complex can mediate both cap-dependent and IRES-mediated translation initiation.

Although the molecular mechanism of the HIV-1 IRES-mediated translation remains largely unknown, Plank *et al.* [42] demonstrated that the HIV-1 IRES is cell type-specific. Using a plasmid encoding a dual-luciferase reporter mRNA, the authors showed that the HIV-1 IRES activity was 4-fold higher in Jurkat T-cells than in HeLa cells. Based on the fact that all spliced and unspliced HIV-1 transcripts possess the same 289 nt long 5'UTR, the authors also demonstrated that *vif*, *vpr*, *vpu*, and *nef* transcripts can initiate translation by an IRES. Interestingly, despite the fact that all HIV-1 constructs contain the same 5' leader region, the IRES activity of these transcripts differ from the IRES-containing gag transcript [42]. Based on these results, Plank *et al.* [42] proposed a model in which the structure of the 5' leader region adopts several conformations to stimulate different processes in the viral replication cycle, such as RNA dimerization prior to packaging or IRES-mediated translation. Thus, cell type-specific ITAFs (IRES Trans-Acting Factors) could promote the structural conformation of the 5' leader region required for an optimal IRES activity. In *vif*, *vpr*, *vpu* or *nef* transcripts, the specific ITAFs bind regions of the 5'UTR common to all these transcripts to form a “Core IRES” that stimulate IRES-mediated translation. However, the IRES activity of these transcripts could be regulated by specific RNA sequences present downstream of the common 5'UTR [42].

Several cellular proteins have been reported as cellular factors increasing the HIV-1 IRES activity [18]: eIF5 [43], the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) [44] and the Rev-cofactors DDX3 and hRIP [43]. On the contrary, the human embryonic lethal abnormal vision (ELAV)-like protein (HuR) has been identified as a negative regulator of the HIV-1 IRES activity [45]. *Cis*-acting elements have also been shown to negatively modulate HIV-1 IRES activity. Brasey *et al.* [32] showed that the Gag ORF impacts the HIV-1 IRES-mediated translation initiation in the context of a bi-cistronic mRNA. Gendron *et al.* [38] identified another region located upstream of the PBS, the IRES negative element (IRENE) that also negatively regulates the HIV-1 IRES activity (Figure 4). Recently, it was shown that the instability element 1 (INS-1), a *cis*-acting regulatory element present within the gag ORF, also inhibits HIV-1 IRES activity (Figure 4) [46]. Furthermore, several HIV-1 IRES ITAFs have been identified from G2/M-arrested cell extracts [41], including proteins that have already been identified to have a role in

HIV-1 replication, such as the high mobility group protein HMG-I/HMG-Y (HMG-I(Y)) [47] or the activated RNA polymerase II transcriptional co-activator p15 [48].

The HIV-1 Gag IRES mediates translation of both full length Pr55^{Gag} polyprotein and a N-truncated 40-kDa Gag (p40) isoform lacking the matrix domain [37,49]. Despite the fact that p40 is produced at a much lower level than Pr55^{Gag}, this protein seems to be important in wild-type replication of HIV-1 in cultured cells [37]. Expression of p40 has also been observed in all HIV-1 clinical isolates from a large cohort of patients ($n = 100$) [18].

3.3.2. Ribosomal Frameshift

The Gag-Pol polyprotein, which is synthesized at a $\sim 1/10$ ratio compared to Gag, is translated via a -1 nucleotide ribosomal frameshift [50,51]. This process is regulated by two main factors, a slippery heptanucleotide sequence (UUUUUUA) where the frameshift takes place, and a downstream RNA element called the frameshift stimulatory signal (FSS) that controls the frameshift efficiency (Figure 5) [52]. The shift places the *gag* termination codon into an out-of-frame context and translation continues toward the downstream *pol* sequence [50,51]. The structure of the FSS and its mechanistic mode of action are not well understood. It has recently been proposed that the -1 frameshift is promoted by 4 pseudoknots (PK1-4) present in the FSS [53,54]. However, *ex virio* SHAPE (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension) experiments [55] and frameshifting assays [56] do not support this model.

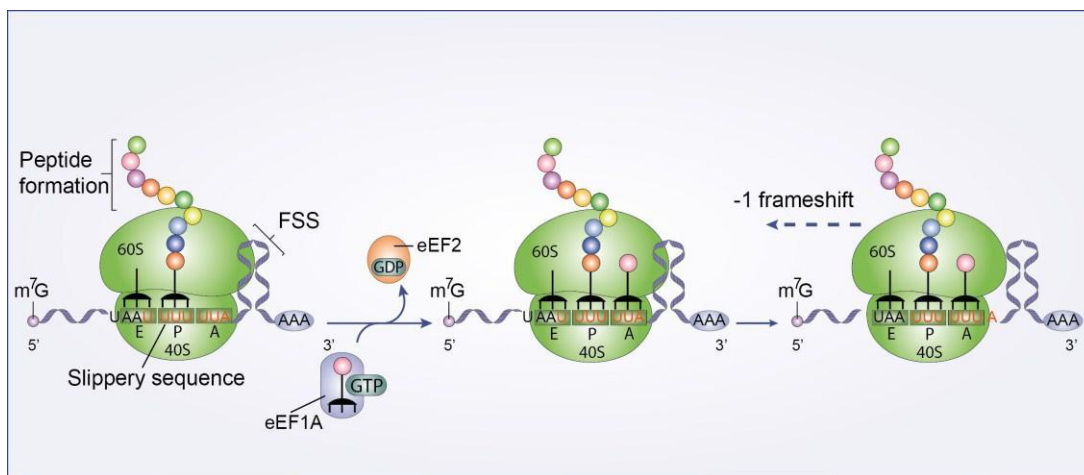


Figure 5. HIV-1 Ribosomal frameshift. A schematic diagram of the -1 nucleotide ribosomal frameshift. This process is mediated by a slippery heptanucleotide sequence (UUUUUUA) where the frameshift takes place, and an RNA element called the frameshift stimulatory signal (FSS).

The most widely accepted model suggests that -1 frameshift is triggered when the FSS forces a small portion of the 80S complexes to make a pause. This pause forces the 80S complexes to shift one nucleotide backwards into the *pol* sequence [57–59]. Léger *et al.* [57] have proposed a model in which, after release of the eEF2-GDP complex from the ribosome, the two tRNAs cannot be translocated by three nucleotides (from P/A to E/P sites). Instead the two tRNAs are translocated only by two nucleotides due to the FSS. Consequently, the two tRNAs are trapped in an intermediate translocation state and frameshift is achieved [57]. This is supported by the cryo-EM structure resolved by Namy *et al.* [58], in

which the ribosome is stalled by the presence of the FSS. Additionally, Mouzakis *et al.* [56] have demonstrated that the base pairs important for this process are located at an 8 nt distance from the slippery sequence, which is consistent with the paused-ribosome model.

Further studies have shown that the highly structured TAR element and the Tat protein modulate ribosomal frameshift [60,61]. Charbonneau *et al.* [61] demonstrated that the presence of the HIV-1 5'UTR in a reporter mRNA increases the -1 frameshift efficiency fourfold in Jurkat T-cells, compared to a control reporter with a short unstructured 5'UTR. This is associated with the presence of the TAR region within the 5'UTR [60,61]. This region slows down the rate of translation initiation during cap-dependent translation. As a consequence, the distance between ribosomes is larger and the FSS has more time to refold [60,61]. Thus, a structured FSS is required for an optimal -1 frameshift process. The increase in the -1 frameshift efficiency is antagonized by the HIV-1 Tat protein, which indirectly destabilizes TAR structure by increasing recruitment of RNA helicases, such as DDX3 [23]. Moreover, Lorgeoux *et al.* [62], using a dual-luciferase reporter assay, showed that the helicase DDX17 is required for -1 frameshift and for maintaining proper ratios of Gag vs. Gag-Pol proteins.

3.4. Redirecting mRNA Activation

In the G2/M phase of the cell cycle, cap-dependent translation is down-regulated by a cascade of events that lead to the disruption of the eIF4F complex, and thereby inhibition of the mRNA activation step (Figure 1, step 3) [63]. In this process, formation of the eIF4F complex is prevented by targeting of eIF4E. This factor is regulated by a family of translation inhibitor proteins, named the eIF4E-binding proteins (4E-BPs). After hypophosphorylation, 4E-BPs compete with eIF4G for the same binding site on eIF4E, preventing eIF4F complex assembly [63,64].

In HIV-1-infected cells, viral proteins alter cell function by affecting different cellular pathways. HIV-1 viral protein R (Vpr) has been identified as a viral protein capable of arresting cells in the G2/M phase. Vpr mediates G2/M arrest via a complex signaling cascade involving activation of the ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related kinase (ATR) [65]. Vpr-induced G2/M arrest also inhibits host protein translation by a process involving the regulation of eIF4E activity (Figure 1C) [66].

Despite the global reduction of host protein synthesis by Vpr-induced G2/M arrest, translation of HIV-1 structural proteins is maintained [58]. RNA-coimmunoprecipitation experiments showed that full-length unspliced HIV-1 genomic RNA and singly spliced mRNAs are associated with CBC in contrast to multi-spliced viral and cellular mRNAs that are associated with eIF4E. Moreover, unspliced and singly-spliced viral mRNAs retain their interaction with CBC during translation and packaging. Based on these observations, Sharma *et al.* [66] hypothesized that unspliced and singly-spliced viral mRNAs are translated due to the ability of the CBC to activate mRNA during initiation (Figure 1A). Thus, CBC retention could allow viral protein synthesis while the global protein translation is inhibited by an eIF4E decrease.

3.5. Targeting Cellular Translation Factors

During the HIV-1 replication cycle, viral proteins inhibit different translation factors. This is the case of the HIV-1 protease, which partially impairs cap-dependent protein translation, in addition to its main function during virion maturation. Ventoso *et al.* [67] were the first to report that HIV-1 protease is able to cleave the initiation factor eIF4G *in cellula* (Figure 1B), by using HIV-1 C8166 target cells. Further studies using rabbit reticulocyte lysates have demonstrated that HIV-1 protease not only cleaves eIF4G but also PABP (Figure 1B) [68–70]. Degradation of eIF4G and PABP leads to an inhibition of the cap- and PABP-dependent translation initiation [67–70]. Jäger *et al.* [71] reported that the HIV-1 protease also cleaves eIF3d (Figure 1B), a subunit of eIF3. This cleavage presents a similar efficiency to the one of the Pr55^{Gag}. This may also promote inhibition of cap-dependent protein synthesis.

In the early phases of HIV-1 replication, the HIV-1 TAR RNA element activates PKR, which mediates host translation inhibition [72]. PKR interacts with the TAR element, inducing PKR dimerization, auto-phosphorylation and activation. Activated PKR phosphorylates the alpha subunit of eIF2 (eIF2 α), blocking its recycling for ongoing translation, resulting in a potent translation inhibition of cellular and viral mRNA [73]. HIV-1 indirectly prevents phosphorylation by targeting PKR. Indeed, the HIV-1 Tat protein directly interacts with PKR, thus, preventing auto-phosphorylation (Fig 1D) which is essential for function [72,74]. Moreover, during the late events of HIV-1 replication, PKR activity is inhibited by the high concentration of the HIV-1 TAR element (Fig 1D). Studies with TAR and other RNAs showed that high concentration of double-stranded RNA (dsRNA) inhibits PKR dimerization and therefore its activation [75]. PKR activation is further inhibited by HIV-induced mechanisms involving the cellular factors TRBP, Adenosine deaminase ADAR1 and a change in PACT function [72,76].

Moreover, by using a yeast two-hybrid screen assay, Cimarelli and Luban [77] reported that the HIV-1 Pr55^{Gag} binds to eEF1A through its matrix (MA) and nucleocapsid (NC) domains. They demonstrated that this interaction requires RNA, and suggested that tRNA could probably mediate this interaction since both NC and eEF1A have been shown to bind tRNAs [78,79]. Thus, as cellular concentration of Pr55^{Gag} increases in the cell, Pr55^{Gag} association with eEF1A-tRNA complexes may induce translational inhibition (Figure 2A). As a consequence of this inhibition, viral genomic RNA could be released from the translation machinery. Subsequently, Pr55^{Gag} interaction with the genomic RNA may lead to a further viral translation inhibition, thus stimulating RNA packaging into virions [77]. The authors also showed that both eEF1A and a truncated form of eEF1A of 34 to 36 kDa are incorporated into virions. In addition, eEF1A can also interact with the cellular cytoskeleton, suggesting a possible role of eEF1A in virion assembly and budding [80]. Despite these reports, direct evidence for a role of eEF1A in RNA packaging, virion assembly or viral particle budding remains to be demonstrated [81].

Similar to Pr55^{Gag}, HIV-1 Nef protein also interacts with eEF1A and forms a Nef/eEF1A/tRNA complex. Thus, Nef mediates a nucleocytoplasmic relocalization of eEF1A and tRNAs to prevent stress-induced apoptosis in primary human macrophages (Figure 2B) [82]. Moreover, Warren *et al.* [83] have reported that the HIV-1 reverse transcription complex (RTC) recruits eEF1 to stimulate late steps of the HIV-1 reverse transcription process (Figure 2C). The eEF1 factor binds to the HIV-1 RTC through an interaction with reverse transcriptase (RT) and integrase (IN). This association enhances the stability of the RTC in the cytoplasm [83]. Nevertheless, further studies will be needed to establish whether eEF1 functions synergistically with the components of the RTC, or independently during reverse transcription.

3.6. Inhibiting APOBEC3G Translation

APOBEC3G (*apolipoprotein B* mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G, or A3G) is a restriction factor that impairs HIV-1 replication [84]. A3G is incorporated into viral particles and during reverse transcription in the target cells, it converts cytidines into uridines in the (−) strand DNA. This will generate further reverse transcription and integration defects and potentially produce non-functional viral proteins. HIV-1 counteracts this cellular factor by at least two pathways involving the HIV-1 viral infectivity factor (Vif). First, binding of Vif to A3G allows the recruitment of an E3 ubiquitin ligase that mediates the poly-ubiquitination of A3G and its degradation through the proteasome pathway. Second, Vif impairs the translation of A3G mRNA through a putative mRNA-binding mechanism [85,86].

Mariani *et al.* [87] were the first to observe that Vif inhibits A3G translation and suggested that this repression may contribute to the reduction of A3G encapsidation. The authors reported that Vif causes a 4.6 fold reduction in A3G synthesis by pulse-chase metabolic labeling experiments. Additionally, Kao *et al.* [88] showed that Vif causes the reduction of cell-associated A3G by 20%–30% compared to up to 50-fold reduction in virus-associated protein. This result supports the idea that Vif functions at different levels to reduce the intracellular levels of A3G. A3G translational inhibition was finally confirmed by Stopak *et al.* [89]. By using kinetic analyses and *in vitro* transcription-translation experiments, the authors showed that Vif was capable of impairing A3G translation by approximately 30%–40% [89].

Based on these observations, we recently showed that Vif binds to A3G mRNA and inhibits its translation *in vitro* [86]. Indeed, filter binding assays and fluorescence titration experiments revealed that Vif tightly binds A3G mRNA. We also demonstrated that Vif is able to inhibit A3G translation in *in vitro*-coupled transcription/translation assays. In these experiments, Vif caused a two-fold reduction of A3G translation in a 5'UTR-dependent manner, most likely through mRNA binding and/or through its RNA chaperone activity [90,91]. These observations show that HIV-1 not only targets the host translational machinery to improve translation of its own proteins, but also inhibits translation of the host restriction factor A3G.

4. Concluding Remarks

HIV-1 has evolved several mechanisms that control the host translation machinery and overcome different obstacles in the cell, such as ribosomal scanning inhibition due to highly structured RNA elements and cap-dependent translation inhibition triggered by host immune responses. During this antiviral state triggered by the cell, HIV-1 proteins interact with the eukaryotic translation apparatus in different ways. Thus, these mechanisms not only promote translation of HIV-1 proteins, but also guarantee the fitness of newly produced viral particles by inhibiting A3G incorporation. It seems that the sophisticated functions presented in this review only represent a fraction of the strategies that have evolved by HIV-1 interaction with cellular functions, leading to a control of the host translation machinery during viral replication. Indeed, Jäger *et al.* [71] reported 497 interactions between 16 HIV-1 proteins and 435 human proteins. In addition, genome-wide techniques such as ribosome profiling [92] and/or iCLIP (individual-nucleotide resolution UV cross-linking and immunoprecipitation) [93] could be used, for example to identify HIV-1 Vif mRNA targets and to understand how this protein inhibits translation of specific genes. Identifying

which cellular proteins of the translational eukaryotic machinery are targeted by HIV-1 will be crucial for a global understanding of the HIV-1 replication.

Acknowledgments

We are grateful to Redmond Smyth for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) to JCP, and by post-doctoral and doctoral fellowships from ANRS to JB, SG and CL.

Author Contributions

S.G., R.M. and J.C.P. conceived the review topic. S.G. drafted the manuscript and generated the figures. J.C.P. and R.M. corrected and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Izaurralde, E.; Lewis, J.; McGuigan, C.; Jankowska, M.; Darzynkiewicz, E.; Mattaj, I.W. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **1994**, *78*, 657–668.
2. Adams, R.L.; Wentz, S.R. Uncovering nuclear pore complexity with innovation. *Cell* **2013**, *152*, 1218–1221.
3. Moore, M.J.; Proudfoot, N.J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **2009**, *136*, 688–700.
4. Maquat, L.E.; Tarn, W.Y.; Isken, O. The pioneer round of translation: Features and functions. *Cell* **2010**, *142*, 368–374.
5. Uchida, N.; Hoshino, S.I.; Imataka, H.; Sonenberg, N.; Katada, T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50286–50292.
6. Majumdar, R.; Bandyopadhyay, A.; Maitra, U. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40S preinitiation complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6580–6587.
7. Kozak, M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature* **1984**, *308*, 241–246.
8. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **1986**, *44*, 283–292.
9. Kozak, C.A.; Chakraborti, A. Single amino acid changes in the murine leukemia virus capsid protein gene define the target of Fv1 resistance. *Virology* **1996**, *225*, 300–305.
10. Maag, D.; Fekete, C.A.; Gryczynski, Z.; Lorsch, J.R. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol. Cell* **2005**, *17*, 265–275.

11. Nanda, J.S.; Cheung, Y.N.; Takacs, J.E.; Martin-Marcos, P.; Saini, A.K.; Hinnebusch, A.G.; Lorsch, J.R. eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 268–285.
12. Pestova, T.V.; Lomakin, I.B.; Lee, J.H.; Choi, S.K.; Dever, T.E.; Hellen, C.U. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **2000**, *403*, 332–335.
13. 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.
14. Groppo, R.; Richter, J.D. Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 444–451.
15. Kapp, L.D.; Lorsch, J.R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 657–704.
16. Jackson, R.J.; Hellen, C.U.T.; Pestova, T.V. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2012**, *86*, 45–93.
17. Pisarev, A.V.; Skabkin, M.A.; Pisareva, V.P.; Skabkina, O.V.; Rakotondrafara, A.M.; Hentze, M.W.; Hellen, C.U.T.; Pestova, T.V. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* **2010**, *37*, 196–210.
18. De Breyne, S.; Soto-Rifo, R.; López-Lastra, M.; Ohlmann, T. Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs. *Virus Res.* **2013**, *171*, 366–381.
19. Soto-Rifo, R.; Rubilar, P.S.; Limousin, T.; de Breyne, S.; Décimo, D.; Ohlmann, T. DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3745–3756.
20. Soto-Rifo, R.; Rubilar, P.S.; Ohlmann, T. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6286–6299.
21. Groom, H.C.T.; Anderson, E.C.; Dangerfield, J.A.; Lever, A.M.L. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1141–1147.
22. Greatorex, J.; Gallego, J.; Varani, G.; Lever, A. Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 543–557.
23. Lai, M.C.; Wang, S.W.; Cheng, L.; Tarn, W.Y.; Tsai, S.J.; Sun, H.S. Human DDX3 Interacts with the HIV-1 Tat Protein to Facilitate Viral mRNA Translation. *PLoS One* **2013**, *8*, e68665.
24. Fujii, R.; Okamoto, M.; Aratani, S.; Oishi, T.; Ohshima, T.; Taira, K.; Baba, M.; Fukamizu, A.; Nakajima, T. A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5445–5451.
25. Dorin, D.; Bonnet, M.C.; Bannwarth, S.; Gatignol, A.; Meurs, E.F.; Vaquero, C. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs *in vitro* and *in vivo* independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4440–4448.
26. Dugré-Brisson, S.; Elvira, G.; Boulay, K.; Chatel-Chaix, L.; Mouland, A.J.; DesGroseillers, L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4797–4812.

27. Svitkin, Y.V.; Pause, A.; Sonenberg, N. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J. Virol.* **1994**, *68*, 7001–7007.
28. Schwartz, S.; Felber, B.K.; Pavlakis, G.N. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 207–219.
29. Schwartz, S.; Felber, B.K.; Fenyő, E.M.; Pavlakis, G.N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5448–5456.
30. Anderson, J.L.; Johnson, A.T.; Howard, J.L.; Purcell, D.F.J. Both linear and discontinuous ribosome scanning are used for translation initiation from bicistronic human immunodeficiency virus type 1 env mRNAs. *J. Virol.* **2007**, *81*, 4664–4676.
31. Krummheuer, J.; Johnson, A.T.; Hauber, I.; Kammler, S.; Anderson, J.L.; Hauber, J.; Purcell, D.F.J.; Schaal, H. A minimal uORF within the HIV-1 vpu leader allows efficient translation initiation at the downstream env AUG. *Virology* **2007**, *363*, 261–271.
32. Brasey, A.; Lopez-Lastra, M.; Ohlmann, T.; Beerens, N.; Berkhout, B.; Darlix, J.L.; Sonenberg, N. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J. Virol.* **2003**, *77*, 3939–3949.
33. Berkhout, B.; Arts, K.; Abbink, T.E.M. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5232–5244.
34. Monette, A.; Valiente-Echeverría, F.; Rivero, M.; Cohen, E.A.; Lopez-Lastra, M.; Mouland, A.J. Dual Mechanisms of Translation Initiation of the Full-Length HIV-1 mRNA Contribute to Gag Synthesis. *PLoS One* **2013**, *8*, e68108.
35. Ricci, E.P.; Soto Rifo, R.; Herbreteau, C.H.; Decimo, D.; Ohlmann, T. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 690–693.
36. Miele, G.; Mouland, A.; Harrison, G.P.; Cohen, E.; Lever, A.M. The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J. Virol.* **1996**, *70*, 944–951.
37. Buck, C.B.; Shen, X.; Egan, M.A.; Pierson, T.C.; Walker, C.M.; Siliciano, R.F. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J. Virol.* **2001**, *75*, 181–191.
38. Gendron, K.; Ferbeyre, G.; Heveker, N.; Brakier-Gingras, L. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 902–912.
39. Vallejos, M.; Carvajal, F.; Pino, K.; Navarrete, C.; Ferres, M.; Huidobro-Toro, J.P.; Sargueil, B.; López-Lastra, M. Functional and Structural Analysis of the Internal Ribosome Entry Site Present in the mRNA of Natural Variants of the HIV-1. *PLoS One* **2012**, *7*, e35031.
40. Amorim, R.; Costa, S.M.; Cavaleiro, N.P.; da Silva, E.E.; da Costa, L.J. HIV-1 transcripts use IRES-initiation under conditions where Cap-dependent translation is restricted by poliovirus 2A protease. *PLoS One* **2014**, *9*, e88619.
41. Vallejos, M.; Deforges, J.; Plank, T.D.M.; Letelier, A.; Ramdohr, P.; Abraham, C.G.; Valiente-Echeverría, F.; Kieft, J.S.; Sargueil, B.; López-Lastra, M. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 6186–6200.

42. Plank, T.D.M.; Whitehurst, J.T.; Kieft, J.S. Cell type specificity and structural determinants of IRES activity from the 5' leaders of different HIV-1 transcripts. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6698–6714.
43. Liu, J.; Henao-Mejia, J.; Liu, H.; Zhao, Y.; He, J.J. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2011**, *6*, 308–321.
44. Monette, A.; Ajamian, L.; López-Lastra, M.; Mouland, A.J. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: Implications for HIV-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31350–31362.
45. Rivas-Aravena, A.; Ramdohr, P.; Vallejos, M.; Valiente-Echeverría, F.; Dormoy-Raclet, V.; Rodríguez, F.; Pino, K.; Holzmann, C.; Huidobro-Toro, J.P.; Gallouzi, I.E.; *et al.* The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology* **2009**, *392*, 178–185.
46. Valiente-Echeverría, F.; Vallejos, M.; Monette, A.; Pino, K.; Letelier, A.; Huidobro-Toro, J.P.; Mouland, A.J.; López-Lastra, M. A cis-acting element present within the Gag open reading frame negatively impacts on the activity of the HIV-1 IRES. *PLoS One* **2013**, *8*, e56962.
47. Li, L.; Yoder, K.; Hansen, M.S.; Olvera, J.; Miller, M.D.; Bushman, F.D. Retroviral cDNA integration: Stimulation by HMG I family proteins. *J. Virol.* **2000**, *74*, 10965–10974.
48. Holloway, A.F.; Occhiodoro, F.; Mittler, G.; Meisterernst, M.; Shannon, M.F. Functional interaction between the HIV transactivator Tat and the transcriptional coactivator PC4 in T cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21668–21677.
49. Weill, L.; James, L.; Ulryck, N.; Chamond, N.; Herbreteau, C.H.; Ohlmann, T.; Sargueil, B. A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1367–1381.
50. Brierley, I.; Dos Ramos, F.J. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res.* **2006**, *119*, 29–42.
51. Giedroc, D.P.; Cornish, P.V. Frameshifting RNA pseudoknots: Structure and mechanism. *Virus Res.* **2009**, *139*, 193–208.
52. Staple, D.W.; Butcher, S.E. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 1011–1023.
53. Huang, X.; Yang, Y.; Wang, G.; Cheng, Q.; Du, Z. Highly conserved RNA pseudoknots at the Gag-Pol junction of HIV-1 suggest a novel mechanism of –1 ribosomal frameshifting. *RNA N. Y. N* **2014**, *20*, 587–593.
54. Wang, G.; Yang, Y.; Huang, X.; Du, Z. Possible involvement of coaxially stacked double pseudoknots in the regulation of –1 programmed ribosomal frameshifting in RNA viruses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2014**, 1–11.
55. Low, J.T.; Garcia-Miranda, P.; Mouzakis, K.D.; Gorelick, R.J.; Butcher, S.E.; Weeks, K.M. Structure and Dynamics of the HIV-1 Frameshift Element RNA. *Biochemistry (Mosc.)* **2014**, *53*, 4282–4291.
56. Mouzakis, K.D.; Lang, A.L.; Meulen, K.A.V.; Easterday, P.D.; Butcher, S.E. HIV-1 frameshift efficiency is primarily determined by the stability of base pairs positioned at the mRNA entrance channel of the ribosome. *Nucleic Acids Res.* **2012**, doi:10.1093/nar/gks1254.

57. Léger, M.; Dulude, D.; Steinberg, S.V.; Brakier-Gingras, L. The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5581–5592.
58. Namy, O.; Moran, S.J.; Stuart, D.I.; Gilbert, R.J.C.; Brierley, I. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* **2006**, *441*, 244–247.
59. Liao, P.Y.; Choi, Y.S.; Dinman, J.D.; Lee, K.H. The many paths to frameshifting: Kinetic modelling and analysis of the effects of different elongation steps on programmed -1 ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 300–312.
60. Gendron, K.; Charbonneau, J.; Dulude, D.; Heveker, N.; Ferbeyre, G.; Brakier-Gingras, L. The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 30–40.
61. Charbonneau, J.; Gendron, K.; Ferbeyre, G.; Brakier-Gingras, L. The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *RNA N. Y. N* **2012**, *18*, 519–529.
62. Lorgeoux, R.P.; Pan, Q.; Le Duff, Y.; Liang, C. DDX17 promotes the production of infectious HIV-1 particles through modulating viral RNA packaging and translation frameshift. *Virology* **2013**, *443*, 384–392.
63. Kronja, I.; Orr-Weaver, T.L. Translational regulation of the cell cycle: When, where, how and why? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2011**, *366*, 3638–3652.
64. Richter, J.D.; Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **2005**, *433*, 477–480.
65. Planelles, V.; Barker, E. Roles of Vpr and Vpx in modulating the virus-host cell relationship. *Mol. Asp. Med.* **2010**, *31*, 398–406.
66. Sharma, A.; Yilmaz, A.; Marsh, K.; Cochrane, A.; Boris-Lawrie, K. Thriving under stress: Selective translation of HIV-1 structural protein mRNA during Vpr-mediated impairment of eIF4E translation activity. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002612.
67. Ventoso, I.; Blanco, R.; Perales, C.; Carrasco, L. HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12966–12971.
68. Alvarez, E.; Castelló, A.; Menéndez-Arias, L.; Carrasco, L. HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem. J.* **2006**, *396*, 219–226.
69. Castelló, A.; Franco, D.; Moral-López, P.; Berlanga, J.J.; Alvarez, E.; Wimmer, E.; Carrasco, L. HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* **2009**, *4*, e7997.
70. Ohlmann, T.; Prévôt, D.; Décimo, D.; Roux, F.; Garin, J.; Morley, S.J.; Darlix, J.L. In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 9–20.
71. Jäger, S.; Cimermancic, P.; Gulbahce, N.; Johnson, J.R.; McGovern, K.E.; Clarke, S.C.; Shales, M.; Mercenne, G.; Pache, L.; Li, K.; *et al.* Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* **2012**, *481*, 365–370.
72. Clerzius, G.; Gélinas, J.F.; Gatignol, A. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev. Med. Virol.* **2011**, *21*, 42–53.

73. Sadler, A.J.; Williams, B.R.G. Structure and function of the protein kinase R. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2007**, *316*, 253–292.
74. Mcmillan, N.A.J.; Chun, R.F.; Siderovski, D.P.; Galabru, J.; Toone, W.M.; Samuel, C.E.; Mak, T.W.; Hovanessian, A.G.; Jeang, K.T.; Williams, B.R.G. HIV-1 Tat Directly Interacts with the Interferon-Induced, Double-Stranded RNA-Dependent Kinase, PKR. *Virology* **1995**, *213*, 413–424.
75. Lemaire, P.A.; Anderson, E.; Lary, J.; Cole, J.L. Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 351–360.
76. Clerzius, G.; Shaw, E.; Daher, A.; Burugu, S.; Gélinas, J.F.; Ear, T.; Sinck, L.; Routy, J.P.; Moulard, A.J.; Patel, R.C.; Gatignol, A. The PKR activator, PACT, becomes a PKR inhibitor during HIV-1 replication. *Retrovirology* **2013**, *10*, 96.
77. Cimarelli, A.; Luban, J. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* **1999**, *73*, 5388–5401.
78. Khan, R.; Giedroc, D.P. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6689–6695.
79. Merrick, W.C. Eukaryotic Protein Synthesis: Still a Mystery. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21197–21201.
80. Ott, D.E.; Coren, L.V.; Johnson, D.G.; Kane, B.P.; Sowder, R.C., 2nd; Kim, Y.D.; Fisher, R.J.; Zhou, X.Z.; Lu, K.P.; Henderson, L.E. Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **2000**, *266*, 42–51.
81. Li, D.; Wei, T.; Abbott, C.M.; Harrich, D. The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2013**, *77*, 253–266.
82. Abbas, W.; Khan, K.A.; Tripathy, M.K.; Dichamp, I.; Keita, M.; Rohr, O.; Herbein, G. Inhibition of ER stress-mediated apoptosis in macrophages by nuclear-cytoplasmic relocalization of eEF1A by the HIV-1 Nef protein. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e292.
83. Warren, K.; Wei, T.; Li, D.; Qin, F.; Warrilow, D.; Lin, M.H.; Sivakumaran, H.; Apolloni, A.; Abbott, C.M.; Jones, A.; Anderson, J.L.; Harrich, D. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9587–9592.
84. 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.
85. Henriët, 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*, 211–232.
86. Mercenne, G.; Bernacchi, S.; Richer, D.; Bec, G.; Henriët, S.; Paillart, J.C.; Marquet, R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 633–646.
87. 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.
88. 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.

89. 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.
90. 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.
91. Sleiman, D.; Bernacchi, S.; Xavier Guerrero, S.; 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.
92. Ingolia, N.T. Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 205–213.
93. König, J.; Zarnack, K.; Rot, G.; Curk, T.; Kayikci, M.; Zupan, B.; Turner, D.J.; Luscombe, N.M.; Ule, J. iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 909–915.

© 2015 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 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- Traduction des facteurs APOBEC3F/G

En 2003, deux études ont suggéré que Vif peut inhiber la traduction d'A3G (Mariani et al 2003 ; Kao et al 2003 ; Stopak et al 2003). En effet, à travers des expériences de transcription et de traduction *in vitro*, les auteurs ont montré une nette diminution de l'expression d'A3G en présence de Vif ainsi qu'en présence d'un inhibiteur du protéasome appelé époxomycine (figure 24). De plus, cette inhibition ne semble pas dépendre ni de la stabilité d'A3G, ni de celle de son ARNm. Cependant, ces auteurs ont utilisé un vecteur d'expression d'A3G ne contenant pas les régions non traduites de l'ARNm d'A3G. Etant donné l'importance des UTR dans la régulation de la traduction des ARNm, notre laboratoire s'est intéressé à leur rôle dans l'inhibition de la traduction d'A3G par Vif.

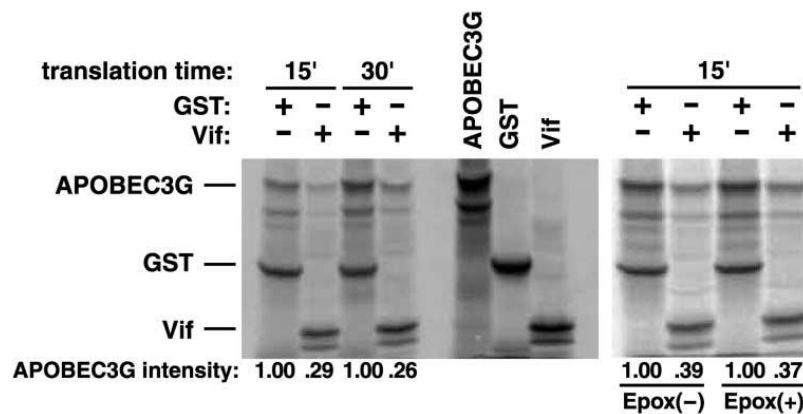


Figure 24 : Transcription/traduction d'A3G *in vitro* en présence/absence de Vif (Stopak et al 2003)

La protéine Vif et la contrôle GST ont été ajoutés au mix transcription/traduction d'A3G en présence ou en absence de 5 μ M d'époxomycine. Les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis analysées par autoradiographie. L'intensité relative des bandes a été quantifiée et les échantillons en absence de Vif ont été normalisés à 1.

L'équipe a tout d'abord montré que Vif est capable de se lier directement à l'ARNm d'A3G et inhibe sa traduction *in vitro* en réticulocytes de lapin de façon UTR-dépendante (Mercenne et al 2010 ; figure 25). De plus, des approches biochimiques et biophysiques ont permis de mettre en évidence des interactions spécifiques de Vif avec les régions 5' et 3' UTR de l'ARNm d'A3G. Des expériences de cartographie chimique et enzymatique réalisées sur les UTR de l'ARNm ont montré une structuration en trois domaines tige-boucle séparés par des séquences simple brin (figure 26) (Mercenne et al 2010), et de nombreux sites de fixation de Vif ont été observés aussi bien sur la 5' que sur la 3'UTR (figure 26). A noter que

Vif est également capable de se fixer à la région 5'UTR de l'ARN génomique du VIH-1 (Bernacchi et al 2007).

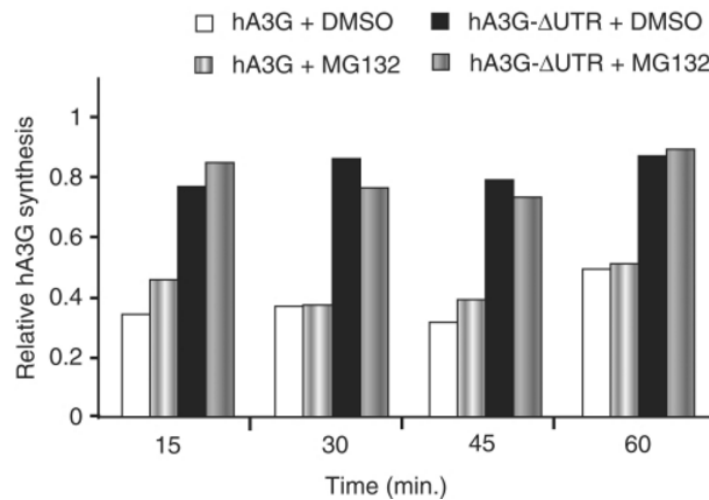


Figure 25 : Expériences de traduction *in vitro* d'A3G WT et ΔUTR en présence de Vif (Mercenne et al 2010)

Les protéines A3G provenant des constructions A3G sauvage et ΔUTR ont été synthétisées en présence de Vif ainsi qu'en présence ou en absence d'un inhibiteur du protéasome (MG132). Les expériences de traduction ont été analysées à différents temps d'incubation (15, 30, 45 et 60 min).

Récemment, notre équipe a mis en évidence la présence d'une séquence uORF (upstream Open Reading Frame) dans la 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F (Guerrero S, Thèse Université de Strasbourg, 2013). Cette séquence fortement conservée est localisée entre les tiges boucles 2 et 3 et code pour un peptide putatif de 23 acides aminés (figure 27).

Il est intéressant de noter que la présence d'une ou plusieurs uORF situés dans les 5'UTR des ARNm peut réguler la traduction (Morris et Geballe 2000). En effet, environ 50% des gènes de mammifères expriment des ARNm contenant une ou plusieurs uORF en amont de l'ORF principal (Calvo et al 2009). Les uORF peuvent avoir une taille minimale de 9 nucléotides avec une moyenne d'environ 48 nucléotides chez l'homme. De nombreux exemples montrent que ces courtes séquences sont des éléments de régulation de la traduction et peuvent impacter l'expression des gènes de plusieurs façons, menant dans tous les cas à la réduction de l'expression de la protéine codée en aval. Il est estimé que les uORF réduisent l'expression protéique de 30 à 80% sans impacter le taux d'ARNm global.

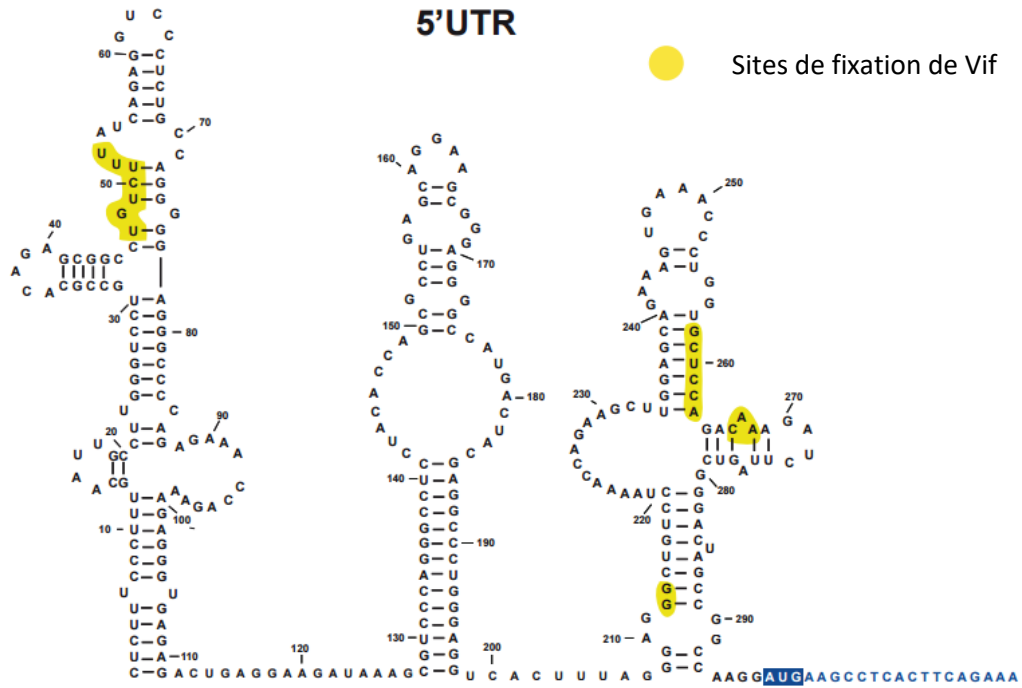
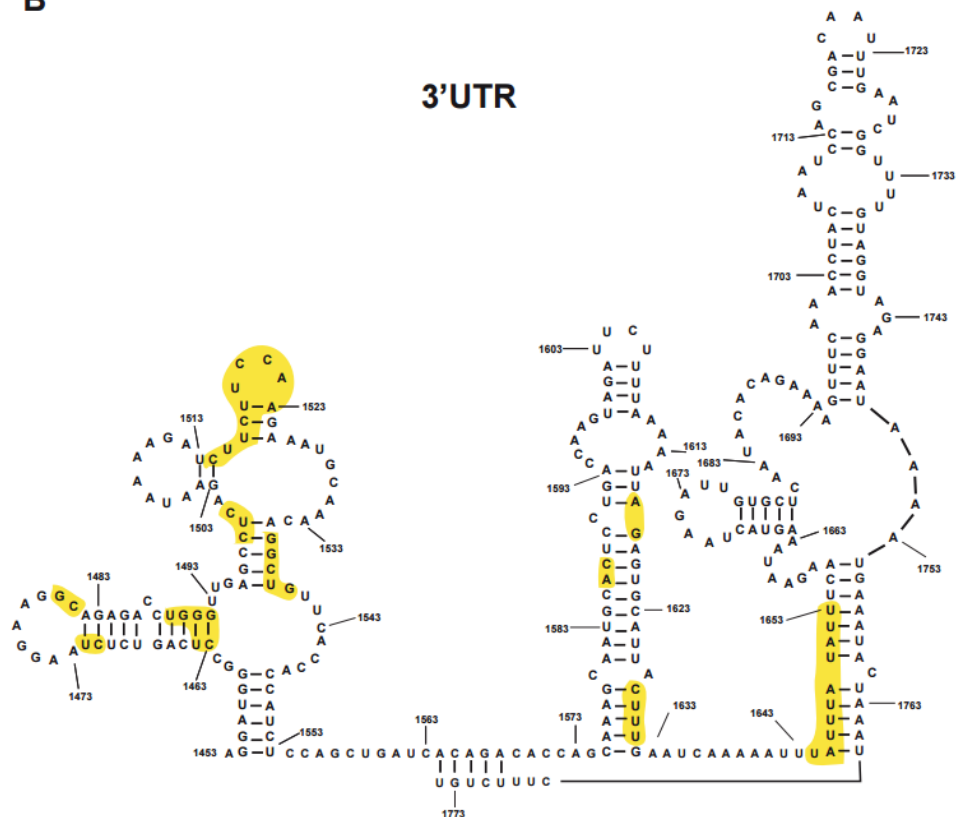
A**B**

Figure 26 : Modèle de structure secondaire des régions 5' et 3'UTR de l'ARNm d'A3G (Mercenne et al 2010)

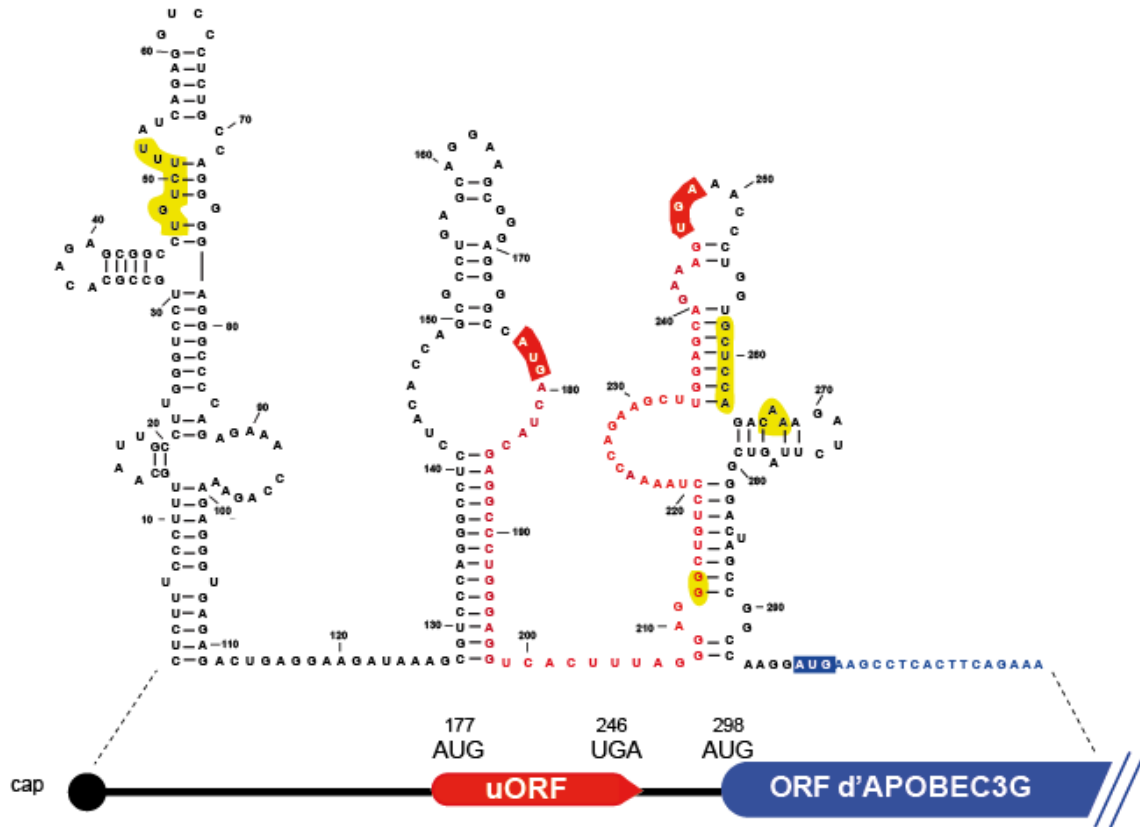


Figure 27 : Localisation de l'uORF dans la 5'UTR de l'ARNm d'A3G

La traduction des ARNm contenant une ou plusieurs uORF peut se dérouler *via* différents mécanismes (Barbosa et al 2013) (figure 28). En effet, A) le ribosome peut ne pas reconnaître le codon d'initiation de l'uORF et traduire à partir du codon d'initiation de l'ORF principal (leaky-scanning), B) les deux sous-unités ribosomiques peuvent se dissocier après traduction de l'uORF, C) le peptide codé par l'uORF peut bloquer le ribosome pour empêcher la traduction de l'ORF (stalling), D) le codon de terminaison de l'uORF peut être reconnu comme codon stop prémature par le système NMD (Nonsense Mediated Decay), E) l'ORF principal peut être traduit après un mécanisme de ré-initiation.

De nombreux exemples de traduction de gènes possédant un ou plusieurs uORF ont été rapportés. En effet, plusieurs gènes contenant un ou plusieurs uORF ont une traduction réduite dans des conditions optimales mais leur expression augmente lors d'un stress. Par exemple, le gène *GCN4* (General Control protein) qui contient 4 uORF dans sa 5'UTR a un taux de traduction beaucoup plus important lors d'un stress induit par le manque d'acides aminés (Hinnebusch 2005). La traduction du gène *BACE1* (beta-site beta-amyloid precursor

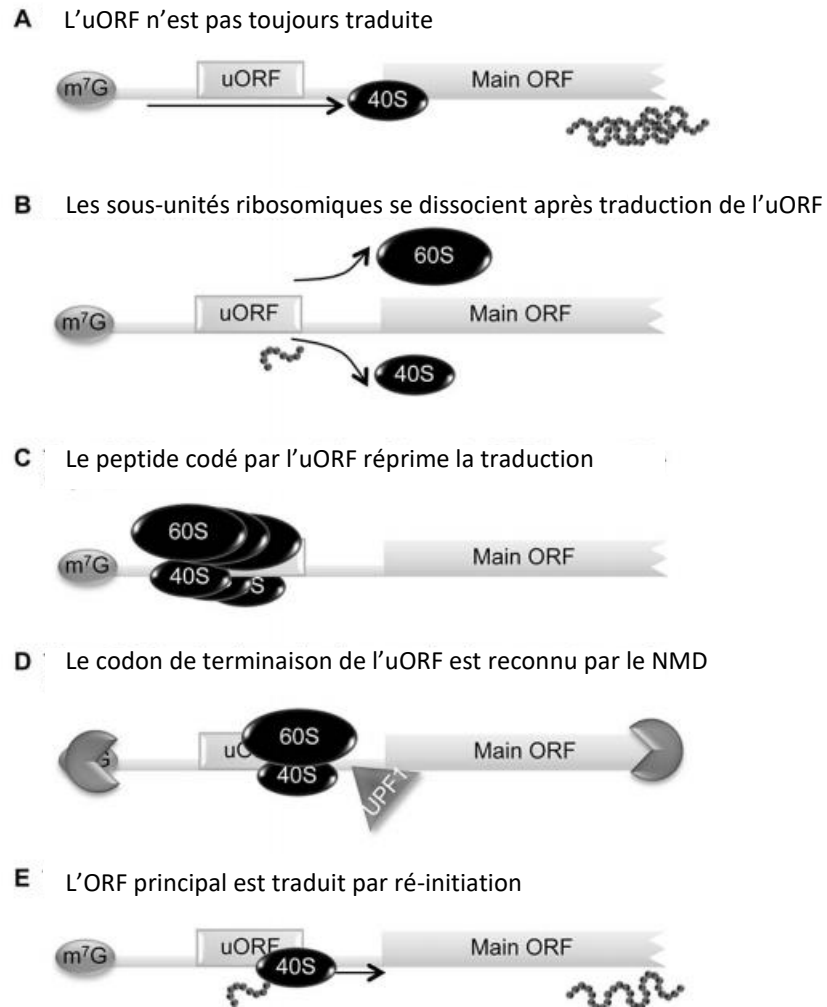


Figure 28 : La traduction des ARN contenant une séquence uORF peut se dérouler *via* des mécanismes différents (Adapté de Barbosa et al 2013)

protein (APP)-cleaving enzyme 1) dépend de la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α (O'Connor et al 2008). En effet, ce gène contenant trois uORF dans sa 5'UTR est activé lors de la phosphorylation du facteur eIF2 α causée par un manque d'énergie. Enfin, le gène AMD1 (Adenosyl Methionine Decarboxylase) impliqué dans la biosynthèse des polyamines est également régulé par son uORF (Wethmar 2014). Dans ce cas, le peptide de 6 acides aminés codé par l'uORF provoque le blocage du ribosome sur la 5'UTR. Lors d'une grande quantité de polyamines, ces protéines favorisent l'interaction entre le ribosome et le peptide codé par l'uORF empêchant la terminaison de la traduction de l'uORF et donc induisant la voie du NMD.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la traduction de l'ORF en aval de l'uORF. Ainsi, l'impact des uORF sur la traduction peut dépendre : 1) de la distance entre la coiffe et le codon d'initiation de l'uORF, 2) du contexte Kozak du codon d'initiation de l'uORF (un contexte Kozak fort favorise la ré-initiation tandis qu'un contexte faible induit plus facilement un leaky-scanning), 3) la taille de l'uORF, 4) la structure secondaire de cette région, 5) la conservation de l'uORF, 6) le nombre d'uORF dans la région 5'UTR, 7) la position du codon stop de l'uORF et 8) la distance entre les deux ORF (figure 29).

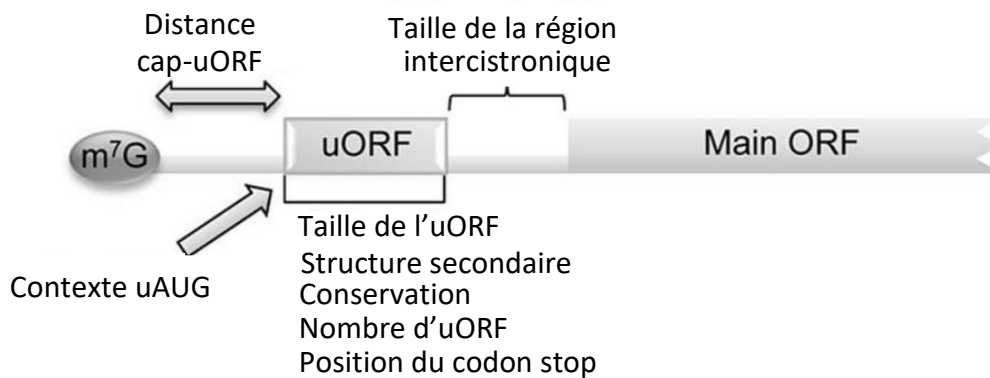


Figure 29 : Facteurs pouvant influencer l'efficacité de la traduction dépendante d'une uORF (Adapté de Barbosa et al 2013)

La ré-initiation est un mécanisme pouvant être défini par la capacité de la sous-unité 40S à reformer un complexe ribosomique capable de ré-initier la traduction au codon d'initiation de l'ORF principal après avoir traduit l'uORF. Dans ce cas, l'étape de terminaison de la traduction de l'uORF s'effectue avec les facteurs de relargage eRF1 et eRF3 (Jackson et al 2012) et le complexe de terminaison n'est pas complètement dissocié. La sous-unité 40S reste accrochée à l'ARNm et continue son balayage même en absence du complexe ternaire et d'autres facteurs d'initiation. Il a été établi que l'efficacité de la ré-initiation est dépendante du temps que met le ribosome pour traduire l'uORF (Somers et al 2013). En effet, le taux de ré-initiation diminue lorsque la traduction de l'uORF est ralentie à cause d'une forte structure secondaire forçant le ribosome à effectuer des pauses (Kozak 2001).

Etant donné la présence d'une séquence uORF dans la région 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F, il semble intéressant de connaître son impact sur la traduction de ces facteurs de restriction mais également de savoir si cette séquence est impliquée dans la régulation traductionnelle des ARNm d'A3G et d'A3F par Vif.

OBJECTIFS

La protéine Vif permet la réplication du VIH-1 dans les cellules cibles en inhibant l'action des facteurs de restriction APOBEC3 (A3). Etant donné que les protéines A3G et A3F ont la plus forte activité contre ce virus, je me suis donc intéressée à la relation entre Vif et ces deux facteurs. Vif inhibe l'action d'A3G et d'A3F par trois mécanismes différents : 1) Vif induit leur dégradation par le protéasome *via* le recrutement d'un complexe E3 ubiquitine ligase (Yu et al 2003), 2) Vif détourne le facteur de transcription CBF β afin d'inhiber leur transcription (Anderson et al 2015) et 3) Vif est capable d'inhiber leur traduction (Kao et al 2003). Etant donné que le mécanisme précis d'inhibition traductionnelle n'est pas encore élucidé, à part le fait que Vif soit capable d'inhiber la traduction de l'ARNm d'A3G de façon 5'UTR-dépendante *in vitro* (Mercenne et al 2010), je me suis intéressée à cette dernière voie de régulation des facteurs de restriction par Vif. En effet, étant donné l'importance de ce nouveau mécanisme dans les résultats préliminaires, il semble nécessaire d'étudier plus en détail cette inhibition traductionnelle d'A3G et d'A3F.

Après la découverte d'un petit cadre de lecture ouvert (uORF) dans la 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F, j'ai étudié la manière dont ces protéines sont traduites ainsi que leur répression traductionnelle par Vif. L'objectif principal de ce travail de thèse est donc d'étudier le mécanisme par lequel Vif inhibe la traduction d'A3G et d'A3F. La séquence uORF régule-t-elle la traduction des ARNm d'A3G et d'A3F ? Est-elle importante pour le mécanisme d'inhibition traductionnelle ? Quels sont les éléments essentiels à ce mécanisme ?

En parallèle de cet objectif, je me suis également intéressée aux domaines de Vif impliqués dans ce mécanisme d'inhibition traductionnelle ainsi qu'à l'implication de l'interaction Vif-A3G sur ce mécanisme.

RESULTATS

I. IMPORTANCE DE LA 5'UTR DANS L'INHIBITION DE LA TRADUCTION DU FACTEUR DE RESTRICTION APOBEC3G

Article 1: Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity.

Guerrero Santiago, Libre Camille, Batisse Julien, Mercenne Gaëlle, Richer Delphine, Laumond Géraldine, Decoville Thomas, Moog Christiane, Marquet Roland & Paillart Jean-Christophe

Article soumis à *Scientific Report* (août 2016)

La protéine Vif du VIH-1 est une petite protéine basique essentielle pour la pathogénicité virale. Vif permet l'infection de cellules non-permissives (telles que les cellules cibles naturelles du VIH-1) en contrecarrant les désaminases de cytidines cellulaires APOBEC3G (A3G) et A3F par différents mécanismes ce qui réduit leur encapsidation dans les particules virales. La dégradation d'A3G induite par Vif *via* la voie du protéasome a été très étudiée, mais peu de choses sont connues sur la répression traductionnelle de l'ARNm d'A3G. Ici, nous montrons que deux tiges-boucles contenues dans la 5'UTR de l'ARNm d'A3G sont nécessaires pour cette inhibition traductionnelle et que la plupart des sous-types de Vif inhibent efficacement la traduction d'A3G. De façon intéressante, la mutation K26R de Vif inhibe la dégradation d'A3G par le protéasome mais n'a aucun effet sur l'inhibition traductionnelle, ce qui indique que ces mécanismes sont indépendants. Ces deux mécanismes comptent pour environ 50% de réduction d'A3G dans la cellule par Vif et réduisent son incorporation dans les virions. De manière intéressante, l'inhibition traductionnelle d'A3G est suffisante pour restaurer en partie l'infectivité virale en absence de la dégradation dépendante du protéasome. Ces résultats montrent que le VIH-1 a développé différents mécanismes pour inhiber spécifiquement l'activité antivirale d'A3G.

Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity

Guerrero Santiago^{1†}, Libre Camille¹, Batisse Julien^{1#}, Mercenne Gaëlle^{1‡}, Richer Delphine¹, Laumond Géraldine², Decoville Thomas², Moog Christiane², Marquet Roland¹ & Paillart Jean-Christophe^{1*}

¹ Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg cedex, France

² INSERM-UMR 1109, Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Corresponding author : Dr. Jean-Christophe Paillart

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

Phone: + 33 3 88 41 70 35 ; Fax: + 33 3 88 60 22 18

Present addresses: [†] Center for Genomic Regulation (CRG), C/ Dr. Aiguader, 88, PRBB Building, 08003 Barcelona, Spain. [‡] Recursion Pharmaceutical, LLC, 283 S. Colorow Drive, Salt Lake City, UT 84108-5650, USA. [#] IGBMC, Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

ABSTRACT

The essential HIV-1 viral infectivity factor (Vif) allows productive infection of non-permissive cells expressing cytidine deaminases APOBEC3G (A3G) and A3F by decreasing their cellular level, and preventing their incorporation into virions. Unlike the Vif-induced degradation of A3G, the functional role of the inhibition of A3G translation by Vif remained unclear. Here, we show that two stem-loop structures within the 5'-untranslated region of A3G mRNA are crucial for translation inhibition by Vif in cells, and most Vif alleles neutralize A3G translation efficiently. Interestingly, K26R mutation in Vif abolishes degradation of A3G by the proteasome but has no effect at the translational level, indicating these two pathways are independent. These two mechanisms, proteasomal degradation and translational inhibition, similarly contribute to decrease the cellular level of A3G by Vif and to prevent its incorporation into virions. Importantly, inhibition of A3G translation is sufficient to partially restore viral infectivity in the absence of proteosomal degradation. These findings demonstrate that HIV-1 has evolved redundant mechanisms to specifically inhibit the potent antiviral activity of A3G.

INTRODUCTION

The viral infectivity factor (Vif) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and related lentiviruses neutralizes members of the APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3) family of restriction factors, allowing productive viral replication in non-permissive cells expressing these factors¹⁻⁴. Among these cytidine deaminases, APOBEC3G (here referred to as A3G), A3F, A3D and A3H efficiently block HIV-1 replication after entry⁵⁻¹⁰. In the absence of HIV-1 Vif, A3G is efficiently incorporated into progeny virions through interactions with the nucleocapsid domain of Pr55^{Gag} and/or RNAs¹¹⁻¹⁵. Once a new infection is initiated, the incorporated A3G molecules deaminate deoxycytidine to deoxyuridine in minus strand viral DNA during reverse transcription, resulting in hypermutation of the viral genome. As a result, the HIV-1 proviral DNA is no longer functional or/and rapidly degraded^{6,16-18}. Additionally, deaminase-independent activity of A3G/3F has been shown to inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products and provirus integration^{7,19-22}. Both cytidine deamination and inhibition of reverse transcription contribute to the antiviral activity of endogenous A3G/A3F proteins in CD4+ T cells²³.

Vif reduces the intracellular A3G levels and its incorporation into viral particles by several mechanisms^{2,4,24}. First, it has now been well documented that Vif recruits an E3 ubiquitin ligase complex that polyubiquitinates A3G/A3F proteins and targets them for proteasomal degradation (²⁵ reviewed in^{3,4,26}). Vif is composed of several highly conserved motifs that form discontinuous surfaces, so that Vif can accommodate all A3 proteins and the E3 ligase^{27,28}. Moreover, the cellular transcription factor CBF- β was identified as a cofactor associated with the ubiquitin-like Cul5/Rbx2/EloBC (CRL5) complex and extensive interactions are involved in maintaining the binding of Vif and CBF- β ²⁹⁻³¹. CBF- β has been shown to stabilize Vif, thus allowing efficient degradation of A3G and increasing viral infectivity³²⁻³⁵. Second, it has been proposed that Vif could reduce the intracellular level of A3G by affecting its translation^{36,37}. However, these studies were performed using expression vectors lacking the authentic 5'

and 3' untranslated regions (UTRs) of A3G mRNA, which could play key role(s) in A3G translation^{38,39}, and they thus may not faithfully recapitulate events occurring with endogenous A3G mRNA. Indeed, an *in vitro* translation study highlighted the importance of the 5'-UTRs of A3G mRNA in the inhibition of A3G translation by Vif^{40,41}. However, the relative importance of the translational inhibition of A3G by Vif, compared to the well-documented A3G degradation, and its impact on viral infectivity remained to be established. Here, we used several A3G mRNA expression plasmids mutated in their UTRs, with and without inhibitors of A3G degradation by the proteasome. Our data show that two stem-loop structures in the 5'-UTR of A3G mRNA are required for translational inhibition by Vif. The property of Vif to inhibit the translation of A3G is common to a large variety of Vif alleles and was also demonstrated in HIV-1 chronically infected H9 cells. In addition, we identified a mutation in Vif, K26R, which abolishes degradation of A3G by the proteasome but has no effect on the translational repression of A3G, demonstrating that these two pathways are independent. These two mechanisms contribute to the decrease of the intracellular level of A3G by Vif and to the subsequent A3G incorporation into virions. Importantly, the inhibition of A3G translation by Vif is sufficient to partially restore viral infectivity in A3G expressing cells in the absence of proteasomal degradation. These findings demonstrate that HIV-1 has evolved several redundant mechanisms to specifically inhibit the potent antiviral activity of A3G proteins.

RESULTS

Vif impairs translation of A3G mRNA

Using an *in vitro*-coupled transcription/translation assay, we previously pointed out a two-fold inhibition of A3G translation by Vif in a 5'-UTR dependent manner⁴⁰. Our first goal was thus to test whether a similar inhibition could be observed in human cell lines. First, we examined

the level of A3G expressed in transfected HEK 293T cells from authentic A3G mRNA or from mutant mRNAs deleted of their 5', 3' or 5' plus 3' UTRs (Figure 1 and Figure 2), in presence or in absence of Vif expression. To discriminate the effects of Vif on A3G translation from its well documented effect on A3G degradation, we performed all experiments in presence or absence of a dominant negative mutant of Cul5 (Cul5 Δ Rbx), which has previously been shown to specifically inhibit A3G degradation through the proteasome pathway²⁵, or by using ALLN, a potent chemical proteasome inhibitor also used to study A3G proteasomal degradation^{36,37}. Moreover, to avoid saturating our system by overexpressed concentrations of A3G, we always transfected a pCMV-A3G/pcDNA-Vif (or pNL4.3) ratio of 1/20 (50 ng pCMV-A3G)⁴⁹.

Immunoblotting of normalized cell lysates with an A3G-specific antibody revealed that the expression of A3G from wild-type mRNA was reduced by 60% in the presence of Vif (Figure 2A, left upper panel and Figure 2B, control histogram for quantitation). When we analyzed the UTR-truncated versions of A3G mRNA, we observed a similar decrease when the 3'UTR of A3G mRNA was deleted (50-60% decrease) (Figure 2A, right lower panels and Figure 2B, control histogram). Remarkably, this decrease was twofold less pronounced (around 30%) when the 5'- or both UTRs were deleted (Figure 2A and 2B, control histogram). Interestingly, when A3G degradation by the proteasome was blocked by using either a dominant negative mutant of Cul5 (Cul5 Δ Rbx) (Figure 2A and Figure 2B, central histogram) or a chemical inhibitor (ALLN) (Figure 2B, right histogram), we still observed a significant decrease of A3G (30-40%) expressed from wild-type or Δ 3'UTR mRNAs, while no decrease of A3G expressed from Δ 5'UTR and Δ UTRs mRNAs was observed in the presence of Vif. Consistent with previous studies^{36,37,50}. Vif did not affect A3G mRNA levels, which remained constant in all conditions and for all A3G mRNA constructs (Figure 2C), indicating that variations of the A3G protein level were not due to differential transcription of the vectors or to mRNA degradation. Secondly, in order to test the translational effect of Vif in a more physiological context, we

Figure 1: Guerrero et al

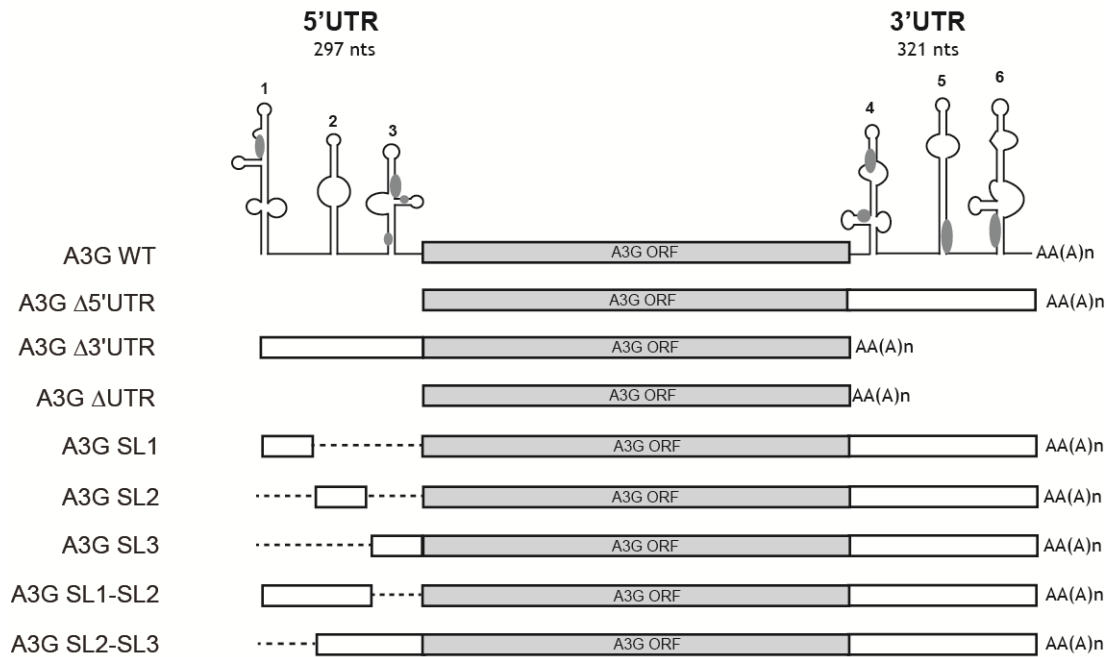


Figure 1. Schematic representation of A3G constructs used in this study. Wild-type authentic A3G mRNA and mutants deleted from their 5', 3' or 5' and 3'-UTRs are represented. Secondary structures of the 5'- and 3'UTRs of wild-type A3G mRNA are also indicated with high affinity binding sites for Vif depicted in grey. Dotted lines represent the deletions.

directly analyzed the level of A3G expressed in HIV-1 chronically infected H9 cells⁴⁷ in presence or in absence of ALLN proteasome inhibitor (Figure 3). These cells expressed normal amounts of viral proteins (Vif and capsid p24) and a higher amount of total ubiquitinated proteins could be observed when the proteasome was inhibited (Figure 3A). As expected from a Vif-induced degradation of A3G, HXB2 infected H9 cells (Vif+) expressed a lower level of A3G protein (Figure 3A), with a decrease of about 70% (Figure 3B, left histogram). Importantly, inhibition of the proteasome with ALLN did not completely restore the expression of A3G, as a 49% inhibition was still observed (Figure 3A and B), suggesting that Vif inhibits translation of A3G. We did not observe any effect on the degradation of A3G protein, or on the translation of its mRNA, in absence of Vif in this context (NL4.3Δvif chronically infected cells) (Figure 3).

Figure 2: Guerrero et al

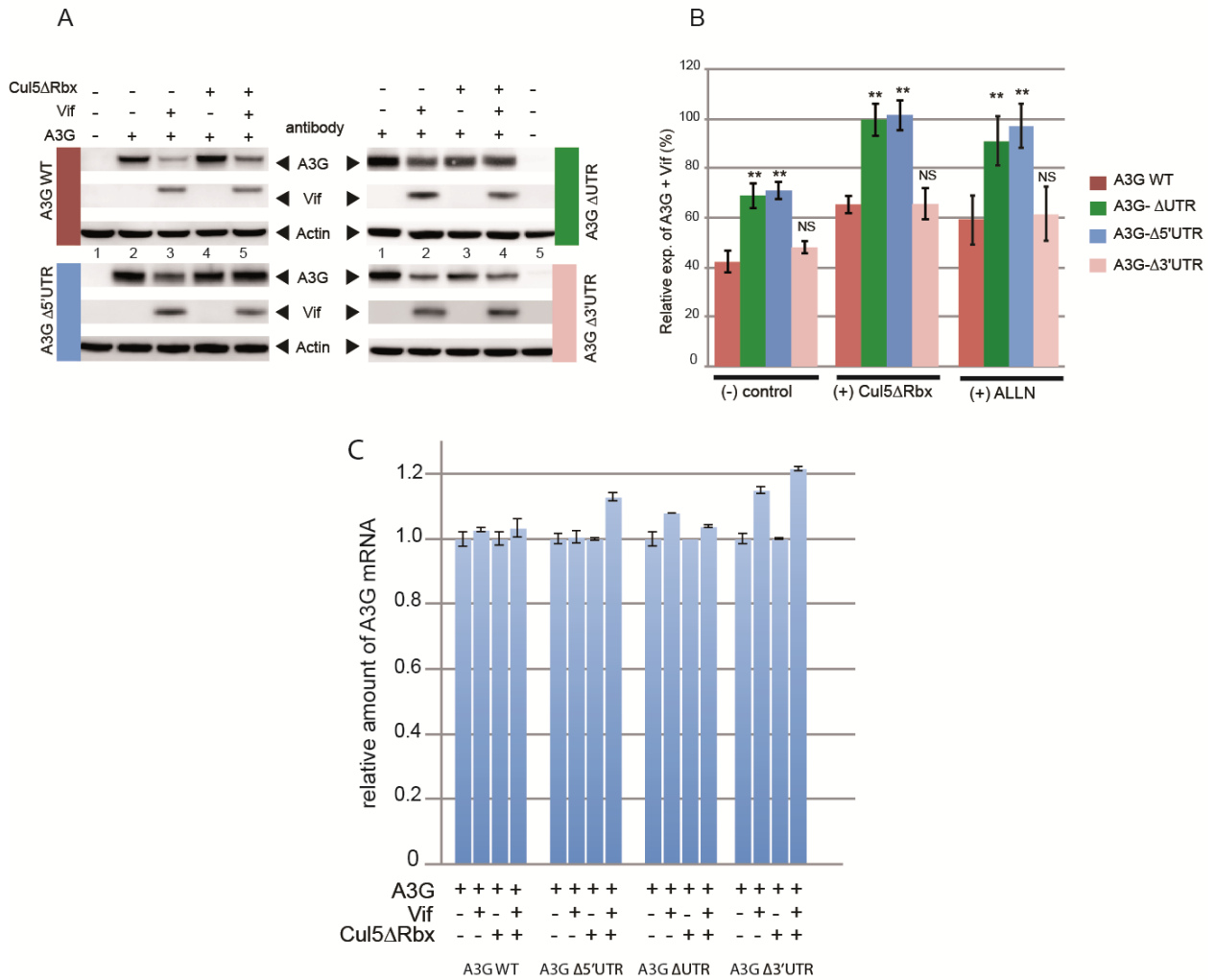


Figure 2. Vif inhibits A3G translation in a 5'UTR dependent manner. (A) HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing A3G from different mRNA constructs in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of proteasome inhibitors (Cul5ΔRbx or ALLN). **(B)** Quantification of the relative expression of A3G. **(C)** Total RNA was extracted from wild-type and mutant A3G transfected HEK 293T cells and A3G RT-qPCR was performed to study the relative expression of A3G constructs. Standard deviations are representative of at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, NS: non significant.

Altogether, these results demonstrate that Vif inhibits A3G translation in H9 infected and HEK 293T transfected cells in a 5'UTR dependent manner and that this translational inhibition could be a quantitatively important mechanism compared to proteasomal degradation. In

other words, Vif-induced proteasomal degradation and translational inhibition by Vif are both efficient processes.

Figure 3: Guerrero et al

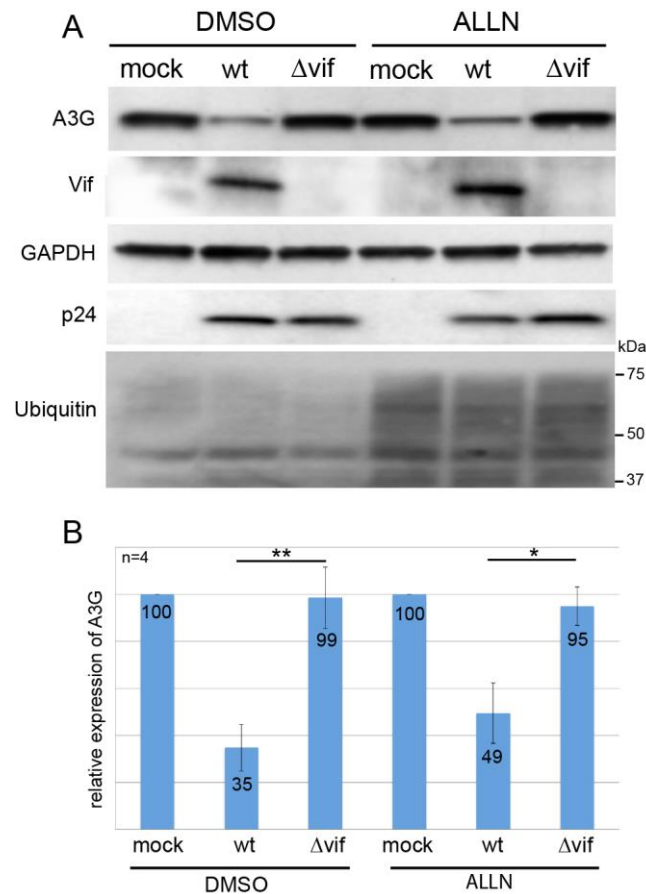


Figure 3. Vif inhibits A3G translation in HIV-1 chronically infected H9 cells. (A) Wild-type and chronically infected H9 cells (HXB2 wild-type and HXB2 Δ vif) were cultured in absence (DMSO) or presence of proteasome inhibitor (ALLN) for 18 h and analyzed by western-blot with specific antibodies against A3G, Vif, GAPDH, p24 and ubiquitin (see Material and Methods). **(B)** Quantification of the relative expression of A3G. Standard deviations are representative of at least four independent experiments. P-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01.

The 5'UTR of A3G mRNA cannot be replaced by heterologous 5'UTRs

The results presented above suggest that reduced translation of A3G in presence of Vif could be attributed to the 5'UTR of its mRNA. To further confirm these observations, we compared the Vif-induced translational inhibition of A3G mRNA containing its native 5'UTR to the one of A3G mRNAs bearing the 5'UTR from different cellular and viral transcripts, such as GAPDH, NADH and HIV-1 (Figure 4A). Interestingly, while we showed a clear degradation of A3G protein for all tested constructs in absence ALLN (Figure 4B, compare bar 2 to bar 1), no significant reduction of A3G expression (degradation and/or translation) could be observed when the proteasome was inhibited, except for the native A3G mRNA (Figure 4B, compare bar 4 to bar 3). These results confirm that the 5'UTR of A3G mRNA is a major element in the process and that the translational inhibition mediated by Vif strictly requires this 5'UTR.

Figure 4: Guerrero et al

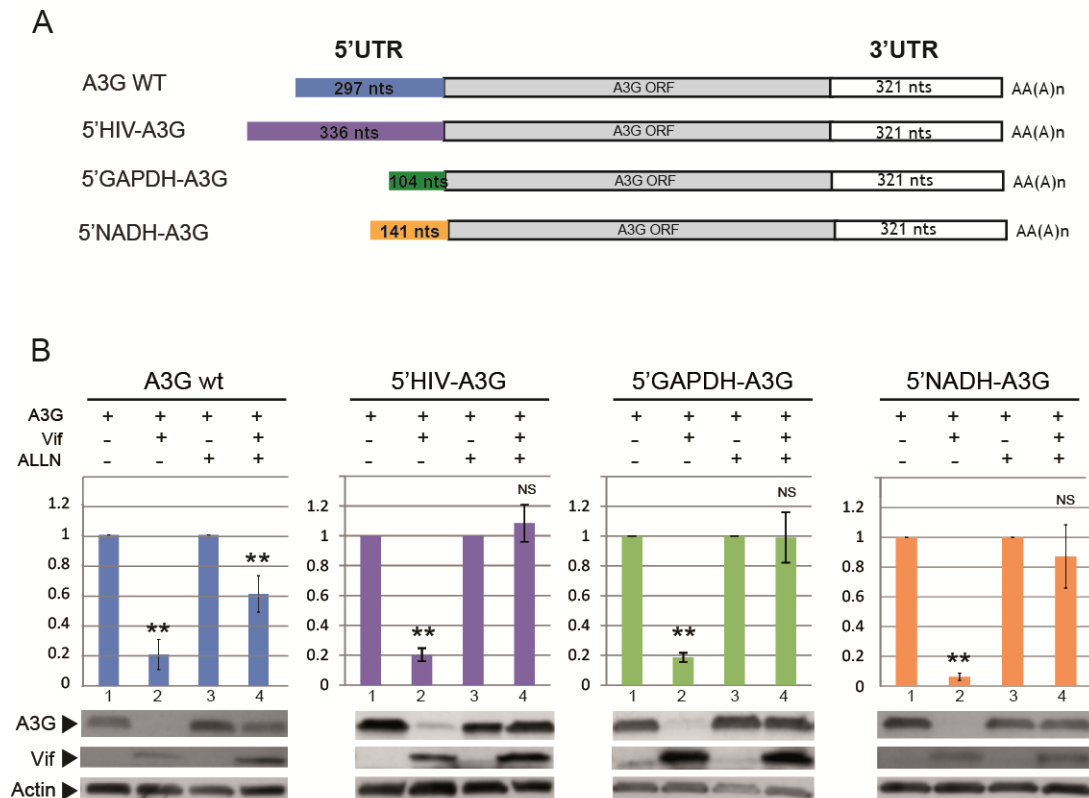


Figure 4. Heterologous 5'UTRs do not allow inhibition of A3G translation by Vif. (A) Schematic representation of A3G expression constructs containing wild-type or heterologous (HIV-1, GAPDH and NADH) 5'UTR. (B) HEK 293T cells were transfected with these 5'UTR vectors in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of proteasome inhibitors (ALLN). Quantification of the relative expression of A3G is represented by histograms. Standard deviations are representative of at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, NS: non significant.

Vif requires stem-loops 2 and 3 of A3G mRNA to inhibit translation

The 5'UTR of A3G mRNA contains three independent stem-loop (SL) motifs (Figure 1), and Vif binds to a few high-affinity binding sites in this region⁴⁰. In order to identify the domains in the 5'UTR that are required for A3G translational inhibition by Vif, we designed A3G mRNA constructs containing each of the individual SL motifs (A3G SL1, containing only SL1, A3G SL2 and A3G SL3) or two consecutive SL motifs (A3G SL1-SL2 and A3G SL2-SL3) (Figure 1). In absence of proteasome inhibition, Vif more strongly affected expression of A3G from

wild-type and A3G SL2-SL3 mRNAs than from the other mRNA constructs (50-60 % versus 20-30 %) (Figure 5A and Figure 5B, left histogram). When proteasomal degradation was inhibited, A3G levels were reduced in the presence of Vif only when it was expressed from wild-type or A3G SL2-SL3 mRNAs (by 30-40%) (Figure 5B). Again, changes in the A3G protein levels were not due to variations in the A3G mRNA levels (Figure 5C). Thus, our data indicated that both the SL2 and SL3 motifs within the 5'UTR of A3G mRNA are required to allow A3G translational inhibition by Vif.

Figure 5: Guerrero et al

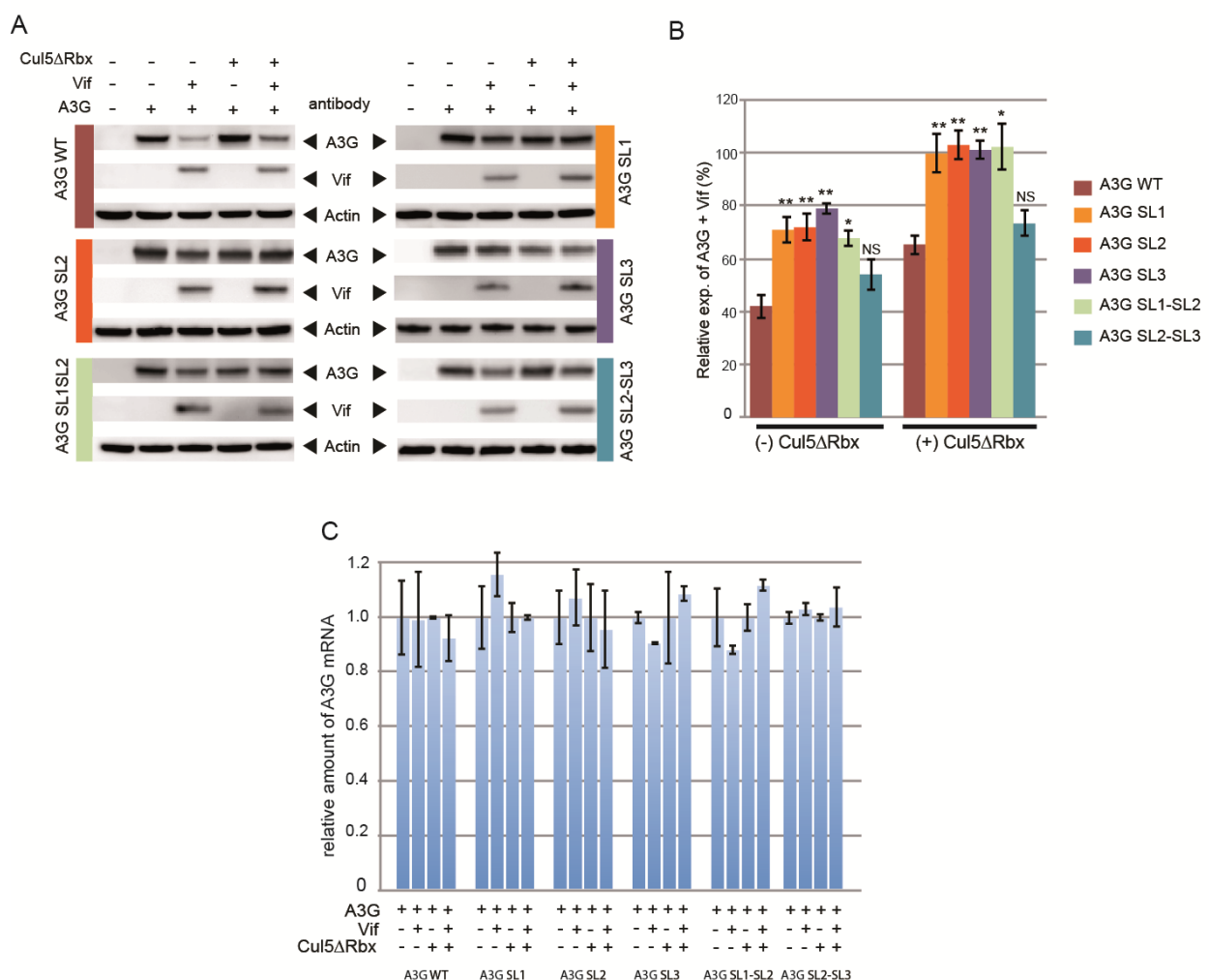


Figure 5. Vif requires SL2 and SL3 to impair A3G translation. HEK 293T cells were transfected with wild-type or mutated A3G mRNA constructs and co-transfected in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of proteasome inhibitors (Cul5ΔRbx). **(A)** Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. **(B)** Quantification of the relative expression of A3G. **(C)** Total RNA was extracted from wild-type and mutant A3G transfected HEK

293T cells and A3G RT-qPCR was performed to study the relative expression of A3G constructs. Standard deviations are representative of at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, NS: non significant.

Residue K26 of Vif is required for A3G degradation by the proteasome but not for A3G translation inhibition

Next, we tested the impact of two mutations in Vif that have been shown to impair A3G degradation on the inhibition of A3G translation by Vif (Figure 6). According to the literature, Vif mutant K26R is still able to interact with A3G⁵¹⁻⁵³, while mutant H42/43N is defective for A3G binding, while retaining binding to the CRL5 complex⁵⁴. First, we tested the interaction of these two Vif mutants with HA-tagged A3G by co-immunoprecipitation (Figure 6A), and we observed that Vif K26R retained its binding capacities with A3G while the binding of Vif H42/43N was decreased ~twofold. Next, we observed that when proteasomal degradation of A3G was not inhibited, expression of A3G from wild-type mRNA was partially reduced (30-40%) by Vif K26R, in comparison to wild-type Vif (60% reduction) (Figure 6B, compare lanes 2 & 4, and Figure 6C), whereas Vif H42/43N did not reduce the A3G protein level (Figure 6B & 6C, lane 3). When A3G was expressed from the Δ 5'UTR mRNA construct, which is not sensitive to translational inhibition by Vif, the two Vif mutants did not induce any decrease in A3G protein level (Figure 6B, lanes 7 & 8), confirming that these mutants are unable to induce A3G degradation by the proteasome. Importantly, when proteasomal degradation was blocked, wild-type and K26R Vif significantly and similarly inhibited translation of A3G (30-40%) when expressed from wild-type mRNA (Figure 6B & 6C, lanes 10 & 12), whereas Vif H42/43N did not reduce A3G levels (Figure 6B, lane 11). When A3G was expressed from the Δ 5'UTR mRNA under the same conditions, A3G protein level was not affected by the wild-type or mutant Vif proteins (Figure 6B & 6C, lanes 13 to 16). Altogether, these results demonstrate that Vif K26R, while defective in A3G degradation through the proteasome pathway, is still fully able to decrease A3G expression through inhibition of A3G mRNA

translation, thus demonstrating that these two processes are independent. By contrast mutation H42/43N inhibits both pathways.

Figure 6: Guerrero et al

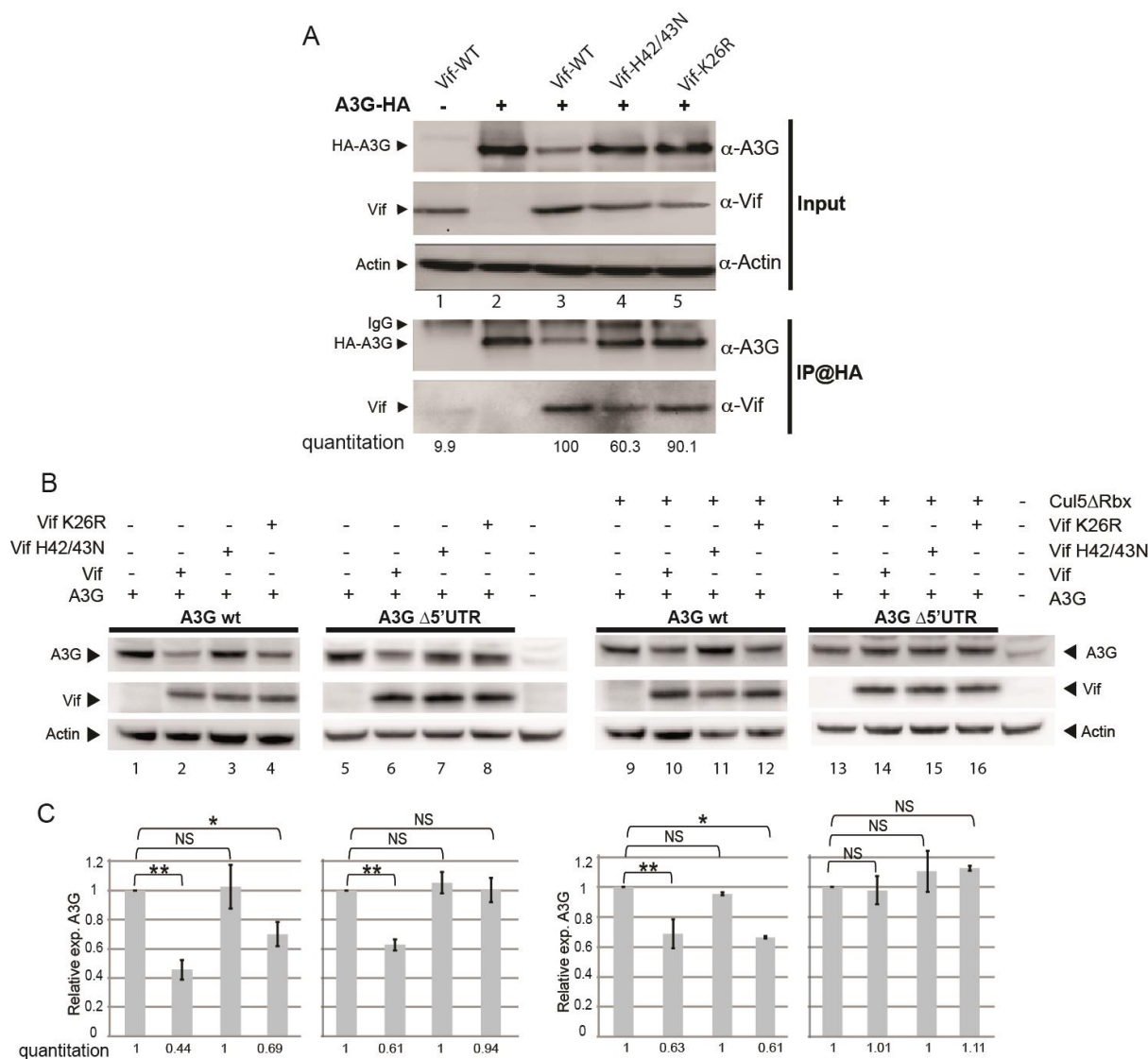


Figure 6. Vif K26 residue is required for the translational inhibition of A3G. (A) HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing A3G-HA in the presence of wild-type or mutant (H42/43N and K26R) Vif expression vectors. The input fractions were revealed by anti-Vif, anti-HA, and anti-Actin antibodies. Immuno-precipitation assays were performed using an anti-HA antibody directed against the A3G-HA protein. A negative control without A3G-HA (lane 1), and a specificity control without Vif (lane 2) were also included. The fraction of Vif proteins interacting with A3G-HA is indicated.

(B) HEK 293T cells were co-transfected with wild-type or Δ5'UTR A3G mRNA expression vectors and with wild-type, K26R or H42/43N Vif expressing vectors. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. (C) Quantification of relative A3G expression. Standard deviations are

representative of at least three independent experiments. P-values for the different assays are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, NS: non significant).

The Vif-induced translational inhibition reduces packaging of A3G

To investigate the impact of the inhibition of the translation of A3G by Vif on its packaging into viral particles, we co-transfected wild-type (pNL4.3) or Vif deleted (pNL4.3 Δ vif) molecular clones of HIV-1 together with full-length, Δ 5'UTR or SL2-SL3 A3G expression vectors (Figure 7). Note that amongst these constructs, only A3G Δ 5'UTR is not sensitive to the translational regulation by Vif (Figure 7A, middle panel). These experiments were performed in presence of the dominant negative mutant of Cul5 (Cul5 Δ Rbx). Cell lysates (Figure 7A) and concentrated virus fractions (Figure 7B) were analyzed by immunoblotting with specific Vif, A3G and CAp24 antibodies (see Material and Methods). Consistent with results in Figures 2A and 5A, analysis of the A3G expression levels showed that inhibition of A3G translation and degradation by the proteasome were equally potent in reducing the intracellular A3G content when Vif was expressed from a proviral molecular clone, as each mechanism contributed to reduce the A3G level by ~35% (Figure 7A, compare lanes 2 & 4 for wild-type A3G and lanes 10 & 12 for A3G SL2-SL3).

Next, we analyzed the packaging of A3G proteins into viral particles (Figure 7B). We observed a direct correlation between the A3G expression level in cells (Figure 7A) and its incorporation into viral particles (Figure 7B). In all cases, reduction in the intracellular A3G levels resulted in decreased incorporation of this restriction factor into the viral particles, independently of the mechanism (inhibition of translation or proteasomal degradation) reducing A3G expression. Note that when the proteasomal degradation and translational repression were both inhibited by expressing Cul5 Δ Rbx and deleting the 5'UTR of A3G mRNA, respectively, the intravirion A3G level was not modified by Vif (Figure 7B, lanes 7 & 8). Thus, these two mechanisms significantly contribute to exclude A3G from viral particles. In agreement with this conclusion, the amount of Vif protein encapsidated into viral particles

was constant under all conditions studied, indicating that a direct competition between Vif and A3G for packaging is unlikely.

The inhibition of A3G translation by Vif restores viral infectivity

To determine whether the repression of A3G translation by Vif impacts HIV-1 infectivity, wild-type (pNL4.3) or Vif-defective (pNL4.3 Δ vif) virus stocks were produced in HEK 293T cells co-transfected with wild-type, Δ 5'UTR or SL2-SL3 A3G mRNA constructs in presence or absence of Cul5 Δ Rbx (Figure 7C). The viral infectivity was determined by infecting TZM-BI indicator HeLa cells after normalization of virus stocks⁵⁵. As expected, viral infectivity was strongly decreased in the absence of Vif (Figure 7C, lanes 1, 5 & 9 in the absence of Cul5 Δ Rbx, and 3, 7 & 11 in the presence of Cul5 Δ Rbx). Interestingly, we observed a partial but significant restoration of viral infectivity in presence of Vif even when A3G degradation was inhibited, when A3G was expressed from wild-type and SL2-SL3 mRNA, i.e. from mRNAs that are sensitive to translation inhibition by Vif (Figure 7C, lanes 4 & 12). However, under these conditions, Vif was not able to restore the HIV-1 infectivity when A3G was translated from an mRNA deleted from its 5'UTR (Figure 7C, compare lanes 7 & 8). These results indicate that the inhibition of A3G translation by Vif is sufficient to partially restore HIV-1 infectivity.

Figure 7: Guerrero et al

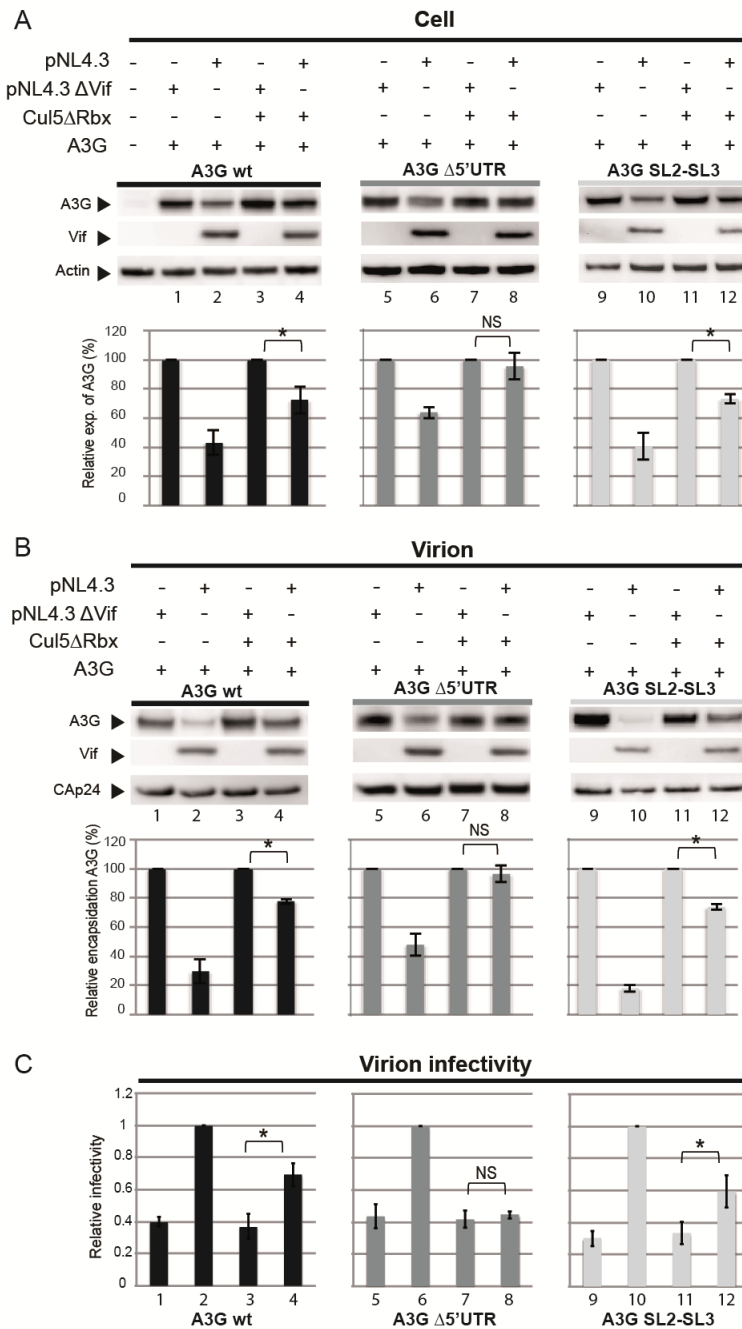


Figure 7. Effect of the inhibition of A3G translation by Vif on A3G packaging and viral infectivity. HEK 293T cells were co-transfected with HIV-1 pNL4.3 or pNL4.3 Δ vif and wild-type or mutant A3G mRNAs +/- proteasome inhibitor Cul5 Δ Rbx. Proteins from cell lysates (**A**) and virions (**B**) were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. (**C**) Viral particles produced in HEK 293T cells were used in viral infectivity assay using TZM-bl indicator cells. Luciferase induction was detected 48 h post-infection. Standard deviations are representative of at least three independent experiments. P-values for the different assays are indicated as follows: * <0.05, ** <0.01, NS: non significant.

Most HIV-1 Vif alleles induce a translational down-regulation of A3G

Although Vif is expressed by all HIV-1 strains, its sequence varies considerably amongst HIV-1 isolates (Los Alamos HIV sequence database, <http://www.lanl.gov/>). To test whether the Vif-induced translational inhibition of A3G is a general property of HIV-1 Vif, we analyzed by western blot the relative expression of A3G after co-transfection of HEK 293T cells with different Vif alleles⁴³ and wild-type A3G, in presence or absence of proteasome inhibitor. Expression of A3G alone (no Vif) was set to 100%, and we chose hVif as a reference for comparison to other Vif proteins as it was used all along in our study (Figure 8). As previously observed (Figure 2B), the expression of A3G from wild-type mRNA in presence of ALLN was reduced by 30-40% in presence of hVif. Three Vif variants (LAI, NL4.3, and C1) displayed lower inhibition of A3G translation (10-30% inhibition), whereas eleven (A1, A2, B1, B2, C2, C3, D2, AE1, F1-3) produced a stronger inhibition (40-80%) going to up to 80% in the case of the D1 Vif allele. Altogether, these results demonstrate that the translational inhibition of A3G is a common property of Vif, but the degree of regulation differs from one HIV-1 isolate to the other.

Figure 8: Guerrero et al

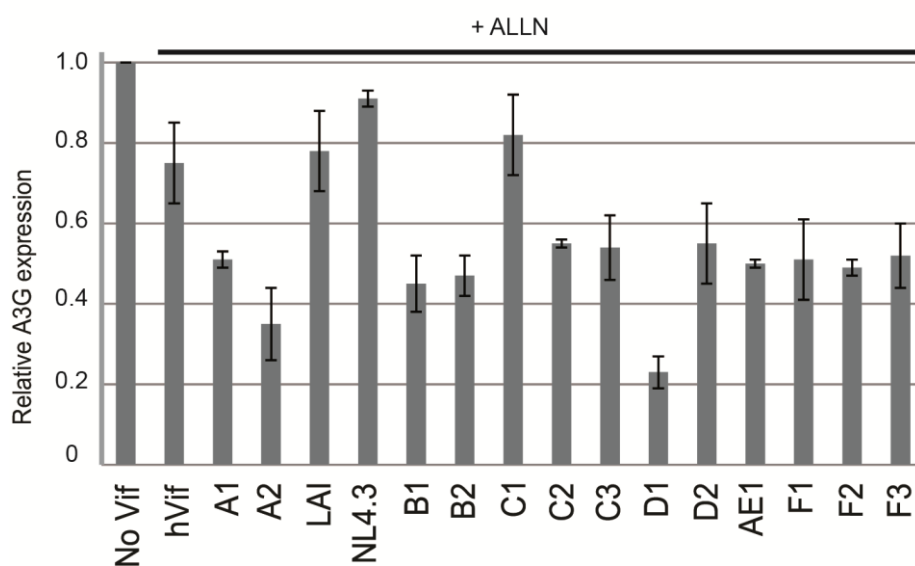


Figure 8. Translational repression of A3G by different Vif alleles. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing wild-type A3G mRNA in the presence of Vif alleles and proteasome inhibition

(ALLN), and the relative A3G expression was analyzed by western blot and quantify using Image J (1.46r). Standard deviations are representative of at least three independent experiments.

DISCUSSION

The HIV-1 Vif protein has been shown to be necessary for efficient viral infection in non-permissive cells by antagonizing the antiviral activity of A3G. While the molecular mechanisms by which Vif induces degradation of A3G by the proteasome have been extensively studied since the discovery of A3G⁵⁰, little is known about the regulation of A3G translation by Vif. Using *in vitro* coupled transcription/translation, we showed that inhibition of A3G translation by Vif requires the 5'UTR of the A3G mRNA⁴⁰. Here, we observed that A3G expression is diminished by Vif in HEK 293T transfected and in H9 infected cells, even when its degradation is blocked, provided this restriction factor is expressed from an mRNA containing the complete 5'UTR (Figure 2) or at least structural domains SL2 and SL3 (Figure 5). Thus, this phenomenon most likely corresponds to the inhibition of translation we previously observed *in vitro*⁴⁰.

Interestingly, *in vitro* foot-printing experiments⁴⁰ identified several Vif-binding sites in the SL3 motif, suggesting that Vif may slow-down the ribosome scanning process on the 5'UTR of A3G mRNA, thus reducing A3G translation. However, SL2 was required for inhibition of A3G translation by Vif (Figure 5), even though no Vif binding site was observed in this region⁴⁰, raising the possibility that the mechanism is more complex. In any case, specific structural elements in the 5'UTR of A3G mRNA are likely required for an optimal down-regulation of A3G translation since its 5'UTR could not be substituted for heterologous cellular or viral 5'UTRs varying in size and complexity (Figure 4).

Although specific amino acids in Vif have been shown to be necessary for A3G binding and proteasomal degradation²⁷, so far none have been identified as being required for inhibition of A3G translational translation. Importantly, we observed that Vif mutant K26R, in the N-

terminus of Vif, while unable to induce A3G degradation by the proteasome was fully able to inhibit A3G translation, demonstrating that these two pathways are independent (Figure 6). Notably, Vif mutant H42/43N, which unlike mutant K26R, displayed decreased interaction with A3G, was unable to inhibit translation, raising the possibility that Vif/A3G interaction might be required for translational regulation.

By using A3G mRNA constructs that allowed or prevented inhibition of A3G translation by Vif, together with inhibitors of A3G proteasomal degradation, we could estimate the relative contributions of these two processes to the overall decrease of A3G intracellular and intravirion concentrations induced by Vif (Figure 2, 5 and 8). Importantly, we observed that these two processes contribute to the decrease of A3G levels in cells and virions, suggesting that the translational inhibition could be a quantitatively important mechanism compared to proteasomal degradation. Thus, the inhibition of A3G translation by Vif is an important process, which was not detected in most previous studies due to the use of A3G expression vectors lacking the authentic 5'UTR, and thus preventing this translational control of A3G by Vif. Moreover, this property is shared by a large number of Vif alleles, with differential translational activity (Figure 8), suggesting that specific sequences/domains of Vif are required to down-regulate A3G translation.

In addition to inducing degradation of A3G and preventing its translation, it has been suggested that Vif could reduce A3G incorporation into viral particles by directly interfering with its packaging possibly by competing for a common RNA motif required for packaging of these two proteins⁵⁶⁻⁵⁹. However, our results show that when degradation of A3G by the proteasome and inhibition of A3G translation are both blocked, the intracellular and intravirion concentrations of A3G are the same as in the absence of Vif (Figure 7A-B), indicating that these two mechanisms are the only significant pathways by which Vif reduces A3G incorporation into virions. At the opposite, basal levels of A3G were incorporated into viral particles even when both pathways were active (Figure 7B).

Finally, we showed that inhibition of A3G translation by Vif is able to partially restore infectivity of the HIV-1 particles in the absence of degradation of this restriction factor (Figure 7C). This is the first demonstration of the functional role of the translational control of A3G by Vif in the context of viral infection. The results of our experiments using reporter cells are corroborated by previous studies^{52,54,60} showing that an HIV-1 mutant bearing mutation K26R in the *vif* gene replicated in restrictive cells, while a virus with the H42/43N mutations did not. Combined with our finding that the first mutation did abolish A3G translational control by Vif, while the second did not (Figure 6), these results further prove that inhibition of A3G translation by Vif is sufficient to partially restore HIV-1 infectivity. Thus, our findings demonstrated that the translational inhibition of A3G by Vif could be considered as a third layer of A3G gene regulation in addition to its protein degradation and transcriptional down-regulation²⁸. This translational control is corroborated by the fact that this property is shared by almost all Vif proteins and opens attractive perspectives for the development of new drugs disrupting the translational control of A3G by Vif. Moreover, considering that the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs is highly conserved, it is likely that Vif is also able to inhibit A3F translation.

METHODS

Plasmids

Plasmids pCMV-hA3G, pCMV-hA3G Δ UTR, pCMV-hA3G Δ 5'UTR and pCMV-hA3G Δ 3'UTR have been previously described⁴⁰. pCMV-hA3G SL1 (deletion of nucleotides 112 to 297, Δ 112-297), SL2 (Δ 1-128 and Δ 199-297), SL3 (Δ 1-207), SL1SL2 (Δ 199-297) and SL2SL3 (Δ 1-127) were generated by Quick-Change Site-directed Mutagenesis (Agilent Technology) based on the secondary structure model of the 5'-UTR of hA3G mRNA⁴⁰ and deletions were confirmed by DNA sequencing (GATC Biotech, Germany). Vif was expressed from plasmid pcDNAhVif encoding codon-optimized NL4.3 Vif⁴² which is available through the NIH AIDS

Research and Reference Reagent Program (catalog #10077). Vectors expressing the different alleles of Vif were obtained from Dr. M. Ooms (Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA)⁴³. Mutations K26R and H42/H43-N were generated in the pcDNAhVif plasmid by Quick-Change Site-directed Mutagenesis (Agilent Technology). The infectious molecular clone pNL4-3 has been previously described⁴⁴ and is also available through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (catalog #114). The vif-defective pNL4-3 variant, pNL4-3 Δ vif, carrying a 178-bp out-of-frame deletion in the *vif* gene, has been previously reported⁴⁵. A plasmid expressing a dominant negative mutant of Cul5, pCul5 Δ Rbx, was used to block A3G degradation by the proteasome²⁵. pNL4.3, pNL4.3 Δ vif, pNL4.3 Δ env and pNL4.3 Δ env Δ vif were generously provided by Dr. Klaus Strebel (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The pCMV A3G-derived constructs containing the heterologous 5'UTR from NADH, GAPDH and HIV-1 (NL4.3) were obtained by ligating the EcoRI-PstI PCR amplified products from NADH (141 nts) and GAPDH (104 nts) cDNAs (kindly provided by Dr T. Ohlmann, INSERM U758 Lyon, France⁴⁶), and HIV-1 pNL4.3 (336 nts), respectively, into the double digested pCMV A3G expression vector. All constructs were confirmed by DNA sequencing (GATC Biotech, Germany).

Cell Culture, transfection and infection

HEK 293T and TZM-bl cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, EUROBIO) with antibiotics (PAA) and passaged upon confluence. Transfections of HEK 293T cells were carried out using the X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were seeded at 70% confluence in a 6-well plate and co-transfected with 50 ng of pCMV-hA3G constructs, 1 μ g of pcDNA hVif, hVif mutants or the different Vif alleles with or without 0.5 μ g of pCul5 Δ Rbx. In parallel experiments, cells were exposed to the chemical proteasome inhibitor ALLN (25 μ M) or DMSO (control) for 14 h. For

HIV-1 chronically infected H9 cells analysis, three T-cell lines were used: wild-type H9 (mock); H9 HXB2 Δ env and H9 HXB2 Δ env Δ vif containing an integrated HIV-HXB2 provirus deleted for *Env* and for both *Env* and *Vif* genes, respectively. These constructions carry the neomycin phospho-transferase gene (*neo^R*) cloned into the *nef* region of the genome. Chronically infected cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% FBS and G418 (1 mg/ml)⁴⁷. As for HEK 293T cells, H9 cells were exposed to ALLN (25 μ M) or DMSO for 14 h. For infectivity assays and study of A3G incorporation into HIV-1 particles, HEK 293T cells were co-transfected with 50 ng of pCMV-hA3G mutants, 0.5 μ g of Cul5 Δ Rbx and 1 μ g of HIV-1 pNL4.3 (pNL4.3 wt, pNL4.3 Δ vif). For infectivity assays, TZM-bl indicator cells were challenged with reverse transcriptase normalized virions and the induction of luciferase was detected 48 h post-infection⁴⁸.

Immuno-precipitation assays

HEK 293T cells were co-transfected with pA3G-HA and plasmids expressing wild type or mutant Vif, Twenty-four h post-transfection, cells were washed in PBS (140 mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na₂HPO₄) and lysed in RIPA 1X (PBS, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS) supplemented with protease inhibitors (cOmplete EDTA Free cocktail, Roche). After centrifugation, an aliquot fraction (50 μ l) was used for determination of the protein expression level, and the remaining was incubated 2 h at 4°C with 1 μ g of HA antibody (Santa Cruz, California, USA) on a rotating wheel. After equilibration, protein A Dynabeads (Life Technologies) were added and incubated for 1.5 h at 4°C. Beads were washed 5 times with cold RIPA, and eluted in glycine pH 2.8, NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies). After 10 min at 70°C, supernatant was loaded on NuPAGE gel (Life Technologies) and analyzed by western blot.

Immunoblotting

Twenty-four hours post-transfection, cells were harvested in RIPA supplemented with protease inhibitors. Virions from transfected 293T cells were concentrated by ultracentrifugation at 100,000 g for 2 h at 4°C through a 20% sucrose cushion and harvested in RIPA. Cell and virions lysates were adjusted to equivalent protein concentration (determined using Bradford reagent (BIO-RAD), fractionated on NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen) and transferred to a 22 µm PVDF membranes using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BIO-RAD). Blots were probed with appropriate primary antibodies. Polyclonal anti-hA3G (#9968) and monoclonal anti-HIV-1 Vif (#319) antibodies were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Monoclonal anti-β-actin antibody was purchased from SIGMA (#A5316). A HIV-positive patient serum was used for the identification of HIV-1 p24 protein. The PVDF membranes were then 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 Healthcares). Bands were quantified using Image J (1.46r) by analyzing pixel density. Student's T-test was used to determine statistical significance.

For H9 T-cells, $5 \cdot 10^6$ cells (treated or not with ALLN/DMSO) were harvested by centrifugation and lysed for 10 min at 4°C in RIPA 1X supplemented with protease inhibitors. Lysates were cleared by centrifugation for 30 min at 14,000 g and protein concentration was determined using a Bradford assay in order to load the equivalent of 150 µg of total proteins on a NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Western blot was then performed as above using antibodies directed against A3G (NIH#9968), Vif (NIH#319), GAPDH (ABD Serotec-Bio-Rad); p24 (HIV-positive patient serum) and Ubiquitin (Santa Cruz, California, USA). Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies were used and revealed by chemiluminescence, and bands were quantified as above.

RNA isolation, cDNA synthesis and real-time qPCR

Twenty-four h post-transfection, total RNA was isolated from 293T cells using TRI Reagent (SIGMA). After RNase-free DNase treatment (Roche), total RNA was isolated by phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation. Total RNA (1 µg) was then reverse-transcribed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix (BIO-RAD) as recommended by the manufacturer. Subsequent qPCR analysis was performed using the KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS) and was monitored on a CFX Real Time System (BIO-RAD). Gene-specific primers were: A3G forward primer, 5'-TCCACCCACATTCACCTTTCA-3', and reverse primer 5'-TTCCAAAAGGGAATCACGTC-3'; β-actin forward primer, 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', and reverse primer 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'. The A3G mRNA levels were normalized to those of β-actin mRNA and relative quantification was determined using the standard curve based method.

REFERENCES

1. Harris, R. S. *et al.* The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* **287**, 40875-83 (2012).
2. Henriot, S. *et al.* 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.* **73**, 211-32 (2009)
3. Feng, Y. *et al.* Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif. *Frontiers Microbiol.* **5**, 450 (2014)
4. Desimie, B. A. *et al.* Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. *J. Mol. Biol.* **426**, 1220-45 (2014)
5. Malim, M. H. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 675-87 (2009)

6. Mangeat, B. *et al.* Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**, 99-103 (2003)
7. Mbisa, J. L. *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.* **81**, 7099-110 (2007)
8. Ooms, M. *et al.* HIV-1 Vif adaptation to human APOBEC3H haplotypes. *Cell Host Microbe* **14**, 411-21 (2013)
9. Sato, K. *et al.* Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* **84**, 9546-56 (2010)
10. Refsland, E. W. *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.* **10**, e1004761 (2014)
11. 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.* **279**, 34083-6 (2004)
12. Douaisi, M. *et al.* HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 566-73 (2004)
13. Strebel, K., Khan, M. A. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology* **5**, 55 (2008)
14. Svarovskaia, E. S. *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.* **279**, 35822-8 (2004)
15. Zennou, V. *et al.* APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **78**, 12058-61 (2004)
16. Harris, R. S. *et al.* DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, **113**, 803-9 (2003)
17. Zhang, H. *et al.* The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-8 (2003)
18. Lecossier, D. *et al.* Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**, 1112 (2003)

19. Li, X. Y. *et al.* APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J. Biol. Chem.* **282**, 32065-74 (2007)
20. Mbisa, J. L. *et al.* APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J. Virol.* **84**, 5250-9 (2010)
21. Newman, E. N. *et al.* Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol.* **15**, 166-70 (2005)
22. Wang, Y., *et al.* The role of innate APOBEC3G and adaptive AID immune responses in HLA-HIV/SIV immunized SHIV infected macaques. *PLoS ONE* **7**, e34433 (2012)
23. Gillick, K., *et al.* 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.* **87**, 1508-17 (2013)
24. Libre, C. *et al.* APOBEC3F/G and Vif: action and counteraction. In: Hope TJ, Stevenson M, Richman DD, editors. Encyclopedia of AIDS. New-York: Springer New-York Press (2015)
25. Yu, X. *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056-60 (2003)
26. Zheng, Y. H. *et al.* Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* **9**, 112 (2012)
27. Letko, M. *et al.* Identification of the HIV-1 Vif and Human APOBEC3G Protein Interface. *Cell Rep.* **13**, 1789-99 (2015)
28. Richards, C. *et al.* The Binding Interface between Human APOBEC3F and HIV-1 Vif Elucidated by Genetic and Computational Approaches. *Cell Rep.* **13**, 1781-8 (2015)
29. Jager, S. *et al.* Vif hijacks CBF- β to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* **481**, 371-5 (2012)
30. Zhang, W. *et al.* T-cell differentiation factor CBF- β regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* **481**, 376-9 (2012)
31. Guo, Y. *et al.* Structural basis for hijacking CBF- β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature* **505**, 229-33 (2014)

32. Kim, D. Y. *et al.* CBF- β stabilizes HIV Vif to counteract APOBEC3 at the expense of RUNX1 target gene expression. *Mol Cell*. **49**, 632-44 (2013)
33. Du, J. *et al.* Differential requirements for HIV-1 Vif-mediated APOBEC3G degradation and RUNX1-mediated transcription by core binding factor beta. *J. Virol*. **87**, 1906-11(2013)
34. Fribourgh, J. L. *et al.* Core binding factor beta plays a critical role by facilitating the assembly of the Vif-cullin 5 E3 ubiquitin ligase. *J. Virol*. **88**, 3309-19 (2014)
35. Wang, H. *et al.* Identification of HIV-1 Vif regions required for CBF- β interaction and APOBEC3 suppression. *PLoS ONE* **9**, e95738 (2014)
36. Kao, S. *et al.* 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*. **77**, 11398-407 (2003)
37. Stopak, K. *et al.* HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell*. **12**, 591-601 (2003)
38. Jackson, R. J. *et al.* The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **11**, 113-27 (2010)
39. Wilkie, G. S. *et al.* Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci*. **28**, 182-8 (2003)
40. Mercenne, G. *et al.* HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res*. **38**, 633-46 (2010)
41. Guerrero, S. *et al.* HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses* **7**, 199-218 (2015)
42. Nguyen, K. L. *et al.* Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their mRNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology* **319**, 163-75 (2004)
43. Binka, M. *et al.* The activity spectrum of Vif from multiple HIV-1 subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. *J. Virol*. **86**, 49-59 (2012)
44. Adachi, A. *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol*. **59**, 284-91 (1986)

45. Karczewski, M. K., Strebel, K. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J. Virol.* **70**, 494-507 (1996)
46. Soto-Rifo, R. *et al.* Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2653-67 (2012)
47. Dettenhofer, M., Yu, X. F. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J. Virol.* **73**, 1460-7 (1999)
48. Tudor, D. *et al.* HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* **2**, 412-26 (2009)
49. Xu, H. *et al.* Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* **360**, 247-56 (2007)
50. Sheehy, A. M. *et al.* Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-50 (2002)
51. 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.* **81** 8201-10 (2007)
52. Dang, Y. *et al.* Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization. *J. Virol.* **83**, 8544-52 (2009)
53. Ai, Y., Ma, J. Multiple lysines combined in HIV-1 Vif determines the responsiveness to CBF-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 385-90 (2015)
54. Mehle, A. *et al.* Identification of an APOBEC3G binding site in human immunodeficiency virus type 1 Vif and inhibitors of Vif-APOBEC3G binding. *J. Virol.* **81**, 13235-41 (2007)
55. Platt, E. J. *et al.* Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **83**, 8289-92 (2009)
56. Opi, S. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J. Virol.* **81**, 8236-46 (2007)

57. Sheehy, A. M. *et al.* The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9**, 1404-7 (2003)
58. Khan, M. A. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J. Virol.* **75**, 7252-65 (2001)
59. Khan, M. A. *et al.* Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* **79**, 5870-4 (2005)
60. Khamsri, B. *et al.* Effects of lysine to arginine mutations in HIV-1 Vif on its expression and viral infectivity. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 679-83 (2006)

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Dr. Redmond Smyth for critical reading of the manuscript, Dr. M. Ooms (Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New-York, NY-USA), and Dr. T. Ohlmann (CIRI, INSERM U758 Lyon, France) who kindly provided us vectors expressing the different Vif alleles and vectors expressing heterologous 5'UTR, 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 post-doctoral and doctoral fellowships from ANRS to JB and SG, respectively. SG also received funding from the Ecuadorian government through the National Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation (Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación-SENESCYT). Funding for open access charge: French National Center for Research (CNRS).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JCP designed research; SG, GM, CL, JB, TD, GL & DR performed research; JCP, RM, SG & CM analyzed data; JCP wrote the paper with contributions from RM.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

II. UN PETIT CADRE DE LECTURE OUVERT (uORF) PRESENT DANS LA 5'UTR DES ARNm D'A3F/G EST ESSENTIEL POUR L'INHIBITION TRADUCTIONNELLE INDUITE PAR VIF

Article 2: A conserved uORF in APOBEC3F and APOBEC3G mRNAs is essential to their translational inhibition by Vif.

Libre Camille, Guerrero Santiago, Marquet Roland & Paillart Jean-Christophe

Article en préparation

Les cellules cibles du VIH-1 sont capables de limiter sa replication en exprimant des facteurs de restriction APOBEC3F (A3F) et A3G. Ces deux protéines ont une activité désaminase de cytidine qui induit des mutations dans l'ADN génomique qui peuvent être létales pour le virus. Pour contrer cette restriction, le VIH-1 exprime un facteur d'infectivité virale (Vif), une protéine qui réduit l'expression cellulaire d'A3F/G à travers trois mécanismes principaux : (1) Vif induit la dégradation d'A3F/G par le protéasome en recrutant un complexe E3 ubiquitine ligase, (2) Vif réduit la transcription d'A3G en détournant le facteur de transcription CBF β et (3) Vif inhibe la traduction d'A3F/G en interagissant avec la région 5' non traduite (UTR) de leurs ARNm. Dans cette étude, nous avons découvert la présence d'un petit cadre de lecture ouvert (uORF - upstream Open Reading Frame) dans la 5'UTR des ARNm d'A3F/G. Nous avons généré des mutants de ces 5'UTR et montré que l'uORF est importante à la fois pour la traduction d'A3G et d'A3F seuls mais également pour la répression traductionnelle induite par Vif. De plus, cet uORF semble fonctionnel et son fort contexte kozak est important pour la régulation de la traduction. Nos résultats montrent que le mécanisme de traduction des ARNm d'A3G et d'A3F est un mélange entre ré-initiation et leaky-scanning. Connaître le mécanisme par lequel Vif inhibe la traduction d'A3G/F permettrait de le contrecarrer et pourrait être un moyen supplémentaire pour lutter contre le VIH-1.

A conserved uORF in APOBEC3F and APOBEC3G mRNAs is essential to their translational inhibition by Vif

Libre Camille¹, Guerrero Santiago^{1#}, Marquet Roland¹ & Paillart Jean-Christophe^{1*}

¹Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084, Strasbourg cedex, 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

#Present address:

Center for Genomic Regulation (CRG), C/ Dr. Aiguader, 88, PRBB Building, 08003 Barcelona, Spain

ABSTRACT

The primary cell targets of HIV-1 are able to limit HIV-1 replication by expressing the restriction factors APOBEC3F (A3F) and A3G. These two proteins have cytidine deaminase activity that induces mutations in the genomic DNA which can be lethal for the virus. To counteract this restriction, HIV-1 has evolved the viral infectivity factor (Vif), a protein that reduces the cellular A3F/G expression level through three major mechanisms: (1) Vif induces the degradation of A3F/G by the proteasome by recruiting an E3 ubiquitin ligase complex, (2) Vif reduces A3G transcription by hijacking the transcription factor CBF β and (3) Vif inhibits A3F/G translation by interacting with the 5' untranslated region (UTR) of their mRNAs. In this study, we discovered the presence of a small upstream ORF (uORF) within their 5'UTR. We generated a panel of A3G/F 5'UTR mutants and showed that this uORF is important not only for A3G/F translation but also for the Vif-mediated translational repression. Moreover, the uORF is functional and its strong kozak context is important for the translational regulation. Our results showed that the translational mechanism is a mix between re-initiation and leaky-scanning. Deciphering the mechanism of translational repression by Vif could allow us to counteract it and could be another way to fight HIV-1.

INTRODUCTION

The Human Immunodeficiency virus Vif (Viral infectivity factor) protein is essential for infectious particles production in targeted cells (Strebel et al 1987). However, these cells express restriction factors like APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3) that interfere with reverse transcription by inducing mutations during the synthesis of the viral single-stranded DNA (Harris et al 2003). These proteins are cytidine deaminases that convert nascent cytidines to uracils in viral cDNA which leads to the production of non-infectious viral particles. Among this deaminase family, APOBEC3D (A3D), A3F, A3G and A3H have an antiviral activity against HIV-1 but A3G and A3F are the most active (Malim 2009; Refsland et al 2014; Sato et al 2014). A3G and A3F are packaged into viral particles to induce viral DNA hypermutations at the next replication cycle (Zennou et al 2004). Therefore, the HIV-1 DNA becomes nonfunctional and is rapidly degraded or the coding proteins are aberrant (Zhang et al 2003; Harris et al 2003). Furthermore, others studies showed that A3G and A3F can inhibit the reverse transcription and the integration steps independently of their deaminase activity (Newman et al 2005; Mbisa et al 2010; Gillick et al 2013). However, the Vif protein counteracts A3G and A3F antiviral activity by several mechanisms. Indeed, Vif can recruit an E3 ubiquitin ligase complex that induces polyubiquitination of A3G and A3F to degrade them by the proteasome (Yu et al 2003). This pathway has been well characterized and is the principal mechanism of A3G and A3F inhibition by Vif. Furthermore, it has also been shown that Vif could hijack the transcription factor CBF β in order to reduce A3G transcription. Finally, Vif can also counteract A3G by inhibiting its translation (Stopak et al 2003; Mercenne et al 2010; Guerrero et al submitted). Indeed, it has been shown that two stem-loop structures within the 5' untranslated region (UTR) of A3G mRNA are essential for the translational inhibition of A3G by Vif (Guerrero et al submitted). 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.

To better understand the importance of the two stem-loop structures within the 5'UTR of A3G mRNA, we searched for *cis*-acting elements within this region. By using a computational platform capable of identifying RNA regulatory elements (RegRNA 2.0), we

identified an uORF (upstream Open Reading Frame) within SL2 and SL3 of the 5'UTR of A3G and A3F mRNA sequences. Given that uORFs usually correlate with reduced protein expression of the downstream ORF, we studied the impact of this uORF on A3G and A3F translation and on their Vif-mediated translational repression. We constructed several A3G and A3F mRNAs mutated in their 5'UTRs to test several aspects of this process such as the impact of the uORF sequence, the uORF peptide length, the uORF peptide nature and the distance between the two ORFs. To better understand the translational regulation of A3G and A3F by Vif, we also tested these constructs with and without Vif in a context where the proteasome was inhibited in order to focus on the translation. Our data showed that this uORF negatively regulates A3G and A3F translation and is required for the translational inhibition of A3G and A3F by Vif. We also observed that the uORF peptide length and the distance between the two ORFs are important both for the translation and the Vif-mediated translational repression.

MATERIAL AND METHODS

- Plasmids

Plasmid pCMV-hA3G has been previously described (Mercenne et al, 2010). The pCMV-hA3F plasmid was obtained after mRNA isolation from H9 cells and RT-PCR analysis. Amplified PCR products containing the A3F mRNA sequence were digested by EcoRI and XbaI and ligated into pCMV6-XL4 previously digested with the same restriction enzymes. Plasmids were generated by Quick-Change Site-directed Mutagenesis (table 1) (Agilent Technology) based on the secondary structure model of the 5'UTR of A3G mRNA (Mercenne et al, 2010) and verified by DNA sequencing (GATC Biotech, Germany). The A3 uORF2 mutants were constructed by adding 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. Vif was expressed from pcDNA-hVif expression vector encoding codon-optimized NL4.3 Vif (Nguyen et al 2004).

- Cell culture

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum with antibiotics (PAA) and passaged

upon confluence. Transfections of HEK293T cells were carried out using the X-tremeGene 9 DNA Transfection Reagent (SIGMA) as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were seeded at 70% confluence in a 6-well plate and co-transfected with 100 ng of pCMV-hA3G constructs and 1 μ g of pcDNA hVif. Cells were also exposed to the chemical proteasome inhibitor ALLN (25 μ M) for 14 h.

- Dual-luciferase reporter assays

Fragments containing the 5'UTR of wild-type A3G, Δ uORF and Mut uUGA were inserted into a pGL3 plasmid in between the Renilla and the Firefly luciferases. For the reporter assay, HEK293T cells were plated into 6-well plates and co-transfected with the pGL3 constructs using the X-tremeGene 9 DNA Transfection Reagent. After 24 h, cells were harvested and assayed using the dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions.

- Immunoblotting

Twenty-four hours post-transfection, cells were washed in PBS 1X (140 mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na₂HPO₄) and lysed for 10 min at 4°C in RIPA 1X (PBS 1X, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS) supplemented with protease inhibitors (complete EDTA Free cocktail, Roche). After a 1 h centrifugation at 14 000 g, cell lysates were adjusted to equivalent protein concentration (determined using the Bradford reagent (BIORAD)), fractionated on Criterion TGX 4-15% gels (BIORAD) and transferred onto a 22 μ m PVDF membranes using the Trans-Blot TurboTM Transfer System (BIORAD). Blots were probed with appropriate primary antibodies. Polyclonal anti-A3G (#9968), anti-A3F (#11226) and monoclonal anti-Vif (#319) antibodies were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Monoclonal anti- β -actin antibody was purchased from SIGMA (#A5316). The PVDF membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (BIORAD), and the proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) using the ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare) and the ChemiDocTM Touch Imaging System (BIORAD). Bands were quantified using Image J by analyzing pixel density. Student's T-test was used to determine statistical significance.

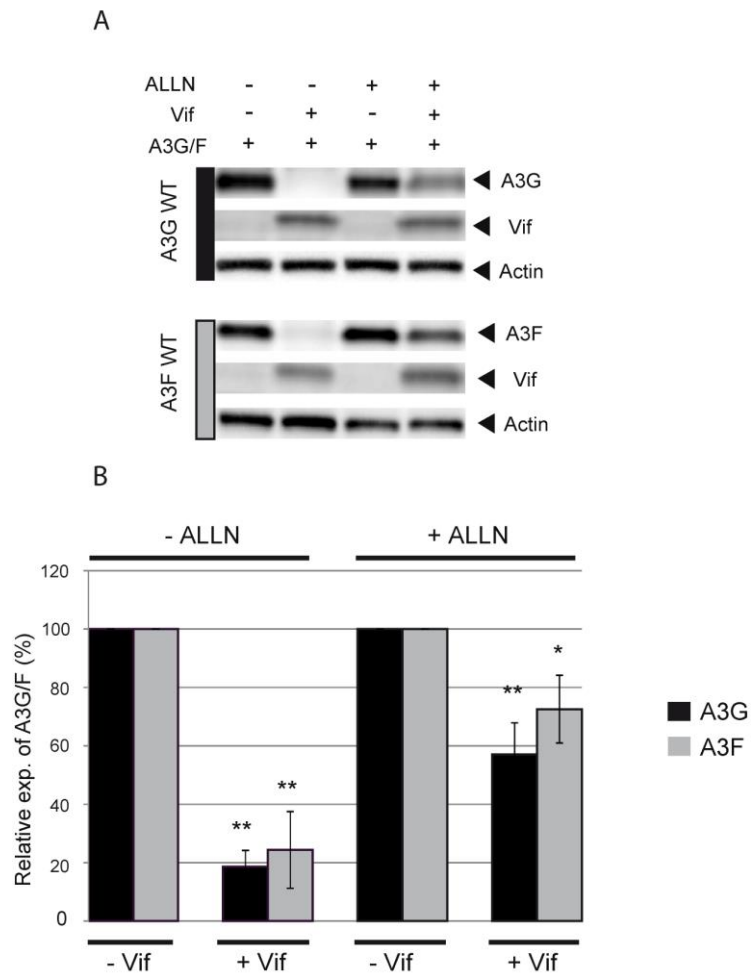


Figure 1: Vif inhibits A3F translation. **A.** HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G and A3F wild-type in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$.

- Real-time qPCR

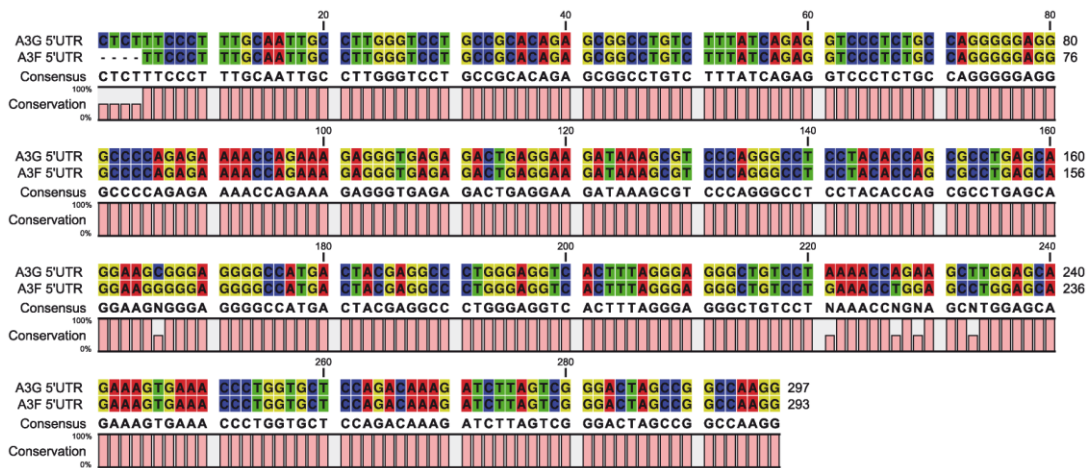
Twenty-four hours post-transfection, total RNA was isolated from HEK293T cells using TRI-Reagent (SIGMA). After RNase-free DNase treatment (Roche), total RNA was isolated by phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation. Total RNA (1 ug) was reverse-transcribed using the iScript™ Reverse Transcription Supermix (BIORAD) as recommended by the manufacturer. Subsequent qPCR analysis was performed using the SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher) and was monitored on a CFX Real Time System (BIORAD). Gene-specific primers were: A3G forward primer, 5'-GGATCCACCCACATTCACCTT-3', and reverse primer, 5'-ATGCGCTCCACCTCATAAC-3'; A3F forward primer, 5'-CCCGATGGAGGCAATGTATC-3', and reverse primer, 5'-GAGATAGGTGAGTGGTGCTTTAC-3'; β -actin forward primer, 5'-GGAAGTTCGAGCAAGAGATGG-3', and reverse primer, 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'. The A3G and A3F mRNA levels were normalized to those of actin mRNA and relative quantification was determined using the standard curve based method.

RESULTS

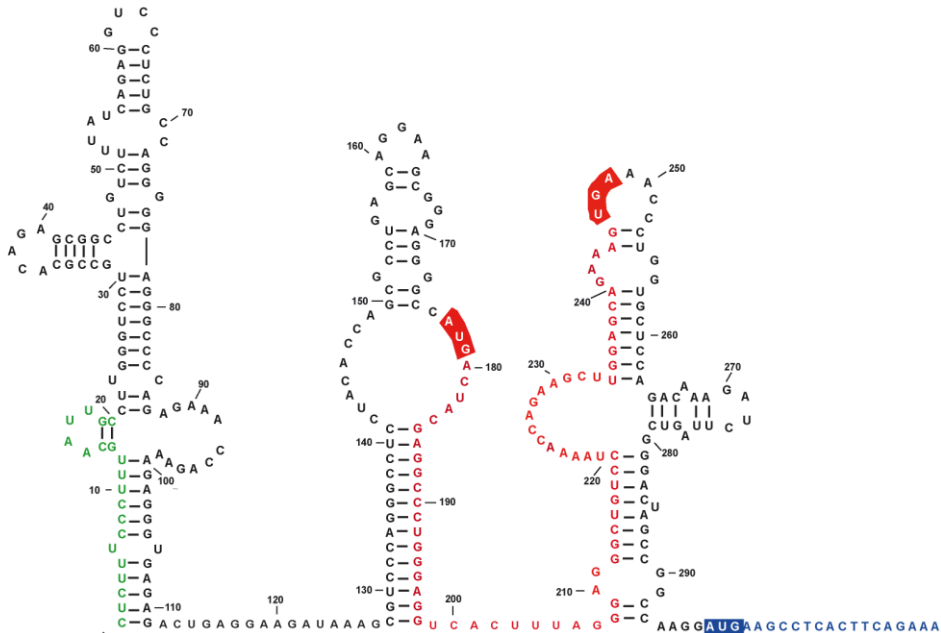
Vif impairs the translation of A3F mRNA in a similar manner as A3G

Considering that A3F, like A3G, has the most antiviral activity against HIV-1 and that Vif can impair the translation of A3G mRNA in cells (Guerrero et al submitted), we asked whether Vif was also able to counteract A3F translation. First, we studied the expression of A3G and A3F in transfected HEK 293T cells from authentic A3G and A3F mRNAs, in presence or in absence of Vif expression. To also discriminate the translational inhibition from the proteasomal degradation, we performed our experiments in presence or absence of ALLN, a chemical proteasome inhibitor. Immunoblotting of normalized cell lysates revealed that the expression of A3G and A3F from wild-type mRNAs was reduced in the presence of Vif and in the presence of ALLN (figure 1A & 1B). After quantitation of the blots, we observed that translational inhibition of A3F and A3G by Vif significantly ranges from 30 to 40% (figure 1B). Moreover, in accordance with others studies (Sheehy et al 2002; Kao et al 2003; Guerrero et al submitted), Vif did not affect A3G and A3F mRNA level, which was shown to be constant in all conditions tested (supporting figure 1), indicating that the reduction of protein level was

A



B



C

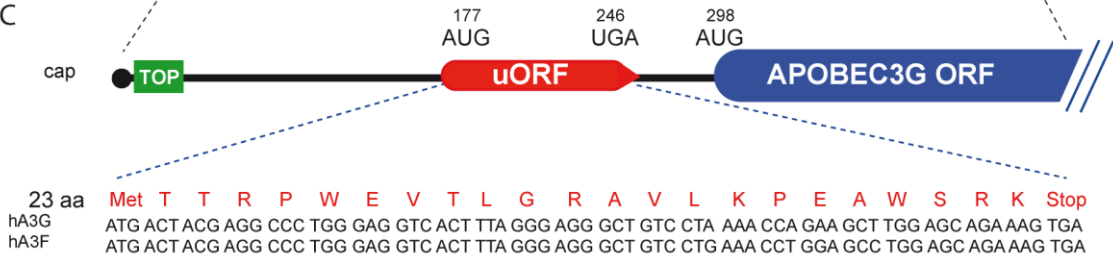


Figure 2: Discovery of an uORF within the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs. **A.** Sequence alignment of A3G and A3F 5'UTR (CLC sequence viewer). **B.** Identification of an uORF within the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs using a computational platform for identifying RNA regulatory elements (RegRNA 2.0). Previously reported A3G mRNA 5'UTR structure (Mercenne et al 2010) the uORF (red). **C.** A sequence alignment of the A3G uORF sequence with A3F.

not the consequence of mRNA degradation or differential transcription rates. Altogether, these results suggest that Vif, beside A3G, also inhibits the translation of A3F mRNA.

Discovery of an uORF within the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs

We previously determined by chemical and enzymatic probing and footprinting experiments that the secondary structure of the 5'UTR of A3G mRNA is composed of three stem-loop (SL) structures and that Vif binds to this region with high affinity (Mercenne et al 2010). Recently, we showed that Vif requires SL2 and SL3 of A3G mRNA to inhibit its translation (Guerrero et al submitted). To go further in the identification of the specific sequences/motifs essential for the A3G translational inhibition by Vif, we used the computational RegRNA 2.0 platform (Chang et al 2013) in order to identify functional RNA regulatory sequences. First, alignment of the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs indicated that the two sequences are highly conserved (around 98% of sequence identity) (figure 2A). Second, we identified the presence of two known motifs within these 5'UTRs: (i) a terminal oligopyrimidine tract (TOP) and (ii) a small uORF (figure 2B). Concerning TOP elements, they have been shown to inhibit the binding of proteins involved in translation (Yamashita et al 2008). This sequence is composed of a 5'cytidine followed by a stretch of 11 pyrimidines immediately after the cap. Although this motif is not completely conserved at the 5'end of A3F mRNA, its sequence is pyrimidine rich. However, the role of this TOP sequence in the translational regulation of A3G mRNA could be ruled out. Indeed, it has recently been shown that mutant A3G SL2-SL3 (deletion of SL1) that does not contain the TOP element showed similar expression profile as wild-type A3G mRNA, in presence or absence of Vif (Guerrero et al submitted). Concerning the uORF, the sequence is 72 nucleotides long and potentially encodes a 23 amino acids peptide (figure 2B & 2C). Moreover, we observed that the Kozak context around the upstream and major ORFs is strong (GGGGCCAUGA for the uAUG and CCAAGGAUGA for the mAUG), suggesting the uAUG is functional. Interestingly, this uORF is embedded into SL2 and SL3 of the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs, suggesting it could account for the translational inhibition previously observed (Guerrero et al submitted).

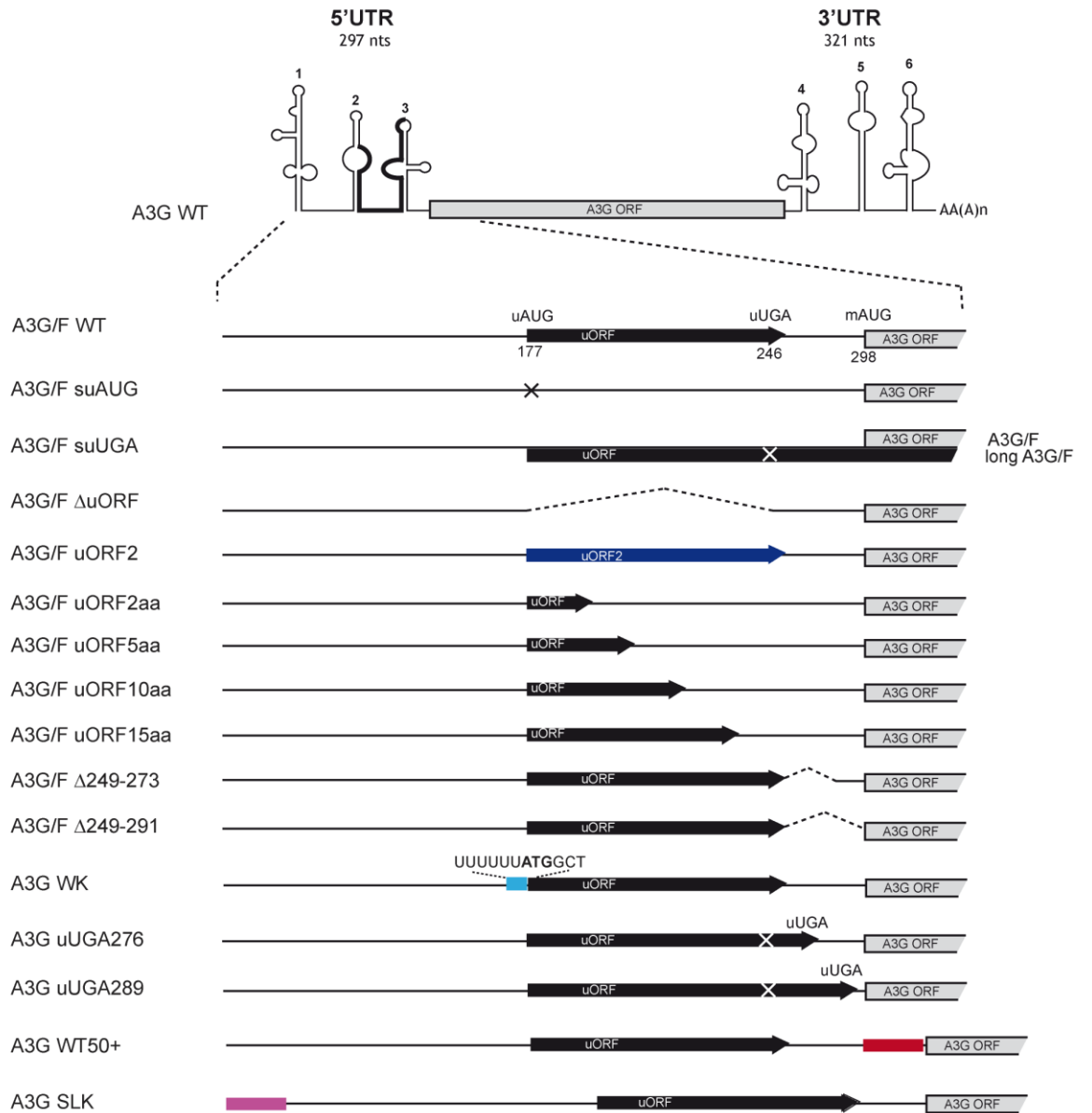


Figure 3: Schematic representation of A3G and A3F constructs used in this study. Wild-type A3G and A3F mRNAs and uORF mutants are represented. Secondary structures of the 5' and 3'UTRs of wild-type A3G mRNA are also indicated with the uORF represented in black.

The uORF represses the translation of wild-type A3G and A3F mRNAs

Before characterizing the Vif-mediated translational inhibition mechanism, it is essential to understand the role of the uORF on the translation of A3G and A3F mRNAs. Upstream ORF sequences are RNA regulatory elements that are well known to reduce protein expression by around 30-80% (Calvo et al 2009). The uORF sequence of A3F/G is located 177 nucleotides after the cap and the distance between this uORF and the main ORF is 49 nucleotides. Several studies revealed that the effect of uORFs on translation depends on several variables such as 1) the distance between the 5'cap and the uORF; 2) the context of the uORF initiation codon; 3) the length of the uORF; 4) the secondary structure of the uORF; 5) the number of uORFs in the 5'UTR; 6) the position of the uORF stop codon; and 6) the length of the intercistronic sequence. In order to study the effect of this uORF on A3G and A3F expression, we constructed a series of A3G and A3F mRNA mutants (figure 3). First, we tested the inactivation of the uORF by either deleting the whole uORF sequence (Δ uORF) or by substituting the upstream AUG start codon of translation (suAUG) (figure 3). The expression of these mutants was examined after transfection of HEK293T cells. Immunoblotting of normalized cell lysates with A3G and A3F-specific antibodies revealed that the expression of A3F/G mutants was increased by 1.5 to 2.5-fold and 4 to 5-fold for A3G and A3F, respectively (figure 4, compare lanes 2-3 to lane 1), suggesting that the uORF intrinsically repressed the translation of wild-type A3G and A3F mRNAs.

Mechanism of translation of A3G and A3F mRNAs

The results presented above show that the uORF negatively regulates the translation of A3G and A3F mRNAs. According to the literature (Barbosa et al, 2013), uORFs can regulate the translation of the main ORF in different manners, and mechanisms such as leaky-scanning, direct translation through an IRES or re-initiation can be envisaged. In order to analyze these various mechanisms, we performed a mutagenesis study on the 5'UTR/uORF of A3G and A3F mRNAs (figure 3). These plasmids were constructed to inactivate the uORF (Δ uORF), to disrupt and weaken the kozak context of the uORF initiation codon (suAUG and WK, respectively), to inactivate the uORF stop (suUGA) codon, to change the putative uORF peptide length (uORF2aa, uORF5aa, uORF10aa, uORF15aa), to change the distance between the two ORFs (Δ 249-273 and Δ 249-291) and to block the ribosome scanning near the cap

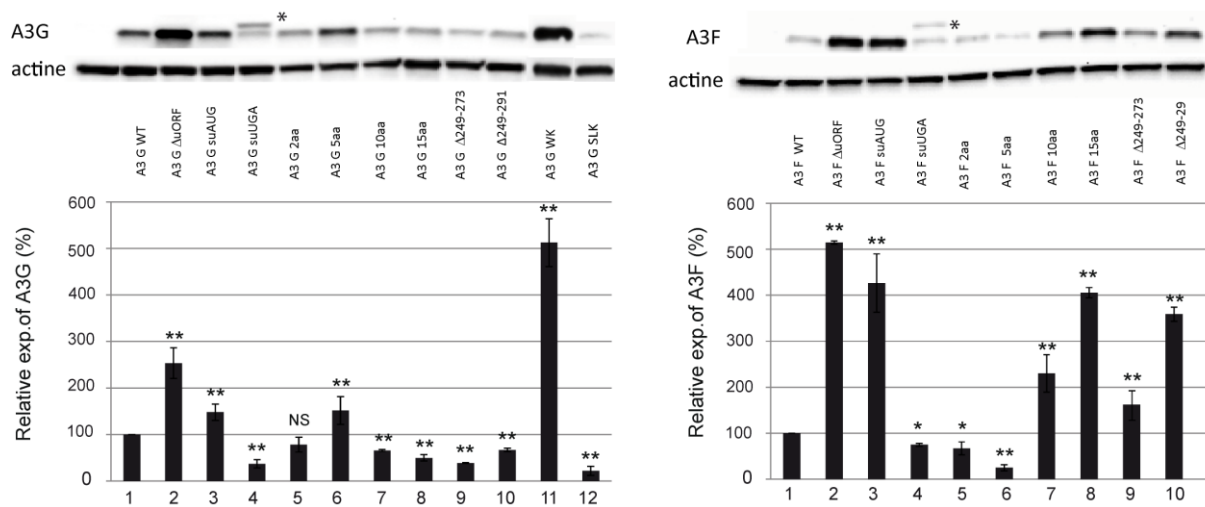


Figure 4: uORF-dependent translation of A3G and A3F mRNAs. Quantitation of the relative expression of A3G and A3F. HEK293T cells were transfected with wild-type or mutated plasmids expressing A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$.

(SLK) in order to observe the uORF effects both in translation and in Vif-mediated translational inhibition.

We previously observed that the expression of two uAUG mutants was increasing (figure 4, lanes 2 & 3) suggesting the implication of the uORF in the translational regulation. Then, we constructed a mutant to inactivate the termination codon of the uORF (uUGA) and we placed the uAUG codon in frame with the main ORF in order to analyze the translation initiation at the uAUG and at the main AUG (figure 3, mutant suUGA). Indeed, if the ribosomal complex recognizes the uAUG, a longer form of A3G and A3F proteins should be observed after western blotting analysis. As expected, we detected the presence of a longer form (figure 4, lane 4 asterisk) in addition to the standard A3G and A3F proteins, suggesting that the AUG initiation codon of the uORF is functional, consistent with its strong Kozak context and that A3G and A3F can be translated by a leaky-scanning mechanism. Indeed, after weakening of the Kozak sequence around the uAUG, we observed an increase of protein expression by around 5 fold (figure 4, lane 11) showing that the uAUG strong Kozak context is an essential element for the translational repression. Interestingly, we observed a diminution of the expression of the main A3G and A3F proteins in the suUGA mutant context (about 50% for A3G and 25% for A3F) (figure 4, lanes 4). Whereas re-initiation is impossible

in this case due to the mutated uORF stop codon, our results suggest that A3G and A3F may partially be translated by re-initiation. However, the fact that wild-type A3G and A3F proteins are still detected in this mutant suggests that the translation of the main ORF could be accomplished by leaky-scanning or through an IRES.

To test the IRES hypothesis, we performed a dual luciferase assay on A3G constructs where the 5'UTR of wild-type and mutants (Δ uORF and suAUG) were inserted between the renilla and firefly luciferases (see Material and Methods). After transfection of these expression vectors in HEK293T cells, we showed that the 5'UTR of wild-type A3G presents a luciferase activity corresponding to 40% of the HCV IRES activity (figure 5). We observed a similar luciferase activity for the mutant A3G suAUG that contains a substitution of its uAUG and which should not perturb the 5'UTR structure. Interestingly, when the uORF was deleted, we did not observe any luciferase activity anymore. These data suggest that the 5'UTR of A3G may contain an IRES, even if its activity is low compared to the one of HCV. To go further in this mechanism, we inserted a stable Kozak stem-loop at the 5'end of A3G mRNA (figure 3, mutant A3G SLK) in order to block ribosome scanning. Interestingly, the expression of this mutant was very low (figure 4, lane 12), ruling out the hypothesis of an IRES-dependent A3G translation.

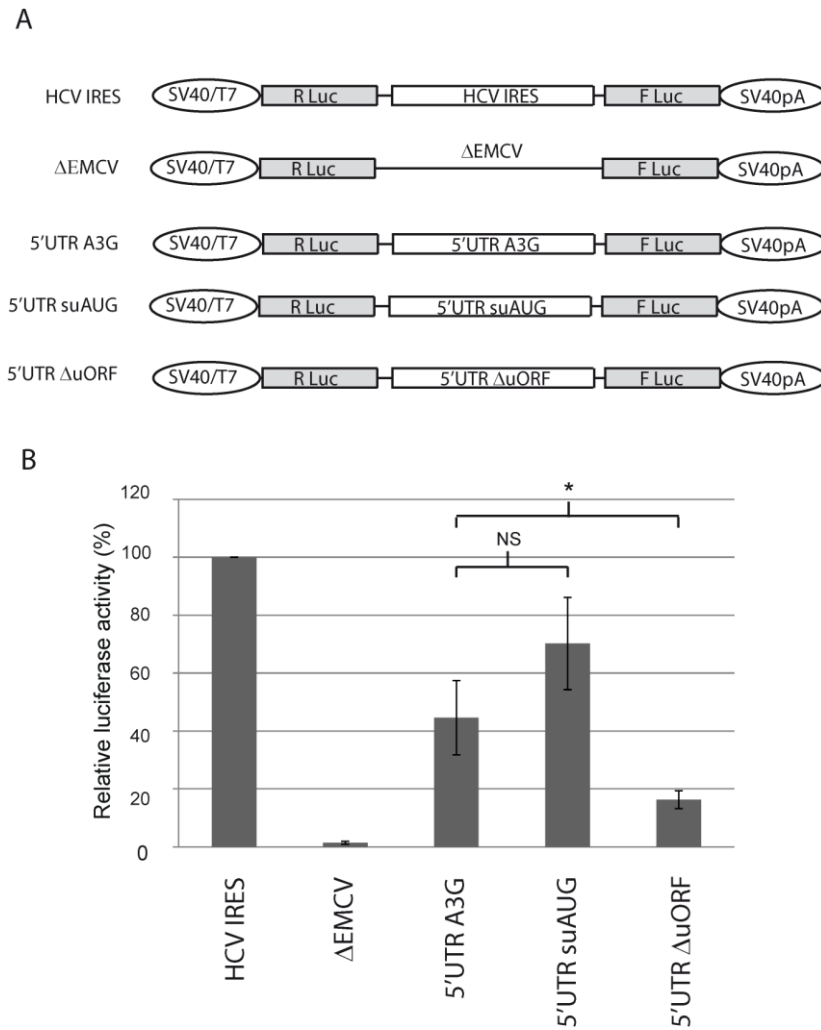


Figure 5: The 5'UTR of A3G mRNA may contain an IRES. A. Schematic representation of pGL3 constructs. **B.** Renilla and Firefly luciferases were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

To determine whether the main ORF is translated by re-initiation, we constructed different mutants based on previous reports. Indeed, it is well known that re-initiation is more efficient when uORF sequences are small (Hinnebusch, 2005) whereas leaky-scanning is not dependent on the length of the uORF (Kozak 2005). Then, reducing the uORF length should enhance A3G and A3F expression if a re-initiation mechanism is involved. First, we tested mutants of A3G and A3F uORF where the putative 23 amino acids peptide was reduced to 2, 5, 10 or 15 amino acids (figure 3). The results showed that A3G mutants 10aa, 15aa and A3F mutants 2aa, 5aa diminished the protein expression whereas A3G 5aa and A3F

10aa, 15aa increased it (figure 4, lanes 5-8), suggesting that the length of the peptide encoded by the uORF somehow regulates the translation of A3G and A3F mRNAs.

Because re-initiation is also dependent on the distance between the uUGA and the main AUG (Kozak 2005), we then reduced the distance between the two ORFs by deleting half (Δ 249-273) or the entire (Δ 249-291) inter-ORF sequence (figure 3). Surprisingly, A3G mutants showed a decrease of protein expression whereas A3F mutants showed an increase of expression (figure 4, lanes 9-10), suggesting that A3G and A3F may present subtle differences in their translation mechanism. Indeed, A3G translation seems to be more dependent on the distance between the uUGA and the main AUG, as predicted for a re-initiation mechanism, contrary to A3F translation.

Importance of the uORF for the A3G/3F translational inhibition by Vif

We then asked whether the uORF is important for the Vif-mediated translational inhibition. We transfected the A3 Δ uORF mutants in HEK293T in presence or absence of Vif and with or without ALLN in order to discriminate the translational inhibition from the proteasomal degradation. The results showed that the Δ uORF mutants present the same expression as the wild-type protein in presence of Vif (around 20%) (figures 1 and 6, lanes 1-2) due to both the proteasomal degradation and the translational inhibition. However, in presence of ALLN, we did not observe any significant decrease of A3G and A3F expression when Vif was present (figure 6, compare lanes 3 & 4), suggesting that the uORF is required for the Vif-mediated translational inhibition. To validate this hypothesis, we transfected A3G and A3F constructs substituted in their upstream initiation codon (suAUG) as described above (figure 6, right panel). As expected, translational inhibition was not observed with these mutants (figure 6 right panel, compare lanes 3 & 4). Taken together, these results indicate that the uORF is essential for the A3G and A3F translational inhibition by Vif.

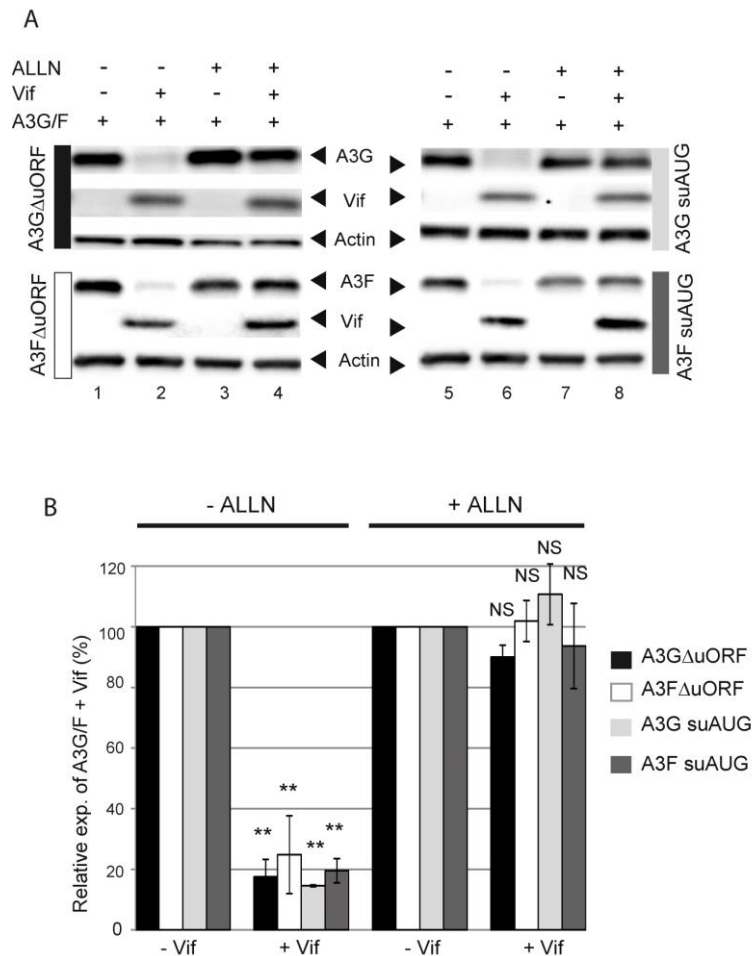


Figure 6: The uORF is important for the translation of A3G and A3F mRNAs. A. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G and A3F Δ uORF and suAUG in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

The peptide encoded by the uORF is not important for the translation inhibition

Next, we asked whether the peptide sequence is important for the translational inhibition mechanism. We then changed the amino acid sequence of the uORF (figure 3, mutant uORF2) by shifting one nucleotide from the uAUG (see Material and Methods) and co-transfected these constructs in presence of Vif with and without ALLN (figure 7). We showed that these mutants present an expression profile similar to wild-type A3G and A3F, with a reduction of protein expression of about 30-40% (figure 7B, lanes 3-4). Taken together, these results suggest that the amino acid sequence of the peptide is not important

for the translational mechanism, ruling out a possible role of this peptide, in conjunction with Vif, to inhibit A3G and A3F translation.

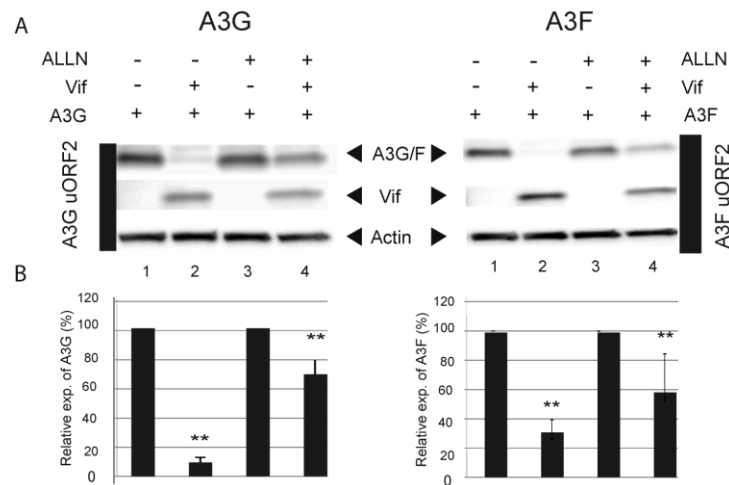


Figure 7: The peptide sequence of the uORF is not required for the translational repression. A. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G and A3F uORF2 in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$.

The peptide length and the distance between the two ORFs are important for the Vif-mediated translational inhibition

We then wanted to know whether the uORF peptide length and the distance between the two ORFs are important for the translational mechanism. To test the effect of the peptide length on the Vif-mediated repression, we co-transfected A3G and A3F 2, 5, 10, 15aa mutants with Vif and ALLN as described above. As observed in [figure 8](#), A3G and A3F 5aa and 10aa did not show any down-regulation of their translation by Vif anymore ([figure 8, lanes 3-4](#)), contrary to mutant 2aa and 15aa, suggesting that the uORF peptide length plays a role in the Vif-mediated translational repression of A3G and A3F. To go further, we tested two other A3G mutants where the peptide length was increased by 9 (A3G uUGA276) or 13 (A3G uUGA289) amino acids ([figure 3](#)). After transfection in HEK293T, we observed that Vif was still able to repress the translation of A3G uUGA276 (20-30%) ([figure 9](#)) contrary to A3G uUGA289 which was insensitive to repression ([figure 9](#)), consistent with the fact that the

peptide length plays a role in the regulation of A3G translational by Vif. The A3G and A3F Δ 249-273 mutants lacking a part of the sequence between the two ORFs showed similar results: no translational inhibition is observed in presence of Vif when the distance between the ORF is smaller, suggesting the importance of the inter-ORF sequence (figure 10, lanes 3-4). However, even if the A3F Δ 249-291 mutant shows the same results, the A3G Δ 249-291 mutant shows a translational inhibition of about 20% (figure 10, lanes 7-8). This result is not in accordance with the A3G uUGA289 translational inhibition but may suggest that Vif could inhibit A3G and A3F translation in a different way. Moreover, an A3G mutant containing a larger inter-ORF sequence (figure 3, mutant A3G WT+50) did not present any translational regulation by Vif anymore (figure 11) confirming that the distance between the uORF stop codon and the main ORF initiation codon is important for the translational inhibition. This is coherent with the absence of translational inhibition of A3G 5aa and 10aa mutants that have a similar distance between the uUGA and the main AUG (around 91 to 106 nucleotides). Taken together, these results show that the peptide length and the distance between the ORFs are essential for the translational repression by Vif.

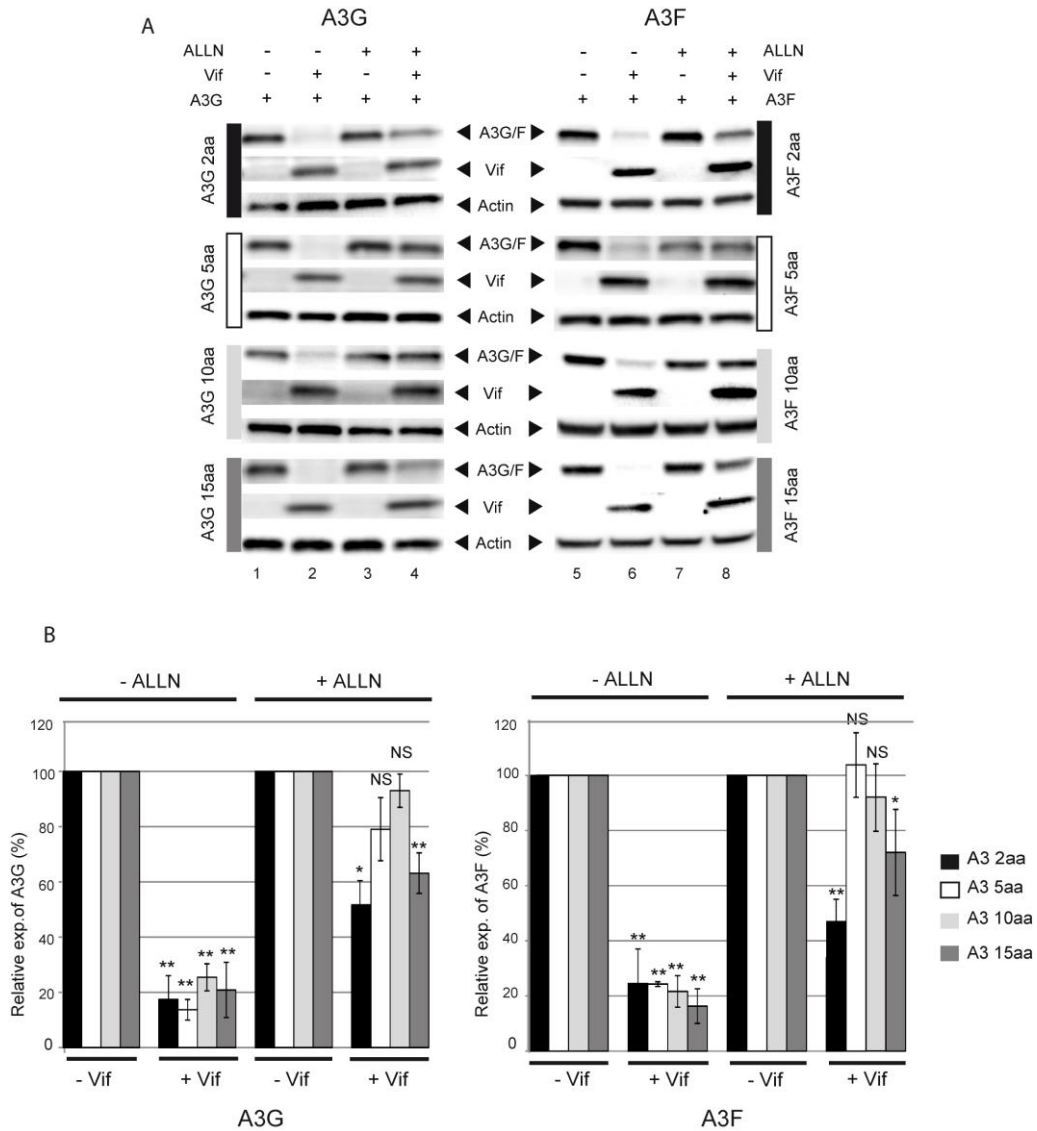


Figure 8: Importance of the uORF peptide length in the translational regulation. **A.** HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G and A3F uORF 2aa, 5aa, 10aa and 15aa in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

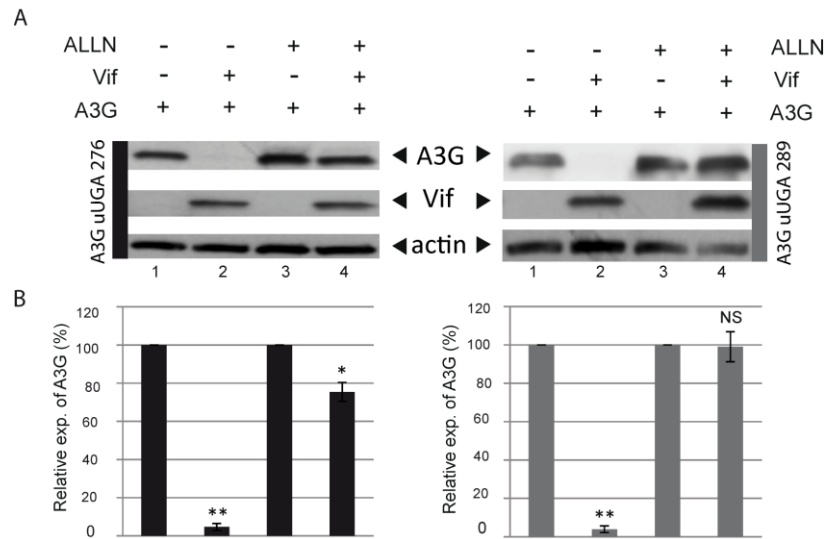


Figure 9: Effect of an increase of the uORF peptide length on the translational regulation. A. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G uUGA276 and A3G uUGA289 in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

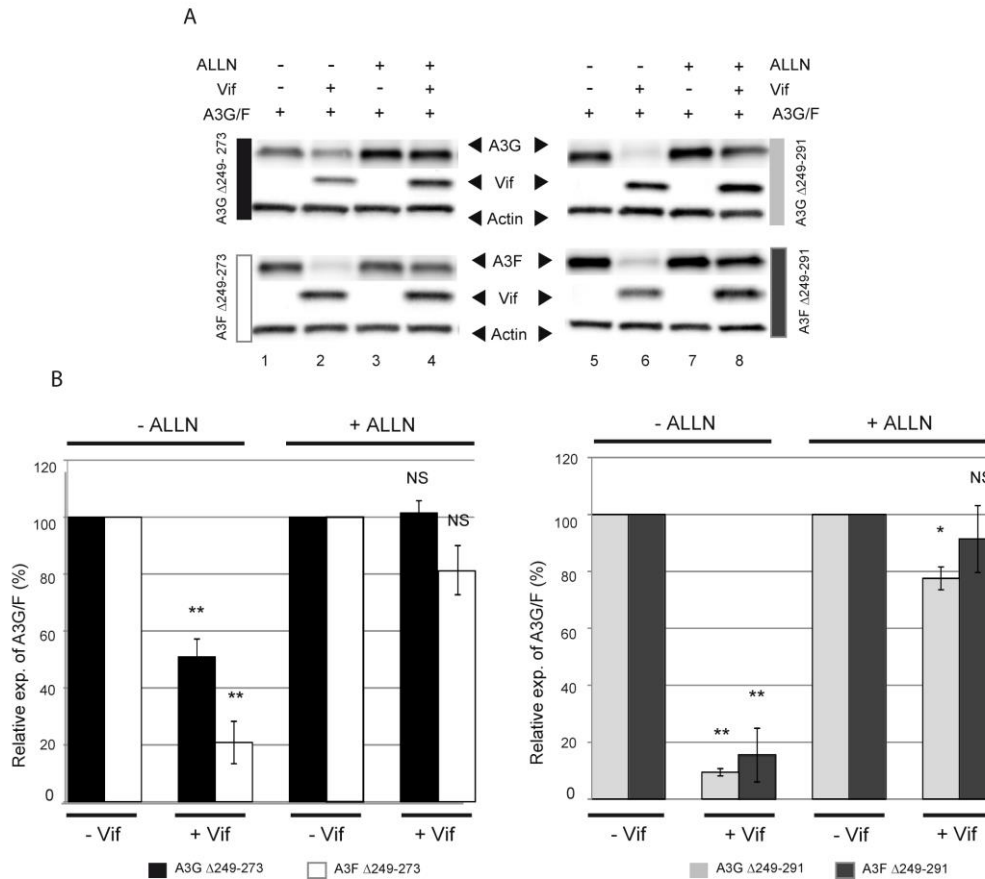


Figure 10: Effect of a decrease of the distance between the two ORFs on the translational regulation. **A.** HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G and A3F Δ 249-273 and Δ 249-291 in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of the relative expression of A3G and A3F. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

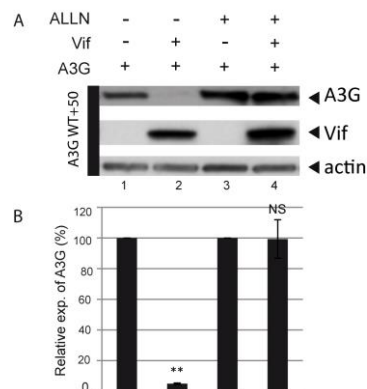


Figure 11: Importance of the distance between the two ORFs on the translational regulation. **A.** HEK293T cells were transfected with plasmids expressing A3G WT+50 in the presence or absence of Vif expression and in the presence or absence of a proteasome inhibitor (ALLN). **B.** Quantification of

the relative expression of A3G. Standard deviations are representative for at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

DISCUSSION

The human cytidine deaminases A3G and A3F potently restrict HIV-1 but the virus, in response to this antiviral effect, expresses Vif that will degrade A3G and A3F. Vif can recruit an E3 ubiquitin ligase complex to induce A3G and A3F degradation but can also inhibit their translation. Because the proteasome-mediated degradation pathway and the translational inhibition similarly contribute to decrease the level of A3G/F and prevent their incorporation into virions, it appears important to determine the mechanism of Vif-mediated translational inhibition. In the present study, we enhanced our comprehension on the molecular mechanism of translational repression by Vif. First, we demonstrate that Vif was able to counteract A3F translation in a similar manner as A3G in agreement with the fact that A3G and A3F mRNAs present a high degree of sequence identity (figure 2A). After the identification of a small uORF within the 5'UTR of A3G and A3F mRNAs, we used mRNA constructs mutated in this uORF in order to test the impact of this sequence both in the translation and in the translational repression mechanism of A3G and A3F. We observed that this uORF represses the translation of A3G and A3F mRNAs (figure 4), as previously observed for several others genes like the tyrosine kinases HCK, LCK, ZAP70, YES1 or the oncogenes MDM2 and CDK4 (Wethmar et al 2016). Moreover, we showed that the uORF regulation requires uAUG recognition by the scanning ribosomes (figure 4) as msl-2 mRNA (Medenbach et al 2011). However, it seems that the translational regulation of this mRNA also occurs *via* its 3'UTR that does not seem to be the case for A3G and A3F mRNA. Furthermore, a suUGA mutant allowed us to observe that the translation of A3G and A3F can be mediated by both leaky-scanning and re-initiation (figure 4). Moreover, other experiments showed the absence of A3G 5'UTR IRES activity (figure 4). However, a situation where the translational control involves both uORF and IRES element would not have been surprising. Indeed, several examples have already been described such as the Cat-1 mRNA where the IRES inactive conformation is restructured into the active IRES during the uORF translation (Somers et al 2013). We also showed that the distance between the uUGA and the main AUG is important for the translational regulation strengthening the hypothesis of a re-

initiation mechanism. Further studies will be needed to clearly establish the ratio between leaky-scanning and re-initiation involved in the A3G and A3F translation. One of them could be the study of the nucleotide context surrounding the uORF stop codon. Indeed, this sequence could contribute to several functions such as ribosomal stalling as observed in the regulation of the human cytomegalovirus gpUL4 (gp48) gene (Bhushan et al 2010). In this case, the ribosome is stopped by a mechanism dependent on the nascent uORF peptide. The termination of the uORF can influence the re-initiation mechanism as in the CAD1 mRNA (Vilela et al 1999) where the uORF termination sequence is a re-initiation inhibitory element because it promotes UPF1-independent mRNA degradation. Finally, the uORF termination context can play a role in the mRNA decay (Wethmar 2014). Studies in mammalian cells and yeast showed that uORF-bearing mRNAs are susceptible to be targeted by NMD which is attributed to the terminations events occurring at uORF stop codons (Mendell et al 2004; He et al 2003).

To test the impact of the uORF on the Vif-mediated translational mechanism, we performed our experiments under conditions where the proteasomal pathway was inhibited, and we showed that the uORF sequence was important for this mechanism. Moreover, we also observed that the amino acid sequence of the uORF is not directly implicated in this repression excluding a peptide *trans* effect on Vif-mediated repression. Finally, we noticed that the uORF peptide length and the distance between the two ORFs are also related to the translational inhibition. According to these observations, we can propose a mechanism by which Vif induces A3G and A3F translational repression. Indeed, Vif is not able to inhibit the A3G/F uAUG mutant translation. In this context, the main protein is translated by a ribosome scanning mechanism but is not stopped by the uORF because the uAUG codon is not recognized by the ribosome. On the contrary, the translational repression mechanism seems to be dependent on the uORF peptide length and the distance between the two ORFs. Our data support a mechanism where Vif could inhibit the translation of A3G and A3F mRNAs within the uORF sequence or between the uORF termination codon and the main AUG codon. Deciphering the mechanism of the Vif-mediated translational inhibition of A3F/G mRNAs will be important to find new molecular inhibitors able to counteract Vif activity and reduce viral infectivity.

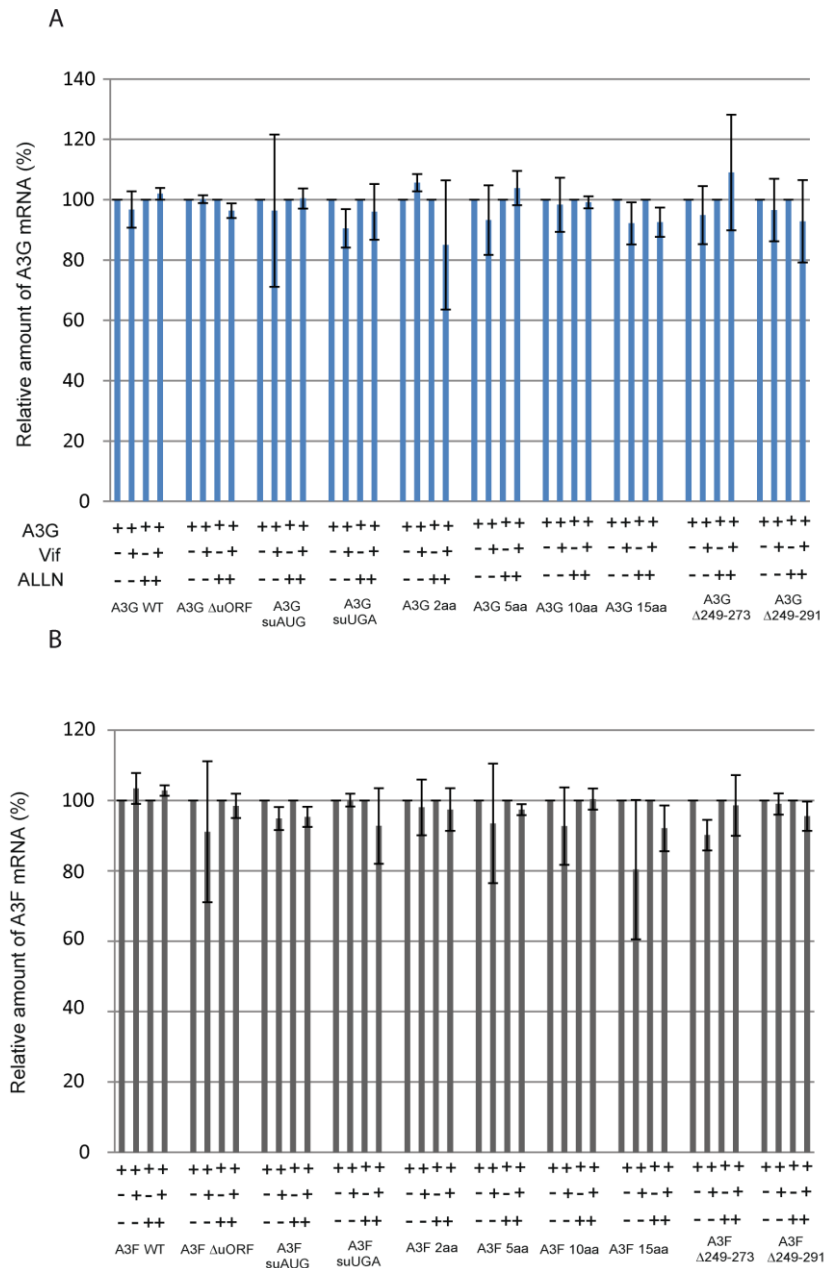
Table 1: Description of the primers used in this study

A3G ΔuORF	pS-ΔuORF A3G 5'- GAAGCGGGAGGGGCAACCCTGGTGCTCCA-3'
	pAS- ΔuORF A3G 5'- TGGAGCACCAGGGTTGGCCCTCCCGCTTC-3'
A3G suAUG	pS-suAUG A3G 5'- GAAGGGGAGGGGCAAGACTACGAGGCCCTGG-3'
	pAS-suAUG A3G 5'-CCAGGGCCTCGTAGTCTTGGCCCTCCCCCTTC-3'
A3G suUGA	pS-suUGA A3G 5'- GCCTGGAGCAGAAAGGAAACCCTGGTGCTCCA-3'
	pAS-suUGA A3G 5'- TGGAGCACCAGGGTTTCCTTTCTGCTCCAGGC-3'
A3G 2aa	pS-A3G2aa A3G 5'- GCCATGACTACGTGATGATGGGAGGTCACT-3'
	pAS- A3G2aa A3G 5'- AGTGACCTCCCATCATCACGTAGTCATGGC-3'
A3G 5aa	pS-A3G5aa A3G 5'- ACGAGGCCCTGGTGATGAACTTTAGGGAGG-3'
	pAS-A3G5aa A3G 5'- CCTCCCTAAAGTTCATCACCAGGGCCTCGT-3'
A3G 10aa	pS-A3G10aa A3G 5'-GTCACCTTAGGGTGATGAGTCCTAAAACCA-3'
	pAS-A3G10aa A3G 5'- TGGTTTTAGGACTCATCACCTAAAGTGAC-3'
A3G 15aa	pS-A3G15aa A3G 5'- GCTGTCCTAAAATGATGAGCTTGGAGCAGA-3'
	pAS-A3G15aa A3G 5'- TCTGCTCCAAGCTCATCATTTTAGGACAGC-3'
A3G Δ249-273	pS-Δ25 A3G 5'- TGGAGCAGAAAGTGATTAGTCGGGACTAGC-3'
	pAS-Δ25 A3G 5'- GCTAGTCCCGACTAATCACTTTCTGCTCCA-3'
A3G Δ249- 291	pS-Δ50 A3G 5'- TGGAGCAGAAAGTGACCAAGGATGAAGCCT-3'
	pAS-Δ50 A3G 5'- AGGCTTCATCCTTGGTCACTTTCTGCTCCA-3'
A3G WK	pS-A3GWK 5'-GAAGCGGGAAAAAAAAATGGCTACGAGGCCCT-3'
	pAS-A3GWK 5'-AGGGCCTCGTAGCCATAAAAAATCCCGCTTC-3'
A3G uORF2	pS-A3G uORF2 5'- GGGAGGGGCCATGGACTACGAGGCCCTGG-3'
	pAS-A3G uORF2 5'- CCAGGGCCTCGTAGTCCATGGCCCTCCC-3'
	pS-A3G uORF2 5'- CTTGGAGCAGAAATGAAACCCTGGTGCTCC-3'
	pAS-A3G uORF2 5'- GGAGCACCAGGGTTTCATTTCTGCTCCAAG-3'
A3G uUGA276	pS-A3G 25 5'-CTCCAGACAAAGATCTGATTAGTCGGGACTAGC-3'
	pAS-A3G 25 5'-GCTAGTCCCGACTAATCAGATCTTTGTCTGGAG-3'

A3G uUGA289	pS-A3G uUGA289 5'-TTAGTCGGGACTAGCTGACGGCCAAGGATGAAG-3'
	pAS-A3G uUGA289 5'-CTTCATCCTTGGCCGTCAGCTAGTCCCGACTAA-3'
A3G WT+50	pS-A3G TB 5'- GTACAGCTGTCATTTGCACCACTAATGCTATAAGGATGAAGCCTCACTTCA-3'
	pAS-A3G TB 5'- TACCAGCTGTCTCTGCACCACTTGGGTGCTATGGCCGGCTAGTCCCGACTAA-3'

A3F ΔuORF	pS-ΔuORF A3F 5'-GAAGGGGGAGGGGCCAACCCCTGGTGCTCCA-3'
	pAS- ΔuORF A3F 5'-TGGAGCACCAGGGTTGGCCCCCTCCCCTTC-3'
A3F suAUG	pS-suAUG A3F 5'-GAAGGGGGAGGGGCCAAGACTACGAGGCCCTGG-3'
	pAS-suAUG A3F 5'-CCAGGGCCTCGTAGTCTTGGCCCCCTCCCCTTC-3'
A3F suUGA	pS-suUGA A3F 5'-GCCTGGAGCAGAAAGGAAACCCTGGTGCTCCA-3'
	pAS-suUGA A3F 5'-TGGAGCACCAGGGTTTCCTTTCTGCTCCAGGC-3'
A3F 2aa	pS-A3F2aa A3F 5'-GGGGCCATGACTACGTGATGATGGGAGGTCACITTA-3'
	pAS- A3F2aa A3F 5'-TAAAGTGACCTCCATCATCACGTAGTCATGGCCCC-3'
A3F 5aa	pS-A3F5aa A3F 5'-ACTACGAGGCCCTGGTGATGAACTTTAGGGAGGGCT-3'
	pAS-A3F5aa A3F 5' - AGCCCTCCCTAAAGTTCATCACCAGGGCCTCGTAGT-3'
A3F 10aa	pS-A3F10aa A3F 5'-GAGGTCACITTTAGGGTGATGAGTCCTGAAACCTGGA-3'
	pAS-A3F10aa A3F 5'-TCCAGGTTTCAGGACTCATCACCTAAAGTGACCTC-3'
A3F 15aa	pS-A3F15aa A3F 5'-AGGGCTGTCCTGAAATGATGAGCCTGGAGCAGAAAG-3'
	pAS-A3F15aa A3F 5'-CTTTCTGCTCCAGGCTCATCITTCAGGACACCCT-3'
A3F Δ249-273	pS-Δ25 A3F 5'-TGGAGCAGAAAGTGATTAGTCGGGACTAGC-3'
	pAS-Δ25 A3F 5'-GCTAGTCCCGACTAATCACTTTCTGCTCCA-3'
A3F Δ249- 291	pS-Δ50 A3F 5'-TGGAGCAGAAAGTGACCAAGGATGAAGCCT-3'
	pAS-Δ50 A3F 5'-AGGCTTCATCCTTGGTCACTTTCTGCTCCA-3'
A3F uORF2	pS-A3F uORF2 5'-GGGAGGGGCCATGGACTACGAGGCCCTGG-3'
	pAS-A3F uORF2 5'-CCAGGGCCTCGTAGTCCATGGCCCCCTCCC-3'
	pS-A3F uORF2 5'-AGCCTGGAGCAGAAATGAAACCCTGGTGCT-3'

pAS-A3F uORF2 5'-AGCACCAGGGTTTCATTTCTGCTCCAGGCT-3'



Supporting figure 1: APOBEC3G and APOBEC3F mRNA expression level in HEK293T transfected cells. Total RNA was extracted from transfected HEK293T cells and A3G and A3F qPCR were performed to study the expression of A3G and A3F constructs. Standard deviations are

representative of at least three independent experiments. P-values are indicated as follows: * $<0,05$; ** $<0,01$; NS: non significant.

REFERENCES

- Barbosa, C., Peixeiro, I., and Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* 9, e1003529.
- Bhushan, S., Meyer, H., Starosta, A.L., Becker, T., Mielke, T., Berninghausen, O., Sattler, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2010). Structural basis for translational stalling by human cytomegalovirus and fungal arginine attenuator peptide. *Mol. Cell* 40, 138–146.
- Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., and Mootha, V.K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7507–7512.
- Chang, T.-H., Huang, H.-Y., Hsu, J.B.-K., Weng, S.-L., Horng, J.-T., and Huang, H.-D. (2013). An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 2, S4.
- Gillick, K., Pollpeter, D., Phalora, P., Kim, E.-Y., Wolinsky, S.M., and Malim, M.H. (2012). 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.* 87, 1508–1517.
- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803–809.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450.
- Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A., and 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. *J. Virol.* 77, 11398–11407.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13–37.
- Malim, M.H. (2009). APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 675–687.
- Mbisa, J.L., Bu, W., and Pathak, V.K. (2010). APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J. Virol.* 84, 5250–5259.
- Medenbach, J., Seiler, M., and Hentze, M.W. (2011). Translational Control via Protein-Regulated Upstream Open Reading Frames. *Cell* 145, 902–913.

- Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriët, S., Paillart, J.-C., and Marquet, R. (2010). HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* *38*, 633–646.
- Newman, E.N., Holmes, R.K., Craig, H.M., Klein, K.C., Lingappa, J.R., Malim, M.H., and Sheehy, A.M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.* *15*, 166–170.
- Nguyen, K.L., Ilano, M., Akari, H., Miyagi, E., Poeschla, E.M., Strebel, K., and 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.
- Refsland, E.W., and Harris, R.S. (2013). The APOBEC3 Family of Retroelement Restriction Factors. In *Intrinsic Immunity*, B.R. Cullen, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–27.
- 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. (2014). APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and Evolution in Humanized Mouse Model. *PLoS Pathog.* *10*, e1004453.
- Somers, J., Pöyry, T., and Willis, A.E. (2013). A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1690–1700.
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., and Greene, W.C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* *12*, 591–601.
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M.A. (1987). The HIV “A” (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* *328*, 728–730.
- Vilela, C., Ramirez, C.V., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C., and McCarthy, J.E. (1999). Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *EMBO J.* *18*, 3139–3152.
- Wethmar, K. (2014). The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *5*, 765–778.
- Wethmar, K., Schulz, J., Muro, E.M., Talyan, S., Andrade-Navarro, M.A., and Leutz, A. (2016). Comprehensive translational control of tyrosine kinase expression by upstream open reading frames. *Oncogene* *35*, 1736–1742.
- Yamashita, T., Kamada, K., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. (2008). Identification of amino acid residues in HIV-1 Vif critical for binding and exclusion of APOBEC3G/F. *Microbes Infect.* *10*, 1142–1149.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* *302*, 1056–1060.
- Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H., and Bieniasz, P.D. (2004). APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *J. Virol.* *78*, 12058–12061.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* *424*, 94–98.

III. DOMAINES DE VIF IMPLIQUES DANS L'INHIBITION TRADUCTIONNELLE

Après avoir observé la conservation de l'inhibition traductionnelle à travers différents sous-types de VIH-1 dans l'article #1 « Translational regulation of APOBEC3G mRNA by Vif requires its 5'UTR and contributes to restoring HIV-1 infectivity », nous avons cherché à identifier les domaines de Vif impliqués dans cette inhibition traductionnelle. Bien que Vif soit exprimée par tous les sous-types du VIH-1, sa séquence varie en fonction des isolats (banque de séquences Los Alamos, <http://www.hiv.lanl.gov>). Afin d'identifier les domaines de Vif importants pour l'inhibition traductionnelle, nous nous sommes intéressés à plusieurs sous-types de Vif (Binka et al 2012). Après avoir observé que tous les sous-types de Vif permettaient l'inhibition traductionnelle d'A3G et que certaines Vif avaient une plus forte activité inhibitrice que d'autres (Figure 9, article #1), nous avons spécifiquement étudié les séquences de ces protéines. En alignant les séquences de Vif représentant 15 sous-types différents ayant environ 15% de diversité avec le groupe B (figure 30), nous avons remarqué une grande hétérogénéité dans quatre domaines distincts (31-50 ; 61-70 ; 121-140 et 151-160). Ces domaines étant connus pour leur implication dans l'interaction avec A3G, A3F, Cul5, EloB et EloC, nous nous sommes intéressés à ces derniers.

Grâce à un alignement des deux Vif ayant la plus forte activité inhibitrice de la traduction d'A3G (sous-type A2 et D1) avec les deux Vif ayant la plus faible activité inhibitrice (sous-type C1 et BLAI), nous avons observé que certains acides aminés sont conservés chez A2 et D1 d'une part, ainsi que chez C1 et BLAI d'autre part, à la même position. Ainsi, les acides aminés F39, H48 et H127 sont conservés chez les Vif de types BLAI et C1 alors que les acides aminés L39, N48 et Q127 sont conservés chez les Vif de types A2 et D1 (figure 31). De plus, il a été montré dans la littérature que ces acides aminés font partie de domaines impliqués dans diverses fonctions de Vif parmi lesquelles des interactions avec des protéines cellulaires. Ainsi, le domaine situé près de l'acide aminé 39 est impliqué dans l'interaction avec A3G (Mehle et al 2007), tout comme l'acide aminé N48 (Binka et al 2011), et le domaine 108-139 dans lequel se trouve l'acide aminé 127 constitue un motif en doigt de zinc qui interagit à la fois avec la culline 5 mais également avec les EloB/EloC constituant le

complexe E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation d'A3G et d'A3F par le protéasome.

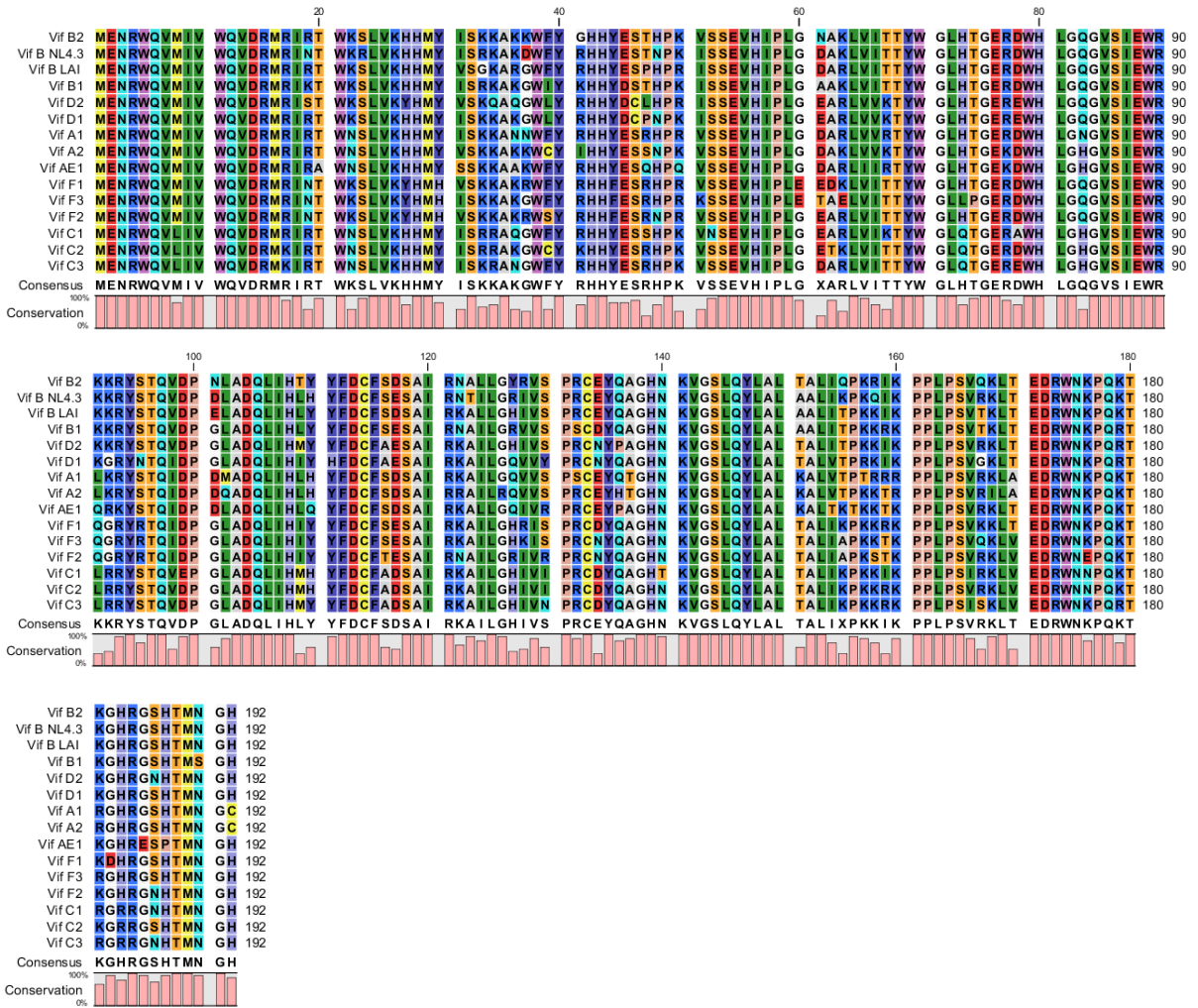


Figure 30 : Alignement des Vif des différents sous-types testés (CLC sequence viewer).

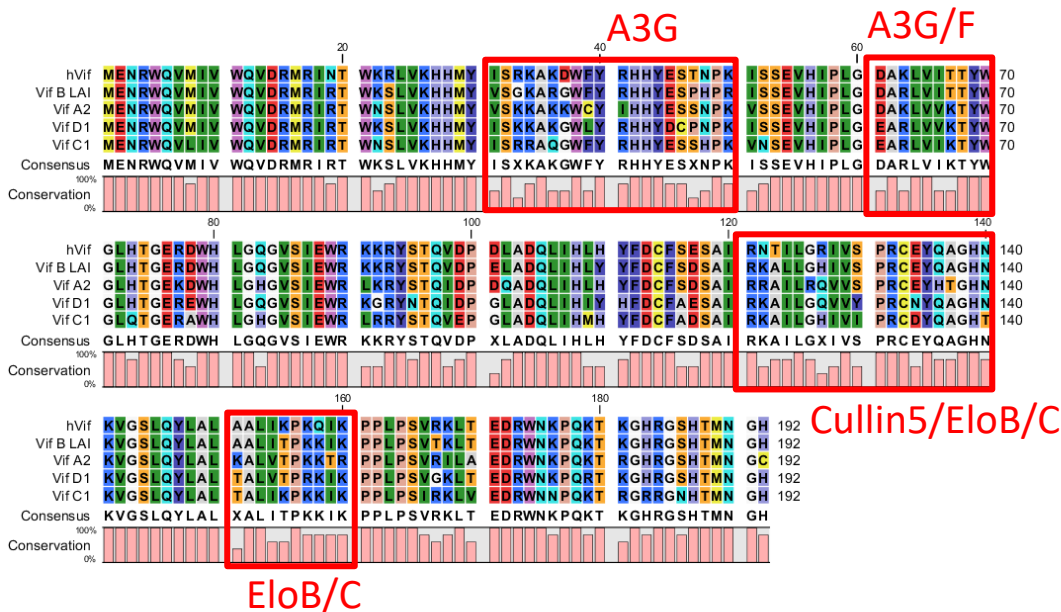


Figure 31 : Alignement des Vif de sous-types BLAI, A2, D1 et C1 (CLC sequence viewer).

Afin de tester l'implication de ces trois acides aminés dans l'inhibition traductionnelle sans modifier la structure des Vif, nous avons tout d'abord envisagé d'échanger ces trois acides aminés par mutagenèse dirigée et de vérifier l'augmentation ou la diminution de l'activité inhibitrice de la traduction d'A3G. Ainsi, nous avons inséré les acides aminés F39, H48 et H127 (spécifiques des Vif C1 et BLAI) à Vif D1 et L39, N48 et Q127 (spécifiques des Vif A2 et D1) à Vif C1. Après co-transfections de ces plasmides avec A3G sauvage en conditions où le protéasome est inhibé par ajout d'ALLN, nous avons comparé les activités inhibitrices de ces Vif mutées avec celles des Vif D1 et C1 sauvages. En ce qui concerne Vif D1, les résultats de ces transfections montrent que Vif D1 L39F a la même activité que Vif D1 sauvage alors que les Vif D1 N48H et Q127H ne présentent plus d'activité inhibitrice (figure 32A). Ces résultats suggèrent que les acides aminés N48 et Q127 jouent un rôle positif pour le sous-type D1 dans l'inhibition traductionnelle d'A3G par Vif. Lors des transfections des Vif C1, nous avons observé que Vif C1 F39L a une inhibition traductionnelle d'environ 20% tandis que les Vif C1 H48N et H127Q n'ont plus d'activité inhibitrice (figure 32B). Ces données suggèrent que les acides aminés H48 et H127 ont un rôle positif pour le sous-type C1 dans l'inhibition traductionnelle par Vif. Nous avons également échangé simultanément les trois acides aminés des Vif D1 et C1 et comparé leur activité inhibitrice avec celle des protéines D1 et C1 sauvages. Les résultats montrent une inhibition traductionnelle plus faible pour Vif D1 mutée que pour Vif D1 sauvage alors que Vif C1 mutée n'a plus aucune activité inhibitrice (figure 32C). Ce résultat suggère que les acides aminés F39, H48 et H127 réunis peuvent jouer un rôle positif dans l'inhibition traductionnelle pour le sous-type C1 mais que les acides aminés L39, N48 et Q127 ensemble ne sont pas suffisants pour rétablir l'inhibition traductionnelle de Vif. Cependant, l'échange d'acides aminés de charges différentes peut aussi avoir un impact sur l'effet de Vif. En effet, les histidines chargées positivement sont remplacées par des acides aminés non chargés tels que l'asparagine et la glutamine. De plus, les acides aminés échangés dans cette étude sont disposés de façon à interagir avec d'autres protéines telles qu'A3G, la culline 5, l'élongine B et l'élongine C dans la structure tridimensionnelle de Vif (Guo et al 2014) ce qui suggère que le remplacement de certains acides aminés par d'autres peut affecter l'interaction avec celles-ci. L'activité inhibitrice de Vif semble donc dépendre du contexte dans lequel ces acides aminés sont ou de la structure de la protéine dans le cas où ces mutations induisent un changement de conformation de Vif.

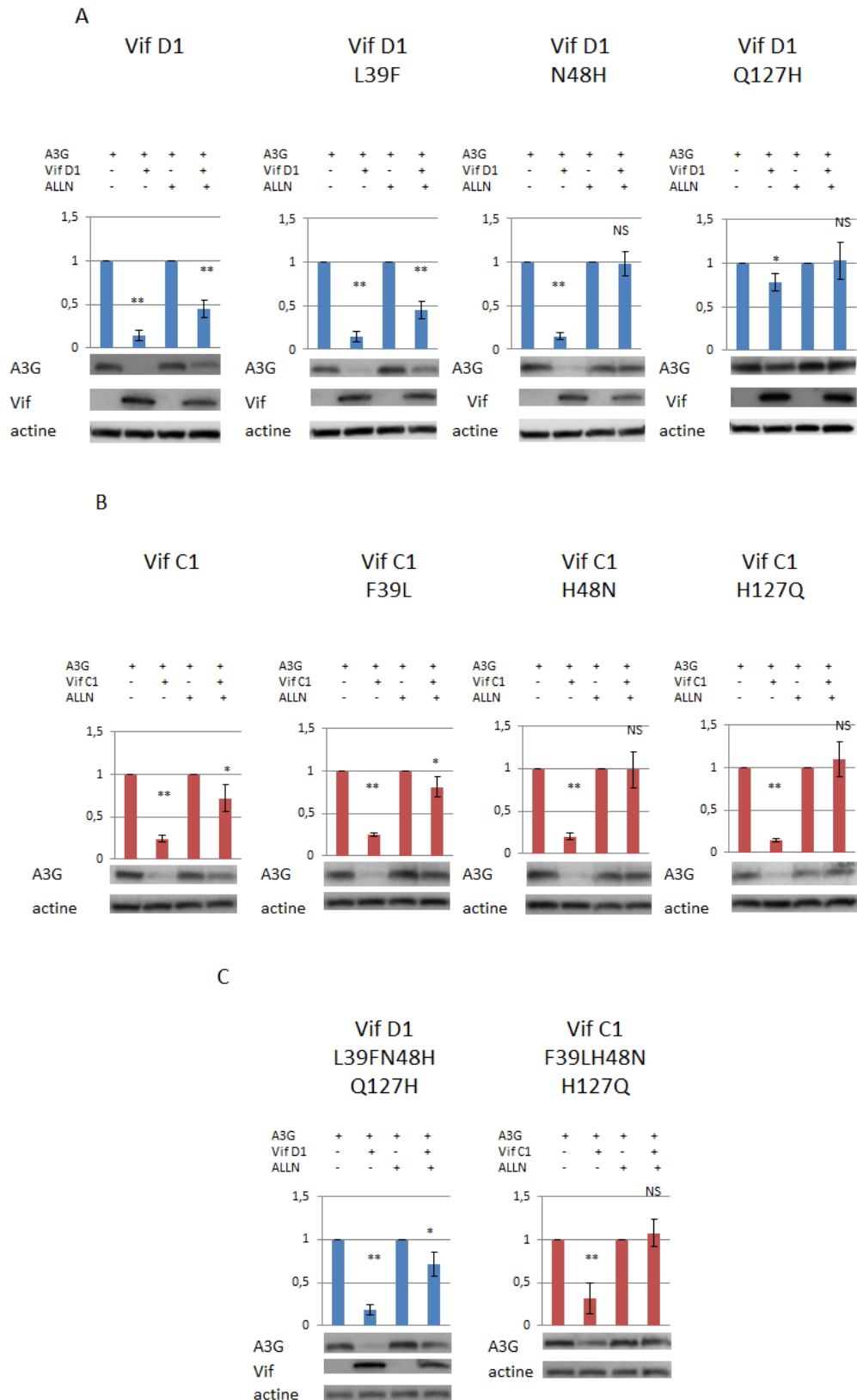


Figure 32 : Inhibition traductionnelle médiée par les Vif de sous-types D1 et C1 mutées

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide exprimant A3G sauvage avec ou sans Vif ainsi qu'en présence ou en absence d'ALLN. Leur expression relative correspond à la quantification de leur expression par

rapport à celle de l'actine. Les écart-types représentent trois expériences indépendantes. L'anticorps anti-Vif utilisé ne permet pas de reconnaître les Vif de type C1.

IV. UNE INTERACTION A3G-VIF EST-ELLE NECESSAIRE POUR L'INHIBITION TRADUCTIONNELLE ?

Après avoir observé l'inhibition traductionnelle d'A3G, nous avons voulu savoir si ce mécanisme est lié ou non avec l'interaction d'A3G à Vif. La protéine Vif possède de nombreux sites de fixation à A3G, plusieurs domaines d'interaction sont situés en partie N-terminale tels que les domaines ²¹WKSLVK²⁶, ⁴⁰YRHHY⁴⁴, ⁵⁵VxIPLx4L⁶⁴, ⁶⁹YWxL⁷² ou encore ⁸⁵VSIEW⁸⁹ (Mehle et al 2007 ; Dang et al 2009 ; Pery et al 2009). En ce qui concerne A3G, les résidus responsables de l'interaction avec Vif se situent entre les positions 126-132. De plus, il a été montré que cette interaction peut être inhibée par la seule substitution de l'acide aminé D128 d'A3G par une lysine (D128K) (Xu et al 2004). Par ailleurs, cette substitution confère une résistance d'A3G à Vif ayant pour conséquence une diminution de l'infectivité virale.

Nous avons transfecté A3GD128K en présence et en absence de Vif ainsi qu'en présence et en absence d'ALLN. Nos résultats confirment que la protéine A3G D128K est bien insensible à la dégradation induite par Vif (figure 33, piste 1-2). Cependant, et de façon surprenante, nous n'observons pas d'inhibition traductionnelle d'A3G D128K par Vif en présence d'inhibiteur du protéasome (figure 33, piste 3-4), malgré la présence de l'uORF sur la 5'UTR, ce qui suggère que l'interaction entre Vif et A3G est importante pour l'inhibition traductionnelle d'A3G. De plus, lorsque nous transfectons le mutant Vif K26R interagissant encore avec A3G, nous observons encore une inhibition traductionnelle d'A3G (article #1, figure 6). Nous avons donc constaté une corrélation entre l'inhibition traductionnelle induite par Vif avec son interaction avec A3G.

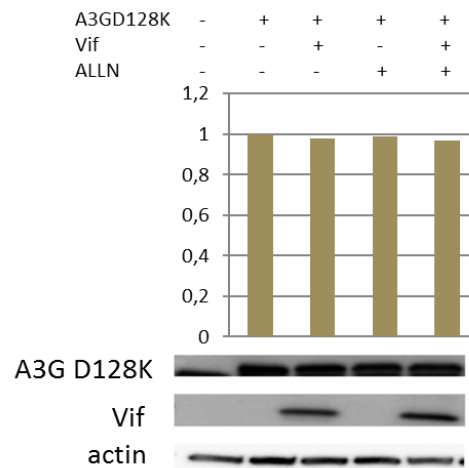


Figure 33 : A3GD128K n'interagissant pas avec Vif n'a pas de régulation de sa traduction

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide exprimant A3G D128K avec ou sans Vif ainsi qu'en présence ou en absence d'ALLN. Leur expression relative correspond à la quantification de leur expression par rapport à celle de l'actine.

Afin de tester si l'interaction entre A3G et Vif a un effet sur l'inhibition traductionnelle d'A3G, nous avons transfecté le plasmide exprimant A3G D128K (insensible à la dégradation induite par Vif et n'interagissant pas avec Vif) avec un plasmide exprimant A3G à partir d'un vecteur dépourvu des régions non traduites (A3G Δ UTR insensible à l'inhibition traductionnelle imposée par Vif et interagissant avec Vif). Afin de détecter chacune des protéines A3G (sauvage et D128K), celles-ci ont été étiquetées avec un tag HA (A3G Δ UTR) et un tag c-myc (A3G D128K) (**figure 34**).

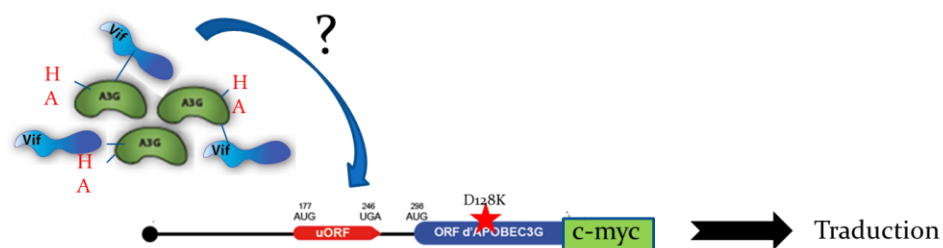


Figure 34 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail

De façon intéressante, nous observons que l'expression de quantité croissante d'A3G Δ UTR (de 0,1 à 2 μ g) diminue considérablement l'expression d'A3G D128K (environ 60%) en présence d'ALLN (**figure 35**). Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que l'interaction entre Vif et A3G est nécessaire afin de promouvoir l'inhibition traductionnelle d'A3G, très probablement *via* une interaction avec la région 5'UTR de son ARNm. D'autres

expériences telles que le iCLIP ou le CLIP-seq pourront nous permettre de connaître la cible exacte de la protéine A3G ainsi que celle du complexe Vif-A3G sur la région 5'UTR de l'ARNm d'A3G.

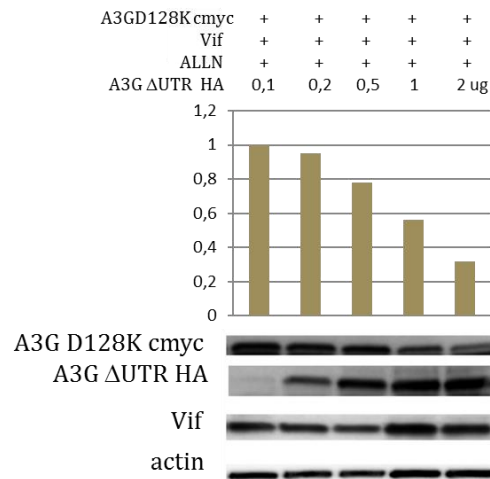


Figure 35 : L'interaction entre Vif et A3G joue un rôle dans l'inhibition traductionnelle

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides exprimant A3GD128K-cmyc, Vif et une concentration croissante de plasmide A3GΔUTR-HA en présence d'ALLN. L'expression relative d'A3G D128K correspond à la quantification de son expression par rapport à celle de l'actine.

Grâce à ces différents résultats, nous pouvons imaginer un modèle de mécanisme d'inhibition traductionnelle dans lequel A3G et A3F sont traduits par leaky-scanning ainsi que par ré-initiation, Vif va interagir avec A3G/F à la fois pour leur dégradation protéasomale ainsi que pour leur inhibition traductionnelle. En effet, le complexe Vif-A3G ou Vif-A3F se fixe sur l'ARNm d'A3G/F soit directement sur l'uORF, soit sur la région située entre les deux ORF afin de bloquer soit le scanning du ribosome sur l'uORF soit la ré-initiation (figure 36).

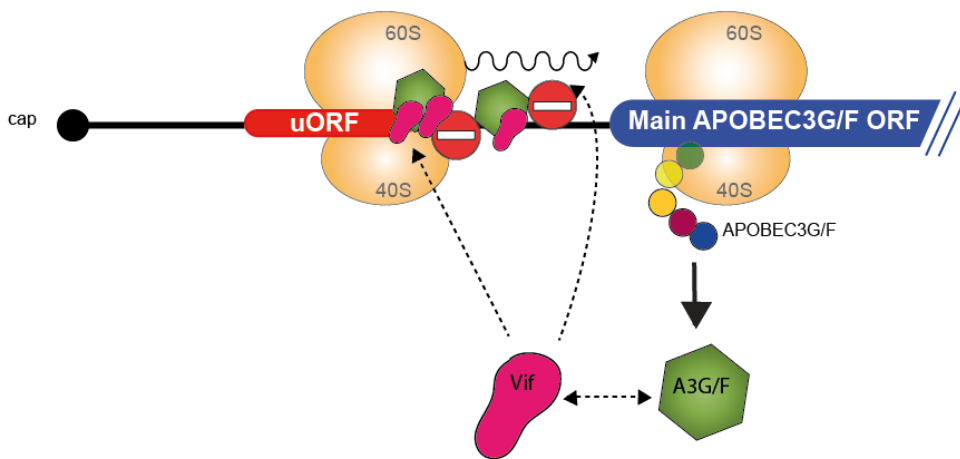


Figure 36 : Modèle hypothétique de mécanisme d'inhibition traductionnelle d'A3G/F par Vif

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Depuis que les facteurs de restriction A3G et A3F ont été identifiés au début des années 2000 (Sheehy et al 2002 ; Zheng et al 2004 ; Wiegand et al 2004), de nombreuses études ont permis de découvrir la façon dont ces protéines inhibent la production de particules virales infectieuses et par quels mécanismes le VIH-1 contourne l'action de ces facteurs de l'immunité innée par l'intermédiaire de la protéine Vif. Alors que les mécanismes de dégradation protéasomale et d'inhibition traductionnelle semblent très importants pour la régulation de l'expression d'A3G et d'A3F, l'effet de Vif sur la transcription d'A3G n'est pas perceptible dans nos résultats, les cellules HEK293T utilisées n'exprimant pas le facteur RUNX. Ce projet de thèse a permis de mieux comprendre à la fois la régulation de la traduction d'A3G et d'A3F et le mécanisme de répression traductionnelle de ces facteurs par Vif. Il a également permis d'identifier des motifs de Vif susceptibles d'être importants pour l'inhibition traductionnelle et de suggérer que l'interaction des protéines Vif et A3G est nécessaire pour ce mécanisme.

I. TRADUCTION DES PROTEINES A3G ET A3F

Après la découverte d'un petit cadre ouvert de lecture (uORF) contenu dans la 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F, nous avons déterminé son impact sur la traduction de ces protéines. Les séquences uORF sont des éléments présents dans de nombreux ARNm eucaryotes, 50% des gènes de mammifères contiennent d'ailleurs au moins une séquence uORF (Calvo et al 2009). De récents progrès dans les technologies de séquençage et le développement des méthodes de profilage des ribosomes ont permis de générer de nombreuses informations sur la localisation des uORF ainsi que leur fonction (Lee et al 2012 ; Wethmar et al 2014). Les uORF sont souvent reconnues comme des séquences *cis*-régulatrices qui affectent la traduction des principaux ORF, ayant pour conséquence une diminution de l'expression protéiques dans la plupart des cas (Calvo et al 2009 ; Medenbach et al 2011). En effet, nous avons montré que l'uORF des ARNm d'A3G et d'A3F régule négativement la traduction protéique. Le codon d'initiation de l'uORF et son contexte Kozak étant importants pour la répression de la traduction, nous en avons conclu que la régulation de la traduction nécessite la reconnaissance du codon initiateur de l'uORF par le ribosome

comme la régulation de la traduction de l'ARNm *msl-2* (male specific lethal 2 homolog) (Medenbach et al 2011). Cependant, cette étude montre aussi une régulation de la traduction de cet ARN *via* sa 3'UTR par la protéine SXL (Sex Lethal), ce qui ne semble pas être le cas pour A3G et A3F. De plus, nous avons montré que les protéines A3G et A3F peuvent être traduites par un mécanisme de leaky-scanning (article #2, figure 4). Comme observé dans d'autres études (Kozak 1984 ; Hinnebusch 2005), un mutant du codon stop de l'uORF nous a permis de montrer que les protéines peuvent également être traduites par ré-initiation (article #2, figure 4). Nous avons étudié la distance entre le codon stop de l'uORF et le codon d'initiation de l'ORF principal et observé que celle-ci était importante dans la régulation de la traduction. Ce résultat nous conforte dans l'hypothèse d'un mécanisme de ré-initiation pour la traduction d'A3G et d'A3F.

Les perspectives de ce projet sont nombreuses : tout d'abord, la construction d'autres mutants seraient nécessaire afin d'établir la part du leaky-scanning et de la ré-initiation impliquée dans la traduction des facteurs de restriction. Etant donné qu'A3G et A3F ne sont pas les seules protéines APOBEC3, nous pouvons également nous demander si d'autres APOBEC3 pourraient aussi être régulées au niveau traductionnel. Cependant, la séquence uORF n'est pas présente dans les 5'UTR des autres cytidines désaminases. Seule A3D possède une courte séquence pouvant potentiellement exprimer un peptide de 9 acides aminés. Il serait intéressant de vérifier si cette séquence est impliquée ou non dans la régulation de la traduction d'A3D comme l'uORF contenue dans la 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F. De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation entre l'expression d'A3G chez des patients contrôleurs du VIH ou non progressseurs à long terme et la progression du SIDA (Eyzaguirre et al 2013), avec un taux de protéine A3G plus abondant chez ces patients (De Pasquale et al 2013). Nous pourrions ainsi envisager d'étudier la validité de l'uORF (séquence sauvage ou mutée) contenue dans la 5'UTR en séquençant les gènes *A3G* et *A3F* de ces patients et vérifier s'il existe une corrélation avec le taux de protéines exprimées et la progression de la maladie.

II. MECANISME D'INHIBITION TRADUCTIONNELLE D'A3G ET D'A3F PAR VIF

1) La 5'UTR des ARNm d'A3G/3F est essentielle pour leur inhibition traductionnelle

Alors que le mécanisme moléculaire par lequel Vif induit la dégradation d'A3G et d'A3F par le protéasome est fortement documenté (Yu et al 2003 ; Henri et al 2009 ; Zheng et al 2012), le mécanisme d'inhibition traductionnelle n'est pas encore élucidé. Après des expériences réalisées *in vitro*, il nous est apparu essentiel de vérifier l'inhibition traductionnelle d'A3G *ex vivo*. Ainsi, en cellules HEK293T, nous avons observé que l'inhibition traductionnelle d'A3G dépend entièrement de la 5'UTR de son ARNm. En effet, les UTR sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires et sont souvent la cible de protéines régulatrices (Wilkie et al 2003). En se basant sur la structure secondaire de la 5'UTR de l'ARN d'A3G, nous avons identifié les deux tige-boucles SL2 et SL3 comme motifs requis pour ce mécanisme. De plus, nous avons montré que l'inhibition traductionnelle d'A3G et la dégradation protéasomale induite par Vif sont deux mécanismes contribuant de façon similaire à la diminution d'expression d'A3G dans la cellule suggérant que la répression de la traduction est un mécanisme aussi important que la dégradation par le protéasome. Enfin, nous avons observé que ce mécanisme réduit considérablement l'incorporation d'A3G dans les nouvelles particules virales ayant pour conséquence une augmentation de l'infectivité virale du VIH-1. Nous avons également montré que Vif réduit la traduction d'A3F par un mécanisme dépendant de la 5'UTR de son ARNm.

2) Rôle de l'uORF dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle

Après la découverte de l'existence d'un petit cadre ouvert de lecture (uORF) contenu dans la région 5'UTR des ARNm d'A3G et d'A3F, nous avons démontré que celui-ci est impliqué à la fois dans la régulation de la traduction de ces protéines mais également dans le mécanisme d'inhibition de leur traduction induite par Vif. L'inactivation de cette séquence uORF par mutations montre que Vif n'est capable de réguler la traduction que dans le cas d'une séquence uORF fonctionnelle. Nous avons également observé que la séquence peptidique de l'uORF n'est pas impliquée directement dans ce mécanisme contrairement à la taille du peptide codé par l'uORF ainsi que la distance entre l'uORF et l'ORF principal. Ceci

suggère donc que Vif inhibe la traduction des protéines A3G et A3F soit *via* la séquence uORF, en bloquant la traduction de l'uORF, soit *via* la séquence entre l'uORF et l'ORF principal en bloquant le scanning du ribosome ou la ré-initiation sur cette région. D'autres études telles que des expériences de CLIP-seq (Cross-linking immunoprecipitation sequencing) en présence de Vif seront nécessaires afin de connaître la cible exacte de Vif sur la 5'UTR de ces ARNm.

Une des perspectives envisagées est la détermination de la structure secondaire des ARNm d'A3G et d'A3F afin de savoir si l'effet observé au niveau traductionnel est un effet direct (Vif) ou indirect dû à la perturbation de la conformation de l'ARNm. Ainsi, nous envisageons de réaliser des expériences de SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension) sur les ARNm sauvages et sur les ARN mutants qui ont montré le plus d'effet au niveau de la régulation traductionnelle.

III. IDENTIFICATION DES DOMAINES DE VIF IMPLIQUES DANS CE MECANISME

1) Domaines de Vif à identifier

Afin d'identifier les domaines de Vif importants pour l'inhibition traductionnelle, nous sommes intéressés à plusieurs sous-types de Vif et avons observé une hétérogénéité de l'activité inhibitrice de ces différents Vif. En comparant des protéines Vif ayant une forte et une faible activité inhibitrice, nous avons identifié quatre domaines qui pourraient être impliqués dans cette régulation. De plus, ces domaines sont connus pour interagir avec de nombreux partenaires de Vif dont A3G, A3F, Cul5, EloB et EloC. Nous avons également observé l'importance de trois acides aminés conservés dans ces domaines en position 39, 48 et 127 et déjà connus pour leur interaction avec A3G et les protéines du complexe E3 ubiquitine ligase. Enfin, nous avons remarqué que l'activité inhibitrice de Vif devait dépendre soit de l'association de ces trois acides aminés, soit de l'interaction entre ces acides aminés et d'autres protéines ou de la structure de la protéine Vif elle-même.

2) Identification de protéines cellulaires impliquées dans l'inhibition traductionnelle

La traduction des ARNm d'A3G et d'A3F peut être inhibée à plusieurs étapes (initiation, élongation et terminaison). La plupart des mécanismes de régulation traductionnelle se faisant au niveau de l'initiation (Diaz-Guerra et al 2008), nous avons démontré que Vif régule également la traduction des facteurs de restriction à ce niveau. Cependant, nous ne savons pas si des facteurs d'initiation de la traduction sont liés ou non à Vif pour l'inhibition traductionnelle. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences incluant différents facteurs d'initiation de la traduction à travers des expériences de « toe-print » en cellule sur les ARNm sauvages et mutés au niveau de l'uORF. L'interaction potentielle de Vif avec ces facteurs pourrait ainsi nous amener à l'hypothèse de leur implication dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle.

D'autres expériences sont également envisagées afin d'identifier des protéines cellulaires impliquées dans ce mécanisme. Pour cela, des expériences de pull-down (système ARN biotinylé et bille de streptavidine) des ARNm suivies d'une analyse des complexes protéiques qui y sont associés par spectrométrie de masse sont réalisées. Ainsi, la comparaison des protéines cellulaires en présence et en absence de Vif nous permettra de mieux comprendre l'effet de Vif sur l'initiation de la traduction des protéines A3G et A3F.

IV. OUVERTURE VERS DE NOUVELLES VOIES DE STRATEGIES THERAPEUTIQUES ?

1) Infectivité virale

Les expériences de traduction effectuées avec les mutants de l'uORF des ARN d'A3G et d'A3F ont été réalisées avec un clone d'expression de la protéine Vif (hVif). Comme pour les expériences effectuées sur les ARN d'A3G mutés dans leur 5'UTR (Guerrero et al soumis), il sera primordial de faire des études incluant les mutants de l'uORF dans un contexte viral où la protéine Vif est apportée par un clone infectieux du VIH-1 tel que pNL4.3. Les expériences devront être réalisées dans un contexte sauvage (pNL4.3) ainsi que dans un contexte dépourvu de Vif (pNL4.3ΔVif). Deux types de cellules (cibles et HEK293T) pourraient permettre de comparer l'effet de l'uORF en contexte permissif et non permissif. Ainsi, le taux des protéines A3G/F produites dans les cellules, l'encapsidation de ces facteurs

de restriction et l'infectivité des virions provenant des cellules transfectées par les A3G et A3F mutés pourront être étudiés en même temps.

L'utilisation du système CRISPR/cas9 est envisagée afin de supprimer voire de substituer la séquence uORF des ARN d'A3G et d'A3F et d'observer la réplication dans des cellules non permissives. Ceci nous permettrait de savoir l'impact de l'uORF sur la réplication virale issue de cellules cibles du VIH.

2) Molécules inhibitrices de l'action de Vif

De nombreuses études ont identifié des molécules capables d'inhiber la dégradation protéasomale d'A3G induite par Vif. Ainsi, le TPEN (N, N, N', N'-Tetrakis-(2-Pyridilmethyl) Ethylenediamine) permet d'inhiber l'interaction entre Vif et la culline 5 (Xiao et al 2007), la molécule VEC-5 (dérivé indolique) inhibe la liaison entre Vif et l'elongin C (Zuo et al 2012) ou encore les molécules IMB-26/35 ($C_{20}H_{23}N_2O_6Br$ / $C_{20}H_{22}NO_7Br$) interfèrent directement avec l'interaction Vif-A3G (Cen et al 2010). Cependant, les stratégies de développement de composés antiviraux ciblant l'action de Vif sur A3G et A3F doivent dorénavant prendre en compte le mécanisme d'inhibition traductionnelle induit par Vif.

Ainsi, une des perspectives directes des stratégies thérapeutiques serait de définir un ou plusieurs sites d'interaction de Vif et d'A3G/F impliqués à la fois dans l'interaction avec le complexe E3 ubiquitine ligase et dans la répression de la traduction. La région N-terminale de Vif semble être la meilleure zone de recherches étant donné son implication dans les liaisons avec A3G, A3F, l'ARN génomique et le facteur CBF β important pour la stabilité du complexe de dégradation par le protéasome. D'autres études seront nécessaires afin d'identifier les cibles de Vif inhibant son action sur les facteurs de restriction mais également pour s'assurer que les interactions ciblées n'interfèrent pas avec d'autres fonctions cellulaires essentielles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Wahab, E.W., Smyth, R.P., Mailler, E., Bernacchi, S., Vivet-Boudou, V., Hijnen, M., Jossinet, F., Mak, J., Paillart, J.-C., and Marquet, R. (2014). Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. *Nat. Commun.* 5.
- Abe, Y., Fujii, K., Nagata, N., Takeuchi, O., Akira, S., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., and Koike, S. (2012). The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86, 185–194.
- Abudu, A., Wang, X., Dang, Y., Zhou, T., Xiang, S.-H., and Zheng, Y.-H. (2012). Identification of molecular determinants from Moloney leukemia virus 10 homolog (MOV10) protein for virion packaging and anti-HIV-1 activity. *J. Biol. Chem.* 287, 1220–1228.
- Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K. (2004). 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.* 279, 12355–12362.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327, 581–589.
- Allouch, A., Di Primio, C., Alpi, E., Lusic, M., Arosio, D., Giacca, M., and Cereseto, A. (2011). The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration. *Cell Host Microbe* 9, 484–495.
- Altfeld, M., and Gale, M. (2015). Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 16, 554–562.
- Anderson, B.D., and Harris, R.S. (2015). Transcriptional regulation of APOBEC3 antiviral immunity through the CBF- β /RUNX axis. *Sci. Adv.* 1, e1500296.
- Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.-C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* 26, 3025–3037.
- Ashur-Fabian, O., Har-Zahav, A., Shaish, A., Wiener Amram, H., Margalit, O., Weizer-Stern, O., Dominissini, D., Harats, D., Amariglio, N., and Rechavi, G. (2010). apoB and apobec1, two genes key to lipid metabolism, are transcriptionally regulated by p53. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 3761–3770.
- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat. Med.* 18, 1682–1687.
- Ballana, E., and Esté, J.A. (2015). SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. *Trends Microbiol.* 23, 680–692.

- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 542–557.
- Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B.M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 8, 327–337.
- Barbosa, C., Peixeiro, I., and Romão, L. (2013). Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genet.* 9, e1003529.
- Barré-Sinoussi, F. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Basu, V.P., Song, M., Gao, L., Rigby, S.T., Hanson, M.N., and Bambara, R.A. (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res.* 134, 19–38.
- Batisse, J., Guerrero, S., Bernacchi, S., Leiman, D.S., Gabus, C., Darlix, J.L., Marquet, R., Tisne, C., and Paillart, J.C. (2012). The Role of Vif Oligomerization and Rna Chaperone Activity in Hiv-1 Replication. *Virus Res.*
- Bennett, R.P., Salter, J.D., Liu, X., Wedekind, J.E., and Smith, H.C. (2008). APOBEC3G subunits self-associate via the C-terminal deaminase domain. *J. Biol. Chem.* 283, 33329–33336.
- Berger, A., Sommer, A.F.R., Zwarg, J., Hamdorf, M., Welzel, K., Esly, N., Panitz, S., Reuter, A., Ramos, I., Jatiani, A., et al. (2011). SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 7, e1002425.
- Bernacchi, S., Henriët, S., Dumas, P., Paillart, J.C., and Marquet, R. (2007). RNA and DNA binding properties of HIV-1 Vif protein: a fluorescence study. *J. Biol. Chem.* 282, 26361–26368.
- Bidou, L., Stahl, G., Grima, B., Liu, H., Cassan, M., and Rousset, J.P. (1997). In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal. *RNA N. Y. N* 3, 1153–1158.
- Binka, M., Ooms, M., Steward, M., and Simon, V. (2012). The Activity Spectrum of Vif from Multiple HIV-1 Subtypes against APOBEC3G, APOBEC3F, and APOBEC3H. *J. Virol.* 86, 49–59.
- Bour, S., Schubert, U., and Strebel, K. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* 69, 1510–1520.
- Brady, G., Boggan, L., Bowie, A., and O'Neill, L.A.J. (2005). Schlafen-1 causes a cell cycle arrest by inhibiting induction of cyclin D1. *J. Biol. Chem.* 280, 30723–30734.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.-L., and Sonenberg, N. (2003). The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J. Virol.* 77, 3939–3949.

Burdick, R., Smith, J.L., Chaipan, C., Friew, Y., Chen, J., Venkatachari, N.J., Delviks-Frankenberry, K.A., Hu, W.S., and Pathak, V.K. (2010). P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. *J. Virol.* *84*, 10241–10253.

Busnadiego, I., Kane, M., Rihn, S.J., Preugschas, H.F., Hughes, J., Blanco-Melo, D., Strouvelle, V.P., Zang, T.M., Willett, B.J., Boutell, C., et al. (2014). Host and viral determinants of Mx2 antiretroviral activity. *J. Virol.* *88*, 7738–7752.

Bustos, O., Naik, S., Ayers, G., Casola, C., Perez-Lamigueiro, M.A., Chippindale, P.T., Pritham, E.J., and de la Casa-Esperón, E. (2009). Evolution of the Schlafen genes, a gene family associated with embryonic lethality, meiotic drive, immune processes and orthopoxvirus virulence. *Gene* *447*, 1–11.

Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., and Mootha, V.K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7507–7512.

Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 471–483.

Campbell, G.R., and Spector, S.A. (2012). Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1. *PLoS Pathog.* *8*, e1003017.

Carrington, M., and Alter, G. (2012). Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a007070.

Caruthers, J.M., and McKay, D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *12*, 123–133.

Chaipan, C., Smith, J.L., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2013). APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* *87*, 444–453.

Chamond, N., Locker, N., and Sargueil, B. (2010). The different pathways of HIV genomic RNA translation. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1548–1552.

Chelico, L., Sacho, E.J., Erie, D.A., and Goodman, M.F. (2008). A model for oligomeric regulation of APOBEC3G cytosine deaminase-dependent restriction of HIV. *J. Biol. Chem.* *283*, 13780–13791.

Chen, C.-Y., Liu, X., Boris-Lawrie, K., Sharma, A., and Jeang, K.-T. (2013). Cellular RNA helicases and HIV-1: insights from genome-wide, proteomic, and molecular studies. *Virus Res.* *171*, 357–365.

Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* *387*, 183–188.

Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C.C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V., and Hopfner, K.-P. (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* *498*, 332–337.

Colomer-Lluch, M., Gollahon, L.S., and Serra-Moreno, R. (2016). Anti-HIV Factors: Targeting Each Step of HIV's Replication Cycle. *Curr. HIV Res.* *14*, 175–182.

- Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, P., Darlix, J.-L., and Muriaux, D. (2008). [Revisiting HIV-1 assembly]. *Médecine Sci. MS* 24, 49–55.
- Cullen, B.R. (2003). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem. Sci.* 28, 419–424.
- Dafonseca, S., Coric, P., Gay, B., Hong, S.S., Bouaziz, S., and Boulanger, P. (2008). The inhibition of assembly of HIV-1 virus-like particles by 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB) is counteracted by Vif and requires its Zinc-binding domain. *Virol. J.* 5, 162.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H., and Baulcombe, D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 20, 2069–2078.
- Dang, Y., Wang, X., Zhou, T., York, I.A., and Zheng, Y.H. (2009). Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization. *J. Virol.* 83, 8544–8552.
- Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.-T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat. Commun.* 4, 1886.
- De Pasquale, M., Kourteva, Y., Allos, T., and D'Aquila, R.T. (2013). Lower HIV Provirus Levels Are Associated with More APOBEC3G Protein in Blood Resting Memory CD4+ T Lymphocytes of Controllers In Vivo. *PLoS ONE* 8, e76002.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology* 9, 87.
- Diaz-Griffero, F., Gallo, D.E., Hope, T.J., and Sodroski, J. (2011). Trafficking of some old world primate TRIM5 α proteins through the nucleus. *Retrovirology* 8, 38.
- Dordor, A., Poudevigne, E., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2011). Essential and supporting host cell factors for HIV-1 budding. *Future Microbiol.* 6, 1159–1170.
- Dragin, L., Nguyen, L.A., Lahouassa, H., Sourisce, A., Kim, B., Ramirez, B.C., and Margottin-Goguet, F. (2013). Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply. *Retrovirology* 10, 30.
- Dubé, M., Roy, B.B., Guiot-Guillain, P., Binette, J., Mercier, J., Chiasson, A., and Cohen, E.A. (2010). Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog.* 6, e1000856.
- den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2009). Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 58, 1149–1157.
- Duschene, K.S., and Broderick, J.B. (2012). Viperin: a radical response to viral infection. *Biomol. Concepts* 3, 255–266.
- Eyzaguirre, L.M., Charurat, M., Redfield, R.R., Blattner, W.A., Carr, J.K., and Sajadi, M.M. (2013). Elevated hypermutation levels in HIV-1 natural viral suppressors. *Virology* 443, 306–312.

- Fackler, O.T. (2015). Spotlight on HIV-1 Nef: SERINC3 and SERINC5 Identified as Restriction Factors Antagonized by the Pathogenesis Factor. *Viruses* 7, 6730–6738.
- Fernandes, J., Jayaraman, B., and Frankel, A. (2012). The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biol.* 9, 6–11.
- Fietta, P., and Delsante, G. (2009). The effector T helper cell triade. *Riv. Biol.* 102, 61–74.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496.
- Fribourgh, J.L., Nguyen, H.C., Matreyek, K.A., Alvarez, F.J.D., Summers, B.J., Dewdney, T.G., Aiken, C., Zhang, P., Engelman, A., and Xiong, Y. (2014). Structural insight into HIV-1 restriction by MxB. *Cell Host Microbe* 16, 627–638.
- Fricke, T., White, T.E., Schulte, B., Vieira, D.A. de S.A., Dharan, A., Campbell, E.M., Brandariz-Nuñez, A., and Diaz-Griffero, F. (2014). MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology* 11, 68–68.
- Fujita, M. (2016). Commentary: MARCH8 Inhibits HIV-1 Infection by Reducing Virion Incorporation of Envelope Glycoproteins. *Front. Microbiol.* 7, 254.
- Furtak, V., Mulky, A., Rawlings, S.A., Kozhaya, L., Lee, K., Kewalramani, V.N., and Unutmaz, D. (2010). Perturbation of the P-body component Mov10 inhibits HIV-1 infectivity. *PloS One* 5, e9081.
- Ganser-Pornillos, B.K., Chandrasekaran, V., Pornillos, O., Sodroski, J.G., Sundquist, W.I., and Yeager, M. (2011). Hexagonal assembly of a restricting TRIM5 α protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 534–539.
- Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* 341, 903–906.
- Gay, N.J., Gangloff, M., and Weber, A.N.R. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 693–698.
- Geserick, P., Kaiser, F., Klemm, U., Kaufmann, S.H.E., and Zerrahn, J. (2004). Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int. Immunol.* 16, 1535–1548.
- Goila-Gaur, R., and Strebel, K. (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5, 51.
- Göttlinger, H.G., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5781–5785.
- Goujon, C., Arfi, V., Pertel, T., Luban, J., Lienard, J., Rigal, D., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2008). Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells. *J. Virol.* 82, 12335–12345.

Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562.

Grütter, M.G., and Luban, J. (2012). TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr. Opin. Virol.* 2, 142–150.

Guo, Y., Dong, L., Qiu, X., Wang, Y., Zhang, B., Liu, H., Yu, Y., Zang, Y., Yang, M., and Huang, Z. (2014). Structural basis for hijacking CBF- β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature* 505, 229–233.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358–361.

Harboe, M., and Mollnes, T.E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1074–1084.

Hardarson, H.S., Baker, J.S., Yang, Z., Purevjav, E., Huang, C.-H., Alexopoulou, L., Li, N., Flavell, R.A., Bowles, N.E., and Vallejo, J.G. (2007). Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H251-258.

Harjes, E., Gross, P.J., Chen, K.-M., Lu, Y., Shindo, K., Nowarski, R., Gross, J.D., Kotler, M., Harris, R.S., and Matsuo, H. (2009). An extended structure of the APOBEC3G catalytic domain suggests a unique holoenzyme model. *J. Mol. Biol.* 389, 819–832.

Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus. *J. Biol. Chem.* 287, 40875–40883.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.

Henriet, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R.J., Marquet, R., and Paillart, J.C. (2007). Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 35, 5141–5153.

Henriet, S., Mercenne, G., Bernacchi, S., Paillart, J.-C., and 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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 73, 211–232.

Herbein, G., Montaner, L.J., and Gordon, S. (1996). Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. *J. Virol.* 70, 7388–7397.

Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450.

Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K., and Gabuzda, D. (1994). Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 201, 349–355.

- Holtz, C.M., Sadler, H.A., and Mansky, L.M. (2013). APOBEC3G cytosine deamination hotspots are defined by both sequence context and single-stranded DNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6139–6148.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* *474*, 658–661.
- Huthoff, H., Autore, F., Gallois-Montbrun, S., Fraternali, F., and Malim, M.H. (2009). RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog.* *5*, e1000330.
- Inuzuka, M., Hayakawa, M., and Ingi, T. (2005). Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 35776–35783.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *86*, 45–93.
- Jacobs, S.R., and Damania, B. (2012). NLRs, inflammasomes, and viral infection. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 469–477.
- Jakobsen, M.R., Bak, R.O., Andersen, A., Berg, R.K., Jensen, S.B., Tengchuan, J., Jin, T., Laustsen, A., Hansen, K., Ostergaard, L., et al. (2013). IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4571–4580.
- Janeway, C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* *13*, 11–16.
- Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J.-B., Caillet, M., Marsh, M., and Berlioz-Torrent, C. (2011). The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS Pathog.* *7*, e1001265.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* *79*, 285–296.
- Jia, B., Serra-Moreno, R., Neidermyer, W., Rahmberg, A., Mackey, J., Fofana, I.B., Johnson, W.E., Westmoreland, S., and Evans, D.T. (2009). Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. *PLoS Pathog.* *5*, e1000429.
- Jin, H.K., Yoshimatsu, K., Takada, A., Ogino, M., Asano, A., Arikawa, J., and Watanabe, T. (2001). Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch. Virol.* *146*, 41–49.
- Johnson, W.E., and Sawyer, S.L. (2009). Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* *61*, 163–176.
- Kajaste-Rudnitski, A., Pultrone, C., Marzetta, F., Ghezzi, S., Coradin, T., and Vicenzi, E. (2010). Restriction factors of retroviral replication: the example of Tripartite Motif (TRIM) protein 5 alpha and 22. *Amino Acids* *39*, 1–9.

- Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., et al. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 563–566.
- Kao, S., Khan, M.A., Miyagi, E., Plishka, R., Buckler-White, A., and 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. *J. Virol.* 77, 11398–11407.
- Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A., and Peterlin, B.M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330, 489–493.
- Kataropoulou, A., Bovolenta, C., Belfiore, A., Trabatti, S., Garbelli, A., Porcellini, S., Lupo, R., and Maga, G. (2009). Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 37, 3660–3669.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101–105.
- Katsoulidis, E., Mavrommatis, E., Woodard, J., Shields, M.A., Sassano, A., Carayol, N., Sawicki, K.T., Munshi, H.G., and Plataniias, L.C. (2010). Role of interferon {alpha} (IFN{alpha})-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 285, 40333–40341.
- Kelly, J., Beddall, M.H., Yu, D., Iyer, S.R., Marsh, J.W., and Wu, Y. (2008). Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 372, 300–312.
- Khan, M.A., Aberham, C., Kao, S., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S., and 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.
- King, M.C., Raposo, G., and Lemmon, M.A. (2004). Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8957–8962.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A., and Göttlinger, H.G. (1995). The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* 69, 2759–2764.
- Kouno, T., Luengas, E.M., Shigematsu, M., Shandilya, S.M.D., Zhang, J., Chen, L., Hara, M., Schiffer, C.A., Harris, R.S., and Matsuo, H. (2015). Structure of the Vif-binding domain of the antiviral enzyme APOBEC3G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 485–491.
- Kozak, M. (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 29, 5226–5232.
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., and Xavier, R.J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 611–646.

- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654–657.
- Le Bourhis, L., Benko, S., and Girardin, S.E. (2007). Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 1479–1484.
- Leblanc, J., Weil, J., and Beemon, K. (2013). Posttranscriptional regulation of retroviral gene expression: primary RNA transcripts play three roles as pre-mRNA, mRNA, and genomic RNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *4*, 567–580.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973–983.
- Lester, S.N., and Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.* *426*, 1246–1264.
- Li, M., Kao, E., Gao, X., Sandig, H., Limmer, K., Pavon-Eternod, M., Jones, T.E., Landry, S., Pan, T., Weitzman, M.D., et al. (2012a). Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature* *491*, 125–128.
- Li, N., Zhang, L., Chen, L., Feng, W., Xu, Y., Chen, F., Liu, X., Chen, Z., and Liu, W. (2012b). MxA inhibits hepatitis B virus replication by interaction with hepatitis B core antigen. *Hepatology* *56*, 803–811.
- Lim, E.S., Fregoso, O.I., McCoy, C.O., Matsen, F.A., Malik, H.S., and Emerman, M. (2012). The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx. *Cell Host Microbe* *11*, 194–204.
- Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F., and Liang, C. (2013). The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* *14*, 398–410.
- Lopez-Vergès, S., Camus, G., Blot, G., Beauvoir, R., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2006). Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14947–14952.
- Lorgeoux, R.-P., Guo, F., and Liang, C. (2012). From promoting to inhibiting: diverse roles of helicases in HIV-1 Replication. *Retrovirology* *9*, 79.
- Lu, J., Pan, Q., Rong, L., He, W., Liu, S.-L., and Liang, C. (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J. Virol.* *85*, 2126–2137.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 513–520.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5598–5603.

- Ma, C., and Staudt, L.M. (2001). Molecular definition of the germinal centre stage of B-cell differentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *356*, 83–89.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., and Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* *1*, 565–574.
- Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N.R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* *114*, 21–31.
- Marino, D., Perković, M., Hain, A., Jaguva Vasudevan, A.A., Hofmann, H., Hanschmann, K.-M., Mühlebach, M.D., Schumann, G.G., König, R., Cichutek, K., et al. (2016). APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. *PLoS One* *11*, e0155422.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* *10*, 417–426.
- Matheson, N.J., Sumner, J., Wals, K., Rapiteanu, R., Weekes, M.P., Vigan, R., Weinelt, J., Schindler, M., Antrobus, R., Costa, A.S.H., et al. (2015). Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host Microbe* *18*, 409–423.
- Mavrommatis, E., Fish, E.N., and Platanius, L.C. (2013). The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *33*, 206–210.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 11–23.
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., and Soares, M.P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science* *335*, 936–941.
- Mehle, A., Wilson, H., Zhang, C., Brazier, A.J., McPike, M., Pery, E., and Gabuzda, D. (2007). Identification of an APOBEC3G binding site in human immunodeficiency virus type 1 Vif and inhibitors of Vif-APOBEC3G binding. *J. Virol.* *81*, 13235–13241.
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr. Biol. CB* *15*, 2149–2155.
- Melén, K., Keskinen, P., Ronni, T., Sareneva, T., Lounatmaa, K., and Julkunen, I. (1996). Human MxB protein, an interferon-alpha-inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin region beneath the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* *271*, 23478–23486.
- Melikyan, G.B. (2014). HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Curr. Opin. Virol.* *4*, 1–7.
- Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriët, S., Paillart, J.-C., and Marquet, R. (2010). HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* *38*, 633–646.
- Michallet, M.-C., Rota, G., Maslowski, K., and Guarda, G. (2013). Innate receptors for adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 296–302.

- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9, 235–242.
- Morris, D.R., and Geballe, A.P. (2000). Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8635–8642.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M.-M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol. Cell* 9, 575–586.
- Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 219, 88–102.
- Neil, S.J.D., Sandrin, V., Sundquist, W.I., and Bieniasz, P.D. (2007). An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe* 2, 193–203.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
- Neumann, B., Zhao, L., Murphy, K., and Gonda, T.J. (2008). Subcellular localization of the Schlafen protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 62–66.
- Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J.P., and Yap, M.W. (2004). A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13324–13328.
- O'Connor, T., Sadleir, K.R., Maus, E., Velliquette, R.A., Zhao, J., Cole, S.L., Eimer, W.A., Hitt, B., Bembinster, L.A., Lammich, S., et al. (2008). Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 60, 988–1009.
- Ocwieja, K.E., Sherrill-Mix, S., Mukherjee, R., Custers-Allen, R., David, P., Brown, M., Wang, S., Link, D.R., Olson, J., Travers, K., et al. (2012). Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res.* 40, 10345–10355.
- Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., and Pitha, P.M. (2008). HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* 373, 85–97.
- Onafuwa-Nuga, A., and Telesnitsky, A. (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 73, 451–480, Table of Contents.
- Ono, A., and Freed, E.O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13925–13930.
- Ono, A., Ablan, S.D., Lockett, S.J., Nagashima, K., and Freed, E.O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14889–14894.

- Paillart, J.C., and Göttlinger, H.G. (1999). Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J. Virol.* *73*, 2604–2612.
- Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., and Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 461–472.
- Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J. Virol.* *66*, 2564–2569.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F.A., Uchil, P.D., Chatel, L., et al. (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* *472*, 361–365.
- Pery, E., Rajendran, K.S., Brazier, A.J., and Gabuzda, D. (2009). Regulation of APOBEC3 proteins by a novel YXXL motif in human immunodeficiency virus type 1 Vif and simian immunodeficiency virus SIVagm Vif. *J. Virol.* *83*, 2374–2381.
- Pitossi, F., Blank, A., Schröder, A., Schwarz, A., Hüssi, P., Schwemmler, M., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1993). A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.* *67*, 6726–6732.
- Pocock, G.M., Becker, J.T., Swanson, C.M., Ahlquist, P., and Sherer, N.M. (2016). HIV-1 and M-PMV RNA Nuclear Export Elements Program Viral Genomes for Distinct Cytoplasmic Trafficking Behaviors. *PLoS Pathog.* *12*, e1005565.
- Poli, G., and Fauci, A.S. (1992). The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *8*, 191–197.
- Pontillo, A., Silva, L.T., Oshiro, T.M., Finazzo, C., Crovella, S., and Duarte, A.J.S. (2012). HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS Lond. Engl.* *26*, 11–18.
- Pornillos, O., Higginson, D.S., Stray, K.M., Fisher, R.D., Garrus, J.E., Payne, M., He, G.-P., Wang, H.E., Morham, S.G., and Sundquist, W.I. (2003). HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J. Cell Biol.* *162*, 425–434.
- Price, D.A., O'callaghan, C.A., Whelan, J.A., Easterbrook, P.J., and Phillips, R.E. (1999). Cytotoxic T lymphocytes and viral evolution in primary HIV-1 infection. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *97*, 707–718.
- Pumfery, A., Deng, L., Maddukuri, A., de la Fuente, C., Li, H., Wade, J.D., Lambert, P., Kumar, A., and Kashanchi, F. (2003). Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr. HIV Res.* *1*, 343–362.
- Purcell, D.F., and Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* *67*, 6365–6378.

- Racine, P.-J., Chamontin, C., de Rocquigny, H., Bernacchi, S., Paillart, J.-C., and Mougel, M. (2016). Requirements for nucleocapsid-mediated regulation of reverse transcription during the late steps of HIV-1 assembly. *Sci. Rep.* *6*, 27536.
- Randow, F., and Münz, C. (2012). Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol.* *33*, 475–487.
- Richer, M.J., Lavallée, D.J., Shanina, I., and Horwitz, M.S. (2009). Toll-like receptor 3 signaling on macrophages is required for survival following coxsackievirus B4 infection. *PLoS One* *4*, e4127.
- Rogozin, I.B., Basu, M.K., Jordan, I.K., Pavlov, Y.I., and Koonin, E.V. (2005). APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 1281–1285.
- Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., et al. (2015). HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* *526*, 212–217.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 490–500.
- Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 491–529.
- Sassano, A., Mavrommatis, E., Arslan, A.D., Kroczyńska, B., Beauchamp, E.M., Khuon, S., Chew, T.-L., Green, K.J., Munshi, H.G., Verma, A.K., et al. (2015). Human Schlafen 5 (SLFN5) Is a Regulator of Motility and Invasiveness of Renal Cell Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 2684–2698.
- Sato, Y., Probst, H.C., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Neuberger, M.S., and Rada, C. (2010). Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy. *J. Biol. Chem.* *285*, 7111–7118.
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1512–1517.
- Saxena, M., and Yeretssian, G. (2014). NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* *5*, 327.
- Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K.-P. (2012). Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *Eur. J. Cell Biol.* *91*, 78–85.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* *472*, 481–485.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Fenyö, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* *64*, 5448–5456.

- Schwarz, D.A., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (1998). Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity* *9*, 657–668.
- Shandilya, S.M.D., Nalam, M.N.L., Nalivaika, E.A., Gross, P.J., Valesano, J.C., Shindo, K., Li, M., Munson, M., Royer, W.E., Harjes, E., et al. (2010). Crystal structure of the APOBEC3G catalytic domain reveals potential oligomerization interfaces. *Struct. Lond. Engl.* *18*, 28–38.
- Sharova, N., Wu, Y., Zhu, X., Stranska, R., Kaushik, R., Sharkey, M., and Stevenson, M. (2008). Primate lentiviral Vpx commandeers DDB1 to counteract a macrophage restriction. *PLoS Pathog.* *4*, e1000057.
- Sharp, P.M., Shaw, G.M., and Hahn, B.H. (2005). Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J. Virol.* *79*, 3891–3902.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* *418*, 646–650.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 762–774.
- Silvin, A., and Manel, N. (2013). Interactions between HIV-1 and innate immunity in dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *762*, 183–200.
- Simon, V., Bloch, N., and Landau, N.R. (2015). Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat. Immunol.* *16*, 546–553.
- Sleiman, D., Bernacchi, S., Xavier Guerrero, S., Brachet, F., Larue, V., Paillart, J.-C., and Tisne, C. (2014). Characterization of RNA binding and chaperoning activities of HIV-1 Vif protein. Importance of the C-terminal unstructured tail. *RNA Biol.* *11*, 906–920.
- Solis, M., Nakhaei, P., Jalalirad, M., Lacoste, J., Douville, R., Arguello, M., Zhao, T., Laughrea, M., Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (2011). RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. *J. Virol.* *85*, 1224–1236.
- Somers, J., Pöyry, T., and Willis, A.E. (2013). A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1690–1700.
- Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T.N., et al. (1998). Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.* *187*, 439–444.
- Staeheli, P., and Pavlovic, J. (1991). Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J. Virol.* *65*, 4498–4501.
- St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S.M., Coleman, C.M., Hoy, H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., and Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4+ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. *Retrovirology* *9*, 105.
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., Greene, W.C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell.* *12*(3): 591-601.

- Strebel, K., Klimkait, T., and Martin, M.A. (1988). A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241, 1221–1223.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.
- Swanton, C., McGranahan, N., Starrett, G.J., and Harris, R.S. (2015). APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discov.* 5, 704–712.
- Swingler, S., Morris, A., and Easton, A. (1994). Tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta induce specific subunits of NF κ B to bind the HIV-1 enhancer: characterisation of transcription factors controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression in neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 623–630.
- Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K. (2015). MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat. Med.* 21, 1502–1507.
- Tangye, S.G., and Tarlinton, D.M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 39, 2065–2075.
- Tazi, J., Bakkour, N., Marchand, V., Ayadi, L., Aboufirassi, A., and Branlant, C. (2010). Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J.* 277, 867–876.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62.
- Tripathy, M.K., Abbas, W., and Herbein, G. (2011). Epigenetic regulation of HIV-1 transcription. *Epigenomics* 3, 487–502.
- Uchil, P.D., Quinlan, B.D., Chan, W.-T., Luna, J.M., and Mothes, W. (2008). TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog.* 4, e16.
- Usami, Y., Wu, Y., and Göttlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526, 218–223.
- Varthakavi, V., Smith, R.M., Bour, S.P., Strebel, K., and Spearman, P. (2003). Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15154–15159.
- Votteler, J., and Sundquist, W.I. (2013). Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Cell Host Microbe* 14, 232–241.
- Waggoner, S.N., Reighard, S.D., Gyurova, I.E., Cranert, S.A., Mahl, S.E., Karmeke, E.P., McNally, J.P., Moran, M.T., Brooks, T.R., Yaqoob, F., et al. (2016). Roles of natural killer cells in antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* 16, 15–23.

- Wang, G.P., Ciuffi, A., Leipzig, J., Berry, C.C., and Bushman, F.D. (2007). HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res.* *17*, 1186–1194.
- Wang, J., Reuschel, E.L., Shackelford, J.M., Jeang, L., Shivers, D.K., Diehl, J.A., Yu, X.-F., and Finkel, T.H. (2011). HIV-1 Vif promotes the G₁- to S-phase cell-cycle transition. *Blood* *117*, 1260–1269.
- Wang, X., Han, Y., Dang, Y., Fu, W., Zhou, T., Ptak, R.G., and Zheng, Y.-H. (2010). Moloney leukemia virus 10 (MOV10) protein inhibits retrovirus replication. *J. Biol. Chem.* *285*, 14346–14355.
- Wang, Y., Whittall, T., Rahman, D., Bunnik, E.M., Vaughan, R., Schøller, J., Bergmeier, L.A., Montefiori, D., Singh, M., Schuitemaker, H., et al. (2012). The role of innate APOBEC3G and adaptive AID immune responses in HLA-HIV/SIV immunized SHIV infected macaques. *PLoS One* *7*, e34433.
- Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C.H., Ohlmann, T., and Sargueil, B. (2010). A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1367–1381.
- van Weringh, A., Ragonnet-Cronin, M., Pranckeviciene, E., Pavon-Eternod, M., Kleiman, L., and Xia, X. (2011). HIV-1 modulates the tRNA pool to improve translation efficiency. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 1827–1834.
- Wethmar, K. (2014). The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *5*, 765–778.
- Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.* *23*, 2451–2458.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S., and Gray, N.K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 182–188.
- Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Zang, T., Kutluay, S.B., Jouvenet, N., Alim, M.A., Bitzegeio, J., Rice, C.M., and Bieniasz, P.D. (2012). Inhibition of HIV-1 particle assembly by 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Cell Host Microbe* *12*, 585–597.
- Xu, H., Svarovskaia, E.S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M.A., Strebel, K., and Pathak, V.K. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5652–5657.
- Yap, M.W., Nisole, S., Lynch, C., and Stoye, J.P. (2004). Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10786–10791.
- Zheng, Y.H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T., and Peterlin, B.M. (2004). Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* *78*, 6073–6076.
- Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. (2012). Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* *9*, 112.

Zhou, D., Kang, K.H., and Spector, S.A. (2012). Production of interferon α by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *J. Infect. Dis.* *205*, 1258–1267.

Zhou, Y., Wang, X., Liu, M., Hu, Q., Song, L., Ye, L., Zhou, D., and Ho, W. (2010). A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology* *131*, 40–49.

Zhu, Y., Chen, G., Lv, F., Wang, X., Ji, X., Xu, Y., Sun, J., Wu, L., Zheng, Y.-T., and Gao, G. (2011). Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 15834–15839.

Zürcher, T., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1992). Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology* *187*, 796–800.

Présentations à des congrès

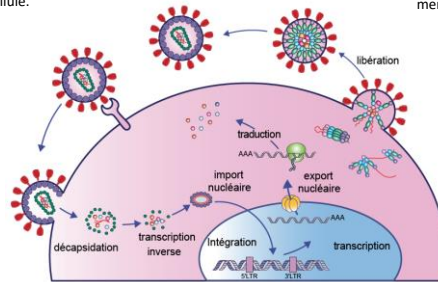
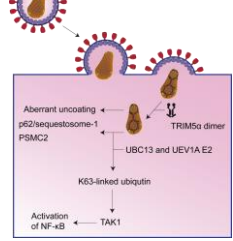
1. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Les facteurs de restriction anti-VIH. Poster présenté à « l'Université des Jeunes Chercheurs », Sidaction, Marseille, France, 12-18 octobre 2013.
2. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Rôle et mécanisme de la régulation traductionnelle des facteurs de restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du VIH-1. Poster présenté aux XVI Journées Francophones de Virologie, Paris, France, 6-7 mars 2014.
3. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Translational control of APOBEC3G/F restriction factors by the HIV-1 Vif protein. Poster présenté à la CROI, Seattle, USA, 23-26 février 2015.
4. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Système immunitaire vs VIH : qui va gagner ? Poster présenté au séminaire « Les Doctoriales d'Alsace », Mittelwhir, France, 10-13 juin 2015.
5. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Rôle et mécanisme de la régulation traductionnelle des facteurs de restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du VIH-1. Poster présenté au séminaire de recherche de l'ANRS, Paris, France, 24-25 septembre 2015.
6. Libre, C., Guerrero, S., Batisse, J., Marquet, R. & Paillart, J.-C. Translational control of APOBEC3G/F restriction factors by the HIV-1 Vif protein. Poster présenté à la conférence Viruses 2016, Bâle, Suisse, 26-28 janvier 2016.

Introduction

Le VIH-1 nécessite de nombreux facteurs cellulaires et utilise plusieurs voies de signalisation pour se répliquer. Pour inhiber sa réplication, les cellules de mammifères expriment de nombreuses protéines qui font partie du système immunitaire inné appelées facteurs de restriction. Ceux-ci vont cibler certaines étapes clés du cycle de réplication du VIH telles que la décapsidation, la transcription inverse et la libération des nouvelles particules virales. Parmi ces protéines, nous trouvons TRIM5 α (Tripartite-motif-containing 5 α), les protéines APOBEC3 (APOlipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like 3) et en particulier APOBEC3G et APOBEC3F, SAMHD1 (Sterile α Motif Domain- and HD domain- containing protein 1) et la tetherin (BST2 Bone marrow stromal cell antigen 2). En réponse à ces mécanismes de défense cellulaire, le VIH exprime des protéines dites auxiliaires qui vont contrecarrer ces facteurs de restriction comme Vif (Viral infectivity factor) et Vpu (Viral protein U) qui vont inhiber respectivement APOBEC3G/F et la tetherin. Le laboratoire s'intéresse plus précisément aux protéines APOBEC3G et F et à leur régulation par la protéine virale Vif.

TRIM5 α

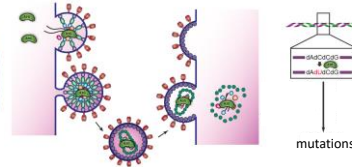
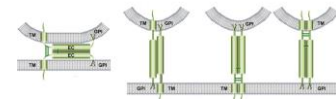
inhibe la décapsidation du virus et empêche la libération de l'ARN viral dans la cellule.



Cycle de réplication du VIH-1

TETHERIN

inhibe la libération des virions. Cette protéine est située à la membrane de la cellule et va retenir l'enveloppe des virions à la surface cellulaire.



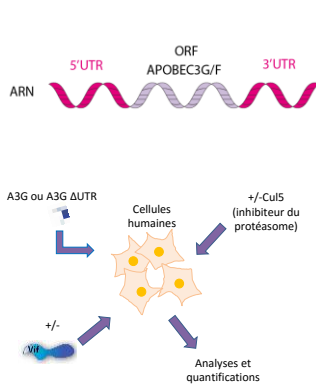
SAMHD1

inhibe la transcription inverse. Ce facteur de restriction diminue le stock de dNTP nécessaire à cette phase du cycle.

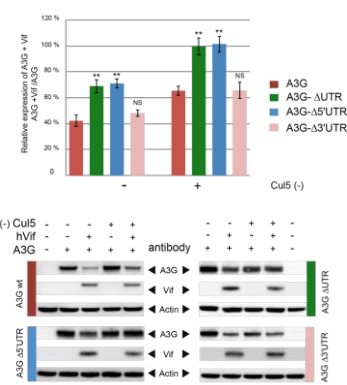
APOBEC3G/F

inhibent la transcription inverse en induisant des hypermutations dans le génome viral

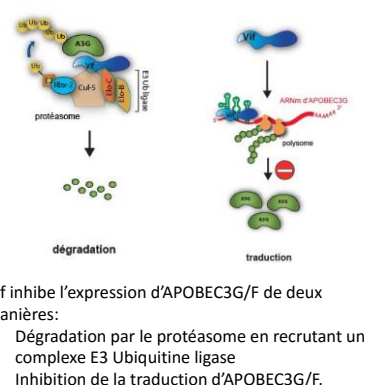
Stratégie expérimentale



Résultats



Conclusion



Conclusions et perspectives

Le VIH est inhibé par plusieurs protéines antivirales naturelles appelées facteurs de restriction. Ces facteurs vont cibler certaines étapes du cycle de réplication mais vont eux-mêmes être contrôlés par des protéines exprimées par le VIH comme Vif. Cette protéine inhibe l'expression d'A3G et d'A3F en induisant leur dégradation via un complexe de dégradation cellulaire appelé protéasome et en inhibant leur traduction. L'objectif du laboratoire est de définir les mécanismes mis en place par Vif, via la région 5'UTR, pour réguler la traduction d'A3G/F ainsi que d'observer les domaines de Vif impliqués dans cette inhibition traductionnelle.

Bibliographie:

Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriot, S., Paillart, J.C., Marquet, R. (2010). HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res.* 38, 633-646.



Rôle et mécanisme de la régulation traductionnelle des facteurs de restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du VIH-1

Camille LIBRE, Santiago GUERRERO, Julien BATISSE, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART
Architecture & Réactivité de l'ARN - Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, Strasbourg, France



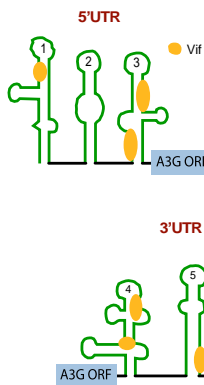
c.libre@ibmc-cnrs.unistra.fr

INTRODUCTION

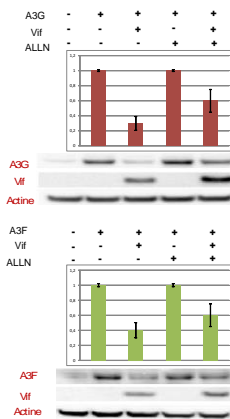
Le VIH-1 code de nombreuses protéines auxiliaires dont la protéine Vif (Viral infectivity factor) essentielle pour la propagation de l'infection in vivo. Cette protéine contrecarre l'activité des facteurs de restriction APOBEC3G (A3G) et A3F, deux cytidines désaminases agissant lors de l'étape de transcription inverse du cycle viral. Ces protéines vont permettre la désamination des cytidines en uridines provoquant des mutations délétères sur le génome viral avec pour conséquence la production de protéines virales non fonctionnelles. Vif réduit l'expression de ces facteurs de restriction soit en recrutant un complexe E3 ubiquitine ligase pour les dégrader via le protéasome, soit en inhibant la traduction de leur ARNm. De plus, il a été montré que Vif se fixe directement sur les régions 5' et 3'UTR de l'ARNm d'A3G. L'objectif de ce projet est de déterminer les mécanismes mis en place par Vif pour inhiber la traduction d'A3G et d'A3F.

RESULTATS

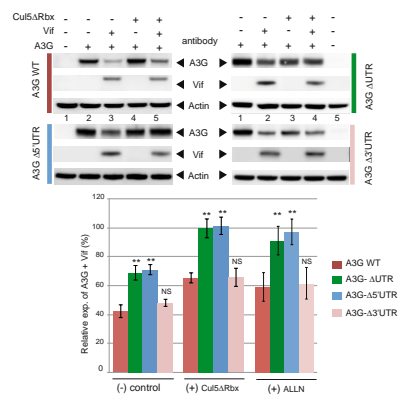
1. Modèles de structures secondaires des UTR de l'ARNm d'A3G et sites de fixation de Vif



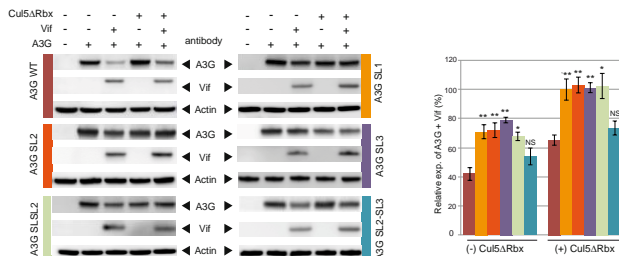
2. A3G et A3F sont inhibés par Vif



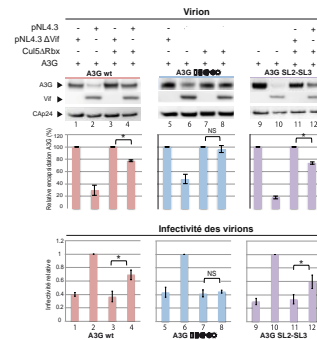
3. La région 5'UTR est importante pour la régulation traductionnelle



4. SL2 et SL3 sont impliquées dans l'inhibition de la traduction de l'ARNm d'A3G



5. L'inhibition traductionnelle affecte l'encapsidation d'A3G et l'inféctivité



Les régions 5' et 3'UTR se structurent en 3 tiges-boucles séparées par des jonctions simples brin. Les expériences d'empreintes enzymatiques révèlent plusieurs sites de fixation de Vif sur les régions 5' et 3'UTR de l'ARNm d'A3G. La traduction des protéines A3G et A3F est inhibée par la protéine Vif. La traduction d'A3G dans les cellules HEK293T en présence ou en absence d'inhibiteurs du protéasome (Cu5ARbx, ALLN), montre l'importance de la région 5'UTR dans l'inhibition de la traduction par Vif. Dans cette 5'UTR, seules les tiges-boucles SL2 et SL3 sont impliquées dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle. Il existe une corrélation entre l'inhibition traductionnelle d'A3G, son incorporation dans les virions et la baisse de l'inféctivité observée.

CONCLUSIONS

Les mutants d'A3F et d'A3G ont permis de savoir que seule la 5'UTR est impliquée dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle par Vif. Les objectifs actuels sont de déterminer plus précisément les motifs de cette 5'UTR essentiels pour cette répression et d'identifier l'impact de celle-ci sur la réplication virale du VIH-1.

D'autre part, nous cherchons à identifier les domaines de Vif responsables de cette répression traductionnelle.

La compréhension de ces mécanismes est importante étant donné que leur inhibition permettrait une augmentation de l'encapsidation d'A3G et d'A3F dans les nouveaux virions ce qui réduirait considérablement l'inféctivité des particules.



Translational control of APOBEC3G/F Restriction Factors by the HIV-1 Vif protein

Camille LIBRE, Santiago GUERRERO, Julien BATTISSE, Roland MARQUET & Jean-Christophe PAILLART
Architecture et Reactivité de l'ARN, CNRS, Université de Strasbourg, IBMC, Strasbourg France

RESULTS

BACKGROUND

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires the concerted contribution of many cellular factors to achieve efficient replication. Similarly, mammalian cells express a set of proteins called restriction factors to suppress viral replication. Among these factors, the family of APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 or A3) proteins and in particular A3G and A3F are the most efficient against HIV-1. They belong to a large family of cytidine deaminases that catalyze the deamination of cytidines to uridines in single stranded DNA substrate during HIV-1 retrotranscription and is lethal for the virus. The antiviral activity of A3G/F is counteracted by HIV-1 Vif (Viral Infectivity Factor) protein. Vif significantly reduces their expression in cell and their incorporation into viral particles by 1) recruiting an E3 ubiquitin ligase complex to induce their degradation by the proteasome, and 2) regulating their translation. Up to now, the mechanisms by which Vif regulates the translation of A3G/F are not known.

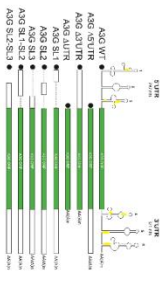
METHODS

To address the role of Vif in the regulation of A3G/F translation, we tested the importance of the untranslated regions (UTRs) of A3G/F mRNA in the translational inhibition. HEK 293T cells were transfected with wild-type and mutated constructions of A3G and A3F mRNAs (AUTRs, Δ5'UTR, Δ3'UTR and ΔSL) in presence or absence of Vif. These experiments were also performed with proteasome inhibitors (Cul5A Rbx, ALLN) in order to distinguish the proteasomal degradation pathway from the translational inhibition.

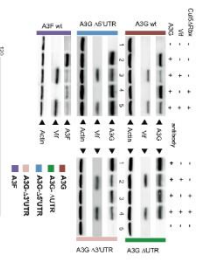
This study shows a second mechanism by which Vif decreases A3G/F expression in cells. This translational inhibition is an A3G 5'UTR-dependent mechanism and can increase HIV-1 viral infectivity. Thus, preventing the translation inhibition mechanism of A3G/F may restore the cellular restriction activity of A3G/F.

CONCLUSION

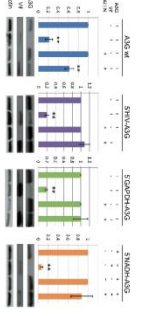
Secondary structure of A3G mRNA and constructs



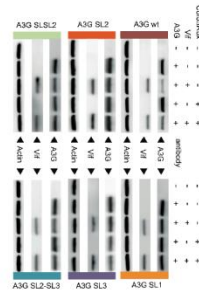
The 5'UTR of A3G and A3F is essential for the translational regulation



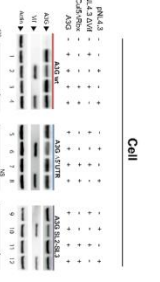
The translational inhibition is specific of the 5'UTR of A3G



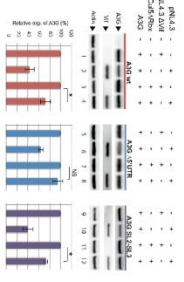
SL2 and SL3 are important for the translation inhibition



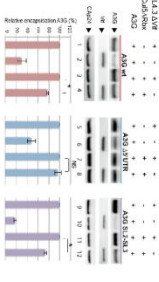
The translational inhibition restores HIV-1 infectivity



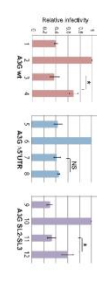
Cell



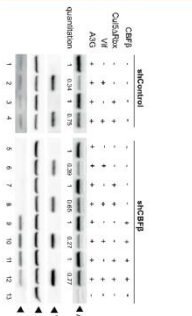
Viron



Viron infectivity



The translational regulation is independent of CBF-β



- 1- Expression of A3G and A3F in HEK 293T cells, with or without proteasome inhibitors, shows that the 5'UTR of A3G/F mRNA is crucial for the Vif-induced translational regulation.
- 2- Within the 5'UTR of A3G mRNA, stem-loops 2 and 3 are required for the translational inhibition of A3G translation by Vif.
- 3- The Vif-induced translational inhibition of A3G reduces the packaging of A3G and partially restores viral infectivity.
- 4- The transcription factor CBF-β (Core Binding Factor β), which is known to stabilize the Vif/A3G complex, is not essential to induce the translational inhibition of A3G by Vif.

We acknowledge the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. A3G polyclonal antibody (gs36) from Dr. Warren Greene, Dr. Michael H. Wallace, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA for the HEK293T stable cell lines (GICFP and shControl).



CONTACT
Camille LIBRE
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
15 Rue René Descartes
F-67084 STRASBOURG-CEDEX FRANCE
Tel. 00 33 (0)3 88 41 70 51
E-mail: libre@ibmc-cnrs.unistra.fr

Système immunitaire vs VIH: qui va gagner?

Présentation

Je suis actuellement en deuxième année de doctorat en virologie à l'institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC) de Strasbourg. Mon parcours est assez classique: après une licence de biologie cellulaire à Lille et un master de biologie des microorganismes spécialité virologie à Strasbourg, j'ai choisi de faire une thèse sur la relation entre une protéine du virus du SIDA (Vif) et une protéine de notre système immunitaire (APOBEC3G).



IBMC de Strasbourg

Projet de thèse

cycle de réplication du VIH

Pour contrer le VIH, les cellules de mammifères expriment de nombreuses protéines du système immunitaire appelés facteurs de restriction. Ces protéines vont cibler certaines étapes du cycle de réplication. APOBEC3G (A3G) fait partie de ces facteurs de restriction et va inhiber l'étape de transcription inverse du génome viral. En réponse à ces mécanismes de défense cellulaire, le VIH exprime des protéines auxiliaires telles que Vif (Viral infectivity factor) qui va contrer A3G.

dégradation d'A3G

inhibition de la traduction d'A3G

Méthode utilisée: transfections de cellules humaines et quantifications des protéines

Western blot (expression des protéines)

Conclusion

Le VIH est contré par plusieurs protéines antivirales naturelles appelées facteurs de restriction. Elles sont elles-mêmes contrées par des protéines codées par le VIH comme Vif qui inhibe APOBEC3G en induisant sa dégradation par le protéasome et en réprimant sa traduction. L'objectif du travail de thèse est de déterminer le ou les mécanismes induits par Vif pour inhiber la traduction d'A3G.



Camille Libre
 Architecture et Réactivité de l'ARN
 UPB 9002
 Equipe Retrovirus et virus à ARN
 c.libre@ibmc-cnrs.unistra.fr

Rôle et mécanisme de la régulation traductionnelle des facteurs de restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du VIH-1

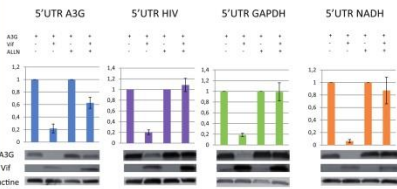
LIBRE C., GUERRERO S., BATISSE J., MARQUET R., & PAILLART J.-C.

Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France
c.libre@ibmc-cnrs.unistra.fr

INTRODUCTION

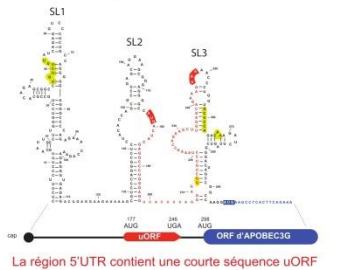
La protéine Vif (Viral Infectivity Factor) exprimée par le VIH-1 est importante pour la réplication du virus. En effet, elle contrecarre l'activité des facteurs de restriction APOBEC3G (A3G) et A3F. Ces protéines sont des désaminases de cytidines qui provoquent de nombreuses mutations délétères sur le génome viral au cours de la transcription inverse. Vif réduit de façon considérable le taux d'expression des protéines A3G/3F par deux mécanismes principaux : (1) en recrutant une E3 ubiquitine ligase, Vif induit la poly-ubiquitination et la dégradation d'A3G/3F par le protéasome ; (2) Vif régule négativement la traduction de l'ARNm d'A3G par un mécanisme encore inconnu. La conséquence est une diminution importante de l'encapsulation de ces facteurs de restriction dans la particule virale. Nous avons montré que Vif se fixe sur les régions non traduites (UTR) de l'ARNm d'A3G et de ce fait, elle pourrait provoquer l'arrêt du ribosome lors de l'initiation de la traduction. L'objectif de ce projet est de déterminer les mécanismes mis en place par Vif pour inhiber la traduction d'A3G et d'A3F.

RESULTATS

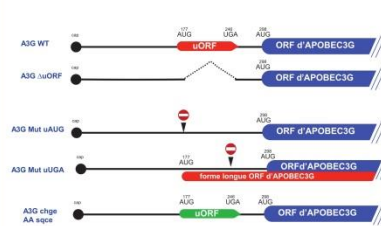


L'inhibition traductionnelle est spécifique de la région 5'UTR

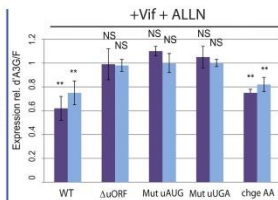
Après étude de plusieurs mutants de la 5'UTR d'A3G, nous avons observé que seules les liges-boucles SL2 et SL3 sont impliquées dans ce mécanisme de répression traductionnelle.



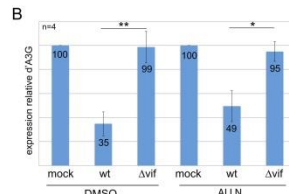
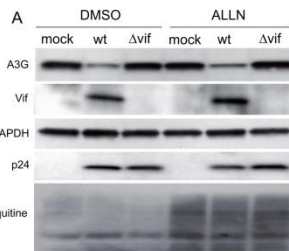
La région 5'UTR contient une courte séquence uORF



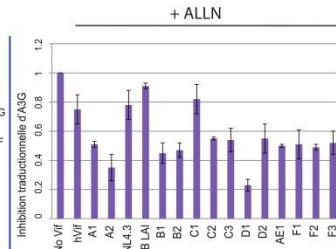
Représentation schématique des mutants étudiés



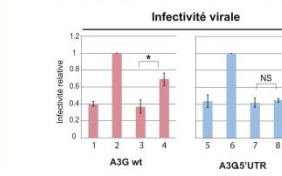
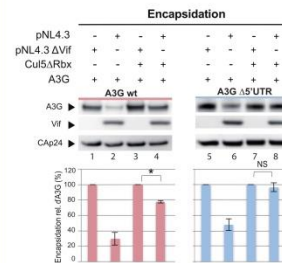
La séquence uORF est importante pour l'inhibition traductionnelle d'A3G/F par Vif mais la séquence en AA de l'uORF ne l'est pas



Vif régule la traduction d'A3G dans des cellules chroniquement infectées par le VIH-1 (H9)



L'inhibition traductionnelle est conservée chez le VIH-1



L'inhibition traductionnelle diminue l'encapsulation d'A3G et augmente l'inféctivité virale

CONCLUSIONS

Les constructions mutantes d'A3G/F ont permis de montrer que seule la région 5'UTR et plus précisément la séquence uORF est impliquée dans le mécanisme d'inhibition traductionnelle. Nous avons montré que cette inhibition traductionnelle est conservée à travers plusieurs sous-types du VIH-1. De plus, cette répression traductionnelle d'A3G/F par Vif est suffisante pour restaurer l'inféctivité virale. La compréhension de ce mécanisme est importante d'un point de vue fonctionnel car son inhibition permettrait une augmentation de l'incorporation d'A3G/F dans les virions et réduirait l'inféctivité virale.

Référence: Mercenne et al., Nucleic Acids Res. 2010 38, 633-646. HIV Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation

Translational control of APOBEC3G/F restriction factors HIV-1 Vif protein

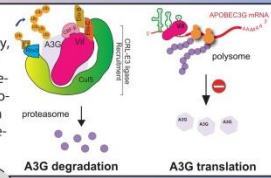


LIBRE C., GUERRERO S., BATISSE J., MARQUET R., & PAILLART J.-C.
 Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue
 René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France
 c.libre@bmc-cnrs.unistra.fr

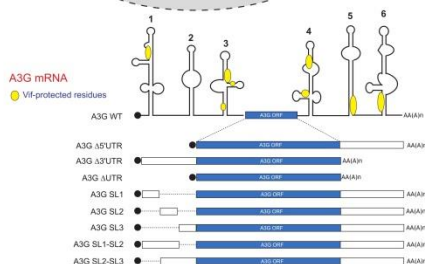


Introduction

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) requires the concerted contribution of many cellular factors to achieve efficient replication. Similarly, mammalian cells express a set of proteins called restriction factors to suppress viral replication. Among these factors, the family of APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 or A3) proteins and in particular A3G and A3F are the most efficient against HIV-1. They belong to a large family of cytidine deaminases that catalyze the deamination of cytidines to uridines in single stranded DNA substrate during HIV-1 retro-transcription. The antiviral activity of A3G/F is counteracted by the HIV-1 Vif (Viral infectivity factor) protein. Vif significantly reduces their expression in cell and their incorporation into viral particles by 1) recruiting an E3 ubiquitin ligase complex to induce their degradation by the proteasome, and 2) regulating their translation. Up to now, mechanisms by which Vif regulates the translation of A3G/F are unknown.

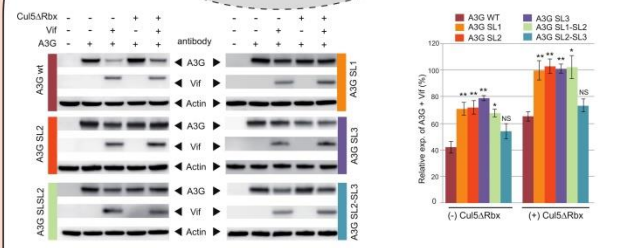


Methods

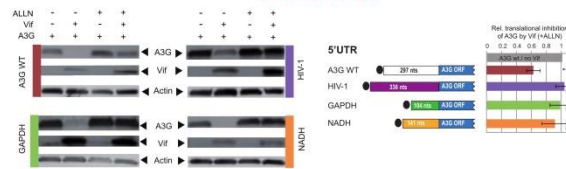


Transfection HEK 293T
 neg/DMSO proteasome inhibitors/Cu5ARbx
 ► Proteasome degradation
 ► Translational inhibition

5'UTR A3G mRNA

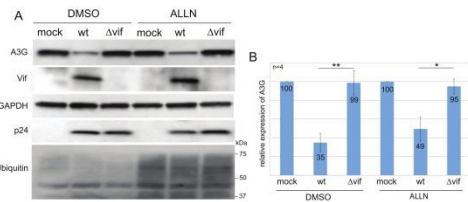


Within the 5'UTR of A3G mRNA, stem-loops 2 and 3 are required for the translational inhibition of A3G

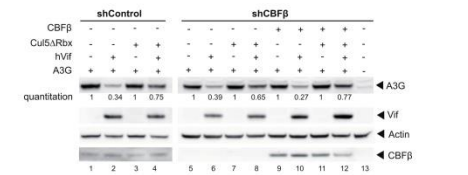


The translational inhibition is specific of the 5'UTR of A3G mRNA

Cells

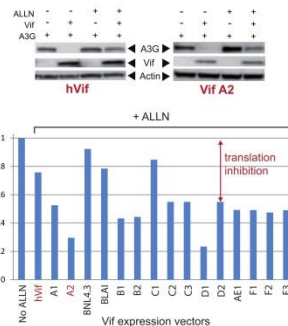


A3G is also translationally regulated by Vif in HIV-1 infected cells (H9)



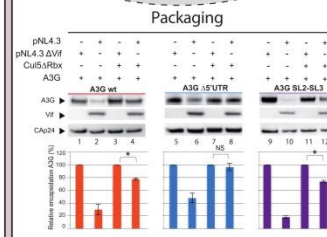
The transcription factor CBF-β (Core Binding Factor β), which is known to stabilize the Vif/A3G complex, is not essential to induce the translational inhibition of A3G by Vif

Vif

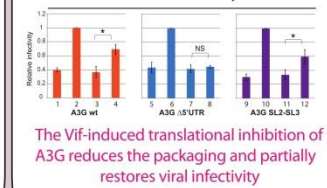


A3G is translationally inhibited by all HIV-1 Vif isolates

Infectivity



Virion infectivity



The Vif-induced translational inhibition of A3G reduces the packaging and partially restores viral infectivity

Conclusion

This study shows a second mechanism by which Vif decreases A3G/F expression in cells. This translational inhibition is an A3G 5'UTR-dependent mechanism and can increase HIV-1 viral infectivity. Thus, preventing the translation inhibition mechanism of A3G/F may restore the cellular restriction activity of A3G/F.

References:

Mercenne et al., Nucleic Acids Res. 2010 38, 633-646. HIV Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation.
 Guerrero et al., Inhibition of APOBEC3G translation by Vif restores HIV-1 infectivity. submitted

Acknowledgements

- NIH AIDS Reagent Program
 - M. Ooms, New-York, NY-USA (Vif subtypes)
 - R. Harris, Minneapolis, MN-USA (CBF-β cell lines)

This work is supported by



Poster présenté à la conférence Viruses 2016, Bâle, Suisse, 26-28 janvier 2016.

Contrôle traductionnel des facteurs de restriction APOBEC3G/F par la protéine Vif du VIH-1

Le VIH-1, *via* sa protéine Vif, contrecarre l'activité des facteurs de restriction A3G et A3F de plusieurs manières dont l'inhibition traductionnelle. Nous avons démontré que cette répression traductionnelle d'A3G par Vif est spécifique de la région 5'UTR. De plus, une séquence uORF contenue dans cette région est essentielle pour la régulation de la traduction ainsi que pour la répression par Vif. Nous avons montré qu'A3G et A3F sont traduits par leaky-scanning et ré-initiation et que la distance entre l'uORF et l'ORF principal est importante pour l'inhibition traductionnelle d'A3G et d'A3F. Ensuite, nous avons montré que ce mécanisme est très conservé à travers différents sous-types de Vif et que les acides aminés de Vif en position 39, 48 et 127 sont impliqués dans cette répression. Enfin, nous avons observé que l'interaction entre Vif et A3G est nécessaire pour la régulation traductionnelle. Des expériences de transfections des différents mutants d'A3G et d'A3F dans un système infectieux tel que le clone pNL4.3 sont envisagées. Celles-ci permettront de voir l'effet de l'uORF sur l'infectivité virale mais aussi sur l'assemblage, la maturation et la libération des nouvelles particules virales.

Mots clés : APOBEC3G/F, Vif, VIH-1, inhibition, traduction

The HIV-1, through its Vif protein, counteracts the restriction factors A3G and A3F activity in several ways including translational inhibition. We demonstrated that this translational repression of A3G by Vif is specific of the 5'UTR. Moreover, an uORF sequence contained in this region is essential for both the translational regulation and the repression by Vif. We showed that A3G and A3F are translated by leaky-scanning and re-initiation mechanisms and that the distance between the two ORFs is important for the translational inhibition. Then, we showed that this mechanism is conserved among several Vif subtypes and that the Vif amino acids 39, 48 and 127 are implicated in this repression. Finally, we observed that the Vif-A3G interaction is necessary for the translational inhibition. A3G and A3F mutants transfections experiments into an infectious system like the pNL4.3 clone are considered. It will permit to observe the uORF effect on the viral infectivity but also on the assembly, the maturation and the release of the viral particles.

Key words: APOBEC3G/F, Vif, HIV-1, inhibition, translation