

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÔLES DE TRIM5 ET ATG5 DANS LA RÉPONSE IMMUNE INNÉE
DE CELLULES INFECTÉES PAR LE VIH-1

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
SOUMIA KHALFI

NOVEMBRE 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Je dédie ce travail :

À mon grand-père Ahmed Khalfi (paix à son âme), une personne très inspirante d'où je tiens ma détermination, qui nous a quittés il y a quelques années, mais qui restera à jamais dans mon cœur.

À mes chers parents qui m'encouragent dans chaque chose que j'entreprends. Depuis ma naissance, vous m'avez tout donné, vous avez cru en moi et vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Je suis fière d'être votre fille. Je vous aime à l'infini et au-delà.

À mon cher mari, mon pilier et mon bras droit, tu m'as accompagné dans chaque étape de ce projet, tu m'as soutenu, tu m'as supporté, mais surtout tu as cru en moi tout au long. Je t'aime.

À ma sœur et son mari, nous avons commencé ensemble et nous brillerons ensemble.

REMERCIEMENTS

Merci au Bon Dieu le Tout-Puissant de m'avoir guidé pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers le professeur Lionel Berthoux, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail dans son laboratoire. Je le remercie aussi pour sa disponibilité et surtout pour le savoir qu'il m'a transmis.

Un grand merci au professeur Marc Germain, mon codirecteur, pour sa disponibilité et tous ses conseils.

Je remercie les évaluateurs Dr Lionel Berthoux, Dr Patrick Narbonne et Dr Benoit Brabeau d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise. Merci pour vos commentaires qui m'ont permis de produire une version de meilleure qualité.

Je remercie mes collègues : Natacha Mérindol et Mélodie B-Plourde pour tout le soutien, les précieux conseils et le savoir qu'elles m'ont transmis. Je remercie aussi : Amita, Nour, Kevin, Paméla et tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire durant ma maîtrise. Vous étiez plus que des collègues, mais une famille, merci pour tous les bons moments.

Je remercie les membres de ma famille : Mes parents, ma sœur et son mari qui, malgré la distance, me soutiennent depuis le début. Merci à mon cher mari, mon pilier, pour le soutien qu'il m'apporte au quotidien. Je remercie ma tante, son mari, et leurs enfants. J'ai de la chance d'avoir une famille comme vous.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tout le cadre professoral qui m'a encadré et soutenu durant ma maîtrise.

Je remercie Catarina Leote Franco Pio pour son aide et ses précieux conseils depuis le début de ma maîtrise.

Je remercie aussi mes collègues des autres laboratoires pour tous les bons moments.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce travail.

RÉSUMÉ

TRIM5 α est une protéine antirétrovirale, qui est stimulée par l'interféron. Elle peut directement se lier au virus et l'inhiber juste après son entrée dans la cellule. En plus de cette fonction, TRIM5 α est capable d'activer les voies de l'immunité innée. Récemment, il a été trouvé que TRIM5 α et d'autres protéines de la famille des TRIM, stimulent l'autophagie, un mécanisme de dégradation intracellulaire, caractérisé par la formation d'une structure avec une double membrane appelée autophagosome. Ce dernier libère des éléments intracellulaires au lysosome pour les dégrader. Il a également été démontré que l'interaction entre TRIM5 α et l'autophagie n'a pas d'effet sur le rôle de restriction de TRIM5 α . Cependant, il est possible que l'autophagie soit impliquée dans l'activation des voies de l'immunité innée par TRIM5 α . Dans ce projet, nous avons étudié le lien entre l'autophagie et l'activation des voies de l'immunité innée par TRIM5 α , et ce, dans des monocytes humains infectés par le VIH-1. Nous avons utilisé un outil génétique afin de bloquer l'autophagie et/ou TRIM5 α , dans le but de déterminer son importance dans l'établissement d'une réponse immunitaire dépendante de TRIM5 α . Ce projet nous a permis d'étudier le rôle de l'autophagie dans l'activation des voies de l'immunité innée par TRIM5 α lors d'une infection par le VIH-1. Nous avons observé une diminution dans l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules THP-1 doubles knockout (Atg5 KO/TRIM5 KO) après une infection par un vecteur VIH-1. Nous avons aussi observé une diminution dans la translocation nucléaire de AP-1 et dans les niveaux de transcription d'IFN- β dans ces mêmes cellules. Par conséquent, nos résultats suggèrent que les deux protéines TRIM5 α et Atg5 ont un rôle dans l'activation des voies de l'immunité innée NF- κ B et AP-1. Cette étude participe à la compréhension des mécanismes déployés au cours d'une infection virale par VIH-1, à l'éventuel développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots-clés : TRIM5, immunité innée, restriction, autophagie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Historique	1
1.1.1 Découverte du SIDA.....	1
1.1.2 Identification de l'agent causal	1
1.2 Rétrovirus	2
1.2.1 Structure.....	3
1.2.2 Génome.....	4
1.2.3 Cycle viral du VIH-1	6
1.2.4 Groupes de VIH-1.....	8
1.2.5 Voies de transmission du VIH	10
1.2.6 Progression de l'infection du VIH-1 au SIDA.....	11
1.2.7 Traitement antirétroviral	13
1.3 Réponse immunitaire innée de l'hôte	14
1.3.1 Facteurs de restriction.....	16
CHAPITRE II	
FONCTIONS CELLULAIRES ET ANTIVIRALES DE TRIM5A.....	21
Résumé.....	21
Abstract	22
La famille des TRIM.....	22
TRIM5 α et la restriction des rétrovirus.....	23
Restriction du VIH-1 et du VIH-2 par huTRIM5 α	24
Activité pro-inflammatoire de TRIM5 α	27
Promotion de l'état antiviral.....	28
Régulation de l'activité antirétrovirale de TRIM5 α humain.....	30

TRIM5 α et les flavivirus	30
TRIM5 α et l'autophagie.....	32
Applications thérapeutiques potentielles.....	35
Conclusion	36
Références	37
CHAPITRE III	
CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE	46
CHAPITRE IV	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
4.1 Culture cellulaire	47
4.2 Plasmides	47
4.3 Construction des plasmides et production des virus.....	48
4.4 Approches pour inhiber l'autophagie	49
4.5 Génération des cellules double knockout	49
4.6 Cytométrie en flux	50
4.7 Western blotting.....	50
4.8 Microscopie par immunofluorescence.....	51
4.9 QRT-PCR	52
CHAPITRE V	
RÉSULTATS.....	53
5.1 Knockout des protéines de l'autophagie (Atg5 et p62) et TRIM5 α par CRISPR dans les monocytes humains.....	53
5.2 Effet sur la fonction de l'autophagie	54
5.3 La suppression des protéines de l'autophagie Atg5 et p62 n'affecte pas la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α	57
5.4 La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée NF κ B induite par TRIM5 α	59
5.5 Le double knockout de TRIM5 α et Atg5 réduit significativement l'activation de AP-1	62
5.6 Le double knockout de TRIM5 α et Atg5 réduit la transcription de l'IFN- β	63
CHAPITRE VI	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	65
6.1 Perspectives	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure		Page
1.1	Structure d'un virion de VIH-1 et ses différents composants.....	4
1.2	Représentation schématique du génome viral du VIH-1	5
1.3	Cycle viral du VIH-1	8
1.4.	Réponse immunitaire innée contre une infection virale	15
1.5	Les sites d'actions des différents facteurs de restrictions du VIH-1	16
4.1	Processus de l'autophagie avec les différentes approches d'inhibition d'autophagie.....	49
5.1	Knockout des protéines Atg5, p62 et TRIM5 α par CRISPR dans des monocytes humains.....	56
5.2	La suppression des protéines de l'autophagie Atg5 et p62 n'affecte pas la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α	58
5.3	La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée NF- κ B induite par TRIM5 α (partie 1).....	60
5.4.	La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de l'immunité innée NF- κ B induite par TRIM5 α (partie 2)	61
5.5	La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée AP-1 induite par TRIM5 α	63
5.6	La suppression de la protéine Atg5 et TRIM5 α réduit la transcription de l'IFN- β	64
 Tableau		
1.1	Les protéines accessoires du VIH-1 et leurs principales fonctions.....	6
4.1	Liste des amorces de qRT-PCR	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activator Protein 1
APOBEC3	Apolipoprotein B editing complex 3
ARN	Acide ribonucléique
ARNg	ARN guide
ARNm	ARN messenger
BaFA1	Bafilomycine a1
B-MLV	Virus de leucémie murine B-tropique
CA	Protéine de la capsid du VIH-1, aussi appelée p24
Cas9 Nucléase	CRISPR associated protein#9
CCR5 Δ 32	Délétion de 32 pb dans le gène CCR5
CDC	Centers of Disease Control and prevention (États-Unis)
CE	Contrôleurs élités
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺
CypA	Cyclophiline A
dNTPase	Enzyme qui clive les dNTPs
dNTPs	Désoxyribonucléotides
EIAV	Virus de l'anémie infectieuse équine
<i>Env</i>	Gène de l'enveloppe rétrovirale
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, un type de cytométrie en flux
FBS	Serum bovin foetal

Gag	<i>Group-specific antigen</i>
GFP	Gène rapporteur de fluorescence verte
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 T, des cellules rénales embryonnaires humaines exprimant l'antigène grand T du virus SV40
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i>
HTLV-3	<i>Human T-lymphotropic virus type 3</i>
huTRIM5 α	Forme humaine la protéine TRIM5 α
IFN-I	Interféron de type I
Indel	Insertion ou délétion lors de la réparation de l'ADN
ISG	Gène stimulé par l'interféron
K63	Lysine en position 63
LAV	<i>Lymphadenopathy Associated Virus</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	Séquence terminale longue répétée, « <i>Long terminal repeat sequence</i> »
MA	Protéine de la matrice du VIH-1, aussi appelée p17
Mx2	<i>Myxovirus resistance 2</i>
N-MLV	Virus de leucémie murine N-tropique
NC	Protéine de la nucléocapside du VIH-1, aussi appelée p7
Nef	Protéine virale « <i>Negative factor</i> »
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
PAM	Motif adjacent au protospacer
PAMP	Motif moléculaire associé à un pathogène
PBS	Tampon salin phosphate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate

Pol	Gène rétroviral de la polymérase
PR	Protéase rétrovirale
Rev	Protéine virale « <i>Regulatory of viral protein expression</i> »
rhTRIM5 α	Forme macaque rhésus du facteur de restriction TRIM5 α
RING	Really Interesting New Gene, Domaine protéique à action E3 ubiquitine ligase
RPMI	Milieu de culture cellulaire Roswell Park Memorial Institute
RT	Enzyme réverse transcriptase
SAMHD1	Sterile Alpha Motif and Histidine-aspartate Domain containing protein 1
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TAK-1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TLR	Récepteur de type Toll, Toll like receptor
TRIM	Protéine à motif tripartite
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A
Vif	Protéine virale « <i>Virion infectivity factor</i> »
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1 en anglais)
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (HIV-2 en anglais)
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne (SIV en anglais)
VIScpz	VIS de chimpanzés
VISgor	VIS de gorilles
VISmm	VIS des singes sooty mangabey
Vpr	Protéine virale R
Vpu	Protéine virale U
VSV-G	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Historique

1.1.1 Découverte du SIDA

Cela fait plus de 30 ans que le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est étudié par la communauté scientifique. En 1981, le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) américain avait décrit un nouvel agent infectieux qui semblait cibler particulièrement fréquemment les jeunes homosexuels, et était caractérisé par l'apparition de symptômes tels que l'asthénie (fatigue générale), la perte de poids, et de maladies opportunistes rares telles que la candidose, les infections au cytomégalovirus, les pneumonies à *Pneumocystis carinii* et le sarcome de Kaposi qui semblaient résistants à tout traitement [1-4].

À cette époque, l'agent causal n'était pas encore identifié, mais au niveau biologique, il fut constaté qu'il y'avait une baisse rapide au niveau des lymphocytes T CD4⁺ rendant les patients vulnérables aux infections opportunistes et à diverses tumeurs, lorsque passant sous le seuil de 200 cellules/mm³[5]. En 1984, l'affection est désignée sous le terme de SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) [6].

1.1.2 Identification de l'agent causal

L'origine du SIDA était d'abord attribuée au premier rétrovirus humain le HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus type 1*) ayant été isolé un an auparavant et ciblant également les cellules T [7]. En 1983, Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi et leurs collègues à l'Institut Pasteur ont découvert l'agent causal du SIDA [8]. Par microscopie électronique, ce nouveau virus apparaissait différent du HTLV-1 et a été nommé

Lymphadenopathy Associated Virus (LAV). Environ un an plus tard, Robert Gallo et ses collègues du *National Institutes of Health* démontraient sans équivoque que ce virus était l'agent causal du SIDA et l'appelèrent HTLV-3 [9]. Enfin, en 1986, le comité international de la taxonomie des virus a recommandé l'unification de l'appellation de ce pathogène sous le nom de « Virus de l'Immunodéficience Humaine » (VIH) [10].

Peu de temps après l'identification du VIH, un second virus causant également le SIDA fut isolé et caractérisé chez des patients d'Afrique de l'Ouest atteint du SIDA [11]. Ce nouveau virus était semblable au VIH au niveau de la morphologie, mais pas au niveau moléculaire on le nomma alors LAV-2 [12]. Puis LAV-2 devint VIH-2 et son prédécesseur LAV-1 devint VIH-1. Sur le plan phylogénétique, le VIH-2 découle du VIS des singes sooty mangabey (VISmm) [13], alors que le VIH-1 provient du VIS trouvé chez les chimpanzés (VIScpz) [14].

Bien qu'ils présentent des symptômes cliniques similaires, le VIH-2 est considéré comme moins pathogénique, car il est moins transmissible et la progression de la maladie est plus lente [11, 15]. Le VIH-1 est responsable de la pandémie mondiale alors que le VIH-2 se limite plutôt à l'Afrique de l'Ouest. La prévalence du VIH-2 est beaucoup moins élevée puisqu'il toucherait entre 1 et 2 millions de personnes [16].

1.2 Rétrovirus

Les rétrovirus sont une famille de virus qui se distinguent par leur mode de répllication. Leur génome composé de deux brins identiques d'ARN monocaténaire est rétro-transcrit en un ADN double brin grâce à une enzyme virale, la transcriptase inverse (RT pour *reverse transcriptase*) dans les cellules nouvellement infectées. Cet ADN viral est ensuite intégré dans le génome de l'hôte sous forme de provirus. L'ARN rétroviral protégé par la capsid virale entre dans le cytoplasme de la cellule. Pour permettre l'import nucléaire et l'intégration dans le génome de la cellule hôte, ce noyau viral doit subir une décapsidation [17]. Ce processus est finement organisé et coordonné pour assurer la rétro-transcription tout en évitant la dégradation des acides nucléiques viraux ou le ciblage par

des facteurs de défense cytoplasmiques de l'hôte. La famille des rétrovirus se divise en deux sous-familles, soit les orthoretrovirus et les spumaretrovirus. Le VIH appartient au genre des *lentivirus* de la sous-famille des orthoretrovirus.

1.2.1 Structure

Les rétrovirus sont des particules de forme sphérique d'environ 100 à 130 nm de diamètre. Ils sont enveloppés d'une bicouche phospholipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte lors du bourgeonnement du virus et aussi composée de glycoprotéines de surface (glycoprotéine 120, gp 120) et transmembranaire (gp41) (Figure 1.1). Sa surface interne est recouverte de protéines structurales : la matrice (MA ou p17). MA est associée à une enzyme virale, la protéase (PR, p10). A l'intérieur de la matrice, le noyau viral en forme de cône est composé de la protéine de capsid (CA, p24) et contient l'ARN viral, ainsi que la protéine de nucléocapsid (NC, p7) formant un complexe ribonucléoprotéique. Ce complexe renferme également des enzymes virales spécifiques : la transcriptase inverse (RT, p66/p51) et l'intégrase (IN, p32). Les protéines accessoires : Nef, Vif, Vpr sont présentes dans la particule virale. Trois autres protéines accessoires, Rev, Tat, et Vpu, ne sont pas empaquetées dans le virion.

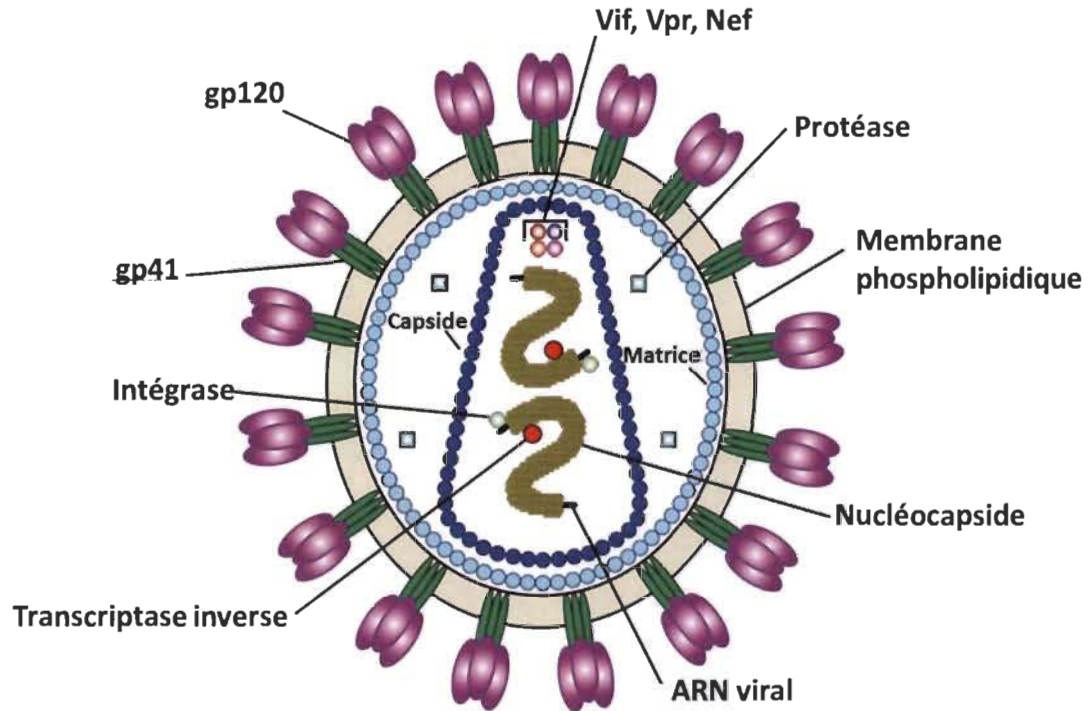


Figure 1.1 Structure d'un virion de VIH-1 et ses différents composants.

Le VIH est un virus à ARN enveloppé. L'enveloppe virale, dérivée des cellules hôtes, est parsemée de glycoprotéines virales, qui facilitent la fusion avec la cellule cible. Le noyau se compose de la capside, une structure conique abritant l'ARN génomique viral et des protéines virales, telles que l'intégrase, la transcriptase inverse et les protéines accessoires virales [18].

1.2.2 Génome

Le génome des rétrovirus est constitué en deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive. Le génome complet du VIH-1 est flanqué à chaque extrémité d'une séquence terminale non codante (LTR, *Long Terminal Repeat*) qui renferme le promoteur (en 5') et le site de polyadénylation (en 3') (Figure 1.2). Trois gènes structuraux codent des polyprotéines [19] essentielles à la réplication et communes à tous les rétrovirus [20]. Le premier *gag* (pour *group-specific antigen*) code pour un polyprécurseur Gag (ou p55) dont le clivage enzymatique par la protéase virale (PR) durant l'assemblage permet la formation de trois protéines de structure : la capside (CA), la matrice (MA) et la nucléocapside (NC). Pour sa part, *pol* (pour *polymerase*) code le précurseur Gag-pol

duquel découlent les trois enzymes virales : la protéase (PR) [3], la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Finalement, le gène *env* (pour enveloppe *glycoproteins*) code pour le précurseur p160 des protéines de l'enveloppe gp120 et gp41.

Les lentivirus possèdent des gènes supplémentaires qui codent pour d'autres protéines virales dites accessoires (pour le VIH-1 : Vif, Vpr, Vpu, Tet, Rev, Tat et Nef), permettant la régulation de diverses étapes de la réplication virale et de l'interaction avec les protéines de l'hôte. Vpu n'est pas présente chez le VIH-2 ni dans la majorité des VIS, où elle est remplacée par Vpx [20].

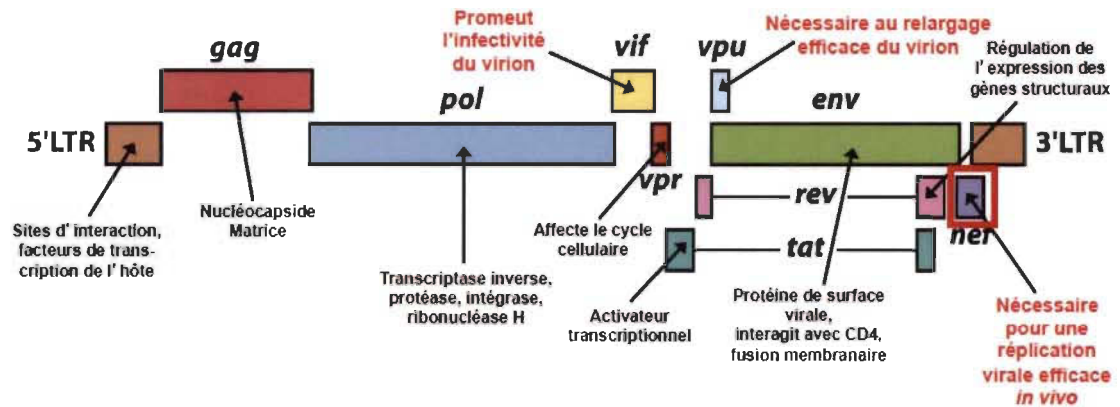


Figure 1.2 Représentation schématique du génome viral du VIH-1.

La transcription de l'ARN du VIH-1 produit plusieurs ARN en raison d'un épissage différentiel. Ceux-ci comprennent : l'ARN non épissé de pleine longueur (~ 9 kb), qui comprend l'ARN génomique et qui encode les précurseurs Gag ou GagPol; un ARN épissé unique (~ 4 kb), qui code pour la glycoprotéine d'enveloppe (Env) et les protéines accessoires Vif, Vpr, Vpu; ou ARN complètement épissé (~ 2 kb), qui code pour Tat, Rev et Nef (Tableau 1.1).

Tableau 1.1

Les protéines accessoires du VIH-1 et leurs principales fonctions [21-23]

Protéine	Fonctions principales
Vpu	Dégradation de CD4 Promouvoir la libération des virions Interférence avec thêterine
Vif	Stimulation de la rétro-transcription Inhibe le facteur de restriction APOBEC3G
Vpr	Importation nucléaire d'un complexe de pré-intégration Interférence avec la progression du cycle cellulaire de l'hôte (régulation G2/M) Induction de l'apoptose Stimulation de la synthèse virale
Nef	Modulation des récepteurs cellulaires (CD4, CMHI, CMHII, CD28) Amélioration de l'infectiosité virale Interférence avec la transduction du signal de la cellule hôte Interférence avec SRINC3/5
Rev	Exportation d'ARN viral non épissé ou monoépissé au noyau Effets sur la stabilité et la traduction de l'ARN viral
Tat	Promouvoir la transcription de l'ARN viral Induction de l'apoptose

1.2.3 Cycle viral du VIH-1

Les rétrovirus se répliquent selon le même cycle viral dans l'ensemble, malgré certaines différences. Nous allons décrire le cycle viral du VIH-1 (Figure 1.3).

Le cycle viral peut être divisé en deux phases :

- La phase précoce allant de la fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire.
- La phase tardive allant de l'expression des gènes du provirus jusqu'au bourgeonnement des nouveaux virions.

Lors de l'infection, les protéines gp120 de l'enveloppe du virus se lient avec une affinité élevée aux récepteurs CD4 des cellules humaines, présents chez les monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques [24, 25]. L'association gp120-CD4 induit un changement de conformation de la gp120, permettant ainsi le recrutement de corécepteur cellulaire. Les corécepteurs principaux impliqués dans l'entrée du VIH-1 sont CCR5 et CXCR4 [26-30], et définissent le tropisme viral. Le recrutement du corécepteur cellulaire entraîne d'autres changements conformationnels importants de la gp41 qui permettent l'exposition du peptide de fusion ce qui mène à la fusion des membranes virales et cellulaires, permettant ainsi le relargage du noyau viral dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme le virus procède à une décapsidation suivie d'une rétro-transcription par la RT, en utilisant les desoxyribonucleotides (dNTPs) présents dans la cellule. Par la suite, le complexe de préintégration s'établit, protégeant ainsi l'ADN viral de la dégradation par des facteurs cellulaires comme APOBEC3G et facilitant son intégration dans le génome de la cellule hôte [31]. La RT n'ayant pas d'activité correctrice, elle est peu fidèle et les erreurs de copie sont à l'origine de la variabilité génétique du VIH [32].

L'ADN viral intégré tire profit de la machinerie de transcription et de synthèse protéique de la cellule infectée afin de débiter la deuxième phase du cycle viral qui consiste à produire de nouveaux virions. La transcription de l'ADN proviral en ARN se fait grâce au LTR 5' jouant le rôle de promoteur et du signal de polyadénylation provenant du LTR 3'. Les ARNs messenger (ARNm) codant pour les précurseurs des polyprotéines Gag et de Gag-pol, pour les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) ainsi que les protéines accessoires et régulatrices, sont alors épissés ou non, puis exportés vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines structurales ou enzymatiques. Ces nouvelles protéines virales seront assemblées à deux brins d'ARN viral non épissé près de la membrane plasmique pour ainsi former de nouveaux virions et procéder au bourgeonnement. Finalement les virions subissent une étape de maturation grâce à la PR exprimée à partir du précurseur Gag-pol. Cette enzyme permet le clivage des deux précurseurs en leurs différentes protéines distinctes, ce qui mène à une maturation complète des virions. Cette dernière étape est cruciale, car seuls les virions matures ont la capacité d'infecter de nouvelles cellules [33].

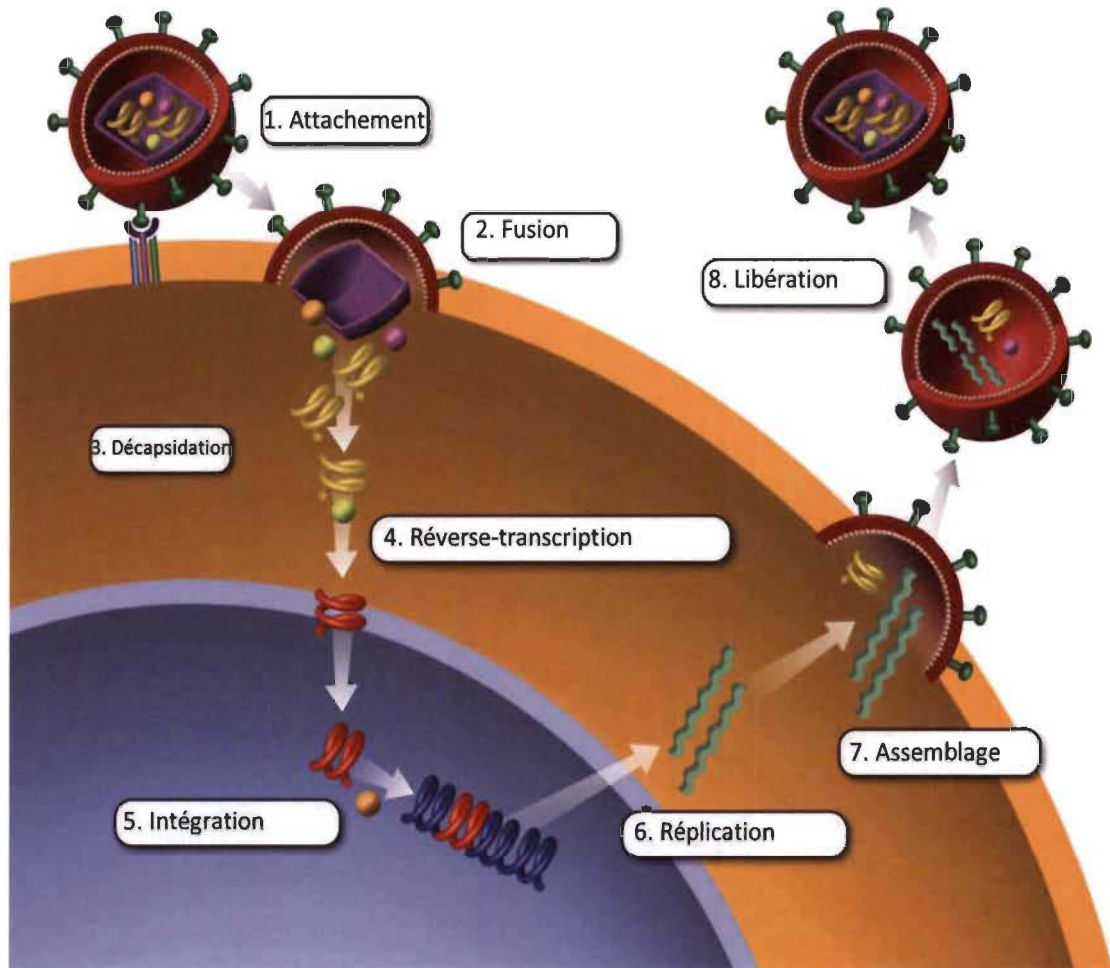


Figure 1.3 Cycle viral du VIH-1.

(1) Le virus s'attache à la membrane de l'hôte via des récepteurs, ce qui va permettre (2) leur fusion. Lors de la fusion (3) et suite à la décapsidation (4), le VIH-1 subit une réverse-transcription de son génome (ARN en ADN), et (5) se dirige vers le noyau, où il s'intègre dans le génome de l'hôte. (6) L'ARN du VIH-1 est transcrit et exporté vers le cytoplasme, (7) où il peut être utilisé dans la synthèse de protéines virales et la génération de virions. (8) Ces derniers sont par la suite libérés [34].

1.2.4 Groupes de VIH-1

Le VIH-1 comprend quatre groupes distincts : M (majeur), O (*outlier*), N (nouveau ou non-M, non-O), et P (putatif), chacun résultant d'un événement de transmission inter-espèces indépendant. Ils sont entre autres distingués par leur lieu d'origine et par l'action de leur protéine régulatrice Vpu. La plupart des infections à VIH-1 dans le monde sont causées par des virus du groupe M.

Le groupe M provient du virus de l'immunodéficience des chimpanzés (VIScpz) [11]. Premier groupe découvert, en 1983, sa transmission à l'humain daterait du début du XX^e siècle. C'est à Kinshasa en République démocratique du Congo où presque toutes les différentes sous-famille du VIH-1 ont été générées à partir de cet unique évènement de transmission chimpanzé-humain [11]. Plus de 70 millions de personnes sont infectées par le VIH-1 groupe M; pour plus de 30 millions de personnes, cette maladie a déjà conduit à une issue fatale.

Le groupe O a été découvert en 1990 et est beaucoup moins répandu que le groupe M [35, 36]. Les analyses phylogénétiques tendent à démontrer que le groupe O tiendrait sa source d'un VIS retrouvé chez les gorilles (VISgor), lui-même étant une adaptation du VIScpz. Le groupe O est endémique au Cameroun et dans les pays voisins de l'ouest de l'Afrique centrale. Cependant, même dans ces pays, le virus représente une minorité des souches de VIH-1 avec une prévalence de moins de 10 % des infections à VIH-1 au Cameroun [37], et moins de 1 % des infections mondiales par le VIH-1 [38, 39].

Le groupe N a été identifié en 1998 [40] et est encore moins répandu que le groupe O; à ce jour, seuls 13 cas d'infection du groupe N ont été documentés tous chez des individus du Cameroun [41]. Il s'agirait d'un variant ayant émergé dans une région du centre sud du Cameroun.

Enfin, le groupe P a été découvert en 2009 chez une Camerounaise [42]. Malgré un dépistage approfondi, le groupe P n'a jusqu'à présent été identifié que chez une autre personne, également du Cameroun qui est indépendante de la première [43]. Contrairement aux virus des groupes M, N et O qui sont proches du VIS infectant le chimpanzé (VIScpz), ce groupe est proche du VIS infectant le gorille (VISgor) [42].

Parmi les facteurs qui pourraient expliquer la prévalence du groupe M par rapport aux autres groupes, on peut noter la présence d'une protéine Vpu efficace tant dans son action anti-CD4 qu'anti-tétherine [11]. Le groupe O produit une protéine Vpu avec seulement l'action anti-CD4, mais bloque très peu la tétherine. Enfin pour le groupe N la protéine Vpu n'a qu'une très faible action [11].

1.2.5 Voies de transmission du VIH

Il existe plusieurs modes de transmission qui permettent au VIH d'être en contact avec ses cellules cibles qui sont entre autres des cellules de sang, notamment par contact direct avec : du sang, par des sécrétions sexuelles, et le lait maternel provenant de personnes infectées et par transplantation d'organe. Il peut aussi se transmettre de la mère à l'enfant pendant la grossesse et lors de l'accouchement [44]. Néanmoins, la voie d'infection la plus commune reste la transmission lors des relations sexuelles [45]. Toutefois, l'efficacité de transmission varie beaucoup entre ces différentes voies.

1.2.5.1 Transfusions sanguines et sang contaminé

L'efficacité de transmission par cette voie est de 95 %. Durant les années 90, les dons de sang n'étaient pas contrôlés, de nombreuses personnes ont été infectées suite à des transfusions de sang contaminé par le VIH [46].

1.2.5.2 Transmission de la mère à l'enfant

La transmission de la mère à l'enfant est la principale cause d'infection par le VIH chez les enfants et peut se faire à trois moments différents : au cours de la grossesse, au moment de l'accouchement, ou après l'accouchement lors de l'allaitement. En l'absence de toute intervention, 35 % à 49 % des enfants nés de mères séropositives sont infectés avec environ 8 % d'infection pendant la grossesse, 15 % pendant le travail et l'accouchement, et 12 % à 26 % pendant l'allaitement [47, 48].

1.2.5.3 Partage de seringues chez les consommateurs de drogues

Le partage de matériel d'injection non stérilisé chez les consommateurs de drogues injectables peut mener à la transmission par des agents infectieux des infections transmissibles par le sang comme le VIH. Ainsi, l'efficacité de transmission du VIH par partage de seringue infectée est de 3 à 10 %.

1.2.5.4 Contaminations accidentelles dans les milieux de santé

Le personnel de santé ainsi que les chercheurs peuvent, dans de rares cas, peuvent être infectés par le VIH lors d'une coupure ou d'une piqûre avec du matériel souillé ou lors d'une projection de sang infecté sur une muqueuse avec une efficacité d'environ 0,5 % (les yeux, l'intérieur du nez) [49].

1.2.5.5 Transmissions sexuelles

Certains types de relations sexuelles sont en moyenne associés à un risque plus élevé de transmission du VIH que d'autres. Par exemple, pour les relations anales, l'efficacité (0,11 % et 1,4 %) est plus élevée que dans les relations vaginales (0,04 % et 0,08 %). La transmission par voie sexuelle étant la moins efficace (0,1 % à 1 %), il demeure que c'est le mode de transmission majeur du VIH entre les individus.

Plusieurs pratiques ont aidé à la diminution des nouveaux cas dans les pays industrialisés telles que : le traitement antirétroviral (TAR), un meilleur dépistage, un contrôle pointu des dons (organes et sang), un suivi des grossesses rigoureux chez les femmes séropositives en plus d'effectuer les naissances par césarienne et de traiter tant la mère que l'enfant durant l'allaitement, l'apparition des centres d'injections supervisées et évidemment une sensibilisation de la population quant aux pratiques sexuelles protégées.

1.2.6 Progression de l'infection du VIH-1 au SIDA

Le VIH-1 est l'un des agents infectieux actuels les plus meurtriers en raison de l'absence de vaccin et de l'augmentation continue de la prévalence. Depuis son apparition, le VIH-1 a causé près de 40 millions de morts. Le sida est le stade avancé de l'infection par le VIH qui survient lorsque le système immunitaire de l'organisme est gravement affaibli à cause du virus. La progression de la maladie se développe en trois étapes résumées ci-dessous.

1.2.6.1 Infection aiguë par le VIH

L'infection aiguë par le VIH est le stade le plus précoce de l'infection et dure généralement 2 à 4 semaines. Durant cette phase, certaines personnes présentent des symptômes pseudo-grippaux, tels que fièvre, maux de tête et éruptions cutanées. Au stade aigu de l'infection, le VIH se réplique rapidement et se dissémine dans tout le corps. Le virus infecte plus de cellules CD4⁺ anti-infectieuses déployées par le système immunitaire. La baisse des cellules immunitaires conduit à une augmentation du taux de VIH dans le sang, avec une augmentation considérable du risque de transmission du VIH [50].

1.2.6.2 Infection chronique à VIH

L'infection chronique du VIH est le deuxième stade de l'infection, également appelée infection à VIH asymptomatique ou latence clinique. Au cours de cette étape, les personnes atteintes d'une infection chronique par le VIH peuvent ne présenter aucun symptôme lié au VIH. Néanmoins, le sujet peut démontrer des symptômes de fièvre, de perte de poids, de diarrhée, de toux et d'enflure des ganglions lymphatiques. Le VIH continue de se multiplier dans le corps à des niveaux assez élevés [51]. C'est au cours de cette étape qu'on peut commencer à détecter des anticorps spécifiques au VIH-1, dont ceux contre la protéine virale de CA p24 [52]. Bien que la charge virale sanguine soit diminuée comparativement à la phase aiguë, le sujet reste infectieux [51]. Sans traitement antirétroviral, l'infection chronique à VIH évolue généralement vers le SIDA en 10 ans ou plus, bien que chez certaines personnes, elle puisse progresser plus rapidement.

1.2.6.3 SIDA

Le SIDA est le stade final de l'infection par le VIH, puisque le système immunitaire est gravement affaibli et le corps ne peut plus combattre les infections opportunistes. On établit qu'un sujet passe du stade infection au stade SIDA si son taux de CD4⁺ est inférieur à 200 cellules/mm³ ou s'il a certaines infections opportunistes [53]. Il peut avoir une charge virale élevée conduisant à des fréquences de une transmission plus

élevées [53]. Sans traitement antirétroviraux, les personnes atteintes du SIDA ont une espérance de vie de quelques mois à trois ans.

1.2.7 Traitement antirétroviral

Les progrès des stratégies thérapeutiques antirétrovirales ont considérablement amélioré la survie et réduit la mortalité associée à l'infection. Actuellement, plus de 25 médicaments ont été développés pour cibler divers aspects du cycle de vie du VIH-1, et surtout, ces médicaments sont utilisés en combinaison pour limiter le développement potentiel de la résistance aux médicaments [15]. Toutefois, à ce jour, aucun des traitements disponibles ne permet d'éradiquer l'infection. Les traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART) ont pour objectifs de réduire la charge virale, de limiter la production de nouvelles particules virales et l'infection de nouvelles cellules ainsi que de restaurer l'immunité des individus infectés [54].

Chaque classe de médicament antirétroviral est dirigée contre une étape du cycle viral. Ils incluent des inhibiteurs d'attachement et d'entrée, de la reverse-transcription, des inhibiteurs de protéase et des inhibiteurs d'intégrase [15].

À l'heure actuelle, la norme pour toute personne sous HAART est l'utilisation de médicaments avec au moins deux mécanismes d'action différents (par exemple, deux inhibiteurs de reverse-transcription et un inhibiteur de protéase) [15]. En effet, au cours du temps, le VIH peut subir des mutations qui le rendent résistant aux médicaments. En ciblant plusieurs étapes du cycle viral en même temps, l'émergence de la résistance peut être ralentie ou empêchée. On considère que le traitement est efficace lorsque la charge virale plasmatique est sous le niveau de détection, soit moins de 50 copies d'ADN viral par millilitre [51]. Par contre, l'arrêt du traitement mène à un rebond de la virémie, généralement dans les 2 à 3 semaines suivant l'interruption du traitement [55]. Cette virémie résiduelle est présente chez tous les patients infectés par le VIH-1, peu importe depuis combien d'années ils sont sous traitement [51]. Elle est due à l'existence de réservoirs cellulaires où le VIH-1 échappe aux antirétroviraux, sans pour

autant acquérir des mutations de résistance à ces drogues, et tout en gardant leur potentiel répliatif menant à ce rebond viral [56]. Ce sont majoritairement les cellules T CD4⁺ qui sont infectées de façon latente [51].

1.3 Réponse immunitaire innée de l'hôte

La réponse antivirale innée intracellulaire dans les cellules humaines est une composante essentielle de l'immunité contre l'infection virale. Les éléments de l'immunité innée comprennent les barrières anatomiques (mécaniques : surfaces épithéliales, et chimiques : lysozyme et phospholipase de la salive, des larmes et des sécrétions nasales) [57], les molécules sécrétées (telles que l'interféron et l'interleukine) [58] et des composantes cellulaires (macrophages, cellules NK, neutrophiles et éosinophiles) [59]. Elle est conçue pour reconnaître des structures fortement conservées présentes dans de nombreux micro-organismes appelées *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) dont le LPS (lipopolysaccharide) de la paroi cellulaire des bactéries gram négatif, les peptidoglycanes, les acides lipotéchoïques de la paroi cellulaire des bactéries gram positif, le mannose, l'ADN bactérien, les ARN et ADN viraux, et les glycanes de la paroi des cellules fongiques [60]. La plupart des cellules immunitaires possèdent des *pattern-recognition receptor* (PRR) qui reconnaissent ces PAMP et induisent une réponse immunitaire immédiate contre les micro-organismes. La distribution des PRR varie : par exemple, les récepteurs de type TLR sont distribués dans divers types de cellules et sont exprimés à la surface cellulaire ou dans les endosomes [61, 62]. D'autre part, les récepteurs de type RIG-I (RLR) sont des PRR cytosoliques largement exprimés dans la plupart des types de cellules [63, 64]. Une caractéristique commune de la signalisation PRR est l'induction de la production de l'IFN de type I (α et β).

La réponse immunitaire est induite lorsque les PRR de la cellule hôte détectent les PAMP. Ce processus induit une signalisation en aval via des protéines adaptatrices pour activer des facteurs de transcription latents qui conduisent à l'expression de gènes codant pour des protéines effectrices antivirales et immunomodulatrices qui restreignent la réplication du virus et régulent l'immunité adaptative. Les facteurs de régulation de

l'interféron (IRF) sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle majeur dans l'immunité innée. En particulier, IRF3 est activé en réponse à une infection par certains virus comprenant des virus à ARN, des virus à ADN et des rétrovirus tels que le VIH-1 (Figure 1.4) [65]. Une fois activé, IRF3 transloque au noyau et active la transcription du gène IFN-I [64]. L'IFN-I produit se lie à son récepteur pour signaler l'induction de centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG) dans le tissu local non infecté et les cellules infectées, créant ainsi un état antiviral qui supprime l'infection virale et favorise l'induction de l'immunité adaptative (Figure 1.4) [66, 67]. Cet état antiviral est caractérisé par l'action des ISG entre autres les facteurs de restrictions qui peuvent interagir directement avec les virus. En même temps, les ISG exprimés peuvent conférer une maturation des cellules dendritiques pour accélérer la présentation de l'antigène aux cellules immunitaires adaptatives [68], y compris les cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$ [69, 70].

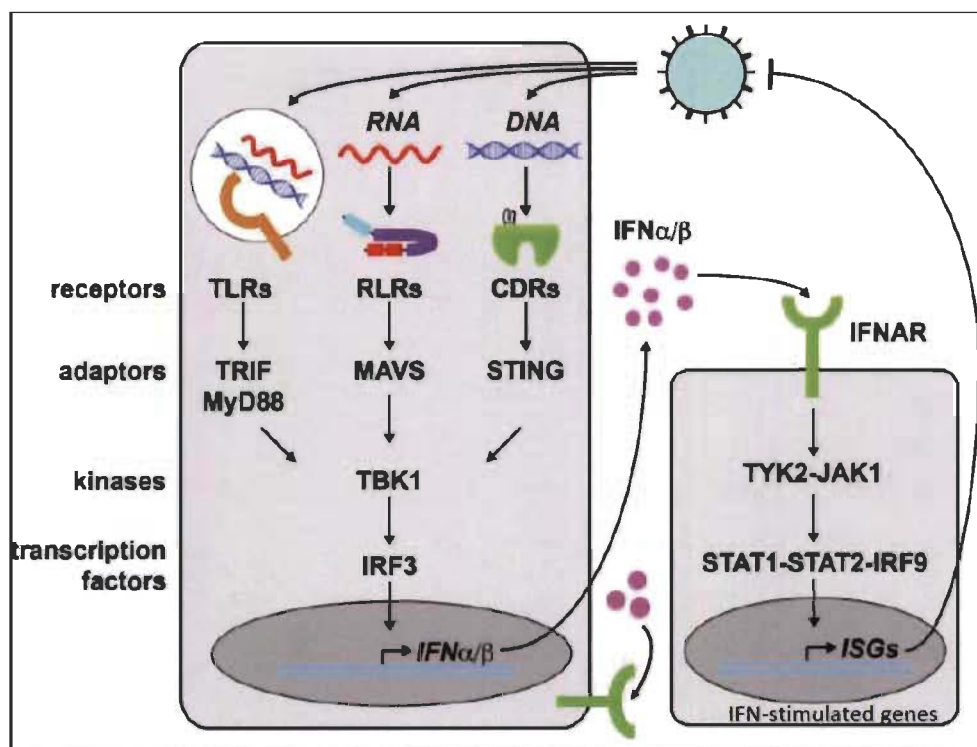


Figure 1.4. Réponse immunitaire innée contre une infection virale.

La reconnaissance PRR-PAMP conduit à la phosphorylation d'IRF3, à la dimérisation, à la translocation nucléaire et à la transcription de l'IFN- β . Une fois transcrit, l'IFN- β se fixe sur son récepteur et conduit à l'activation d'une cascade de signalisation pour activer la transcription des ISG.

1.3.1 Facteurs de restriction

Les facteurs de restriction sont des protéines hôtes qui inhibent spécifiquement une ou plusieurs étapes du cycle viral (Figure 1.5) [71].

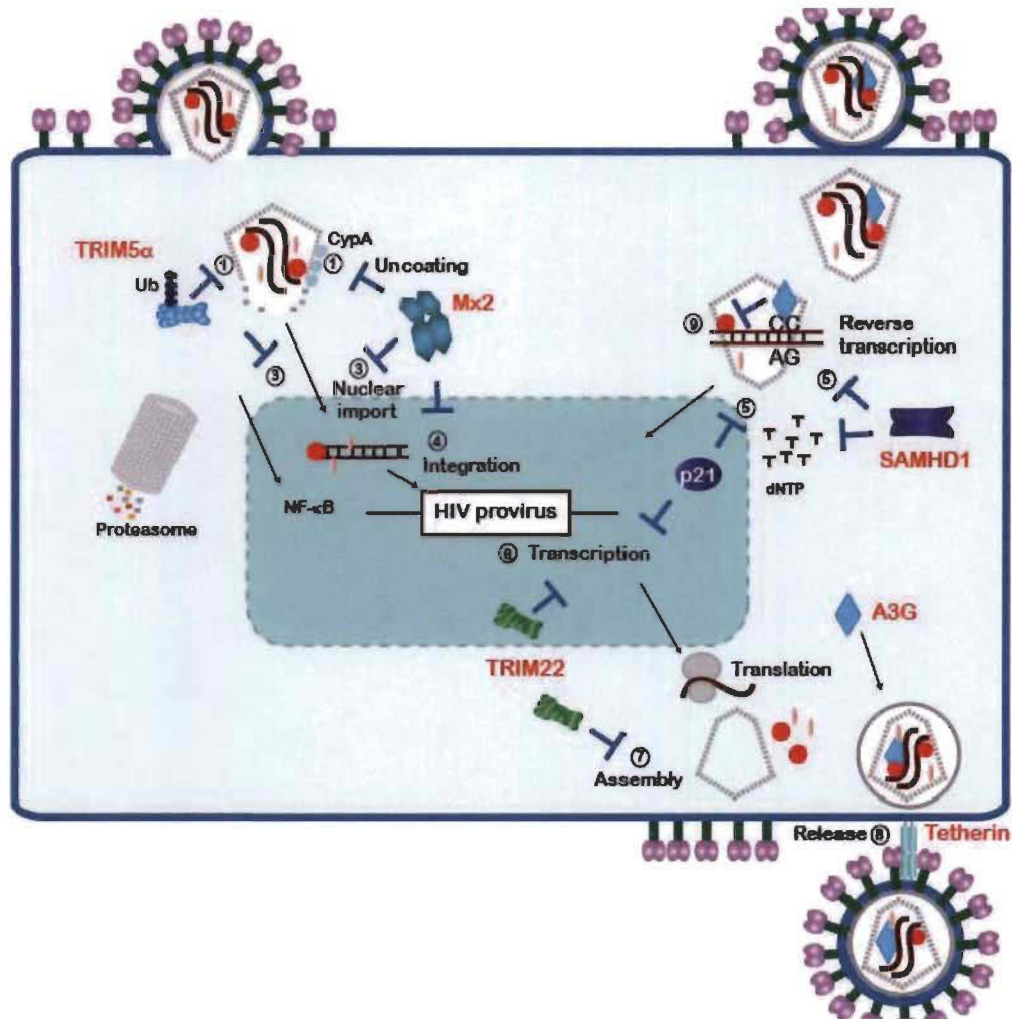


Figure 1.5 Les sites d'actions des différents facteurs de restrictions du VIH-1. Le cycle de réplication viral est finement organisé. Il peut subir des perturbations induites par des facteurs de restriction (en rouge) à différents niveaux. Ces derniers peuvent conduire à la détection et la dégradation du VIH-1 [71].

1.3.1.1 APOBEC3G

APOBEC3G a été le premier facteur de restriction spécifique au VIH-1 à être identifié. Il fait partie de la famille de cytidine désaminase APOBEC3 (*apolipoprotein B*

mRNA-editing complex 3) qui comprend sept protéines (A, B, C, D/E, F, G et H). Les protéines A3 sont induites par l'IFN de type I, en particulier dans les cellules myéloïdes. Elles restreignent plusieurs rétrovirus, y compris le VIH, le VIS, HTLV-1, les spumaviruses, EIAV, le MLV, et le virus de l'hépatite B qui a un intermédiaire ADNsb [72-74] [75]. Ce sont des enzymes encapsidées dans les virions lors du bourgeonnement ainsi que des médiateurs clés de la restriction des rétrovirus en induisant des hypermutations dans le génome du virus. Cependant le VIH échappe à leur action antivirale grâce à la protéine auxiliaire Vif en conduisant à leur dégradation par le protéasome. La protéine APOBEC3B est en partie résistante à la dégradation médiée par Vif et présente une activité anti-VIH non négligeable. Une étude a montré qu'une absence de la protéine APOBEC3B serait associée à un risque accru d'infection par le VIH, ainsi qu'une progression plus rapide vers le stade SIDA [76]. APOBEC3G est le membre le plus abondant *in vivo* et est exprimé dans les lymphocytes B et T et dans les cellules myéloïdes [77-79]. L'existence d'une corrélation positive entre le taux d'expression d'APOBEC3G et une progression favorable de la maladie a été suggérée [80]. La protéine APOBEC3A, dont l'expression est spécifique aux cellules myéloïdes, inhibe également le VIH-1 et d'autres lentivirus humains. La déplétion du « pool » de protéines APOBEC3A conduit à une accumulation de l'ADN viral suggérant donc que cette protéine induit la dégradation des génomes viraux. La protéine virale Vpx offre une protection partielle contre ce facteur en induisant sa dégradation via le protéasome [81].

1.3.1.2 Mx2

Des données indiquent que peu de temps après son entrée dans les cellules cibles, le VIH-1 est ciblé par un facteur de restriction: la protéine Mx2. Aussi connu sous le nom MxB (IFN-inducible Myxovirus resistance 2/B), c'est une GTPase de la famille des « Dynamine-like », inductible par les IFN de type I et de type III [82]. En 2011, Mx2 était décrit comme un inhibiteur potentiel du VIH-1 [67], elle s'est avérée plus tard agir à une étape de post-entrée tardive avant l'intégration de l'ADN proviral, et éventuellement au niveau de l'importation nucléaire après RT [83, 84]. Les orthologues Mx2 agissent selon un mode d'interaction virus-hôte spécifique à l'espèce [85]. Mx2 reconnaît spécifiquement

la capsid virale [86]. L'interaction protéine-protéine se fait via la boucle cyclophiline-A des protéines de capsid [87], permettant l'inhibition de la décapsidation virale par Mx2 [86]. Plusieurs mutations dans la CA et dans l'intégrase peuvent conférer une résistance à Mx2 [83, 85, 87, 88]. Plus précisément, des substitutions dans la boucle de liaison de la cyclophiline aux positions 86-88 et 92 permettent au VIH-1 d'échapper à l'activité restrictive de Mx2 [87]. Le traitement à la cyclosporine, qui bloque l'interaction de la cyclophiline avec la CA, restaure l'infection en présence de Mx2, bien qu'à des degrés divers selon les lignées cellulaires utilisées [85, 89].

1.3.1.3 SAMHD1

Découvert en 2011, SAMHD1 (Sterile Alpha Motif And Histidine-aspartate Domain containing protein 1) est le second facteur de restriction qui inhibe la rétro-transcription. Elle est composée d'un domaine SAM qui interagit avec d'autres protéines et ARN, et d'un domaine HD avec une activité enzymatique dNTPase [90, 91], fractionnant les nucléotides (dNTPs) présents dans la cellule. [91, 92]. SAMHD1 est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et cellules dendritiques (CD)) et dans les cellules T CD4⁺ au repos réfractaire à l'infection par le VIH-1 [93-95]. Elle est inductible par l'IFN de type I dans les monocytes, mais pas dans les CD et les cellules T CD4⁺ au repos [96, 97]. Cette protéine est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme d'une variété de types cellulaires à différents niveaux [96, 98]. On a d'abord cru que le principal potentiel restrictif de SAMHD1 reposait sur son activité dNTP hydrolase qui clive les dNTP en désoxynucléosides et triphosphates, réduisant ainsi la disponibilité du pool de dNTP intracellulaires pour la RT du VIH-1 [90, 96, 99]. Il a ensuite été démontré, *in vitro*, qu'en présence d'une faible quantité de dGTP, SAMHD1 peut lier tant les formes simple-brin d'ADN et d'ARN viral et entraîner leur dégradation par son action RNase, particulièrement lors de la rétro-transcription [100]. Le VIH-1 ne possède pas de mécanisme pour contrer la restriction médiée par SAMHD1, bien qu'un tel mécanisme soit assuré par Vpx chez le VIH-2 [101], et Vpr chez le VIS [102].

1.3.1.4 *SERINC5 et SERINC3*

Les protéines SERINC font partie d'une famille de protéines transmembranaires présentes dans toutes les cellules eucaryotes. De tous les membres de cette famille, seuls les SERINC3 et SERINC5 ont la capacité d'inhiber l'infection virale à un stade précoce du cycle viral, en inhibant la fusion virale et en jouant le rôle de facteurs de restriction [103, 104]. Elles ont pour rôle d'ajouter des serines, un acide amine polaire, dans la membrane lipidique [105]. Cette protéine est incorporée dans les virions, ce qui réduit leur infectivité puisque l'ajout de serines empêche la fusion des virions à de futures cellules cibles. L'activité antivirale de SERINC3 et SERINC5 est contrecarrée par Nef (en conduisant à une diminution de leur incorporation dans les virions), car Nef l'enlève de la membrane plasmique et la séquestre dans les endosomes pour sa dégradation ultérieure [103, 104].

1.3.1.5 *Tétherine*

La tétherine (BST2/CD137) est une protéine ubiquitaire produite par les cellules en réponse à certaines infections virales (taux d'expression de la tétherine contrôlé par la présence d'IFN α). La tétherine est exprimée dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules T CD4 +, les cellules B matures, les cellules stromales de la moelle osseuse et dans certaines lignées de cellules cancéreuses [106-108]. Elle cible la bicouche lipidique et cause la restriction de plusieurs virus enveloppés [109]. En effet, ce facteur de restriction possède un domaine transmembranaire qui l'ancre à la membrane de la cellule, et un domaine glycosylphosphatidylinositol en C-terminal [110] s'insérant dans l'enveloppe virale. Elle n'empêche pas le bourgeonnement des virions, mais, sous son action, le virus est retenu à la surface de la cellule infectée. Les virions accumulés à la surface de la cellule joueraient le rôle de PAMP permettant l'activation de l'immunité innée par la voie NF- κ B lors de la restriction du VIH-1 avec une protéine Vpu défectueuse [111]. Cependant, l'action de tétherine envers le VIH-1 est inhibée par les protéines virales Vpu (pour les groupes M et N) [112] et Nef (pour le groupe O) [113], qui capturent tétherine au site d'assemblage des virions et la retirent de ceux-ci [114].

1.3.1.6 TRIM22

TRIM22, précédemment appelé Staf50, est un autre facteur de restriction qui peut être localisé dans le cytoplasme, dans le noyau ou les deux [115-118]. Elle fait partie de la famille des TRIM (Chapitre II). Les deux déterminants viraux responsables de restriction envers le VIH-1 sont le LTR et Gag [119]. TRIM22 inhibe la transcription des gènes viraux et interfère aussi avec l'assemblage et la libération des virions en empêchant le trafic intracellulaire de Gag vers la membrane plasmique [118, 120].

1.3.1.7 TRIM5 α

TRIM5 α est un autre facteur de restriction que nous allons décrire en détail dans le chapitre II.

CHAPITRE II

FONCTIONS CELLULAIRES ET ANTIVIRALES DE TRIM5A

Article en français accepté pour publication
dans la revue *Virologie* – John Libbey, en août 2020.

Soumia Khalfi¹, Natacha Mérindol¹, Lionel Berthoux¹

¹ Département de biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada

Résumé

Dans cette revue, nous résumons les avancées récentes dans l'étude des fonctions biologiques de TRIM5 α humaine, une protéine cytoplasmique connue principalement pour ses fonctions antirétrovirales. En plus de cibler directement le noyau capsidique viral, une activité appelée « restriction », TRIM5 α a une fonction de détection de rétrovirus conduisant à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et AP-1 de l'immunité innée et résultant notamment en la production d'interféron de type I (IFN-I). L'état antiviral résultant de ces voies d'activation implique la régulation positive d'autres facteurs de restriction, et est considérée comme probablement importante pour le contrôle du VIH-1 chez certains patients. TRIM5 α inhibe également la protéase de certains flavivirus transmis par les tiques, une famille de virus relativement éloignée des rétrovirus. En plus de ces fonctions antivirales, TRIM5 α favorise l'autophagie, un processus de dégradation intracellulaire, et joue le rôle de récepteur de l'autophagie en interagissant avec des protéines clés de l'autophagie telles que ULK1 et p62. Il est également possible que TRIM5 α fonctionne comme récepteur spécifique pour l'autophagie dans certaines conditions. En conclusion, l'état des connaissances sur TRIM5 α montre son potentiel dans le développement d'applications médicales dans le contexte de maladies infectieuses et au-delà.

Mots clés : TRIM5 α , immunité innée, rétrovirus, flavivirus, autophagie.

Abstract

In this review, we summarize recent advances in the knowledge of the biological functions of human TRIM5 α , a cytoplasmic protein mostly known for its antiretroviral functions. In addition to directly targeting retroviral capsid cores, an inhibitory activity called “restriction”, TRIM5 α senses retroviruses and activates NF- κ B and AP-1 signaling pathways, resulting in the production of type I interferon (IFN-I). The antiviral state resulting from the activation of these pathways includes the upregulation of other restriction factors, and is thought to be important for the control of HIV-1 in some patients. TRIM5 α also targets the protease enzyme of several tick-borne flaviviruses, a family of viruses not closely related to retroviruses. In addition to these antiviral functions, TRIM5 α promotes autophagy by interacting with key actors of this pathway, such as ULK1 and p62. TRIM5 α may function as a selective autophagy receptor in some conditions. Altogether, our understanding of TRIM5 α shows its potential for the development of medical applications in viral diseases and beyond.

Keywords: TRIM5 α , innate immunity, retrovirus, flavivirus, autophagy

La famille des TRIM

La famille des protéines à motif tripartite (TRIM) est définie par la présence de trois domaines spécifiques : le domaine RING (*really interesting new gene*) à l'extrémité N-terminale qui confère l'activité ligase d'ubiquitine E3, un ou deux domaines *B-Box*, et le domaine *coiled-coil* (CC) [1-3]. Le domaine C-terminal détermine les principales différences structurelles au sein de la famille des TRIM et leur classification en 11 sous-familles [4-6]. Une grande proportion des protéines TRIM possède aussi un domaine PRYSPRY (ou SPRY pour *splA kinase and Ryanodine Receptor*, ou B30.2) à l'extrémité C-terminale qui leur permet d'interagir avec des protéines cibles [7]. Les protéines TRIM sont impliquées dans divers processus cellulaires, incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement, le contrôle de la qualité des protéines, l'autophagie, l'apoptose, l'oncogenèse et l'immunité innée. Un nombre

grandissant de protéines TRIM présentent une activité antivirale, notamment TRIM1 [8], TRIM11 [8], TRIM15[8], TRIM19 (PML) [10], TRIM22 [11], TRIM28 [12], TRIM31 [8] et TRIM34 [9]. Parmi les membres de la famille TRIM qui inhibent le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), l'isoforme α de TRIM5 (Figure 1) est le mieux étudié.

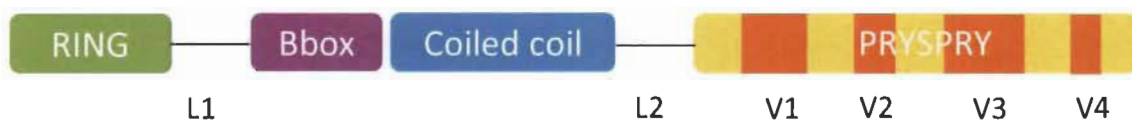


Figure 1 Représentation schématique de la protéine TRIM5 α .

TRIM5 α possède 3 motifs propres à la famille des TRIM : RING, B-Box et Coiled-Coil (RBCC). Les domaines RING et B-Box sont connectés par un segment flexible, linker 1 (L1). Le linker 2 (L2) relie RBCC au domaine de liaison au noyau viral PRYSPRY qui est en C-terminal. Celui-ci possède 4 régions hyper variables.

TRIM5 α et la restriction des rétrovirus

La première fonction démontrée pour TRIM5 α a été l'inhibition des rétrovirus. Les cellules de mammifères expriment de nombreuses protéines effectrices de l'immunité innée, appelées « facteurs de restriction », qui constituent une première ligne de défense en bloquant la réplication et la propagation des virus. Ces facteurs peuvent souvent agir sans stimulation externe, mais leur expression et leur activité sont généralement améliorées par les interférons de type I (IFN-I) [13]. TRIM5 α est localisée au niveau cytoplasmique et forme des structures très dynamiques appelées corps cytoplasmiques [14]. Son expression est stimulée par l'IFN-I [15]. Elle se retrouve également sous forme d'agrégats protéiques lorsqu'elle est surexprimée [16]. À la place de TRIM5 α , certaines espèces simiennes expriment TRIMCyp, une protéine qui se compose des domaines RING, B-box et CC de TRIM5 fusionnés avec la cyclophiline A (Cyp A) en C-terminal [17]. TRIM5 α permet, grâce à son domaine PRYSPRY, la restriction des rétrovirus de manière spécifique à l'espèce à travers des interactions directes avec le noyau viral [7]. En effet, PRYSPRY comporte 4 régions hyper variables (V1 à V4) en forme de boucles qui interagissent avec le domaine N-terminal de la protéine de capsid

rétrovirale et dont la structure flexible permet la reconnaissance spécifique de la capsid de différents rétrovirus [18, 19]. L'activité de restriction de TRIM5 α contribue à la prévention des transmissions inter-espèces des rétrovirus [20-22]. Par exemple, TRIM5 α du macaque Rhésus (rhTRIM5 α) est un puissant inhibiteur du VIH-1 [23, 24], mais pas du virus de l'immunodéficience simienne du macaque (VISmac), alors que TRIM5 α humain (huTRIM5 α) ne provoque généralement qu'une inhibition modeste du VIH-1 mais restreint fortement le virus de la leucémie murine N-tropique [25] et le virus de l'anémie infectieuse équine [26].

Restriction du VIH-1 et du VIH-2 par huTRIM5 α

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est l'un des agents infectieux actuels les plus meurtriers en raison de l'absence de vaccin et de l'augmentation continue de la prévalence. Depuis son apparition, le VIH-1 a causé près de 40 millions de morts. Suite à l'infection, une large majorité des individus présentent une charge virale détectable en l'absence de traitement antirétroviral, et seulement une faible proportion (5 %) connue sous le nom de progressseurs lents restent asymptomatiques pendant 8 ans et plus [27-29]. Une sous-population encore plus rare, représentant moins de 1 % et appelée contrôleurs élites (CE), peut maintenir une virémie indétectable à très faible (< 50 copies/ml) et un nombre de lymphocytes T CD4⁺ normal pendant 1 à 10 ans [30, 31]. Les principaux acteurs du contrôle de la réplication du VIH-1 sont les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) qui reconnaissent les cellules exprimant les peptides du VIH-1 présentés par les molécules du HLA (*human leukocyte antigen*) de classe I [32, 33]. Des facteurs génétiques sont associés à cette capacité de contrôler la maladie tels que certains allèles HLA (HLA-B*57 et HLA-B*27 en particulier), qui sont surreprésentés chez les progressseurs lents [34-36]. La protéine de la capsid rétrovirale est l'une des cibles de la réponse CTL [37, 38], et cette pression immunitaire entraîne l'émergence de mutations d'échappement dans la capsid qui rendent le virus sensible à la reconnaissance par TRIM5 α chez les sujets B27 / B57⁺ [39, 40].

Le VIH-1 est un lentivirus qui fait partie de la famille des *Retroviridae* dont l'ARN génomique est rétro-transcrit en ADN double brin dans les cellules nouvellement infectées. Cet ADN viral sera ensuite intégré dans le génome de l'hôte. L'ARN rétroviral entre dans le cytoplasme de la cellule protégé par la capsid virale. Pour permettre l'importation nucléaire et l'intégration dans le génome de la cellule hôte, ce noyau viral doit subir une décapsidation [41]. Ce processus est finement organisé et coordonné pour assurer la rétro-transcription tout en évitant la dégradation des acides nucléiques viraux ou le ciblage par des facteurs de défense cytoplasmiques de l'hôte. TRIM5 α est l'un des facteurs perturbateurs de ce processus, et son mécanisme de restriction rétrovirale est basé sur l'interaction avec la capsid virale (Figure 2). À travers des interactions impliquant les domaines CC, TRIM5 α forme des dimères, puis des trimères de dimères *via* les domaines B-Box, conduisant à la formation d'hexamères [42-45] (Figure 3). Ces hexamères vont adopter un niveau supérieur d'organisation en formant un réseau (*lattice*), et cette capacité est fortement stimulée en présence du réseau formé par les hexamères de capsid à la surface du noyau viral [46]. Cette multimérisation de TRIM5 α est nécessaire à une restriction optimale en permettant une interaction de plus grande avidité avec la capsid [47]. Les interactions entre TRIM5 α et la capsid conduisent au blocage de la progression de l'infection par plusieurs mécanismes (Figure 2), notamment le désassemblage précoce de la capsid rétrovirale [48], la dégradation des composants centraux du virus par le protéasome [49], et la séquestration de la particule virale dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α , ainsi que l'altération des étapes de rétro-transcription et d'importation nucléaire [50, 51]. Certaines activités de restriction dépendent de l'ubiquitination, tandis que d'autres n'en dépendent pas. Ainsi, l'inhibition du protéasome diminue l'effet de TRIM5 α sur la rétro-transcription mais ne rétablit pas l'infectivité virale, car le virus reste séquestré dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α [51]. L'action du protéasome nécessite l'activité de ligase d'ubiquitine E3 de TRIM5 α , et la restriction rétrovirale est associée à un renouvellement plus rapide de TRIM5 α en raison de l'auto-ubiquitination effectuée par l'intermédiaire du domaine RING, suivie de la dégradation par le protéasome [16]. De plus, des études récentes ont montré que TRIM5 α conduit également les rétrovirus vers la voie de dégradation autophagique [52]; cet aspect est traité dans le paragraphe sur l'autophagie (voir plus bas).

L'espèce humaine est également infectée par le VIH-2, un lentivirus relativement éloigné du VIH-1 et dont la prévalence est beaucoup moins élevée puisqu'il toucherait entre 1 et 2 millions de personnes [53]. Le VIH-2 a été transmis à l'espèce humaine dans la première moitié du 20^e siècle à partir de singe mangabey enfumé, alors que le VIH-1 a fait son apparition chez l'humain à peu près à la même époque mais en provenance d'une toute autre espèce simienne, le chimpanzé [54]. Des études précoces avaient mis en évidence une restriction modeste du VIH-2 par huTRIM5 α , de façon similaire à ce qui était observé avec les souches de laboratoire du VIH-1 [55]. Cependant, la capacité de huTRIM5 α à inhiber le VIH-2 a été ré-évaluée à la hausse, particulièrement lorsque des isolats primaires sont testés [56]. On pense aujourd'hui que la restriction du VIH-2 par huTRIM5 α a un rôle important dans la pathogénicité plus faible de ce virus, expliquant sa nature non-pandémique [57].

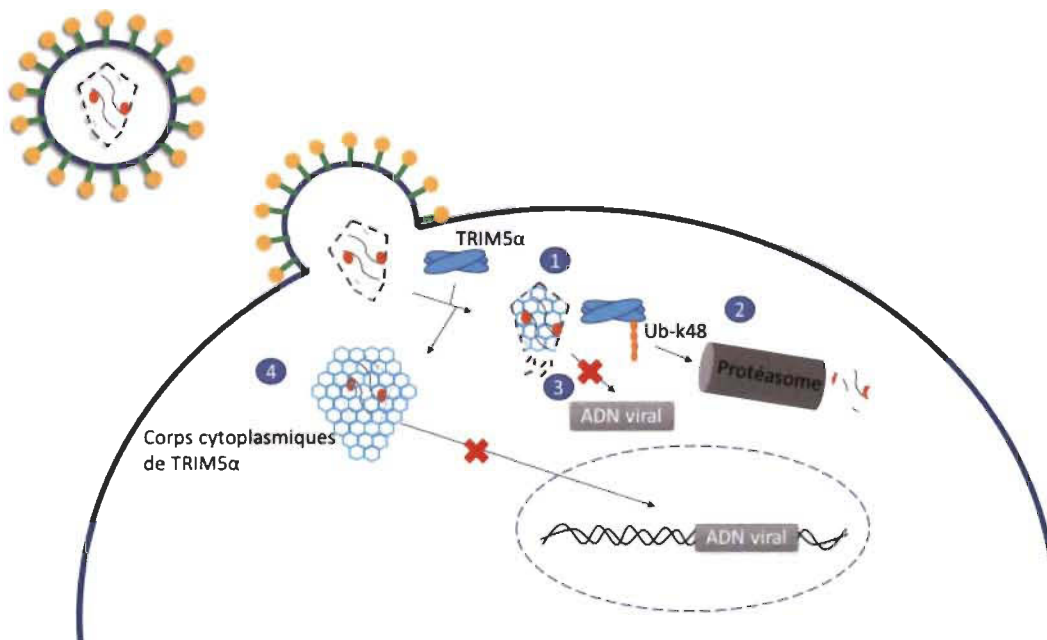


Figure 2 Mécanisme de restriction antirétrovirale par TRIM5 α .

TRIM5 α reconnaît la capsidémie rétrovirale et bloque la réplication du VIH-1 par 1) désassemblage précoce de la capsidémie rétrovirale, accompagné de 2) la dégradation des composants centraux du virus par le protéasome, entraînant 3) une diminution de la synthèse d'ADN viral. Il est à noter que TRIM5 α est dégradée elle aussi. 4). Le noyau viral peut être séquestré dans les corps cytoplasmiques de TRIM5 α , conduisant à l'inhibition de son transport vers le noyau.

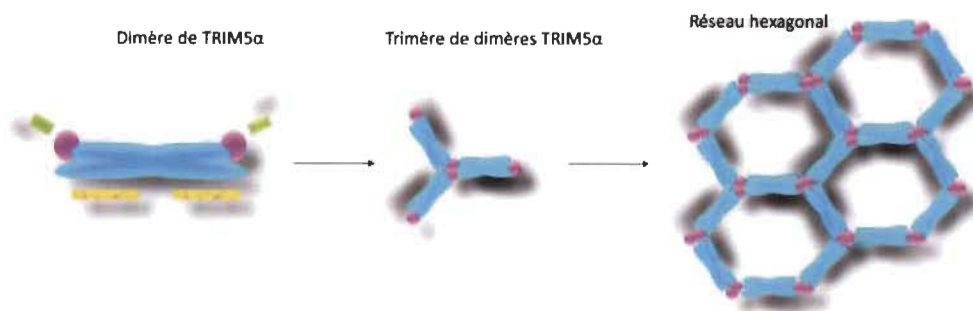


Figure 3 Multimérisation de TRIM5 α .

La protéine dimérise via son domaine Coiled-Coil, puis les dimères s'assemblent en trimères grâce aux domaines B-Box qui peuvent connecter trois dimères. La combinaison des événements de dimérisation et trimérisation génère un réseau hexagonal de TRIM5 α . (Adaptée de Ganser-Pornillos *et al.*, 2019.)

Activité pro-inflammatoire de TRIM5 α

En 2011, Pertel *et al.*, ont identifié un second rôle de TRIM5 α en réponse à une infection virale. De façon concomitante à la restriction d'un rétrovirus, TRIM5 α active la signalisation des voies inflammatoires AP-1 et NF κ B, jouant ainsi le rôle d'un récepteur de l'immunité innée rétrovirale (PRR- *Pattern recognition receptor*) qui détecte la capsidie rétrovirale comme une structure moléculaire associée à un agent pathogène [58]. La reconnaissance d'une capsidie entrante par TRIM5 α stimule ainsi l'expression de cytokines et d'autres gènes induits par l'IFN (ISG, *IFN-stimulated gene*). Grâce à son domaine N-terminal, TRIM5 α recrute l'hétérodimère Ubc13 (Ube2N) / Uev1a (ou Uev2) de l'enzyme de conjugaison E2 pour générer des chaînes de polyubiquitine liées à la lysine K63 qui permettent l'activation du complexe kinase TAK1, comprenant TAK1 ainsi que TAB1 et TAB2 (Figure 4). TAK1 stimule ensuite la signalisation des voies inflammatoires AP-1 (*activation protein 1*) et NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), ce qui conduit notamment à la transcription des cytokines incluant les IFN-I qui pourraient à leur tour contribuer à inhiber la réplication virale par la stimulation de gènes antiviraux [58, 59]. La formation de chaînes d'ubiquitine qui activent TAK1 est significativement augmentée par l'interaction entre TRIM5 α et un virus sensible à la restriction ou par surexpression de TRIM5 α . Bien que TRIMCyp ne possède pas le domaine PRYSPRY, il active également

la voie TAK1, ce qui confirme que l'activité de ligase d'ubiquitine E3 (domaine RING) et non le domaine PRYSPRY, est cruciale pour la signalisation immunitaire effectuée par TRIM5 α [60]. En construisant des mutants dans le domaine d'interaction avec l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine E2, Fletcher et *al.*, ont confirmé que la stimulation de la voie NF- κ B par TRIM5 α est dépendante de sa capacité à promouvoir l'ubiquitination [61].

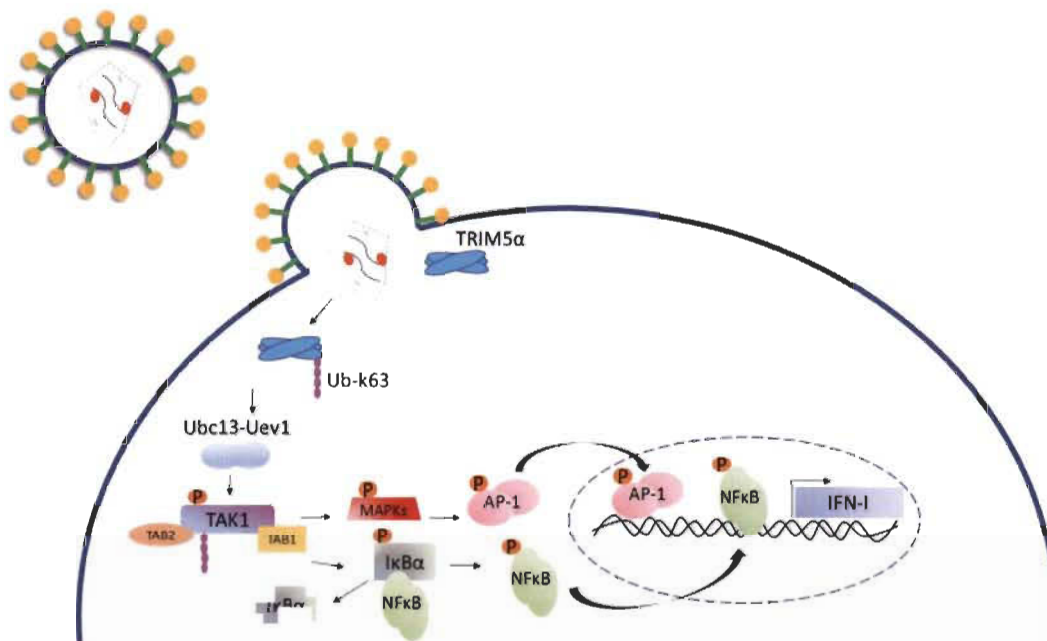


Figure 4 Signalisation médiée par TRIM5 α .

TRIM5 α recrute l'hétérodimère E2 Ubc13/Uev1a (ou Ubc13/Uev2) pour générer des chaînes d'ubiquitine liées à K63. En association avec ces chaînes d'ubiquitine K63, le complexe TAK1/TAB1/TAB2 conduit à la phosphorylation de NF- κ B et son inhibiteur I κ B α . I κ B α sera dégradé par le protéasome, libérant NF- κ B qui est alors transporté au noyau et active la transcription de nombreux gènes, y compris ceux pour IFN-I. TAK1 conduit également à la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription hétérodimérique AP-1 (c-Jun/c-Fos). Semblable à NF- κ B, AP-1 conduit aussi à la transcription de nombreux gènes, y compris ceux codant pour IFN-I. (Adaptée de Mérendol *et al.*, 2015.)

Promotion de l'état antiviral

La signalisation par la voie IFN-I peut induire un état antiviral protecteur chez l'hôte infecté. L'IFN-I interfère avec la réplication du virus par l'expression d'un ensemble

spécifique d'ISG, qui inhibent les virus à différents stades de leur cycle de réplication [62] tels que la décapsidation (TRIM5 α), l'import nucléaire (*Myxovirus resistance 2*, Mx2) [63, 64], l'assemblage (TRIM22) et la libération (Tetherin) [11, 65, 66]. L'IFN-1 est associé à une protection contre l'infection. Par exemple l'administration d'IFN α chez des macaques rhésus infectés par le VISmac régule positivement l'expression des gènes antiviraux et prévient l'infection [67]. De même, une régulation positive des ISG dans des cellules vaginales est associée à la protection contre l'infection par un virus chimérique VIS/VIH (SHIV) chez les macaques rhésus qui avaient reçu une administration vaginale d'IFN- β [68]. L'importance de TRIM5 α dans le contrôle de l'infection au VIH-1 est de plus en plus reconnue. Contrairement à certains orthologues simiens, TRIM5 α humain était considéré comme n'ayant pas d'effet inhibiteur important sur le VIH-1, dû à sa faible reconnaissance des capsides virales cytoplasmiques. Néanmoins, de plus en plus d'études indiquent que les isolats primaires du VIH-1 sont plus sensibles à la restriction par TRIM5 α humain que les souches adaptées de laboratoires [69], et que TRIM5 α humain contribue de manière significative à l'inhibition du VIH-1 par l'interféron [70]. Récemment, notre laboratoire a démontré que, en plus d'inhiber la réplication de souches du VIH-1 isolées de sujets B27/B57⁺, TRIM5 α humain contribue à l'induction d'un état antiviral impliquant des voies pro-inflammatoires, protégeant ainsi les cellules contre les infections ultérieures [39]. De façon intéressante, l'effet d'état antiviral semble impliquer des effecteurs de l'immunité innée autres que TRIM5 α , puisque même des virus insensibles à TRIM5 α sont restreints dans ces conditions [39]. Le VIH-1 a développé un mécanisme d'antagonisme incomplet afin d'échapper à la réponse de certains facteurs de restriction. Ohainle et *al.* démontrent que l'inhibition du VIH-1 effectuée par la voie de l'IFN dans une lignée cellulaire monocyttaire (THP-1) est due à l'action combinée d'un petit ensemble d'ISG qui inclut des facteurs de restriction du VIH-1 connus comme Mx2, TRIM5 α , *Interferon Induced Transmembrane Protein 1* (IFITM1) et Tetherin [70]. Chacun de ces ISG n'induit individuellement qu'une restriction modeste de la réplication du VIH-1, mais ensemble, ils conduisent à une restriction robuste de la réplication du VIH-1 [70].

Régulation de l'activité antirétrovirale de TRIM5 α humain

La reconnaissance de la cible virale n'est pas le seul déterminant de l'efficacité de TRIM5 α humain à restreindre le VIH-1. Des données récentes suggèrent qu'un des facteurs nécessaires à la restriction du VIH-1 par huTRIM5 α serait l'immunoprotéasome, une forme de protéasome présente dans les cellules immunitaires [71]. Suite à son activation par l'IFN, l'immunoprotéasome permet un renouvellement accéléré de TRIM5 α associé à une reprogrammation pour une inhibition efficace de l'infection par le VIH-1 dépendante de la capsidie [72]. L'activité antivirale de TRIM5 α serait aussi contrôlée par la sumoylation. La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui conduit à la liaison d'une ou plusieurs protéines *Small Ubiquitin-Like MOdifier* (SUMO) à un résidu lysine d'une protéine cible. Elle permet la modulation des propriétés biochimiques et biologiques telles que l'activité enzymatique, la stabilité ou la localisation subcellulaire [73]. Ainsi, la surexpression de SUMO augmente l'activité anti-VIH-1 de TRIM5 α alors que l'inhibition de la sumoylation par interférence à l'ARN l'inhibe [74]. Portilho et *al.*, ont montré qu'en plus de réguler l'activité antivirale de TRIM5 α , la sumoylation lui permet de transiter entre le cytoplasme et le noyau. Si TRIM5 α est désumoylée au niveau du noyau, elle y est séquestrée et perd la capacité d'inhiber les capsides virales présentes dans le cytoplasme [75, 76]. Parmi les facteurs qui altèrent les mécanismes de restriction par l'intermédiaire de huTRIM5 α , figure la CypA, une protéine qui interagit avec la capsidie du VIH-1 pour le protéger de la restriction spécifique à la capsidie. Kim et *al.* ont démontré qu'une perturbation de l'interaction capsidie-CypA rendait le VIH-1 très sensible à TRIM5 α endogène dans les cellules sanguines humaines primaires [77]. De façon similaire, le VIH-2 est nettement plus sensible à la restriction par huTRIM5 α en l'absence de CypA [78].

TRIM5 α et les flavivirus

Les flavivirus, de la famille des *Flaviviridae*, sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Ils provoquent des maladies à l'importance élevée chez l'humain, et près de quatre milliards de personne sont à risque de contracter le virus de la

dengue (DENV) chaque année [79]. Ils sont principalement transmis par des piqûres d'arthropodes (moustiques ou tiques) [80]. Parmi ces virus, figurent DENV, le virus du Nil occidental, le virus Zika, le virus de la fièvre jaune, le virus de l'encéphalite japonaise et plusieurs souches de virus de l'encéphalite transmis par les tiques (TBEV). Le génome des flavivirus code pour une polyprotéine précurseur qui donne naissance à sept protéines non structurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS4B et NS5) et trois protéines structurales (capside C, précurseur de membrane prM et enveloppe E) [81]. Les protéines structurales constituent la particule virale, tandis que les protéines NS coordonnent la réplication de l'ARN, l'assemblage et modulent les réponses immunitaires innées. Après leur entrée dans la cellule, les flavivirus induisent un réarrangement des membranes du réticulum endoplasmique (ER) en de nouvelles structures appelées organelles de réplication ou usines virales, ce qui favorise leur réplication. Deux des protéines NS ont une activité enzymatique : la protéine NS3 est une hélicase d'ARN viral et avec son co-facteur NS2B joue aussi le rôle de protéase virale (NS2B / NS3), alors que NS5 possède à la fois une activité de méthyltransférase et d'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP) [82]. Bien que le cycle viral et les protéines des flavivirus soient très différents des rétrovirus, TRIM5 α agit comme un facteur de restriction pour certains flavivirus tels que le TBEV, le virus de la maladie de la forêt de Kyasanur (KFDV) et le virus Langat (LGTV) [83, 84]. Les résultats d'infections de cellules HEK293T surexprimant huTRIM5 α ou rhTRIM5 α par des flavivirus ont montré une forte restriction de certains flavivirus transmis par les tiques avec une diminution de l'accumulation de la protéine NS3. L'inhibition résulte également en une diminution de la réplication de l'ARN viral [83].

Selon cette même étude, TRIM5 α inhibe la réplication virale en se liant à la protéase virale NS2B / NS3 afin d'induire son ubiquitination et sa dégradation protéasomale (Figure 5) [83]. TRIM5 α colocalise partiellement avec NS2B / NS3 dans les cellules infectées, et l'interaction est également observée lorsque la protéase est exprimée indépendamment du virus [83]. Comme pour les rétrovirus, le domaine ligase d'ubiquitine RING de TRIM5 α est nécessaire à la dégradation de NS2B / NS3 induite par le

protéasome, tandis que le domaine PRYSPRY est responsable de la reconnaissance de la cible virale.

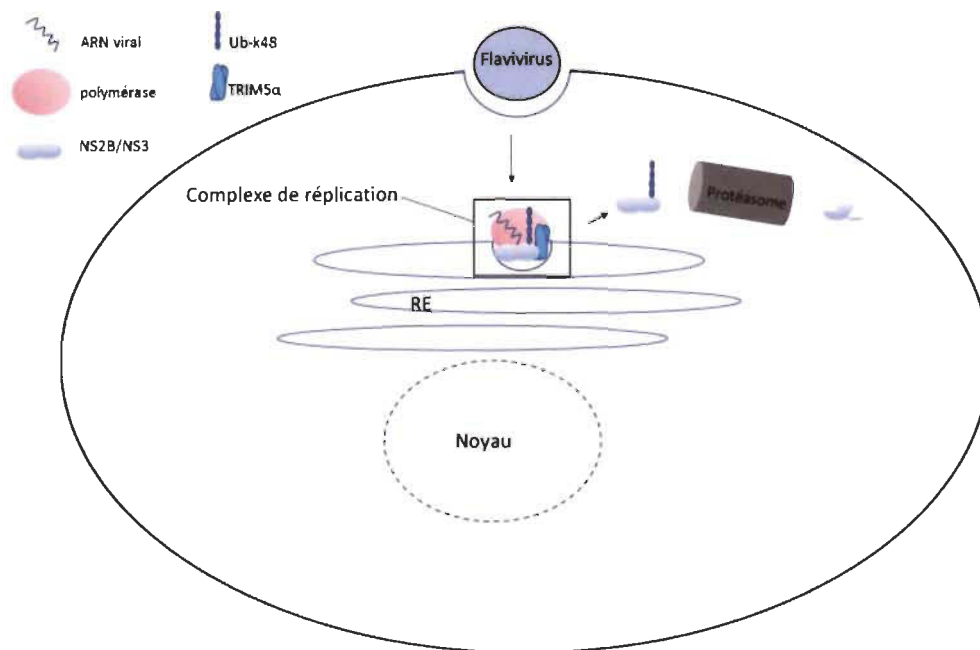


Figure 5 Représentation schématique de la restriction d'un flavivirus par TRIM5α.

Après fixation à la surface extracellulaire de la cellule hôte, le virus entre par un mécanisme d'endocytose. Le génome viral libéré est transporté vers le réticulum endoplasmique (RE) où aura lieu la réplication et l'expression du génome. TRIM5α se lie à la protéase virale NS2B/NS3 afin d'induire son ubiquitination et sa dégradation protéasomale.

TRIM5α et l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme de dégradation intracellulaire par lequel les cellules éliminent les agrégats toxiques, les organites endommagés et les agents infectieux de leur cytoplasme, ou dégradent des éléments dans le cytosol pour les besoins métaboliques [85]. L'étape caractéristique de l'autophagie est l'apparition d'une structure à double membrane appelée phagophore qui s'allonge pour former l'autophagosome sous l'action des facteurs de l'autophagie (Atg, *autophagy-related gene*) [86]. Une fois formé, l'autophagosome fusionne avec le lysosome, et il s'ensuit la dégradation et le recyclage de son contenu. Les facteurs clés de l'activation de l'autophagie sont ULK1 et Beclin I [87-89]. À la suite

d'un stress ou d'un manque nutritionnel, ULK1 dirige le recrutement du complexe PI3 kinase de classe III/Beclin-1 au site de formation du phagophore. L'élongation du phagophore dépend d'un système de conjugaison qui fait intervenir plusieurs protéines Atg. La protéine Atg12 activée par l'enzyme Atg7 va se lier à la protéine Atg5 de façon covalente. Le conjugué Atg12-Atg5 se lie alors à Atg16L1 de manière non covalente, ce qui mène à l'allongement de la membrane. En parallèle, LC3-I est converti en LC3-II par lipodation. Au cours de ce processus, LC3-I est activé par Atg7 car une liaison thioester est formée entre un résidu de cystéine catalytique d'Atg7 et la glycine C-terminale de LC3-I. L'intermédiaire LC3-Atg7 échange avec Atg3, une enzyme de type E2, pour former un deuxième intermédiaire thioester LC3-Atg3 [90]. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 fonctionne comme une ligase, qui va compléter le processus de lipodation et va lier LC3-II à la membrane de l'autophagosome. Grâce à cette localisation spécifique, LC3-II constitue un marqueur de l'autophagie [91].

L'autophagie sélective est caractérisée par des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement des cibles à dégrader. Parmi ces récepteurs on peut citer la protéine p62 / sequestosomel, qui a pour rôle de reconnaître des cibles désignées par des étiquettes spécifiques telles que l'ubiquitine et les galectines, pour ensuite les acheminer vers les autophagosomes. p62 est une protéine inductible par l'IFN [92] qui a été impliquée dans divers processus cellulaires, y compris la modulation des voies de signalisation [93]. En effet, la stabilisation et l'activation des composants du complexe de TAK1 dépendraient de p62. TAK1 régit l'action de p62, en le déplaçant d'un récepteur d'autophagie vers une plate-forme de signalisation [94]. p62 se localise aux corps cytoplasmiques de TRIM5 α humain et de rhesus macaque, et s'associe étroitement avec TRIM5 α dans ces structures [95]. La capacité de p62 à moduler les voies de signalisation associées à la réponse immunitaire innée pourrait avoir un effet sur l'activation de l'immunité innée médiée par TRIM5 α lors d'infections virales. Nos résultats récents, non encore publiés, indiquent que l'autophagie a effectivement un rôle dans l'activation de voies immunitaires innées par TRIM5 α .

Mandell *et al.* ont démontré que la surexpression de huTRIM5 α ou rhTRIM5 α augmentait l'abondance de LC3-II. Une analyse de flux autophagique utilisant la bafilomycine a permis d'identifier TRIM5 α comme intervenant dans l'étape d'initiation et non pas de maturation dans le processus autophagique. De plus TRIM5 α co-localise avec ULK1, une protéine impliquée dans l'initiation de l'autophagie [52]. TRIM5 α agit à la fois comme régulateur de l'autophagie en fournissant une plateforme pour l'assemblage de ULK1 et Beclin 1 et en tant que récepteur de l'autophagie sélective [52]. La stimulation de l'autophagie par TRIM5 α pourrait expliquer en partie le fait que TRIM5 α est dégradée par la voie autophagique en absence de virus [96].

TRIM5 α semble donc stimuler l'autophagie. Cependant, l'autophagie est-elle impliquée dans la restriction rétrovirale par TRIM5 α ? Une possibilité serait que TRIM5 α soit un récepteur sélectif qui dirige la dégradation de virus par autophagie, une activité également appelée virophagie. Mandell *et al.* ont rapporté que la protéine de capsid virale (p24) était dégradée dans des cellules T CD4⁺ primaires de macaques rhésus exprimant TRIM5 α et infectées avec le VIH-1, et que le blocage de l'expression de protéines essentielles de l'autophagie (Atg7, Beclin1, p62) ou de TRIM5 α conduisait à une diminution de cette dégradation [52]. De plus, Ribeiro *et al.* ont démontré que TRIM5 α restreint le VIH-1 en le conduisant vers la voie autophagique dans les cellules de Langerhans [97]. Cependant, les résultats de Imam *et al.* montrent que le blocage de l'autophagie par approche pharmacologique en utilisant la bafilomycine ou par une suppression des protéines clés de l'autophagie (Atg5, Beclin1) dans les cellules HeLa n'a pas d'impact sur le rôle de restriction induit par rhTRIM5 et sur les niveaux d'ADN du VIH-1 [96]. Une autre étude a démontré la possibilité d'interactions physiques entre TRIM5 α et les protéines homologues des Atg8, en particulier LC3 [98]. Cette même étude explique que ces interactions ne sont pas requises pour la restriction du VIH-1 [98]. Ces résultats suggèrent que les liens entre TRIM5 α et l'autophagie ne sont pas impliqués dans la dégradation et l'élimination du virus, en accord avec Imam *et al.*, ainsi qu'avec nos propres observations dans des cellules lymphocytaires et monocytaires (manuscrit en préparation). Les différences observées entre ces études peuvent être dues aux modèles cellulaires singuliers utilisés ; notamment, l'entrée du VIH-1 dans les cellules de

Langerhans se fait par un mécanisme distinct de l'entrée dans les cellules principalement ciblées par le VIH-1.

Applications thérapeutiques potentielles

Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont tenté d'améliorer le pouvoir antiviral de TRIM5 α humain afin d'interférer avec le VIH-1 à des fins de thérapie génique. Les premières études consistaient à surexprimer des versions de huTRIM5 α conçues pour cibler plus efficacement le VIH-1 par le biais de modifications du domaine PRYSPRY. Certains des variants de TRIM5 α utilisés étaient des produits chimériques contenant de petites régions de rhTRIM5 α dans le SPRY [99, 100]. Cependant, une variation de séquence significative entre les orthologues humain et macaque pourrait provoquer une réponse immunitaire contre le transgène chez les patients à une probabilité élevée. D'autres expériences de cartographie humain / rhesus ont permis de découvrir que des mutations de Arg332 dans la région variable 1 (v1) de PRYSPRY conféraient une activité de restriction contre VIH-1 [101, 102], mais qui était nettement plus modeste que la restriction induite par rhTRIM5 α [103]. L'identification par notre laboratoire de mutations combinées en position Arg332 et Arg335 a permis une plus forte restriction que la simple mutation (10 à 30 fois) [104, 105]. Bien que huTRIM5 α R332G-R335G soit considéré comme un candidat de choix dans les approches de thérapie génique pour inhiber le VIH-1, l'utilisation de vecteurs viraux pour le surexprimer dans les cellules humaines n'est pas dénuée de risques. Pour cette raison, nous avons utilisé l'édition génomique afin d'introduire les mutations souhaitables dans le gène de TRIM5 α humain [106]. Cette approche est basée sur l'outil CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) et la nucléase Cas9 associée à CRISPR (CRISPR-Cas9). Nos premiers résultats ont montré qu'il était possible de modifier TRIM5 α à l'aide de cette méthode [106], et nos résultats récents non publiés indiquent que l'introduction des mutations R332G et R335G dans le gène *trim5* de lymphocytes résulte en une diminution appréciable de leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Toute modification génique de TRIM5 α visant à lui conférer une activité antivirale ciblant le VIH-1 (ou même certains flavivirus tel DENV) devra cependant prendre en compte les effets potentiels sur les

fonctions connues de TRIM5 α dans l'autophagie, l'activation de voies immunitaires innées ou la restriction de rétrovirus non-humains. Enfin, la découverte du rôle de TRIM5 α dans l'autophagie en fait une cible de choix pour le développement de composés modulant le processus autophagique pour promouvoir l'inhibition des cellules cancéreuses [107, 108].

Conclusion

Les rôles précis de TRIM5 α dans la cellule ne sont probablement pas encore tous identifiés. Dans la première décennie suivant le dévoilement de ses fonctions antirétrovirales, les études ont été essentiellement axées sur cette activité de TRIM5 α . Cependant, il est de plus en plus clair que TRIM5 α est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires. La découverte de l'effet de restriction de TRIM5 α sur certains flavivirus soulève un questionnement sur la capacité de TRIM5 α à reconnaître des protéines si différentes et ouvre la possibilité qu'elle soit active contre d'autres familles de virus. Le rôle de TRIM5 α humain dans la restriction du VIH-1 est de plus en plus apprécié, ainsi que la régulation de cette activité par différents facteurs. Mieux connaître les mécanismes de régulation de l'activité antivirale de TRIM5 α sera nécessaire pour développer ses applications potentielles. Par ailleurs, la modification de son activité à des fins thérapeutiques représente un défi étant donné l'implication de TRIM5 α dans l'activation de l'autophagie et peut être dans d'autres fonctions cellulaires encore inconnues. Plusieurs questions pourraient faire l'objet de futures études : Dans quel contexte TRIM5 α favorise-t-elle l'autophagie? L'autophagie est-elle importante pour la restriction des flavivirus ou d'autres familles de virus par TRIM5 α ? Des modifications dans le domaine PRYSPRY de TRIM5 α permettraient-elles la reconnaissance d'autres familles de virus? Sans aucun doute, l'exploration des propriétés de cette protéine est loin d'être terminée, et les applications biomédicales potentielles restent à développer.

Références

1. Nisole S, Stoye JP, Saïb A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(10):799.
2. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001;20(9):2140-51.
3. Hatakeyama S. TRIM family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis. *Trends Biochem Sci* 2017;42(4):297-311.
4. Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 2006;281(13):8970-80.
5. Ozato K, Shin D-M, Chang T-H, Morse III HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8(11):849.
6. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sánchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* 2013;38(2):384-98.
7. Li X, Gold B, O'hUigin C, Diaz-Griffero F, Song B, Si Z *et al.* Unique features of TRIM5 α among closely related human TRIM family members. *Virology* 2007;360(2):419-33.
8. Uchil PD, Quinlan BD, Chan W-T, Luna JM, Mothes W. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog* 2008 Feb 8;4(2):e16.
9. Ohainle M, Kim K, Keceli SK, Felton A, Campbell E, Luban J *et al.* TRIM34 restricts HIV-1 and SIV capsids in a TRIM5 α -dependent manner. *PLoS Pathog* 2020;16(4):e1008507.
10. Geoffroy M-C, Chelbi-Alix MK. Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31(1):145-58.
11. Barr SD, Smiley JR, Bushman FD. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* 2008;4(2):e1000007.
12. Allouch A, Di Primio C, Alpi E, Lusic M, Arosio D, Giacca M *et al.* The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration. *Cell Host Microbe* 2011;9(6):484-95.
13. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 2011;1(6):519-25.

14. Campbell EM, Dodding MP, Yap MW, Wu X, Gallois-Montbrun S, Malim MH *et al.* TRIM5 α cytoplasmic bodies are highly dynamic structures. *MBoC* 2007;18(6):2102-11.
15. Sakuma R, Mael AA, Ikeda Y. Alpha interferon enhances TRIM5 α -mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. *J Virol* 2007;81(18):10201-06.
16. Diaz-Griffero F, Li X, Javanbakht H, Song B, Welikala S, Stremlau M *et al.* Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology* 2006;349(2):300-15.
17. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 2004;430(6999):569-73.
18. Song B, Javanbakht H, Perron M, Park DH, Stremlau M, Sodroski J. Retrovirus restriction by TRIM5 α variants from Old World and New World primates. *J Virol* 2005;79(7):3930-37.
19. Grütter MG, Luban J. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr Opin Virol* 2012;2(2):142-50.
20. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004;427(6977):848-53.
21. Soll SJ, Wilson SJ, Kutluay SB, Hatzioannou T, Bieniasz PD. Assisted evolution enables HIV-1 to overcome a high TRIM5 α -imposed genetic barrier to rhesus macaque tropism. *PLoS Pathog* 2013;9(9):e1003667.
22. Sebastian S, Luban J. TRIM5 α selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology* 2005;2(1):40.
23. Shibata R, Sakai H, Kawamura M, Tokunaga K, Adachi A. Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *J Gen Virol* 1995;76(11):2723-30.
24. Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J *et al.* Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1999;73(12):10020-28.
25. Towers G, Bock M, Martin S, Takeuchi Y, Stoye JP, Danos O. A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *PNAS* 2000;97(22):12295-99.
26. Zhang F, Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Derse D, Bieniasz PD. Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins. *Virology* 2006;353(2):396-409.

27. Madec Y, Boufassa F, Avettand-Fenoel V, Hendou S, Melard A, Boucherit S *et al.* Early control of HIV-1 infection in long-term nonprogressors followed since diagnosis in the ANRS SEROCO/HEMOCO cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50(1):19-26.
28. Rodés B, Toro C, Paxinos E, Poveda E, Martinez-Padial M, Benito JM *et al.* Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* 2004;18(8):1109-16.
29. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *Aids* 2009;23(9):1163-69.
30. Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V *et al.* A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS* 2014;28(2):149.
31. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M *et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007;317(5840):944-47.
32. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA *et al.* Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008;29(6):1009-21.
33. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F *et al.* HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *PNAS* 2007;104(16):6776-81.
34. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L *et al.* HLA B* 5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *PNAS* 2000;97(6):2709-14.
35. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah A *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996;2(4):405-11.
36. Gao X, Bashirova A, Iversen AK, Phair J, Goedert JJ, Buchbinder S *et al.* AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2005;11(12):1290-92.
37. Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley J-M, Calvez V, Katlama C *et al.* Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *Aids* 2002;16(18):2399-407.

38. Rolland M, Heckerman D, Deng W, Rousseau CM, Coovadia H, Bishop K *et al.* Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads. *PLoS one* 2008;3(1):e1424.
39. Merindol N, El-Far M, Sylla M, Masroori N, Dufour C, Li J-x *et al.* HIV-1 capsids from B27/B57+ elite controllers escape Mx2 but are targeted by TRIM5 α , leading to the induction of an antiviral state. *PLoS Pathog* 2018;14(11):e1007398.
40. Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Yeni P, Clavel F, Hance AJ. Gag cytotoxic T lymphocyte escape mutations can increase sensitivity of HIV-1 to human TRIM5 α , linking intrinsic and acquired immunity. *J Virol* 2011;85(22):11846-54.
41. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 2010;7(1):96.
42. Nepveu-Traversy M-É, Bérubé J, Berthoux L. TRIM5 α and TRIMCyp form apparent hexamers and their multimeric state is not affected by exposure to restriction-sensitive viruses or by treatment with pharmacological inhibitors. *Retrovirology* 2009;6(1):100.
43. Wagner JM, Roganowicz MD, Skorupka K, Alam SL, Christensen D, Doss G *et al.* Mechanism of B-box 2 domain-mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5 α . *Elife* 2016;5:e16309.
44. Keown JR, Yang JX, Douglas J, Goldstone DC. Characterisation of assembly and ubiquitylation by the RBCC motif of Trim5 α . *Sci Rep* 2016;6(1):1-11.
45. Keown JR, Goldstone DC. Crystal structure of the Trim5 α Bbox2 domain from rhesus macaques describes a plastic oligomerisation interface. *J Struct Biol* 2016;195(3):282-85.
46. Ganser-Pornillos BK, Chandrasekaran V, Pornillos O, Sodroski JG, Sundquist WI, Yeager M. Hexagonal assembly of a restricting TRIM5 α protein. *PNAS* 2011;108(2):534-39.
47. Roganowicz MD, Komurlu S, Mukherjee S, Plewka J, Alam SL, Skorupka KA *et al.* TRIM5 α SPRY/coiled-coil interactions optimize avid retroviral capsid recognition. *PLoS Pathog* 2017;13(10):e1006686.
48. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *PNAS* 2006;103(14):5514-19.
49. Kutluay SB, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS Pathog* 2013;9(3):e1003214.
50. Roa A, Hayashi F, Yang Y, Lienlaf M, Zhou J, Shi J *et al.* RING domain mutations uncouple TRIM5 α restriction of HIV-1 from inhibition of reverse transcription and acceleration of uncoating. *J Virol* 2012;86(3):1717-27.

51. Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, Hope TJ. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 α restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *PNAS* 2006;103(19):7465-70.
52. Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins C *et al.* TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell* 2014;30(4):394-409.
53. Visseaux B, Damond F, Matheron S, Descamps D, Charpentier C. Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2016;46:233-40.
54. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F *et al.* Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 2005;79(19):12515-27.
55. Ylinen LM, Keckesova Z, Wilson SJ, Ranasinghe S, Towers GJ. Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5 α alleles. *J Virol* 2005;79(18):11580-87.
56. Takeuchi JS, Perche B, Migraine J, Mercier-Delarue S, Ponscarne D, Simon F *et al.* High level of susceptibility to human TRIM5 α conferred by HIV-2 capsid sequences. *Retrovirology* 2013;10(1):1-11.
57. Boswell MT, Rowland-Jones S. Delayed disease progression in HIV-2: the importance of TRIM5 α and the retroviral capsid. *Clin Exp Immunol* 2019;196(3):305-17.
58. Pertel T, Hausmann S, Morger D, Züger S, Guerra J, Lascano J *et al.* TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 2011;472(7343):361.
59. Uchil PD, Hinz A, Siegel S, Coenen-Stass A, Pertel T, Luban J *et al.* TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *J Virol* 2013;87(1):257-72.
60. Carthagena L, Parise MC, Ringard M, Chelbi-Alix MK, Hazan U, Nisole S. Implication of TRIM α and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities. *Retrovirology* 2008;5(1):59.
61. Fletcher AJ, Vaysburd M, Maslen S, Zeng J, Skehel JM, Towers GJ *et al.* Trivalent RING assembly on retroviral capsids activates TRIM5 ubiquitination and innate immune signaling. *Cell Host Microbe* 2018;24(6):761-75. e6.
62. Merindol N, Berthoux L. Restriction factors in HIV-1 disease progression. *Curr HIV Res* 2015;13(6):448-61.
63. Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T *et al.* Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 2013;502(7472):559-62.

64. Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, Kutluay SB, Zang T, Wilson SJ *et al.* MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 2013;502(7472):563-66.
65. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008;451(7177):425-30.
66. Tissot C, Mechti N. Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* 1995;270(25):14891-98.
67. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E *et al.* Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 2014;511(7511):601-05.
68. Veazey RS, Pilch-Cooper H, Hope TJ, Alter G, Carias AM, Sips M *et al.* Prevention of SHIV transmission by topical IFN- β treatment. *Mucosal Immunol* 2016;9(6):1528-36.
69. Battivelli E, Lecossier D, Matsuoka S, Migraine J, Clavel F, Hance AJ. Strain-specific differences in the impact of human TRIM5 α , different TRIM5 α alleles, and the inhibition of capsid-cyclophilin a interactions on the infectivity of HIV-1. *J Virol* 2010;84(21):11010-19.
70. OhAinle M, Helms L, Vermeire J, Roesch F, Humes D, Basom R *et al.* A virus-packageable CRISPR screen identifies host factors mediating interferon inhibition of HIV. *Elife* 2018;7:e39823.
71. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 2010;10(1):73-78.
72. Jimenez-Guardeño JM, Apolonia L, Betancor G, Malim MH. Immuno-proteasome activation enables human TRIM5 α restriction of HIV-1. *Nat Microbiol* 2019;4(6):933-40.
73. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2013;82:357-85.
74. Dutrieux J, Portilho DM, Arhel NJ, Hazan U, Nisole S. TRIM5 α is a SUMO substrate. *Retrovirology* 2015;12(1):28.
75. Portilho DM, Fernandez J, Ringiard M, Machado AK, Boulay A, Mayer M *et al.* Endogenous TRIM5 α function is regulated by SUMOylation and nuclear sequestration for efficient innate sensing in dendritic cells. *Cell Rep* 2016;14(2):355-69.
76. Nisole S, Fernandez J, Maarifi G, Arhel NJ. SUMO régule la capacité de TRIM5 α à inhiber le VIH-1. *Med Sci (Paris)* 2019;35(2):106-09.

77. Kim K, Dauphin A, Komurlu S, McCauley SM, Yurkovetskiy L, Carbone C *et al.* Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5 α . *Nat Microbiol* 2019;4(12):2044-51.
78. Mamede JI, Damond F, De Bernardo A, Matheron S, Descamps D, Battini J-L *et al.* Cyclophilins and nucleoporins are required for infection mediated by capsids from circulating HIV-2 primary isolates. *Sci Rep* 2017;7:45214.
79. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(8):e1760.
80. Tabachnick WJ. Climate change and the arboviruses: lessons from the evolution of the dengue and yellow fever viruses. *Annu Rev Virol* 2016;3:125-45.
81. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM, Thiel H, Rice C, Chanock R. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fields virology. 5 ed: Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 2007. p. 1101-52.
82. Padmanabhan R, Mueller N, Reichert E, Yon C, Teramoto T, Kono Y *et al.* Multiple enzyme activities of flavivirus proteins. *Novartis Found Symp: Wiley Online Library*; 2006. p. 74-84.
83. Chiramel AI, Meyerson NR, McNally KL, Broeckel RM, Montoya VR, Méndez-Solís O *et al.* TRIM5 α restricts flavivirus replication by targeting the viral protease for proteasomal degradation. *Cell Rep* 2019;27(11):3269-83. e6.
84. Berthoux L. The Restrictome of Flaviviruses. *Virology* 2020;1-15.
85. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010;12(9):814-22.
86. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:107-32.
87. Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(35):25464-74.
88. Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev pathmechdis Mech Dis* 2008;3:427-55.
89. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402(6762):672-76.
90. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000;408(6811):488-92.

91. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol cell* 2014;55(2):238-52.
92. Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF- κ B activity. *J Immunol* 2009;182(4):2131-40.
93. Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci* 2007;32(2):95-100.
94. Kehl SR, Soos BLA, Saha B, Choi SW, Herren AW, Johansen T *et al.* TAK1 converts Sequestosome 1/p62 from an autophagy receptor to a signaling platform. *EMBO Rep* 2019;20(9):e46238.
95. O'Connor C, Pertel T, Gray S, Robia SL, Bakowska JC, Luban J *et al.* p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5 α . *J Virol* 2010;84(12):5997-6006.
96. Imam S, Talley S, Nelson RS, Dharan A, O'Connor C, Hope TJ *et al.* TRIM5 α degradation via autophagy is not required for retroviral restriction. *J Virol* 2016;90(7):3400-10.
97. Ribeiro CM, Sarrami-Forooshani R, Setiawan LC, Zijlstra-Willems EM, van Hamme JL, Tigchelaar W *et al.* Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5 α in dendritic cell subsets. *Nature* 2016;540(7633):448-52.
98. Keown JR, Black MM, Ferron A, Yap M, Barnett MJ, Pearce FG *et al.* A helical LC3-interacting region mediates the interaction between the retroviral restriction factor Trim5 α and mammalian autophagy-related ATG8 proteins. *J Biol Chem* 2018;293(47):18378-86.
99. Walker JE, Chen RX, McGee J, Nacey C, Pollard RB, Abedi M *et al.* Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34⁺ hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *J Virol* 2012;86(10):5719-29.
100. Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, Malik HS. Positive selection of primate TRIM5 α identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *PNAS* 2005;102(8):2832-37.
101. Li Y, Li X, Stremlau M, Lee M, Sodroski J. Removal of arginine 332 allows human TRIM5 α to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J Virol* 2006;80(14):6738-44.
102. Yap MW, Nisole S, Stoye JP. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5 α leads to HIV-1 restriction. *Curr Biol* 2005;15(1):73-78.

103. Jung U, Urak K, Veillette M, Nepveu-Traversy M-É, Pham QT, Hamel S *et al.* Preclinical assessment of mutant human TRIM5 α as an anti-HIV-1 transgene. *Hum Gene Ther* 2015;26(10):664-79.
104. Pham Q, Bouchard A, Grütter M, Berthoux L. Generation of human TRIM5 α mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther* 2010;17(7):859-71.
105. Pham QT, Veillette M, Brandariz-Nuñez A, Pawlica P, Thibert-Lefebvre C, Chandonnet N *et al.* A novel aminoacid determinant of HIV-1 restriction in the TRIM5 α variable 1 region isolated in a random mutagenic screen. *Virus Res* 2013;173(2):306-14.
106. Dufour C, Claudel A, Joubarne N, Merindol N, Maisonnnet T, Masroori N *et al.* Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1. *PloS one* 2018;13(1):e0191709.
107. Chauhan S, Ahmed Z, Bradfute SB, Arko-Mensah J, Mandell MA, Choi SW *et al.* Pharmaceutical screen identifies novel target processes for activation of autophagy with a broad translational potential. *Nat Commun* 2015;6(1):1-15.
108. Zhang X, Chen LX, Ouyang L, Cheng Y, Liu B. Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Prolif* 2012;45(5):466-76.

CHAPITRE III

CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE

TRIM5 α est un facteur de l'immunité innée permettant la restriction des rétrovirus. Il est inductible par l'interféron de type I [121, 122]. À son extrémité C-terminale se trouve un domaine variable B30.2/SPRY qui détermine la spécificité de la restriction [123, 124]. La reconnaissance d'un rétrovirus par le biais d'interaction entre TRIM5 α et la capsid virale bloque la progression de l'infection par plusieurs mécanismes, notamment le désassemblage précoce de la capsid rétrovirale, accompagné d'une diminution des produits de la rétro-transcription [123, 125]. En conséquence, il y a une dégradation des composants centraux du virus.

En plus de ses fonctions effectrices, TRIM5 α agit en tant que récepteur de l'immunité innée rétrovirale [126]. Grâce à son domaine N-terminal, TRIM5 α recrute l'hétérodimère Ubc13 (Ube2N)/Uev1a (ou Uev2) de l'enzyme de conjugaison E2 pour générer des chaînes de polyubiquitine liées à la lysine K63 qui peuvent être ancrées à TRIM5 α [127]. L'ubiquitine liée à la lysine K63 active le complexe kinase TAK1 et stimule la signalisation des voies inflammatoires AP-1 et NF- κ B, ce qui conduit à la production de l'IFN-1 [128-131].

Récemment, il a été démontré que la protéine TRIM5 α interagit avec des protéines de l'autophagie, et qu'elle joue un rôle régulateur sur cette dernière [132, 133]. En effet, l'autophagie est favorisée en présence de TRIM5 α , alors qu'une diminution dans l'expression de la protéine TRIM5 α provoque une baisse des marqueurs de l'autophagie LC3B-II et p62. Malgré ces liens entre l'autophagie et TRIM5 α , l'effet de l'autophagie sur TRIM5 α reste inconnu. Une série d'expériences a donc été menée afin d'identifier l'action de l'autophagie ou des protéines de l'autophagie sur les rôles de TRIM5 α .

CHAPITRE IV

MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Culture cellulaire

Les THP-1 (lignée dérivée de monocytes) et HEK293T (cellules humaines de rein) étaient dans du milieu de culture RPMI 1640 et les CRFK (cellules de chat) dans du DMEM. Tous les milieux de culture ont été complétés avec 8 % de sérum de veau fœtal (FBS), pénicilline-streptomycine et de la plasmocine. Les cellules ont été maintenues en culture dans des incubateurs à 37 °C avec 5 % de CO₂.

4.2 Plasmides

Plusieurs plasmides ont été utilisés :

- pCMV ΔR8.9 exprime les gènes viraux de structures gag et pol ainsi que les gènes régulateurs Tat et Rev du VIH sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus humain (hCMV) [134].
- pMDG code pour la glycoprotéine G du Virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) [134].
- pNL4-3GFPΔEnvΔNef incapable de se répliquer (appelé par la suite pNL4-3GFP) car il n'exprime pas les protéines du VIH-1 Env et nef qui sont essentielles à sa réplication. La suppression de Env a été réalisée grâce à une délétion qui décale le cadre de lecture. Concernant la protéine Nef elle a été remplacée par GFP [135]. La partie Gag est remplacée par la capsid extraite de virus de patients naturellement résistants à la progression de la maladie « contrôleurs élites ou EC » d'où l'appellation des particules virales EC5-2 GFP [136].

- pNL4-3DsRed a été construit en remplaçant GFP par DsRed en utilisant les enzymes de restrictions NotI et XhoI dans pNL4-3GFP. Il a été utilisé pour la production des particules EC5-2 DsRed ou EC8-1 Dsred dépendamment du patient dont provient la partie codante pour la capsid virale [136].
- pLentiCRISPRv2-puromycine a été utilisé pour exprimer simultanément l'ARN guide, la nucléase Cas9 et le gène de résistance à la puromycine pour permettre la sélection [137].
- pLenti-CRISPRv2-hygromycine a été utilisé pour exprimer simultanément l'ARN guide, la nucléase Cas9 et le gène de résistance à l'hygromycine pour permettre la double sélection dans notre étude [138].

4.3 Construction des plasmides et production des virus

Les vecteurs VIH-1 utilisés ont des capsides dérivées de virus isolés chez des patients naturellement résistants à la progression de la maladie « contrôleurs élites ». Comme décrit auparavant par Merindol et al., 2018 [136], les particules virales qui codent pour le gène DsRed ou le gène GFP ont été générées en co-transfectant les cellules 293T par deux plasmides, un codant pour l'enveloppe VSV-G (pMDG) (5 µg) et un autre codant pour une partie du génome du VIH-1 (10 µg) dont la protéine Nef a été remplacé par GFP ou DsRed (pNL4-3_{GFP} EC5-2 ou pNL4-3_{DsRed} EC5-2 ou pNL4-3_{DsRed} EC8-1) en utilisant du polyéthylénimine (PEI) (45µl) qui a pour rôle de lier l'ADN et le transporter dans la cellule. Les surnageants contenant le virus ont été récoltés 24 et 48 h plus tard, mélangés, centrifugés, filtrés et conservés à -80 °C. La multiplicité d'infection (MOI) des particules du VIH-1 a été évaluée par titration dans des cellules CRFK. Les cellules ont été traitées par des dilutions croissantes de virus. Après 48 h d'infection les cellules ont été passées au FACS. Grâce au calcul ((% des cellules infectées/100)/le volume de la dilution)*nombre de CRFK misent dans le puits), nous avons déterminé les unités infectieuses par µl. Une fois obtenues, nous avons calculé le volume à utiliser selon le nombre de cellules à traiter et la MOI visée.

4.4 Approches pour inhiber l'autophagie

L'inhibition pharmacologique de l'autophagie se fait par l'agent chimique bafilomycine A1 (BaFA1) qui a pour rôle d'inhiber la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et d'inhiber l'acidification des autophagolysosomes (Figure 3.1) [139]. Il est possible d'inhiber l'autophagie par *knockout* plus en détail ci-dessous (Figure 3.1) [139].

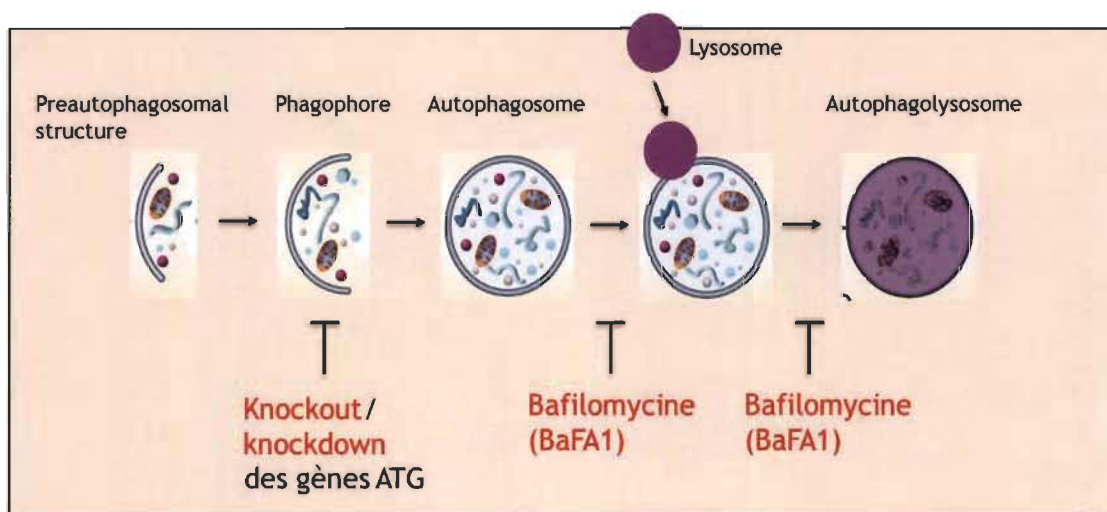


Figure 4.1 Processus de l'autophagie avec les différentes approches d'inhibition d'autophagie.

Le phagophore entoure une partie du cytoplasme pour former un autophagosome. La membrane externe de l'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome, et le matériel interne est dégradé dans l'autophagolysosome.

4.5 Génération des cellules double knockout

Les THP-1 *knockout* ont été générées en utilisant le plasmide pLentiCRISPRv2-puromycine offert par Feng Zhang [140] et le plasmide pLenti-CRISPRv2-hygromycine [138]. Les séquences guides ont été obtenues à l'aide de l'outil de conception CRISPR (<http://www.crispr.mit.edu>). L'ARN guide ciblant TRIM5, 5-CACCGTGGTAACTGATCCGGCACAC-3 a été cloné dans pLenti-CRISPRv2-hygromycine. Le vecteur lentiviral a été préparé en co-transfectant trois plasmides le pMDG (5µg) (codant pour l'enveloppe VSV-G), le pCMV ΔR8.9 (10 µg) (codant pour

gag et pol) et le pLentiCRISPRv2-hygromycine (10 µg) (contenant l'ARN guide d'intérêt) dans les cellules 293T en utilisant le PEI (45 µl). Le surnageant viral a été récolté à 24 h et 48 h après la transfection et filtré. Les cellules THP-1 ont été transduites par ce surnageant viral. Quarante-huit heures après la transduction, 200 µg/ml d'hygromycine a été ajouté aux cellules pour la sélection. Le *knockout* de TRIM5α a été validé par *TIDE assay*, un algorithme qui calcule le pourcentage d'aberration dans la séquence *knockout* en comparaison avec la séquence contrôle. Sur ces cellules un deuxième *knockout* a été réalisé ciblant la protéine p62 ou Atg5 en suivant les mêmes étapes comme décrites ci-dessus. Cependant, l'ARN guide pour Atg5 (5- GATCACAAGCAACTCTGGAT-3) ou p62 (5-AATGGCCATGTCCTACGTGA-3) a été cloné dans pLentiCRISPRv2-puromycine pour permettre une deuxième sélection 48 h après la transduction avec 1 µg/ml de puromycine. Enfin les *knockout* ont été validés par Western blot.

Il est à noter que nous avons reçu le plasmide pLentiCRISPRv2-puromycine contenant l'ARN guide d'Atg5 du Dr Labonté, professeur à l'INRS.

4.6 Cytométrie en flux

Pour mesurer la sensibilité du VIH-1 à TRIM5α, en absence ou en présence des protéines TRIM5α, Atg5 et p62, les cellules ont été mises dans des plaques 96 puits et de l'IFN-β recombinant humain a été ajouté à une concentration finale de 10 ng/ml. Le lendemain, les cellules ont été infectées par NL43_{Dsred} EC5-2 ou NL43_{Dsred} EC8-1. Les pourcentages de cellules DsRed⁺ ont été déterminés après 48 heures d'infection. Pour cela, les cellules ont été fixées dans 4 % formaldéhyde puis analysées au cytomètre FC500 MPL (Beckman Coulter, Inc., CA).

4.7 Western blotting

Afin de mesurer la présence des protéines phosphorylées impliquées dans l'activation de NF-κB et AP-1 suite à une infection par le VIH-1. Les cellules THP-1 double *knockout* ont été mises en plaque à 300 000 cellules/puits et infectées par le vecteur

NL43_{Dsred} EC5-2 avec une MOI = 0,1, ou traitées au LPS 100 ng/ml, ou laissées sans traitement pendant 2 h, ensuite elles ont été lavées (au PBS), lysées (dans du RIPA), bouillies et les extraits ont été migrés sur SDS-PAGE en utilisant des gels de polyacrylamide de 12 %. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées dans une solution contenant 5 % de BSA. Ensuite, elles ont été incubées avec l'anticorps primaire (anti- P-IκB 1:1000, anti- P-p65 1:1000), puis avec l'anticorps secondaire anti-souris (1:2000) pour P-IκB et anti-lapin (1:2000) pour P-p65 selon les spécifications du fabricant (Cell Signaling). Les anticorps conjugués à la HRP ont été détectés à l'aide du réactif de détection de transfert d'*enhanced chemiluminescence* (ECL).

4.8 Microscopie par immunofluorescence

Les cellules THP-1 double *knockout* (500 000 cellules/puits) ont été traitées avec 100 nM de Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, Sigma-Aldrich) pendant 24 h en étant ensemencées sur des lamelles de verre, puis lavées et placées dans un milieu normal. Après 72 h, les THP-1 différenciées ont été infectées par NL43_{GFP} EC5-2 (MOI = 5), ou traitées avec du LPS, ou laissées sans traitement pendant 2 h en présence de 8 µg/ml de polybrene. Les cellules ont ensuite été fixées (4 % de formaldéhyde) et perméabilisées (0,1 % Triton-x 100) puis incubées avec l'anticorps anti-P-cJun (1:100 dans 10 % FBS, Cell Signaling) à 4° pendant 16 h. Après 4 lavages au PBS, les cellules ont été colorées avec un anti-lapin de chèvre conjugué à l'Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) dilué à 1:100 dans du sérum bovin à 10 % pendant 1 h à température ambiante. Les noyaux ont été marqués par du Hoechst33342 dilué 1:10000 (Molecular Probes, Eugene, OR). Les lames ont été montées avec du vectashield et les images ont été acquises au grossissement 20x sur le microscope Axio Scope A1 (SN : 3322000334). (Carl Zeiss, Inc., Toronto, ON, Canada).

4.9 QRT-PCR

Les cellules ont été lavées 6 h après infection par NL4-3_{DsRed} EC5-2. L'extraction de l'ARN total a été faite par Tri-Sure (Bioline) et avec ajout de chloroforme (Sigma-Aldrich). Le glycogène (Life Technologies) a été ajouté au cours de l'extraction pour améliorer les rendements en ARN et l'ADNc a été synthétisé en utilisant Sensifast cDNA synthesis (Bioline) selon le protocole du fabricant. L'amplification de l'IFN β ou GAPDH a été réalisée en utilisant 400 nM d'amorces sens et antisens et 5 μ l de matrice (150 à 500 ng) dans un volume final de 10 μ l selon le protocole du kit SensiFast SYBR Lo-ROX (Bioline). Après 3 min d'incubation à 95 °C, 40 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit : 5 sec à 95 °C, 10 sec à 60 °C, 15 sec à 72 °C. Chaque PCR a été réalisée en double et le cycle seuil (Ct) a été déterminé à l'aide du logiciel MxPro (Agilent). L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode Δ Ct avec GAPDH pour la normalisation ($2^{-(Ct(\text{cible}) - Ct(\text{GAPDH}))}$).

Tableau 4.1

Liste des amorces de qRT-PCR

Gènes	Amorces
IFN β sens	GCTTCTCCACTACAGCTCTTTC
IFN β antisens	CAGTATTCAAGCCTCCCATTCA
GAPDH sens	GTCAGTGGTGGACCTGACCT
GAPDH antisens	TGAGCTTGACAAAGTGGTCG

CHAPITRE V

RÉSULTATS

5.1 Knockout des protéines de l'autophagie (Atg5 et p62) et TRIM5 α par CRISPR dans les monocytes humains

Les protéines Atg5 et p62 ont été déplétées pour étudier les liens entre l'autophagie et l'activité antirétrovirale induite par TRIM5 α . L'autophagie est un processus qui fait intervenir plusieurs protéines comme Atg5 pour former la structure à double membrane, l'autophagosome où se déroule la dégradation. Afin d'inhiber l'autophagie à un stade précoce, nous avons utilisé le *knockout* de la protéine Atg5. Il existe aussi d'autres protéines importantes dans l'autophagie les récepteurs autophagiques qui conduisent les cargos à dégrader vers l'autophagosome comme p62 qui est un substrat pour la dégradation autophagique, donc sa dégradation peut être utilisée comme marqueur qui permet de mesurer l'autophagie [141]. Une étude a montré que TRIM5 α s'associe à la protéine autophagique p62, et le *knockdown* de p62 provoquait une réduction de la restriction rétrovirale dans les cellules exprimant huTRIM5 α ou rhTRIM5 α [142]. Nous avons donc choisi de déléter la protéine p62 pour nos expériences.

Afin de déléter de manière stable et irréversible les protéines Atg5, TRIM5, et p62 dans les monocytes humains (THP-1), nous avons réalisé des *knockout* par le système CRISPR. Nous avons pu observer la présence de la protéine Atg5 de la taille attendue (55 kDa) dans les cellules contrôles et les cellules *knockout* pour la protéine TRIM5 (TRIM5 KO) seulement, mais cette présence était beaucoup moins importante dans les cellules transfectées avec l'ARN guide de Atg5 (Atg5 KO et Atg5 KO/TRIM5 KO) (Figure 5.1A et 5.1C).

Nous avons aussi observé que le *knockout* de TRIM5 réduit l'expression d'Atg5 de 0,5x en comparaison avec le contrôle. Cependant, cette réduction n'était pas

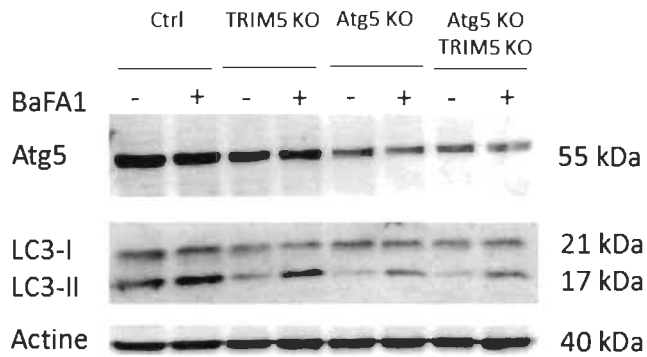
statistiquement significative. Par ailleurs, le *knockout* d'Atg5 réduit l'expression d'Atg5 de 2,71x en comparaison avec le contrôle, une diminution significative (Figure 5.1A et 5.1C). Le fait que TRIM5 α soit impliquée dans l'activation de l'autophagie pourrait expliquer la diminution de l'expression d'Atg5 qui constitue un facteur clé dans la formation et la maturation de l'autophagosome. Donc une diminution dans l'expression de TRIM5 α réduirait l'expression des protéines qui interviennent dans la formation de l'autophagosome, telles que Atg5. Pour la protéine p62, nous avons observé la présence d'une bande avec la taille attendue (62 kDa) dans les cellules contrôles alors que dans les cellules *knockout* pour p62, on voit que la protéine p62 est très peu exprimée (Figure 5.1B). Pour vérifier le *knockout* de la protéine TRIM5, nous avons séquencé les amplicons de TRIM5 dans les cellules contrôles et les cellules *knockout* pour TRIM5 (TRIM5 KO, Atg5 KO/TRIM5 KO et p62 KO/TRIM5 KO) et nous avons remarqué des aberrations au niveau du séquençage dans les séquences *knockout* en comparaison avec les contrôles. En effet, les séquences *knockout* présentaient des pics supplémentaires à chaque position à partir du site de coupure 390 (Figure 5.1E). Nous avons ensuite analysé les données de séquençage en utilisant la méthode de suivi des indels par décomposition (*TIDE assay*) (voir Matériels et méthodes) (Figure 5.1F). Les calculs par cet algorithme ont montré qu'au moins 80 % des allèles étaient *knockout* pour la protéine TRIM5.

5.2 Effet sur la fonction de l'autophagie

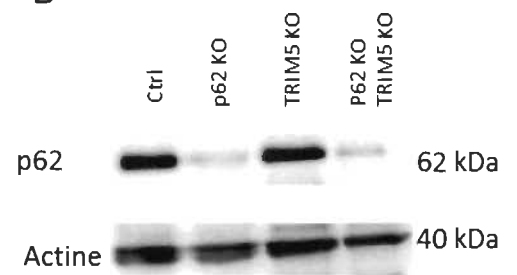
Afin de vérifier l'effet du *knockout* d'Atg5 au niveau fonctionnel, nous avons aussi révélé la membrane avec un anticorps anti-LC3. LC3-II est un marqueur de l'autophagie, une diminution dans les niveaux de LC3-II est synonyme de diminution du processus de l'autophagie [141]. LC3-I est converti en LC3-II par lipidation. Puis LC3-II est lié à la membrane de l'autophagosome. Grâce à cette localisation spécifique, LC3-II constitue un marqueur de l'autophagie [143]. Afin de mesurer le flux autophagique, nous avons prétraité les cellules à la BaFA1, car cette dernière permet l'accumulation du LC3-II en évitant sa dégradation à la dernière étape de l'autophagie (Figure 3.1). Comme le montre la Figure 5.1A et 1D, on voit une forte accumulation de LC3-II qui est beaucoup moins significative dans les cellules *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO) et les cellules *knockout* pour

Atg5 et TRIM5 (Atg5 KO/TRIM5 KO). On remarque aussi une diminution de l'accumulation de LC3-II dans les cellules TRIM5 KO un résultat attendu vu l'implication de TRIM5 dans l'autophagie [132].

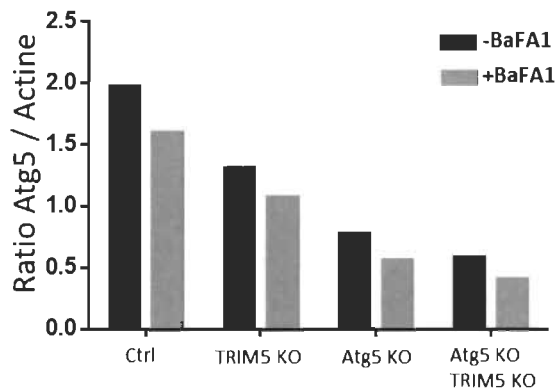
A



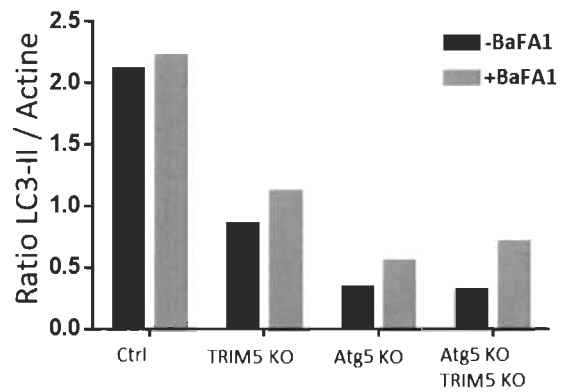
B



C



D



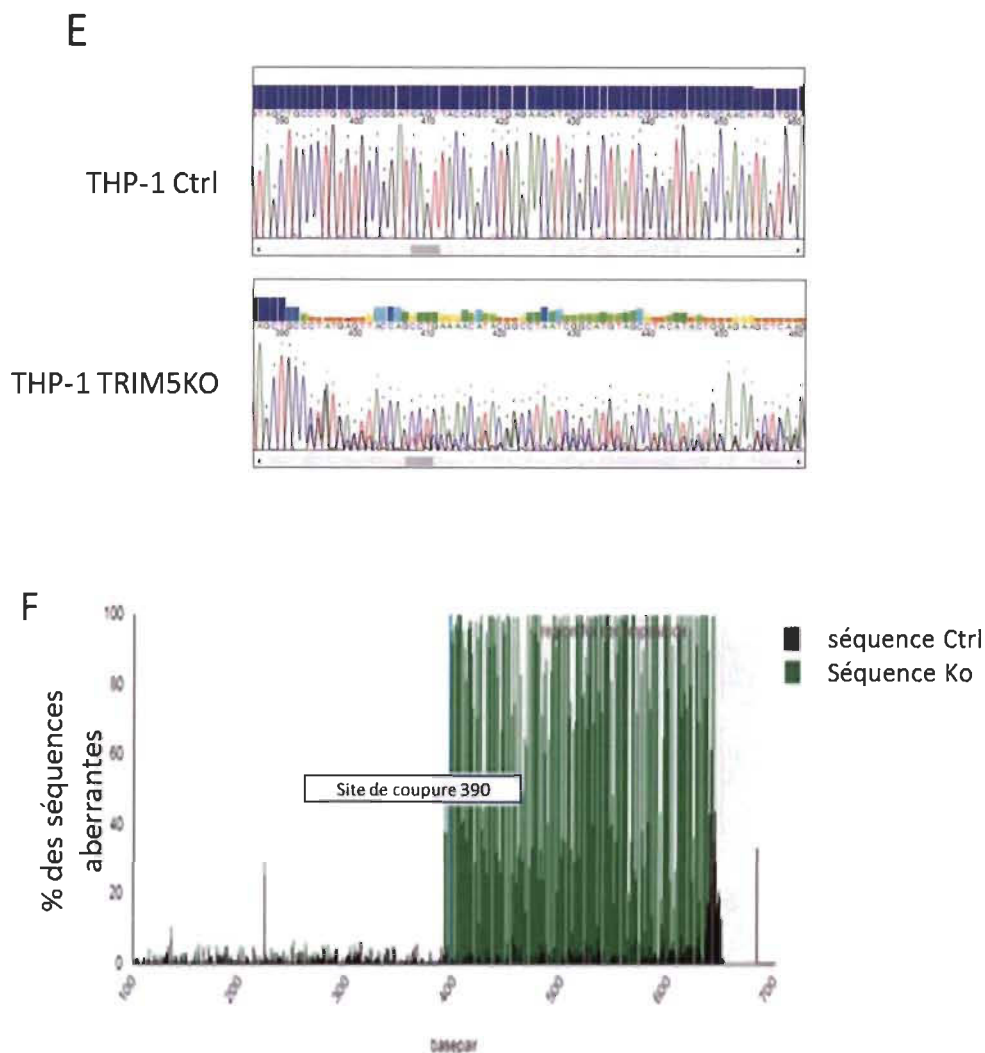


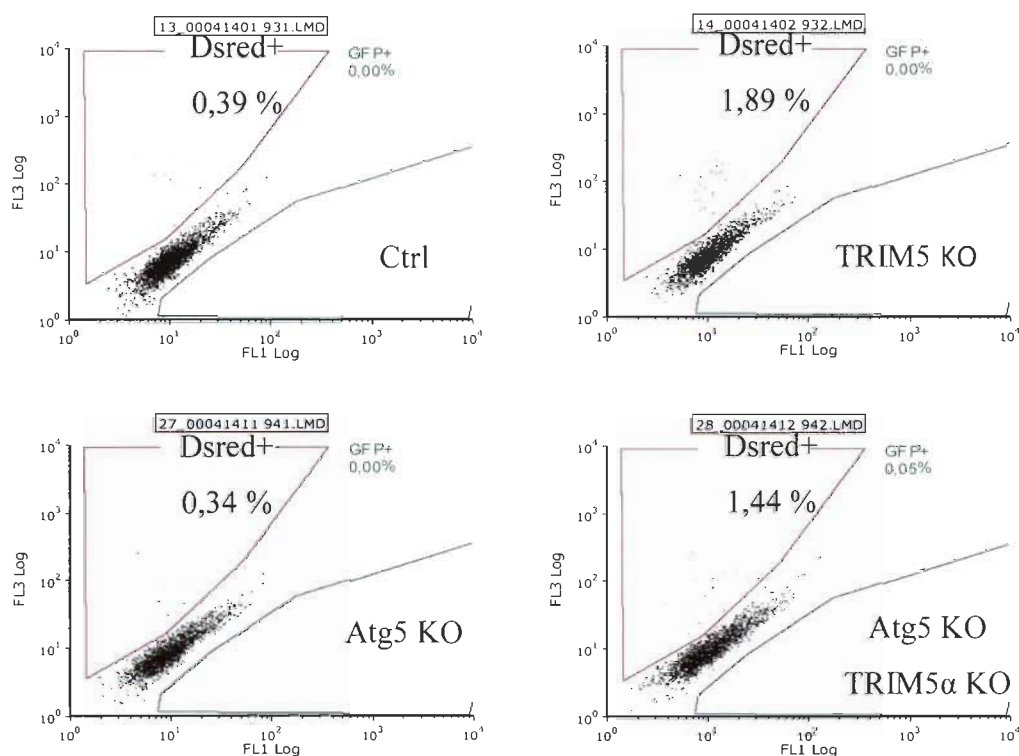
Figure 5.1 Knockout des protéines Atg5, p62 et TRIM5 α par CRISPR dans des monocytes humains.

(A) Les THP-1 ont été déplétés de la protéine Atg5 par CRISPR. L'expression protéique de Atg5 dans les cellules contrôles et les cellules *knockout* transduites a été confirmée par Western blot. (B) Validation des cellules THP-1 *knockout* pour la protéine de l'autophagie p62 par western blot. (C) et (D) quantification du western blot du panel A (un seul réplica). (E) Analyse de séquençage de TRIM5 dans des cellules transduites avec pLCv2-TRIM5. Les cellules THP-1 ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux pLCv2-TRIM5 ensuite sélectionnées à la puromycine, le locus de TRIM5 ciblé a été amplifié par PCR et le produit de PCR a été séquençé par Sanger. La figure montre un alignement des tracés de séquence obtenus. (F) Décomposition des résultats de séquençage par *TIDE assay*. Le graphique montre les pourcentages de pics aberrants en amont et en aval du site de coupure des séquences présentées dans le panel E. Le pourcentage des cellules contenant le *knockout* a été calculé par le *TIDE assay*.

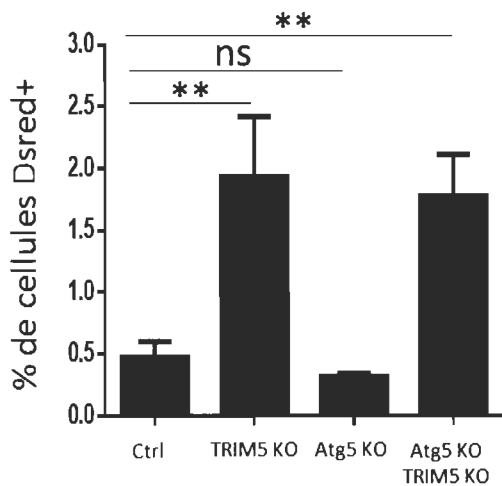
5.3 La suppression des protéines de l'autophagie Atg5 et p62 n'affecte pas la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α

Pour évaluer l'impact relatif d'Atg5 sur la restriction du VIH-1 par TRIM5 α , les cellules THP-1 contrôles ou *knockout* ont été prétraitées à l'IFN- β à une concentration finale de 10 ng/ml, ensuite infectées avec un vecteur NL4-3_{DsRed} EC5-2. Les cellules DsRed-positives ont été analysées au cytomètre en flux. Nous avons observé que, dans les cellules contrôles ou *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO), l'infection par le VIH-1 était restreinte par rapport aux cellules *knockout* pour TRIM5 (TRIM5 KO), ou double *knockout* (Atg5 KO/TRIM5 KO), qui présentaient une infection plus élevée (Figure 5.2A et 5.2B). Nous avons aussi remarqué que l'absence des deux protéines Atg5 et TRIM5 (Atg5 KO/TRIM5 KO) en même temps n'avait pas d'effet supplémentaire. Nous avons ensuite testé les infections avec un autre vecteur du VIH-1 le NL4-3_{DsRed} EC8-1. Les mêmes conditions ont été utilisées à l'exception du vecteur du VIH-1 qui cette fois-ci c'est le NL4-3_{DsRed} EC8-1 et deux populations cellulaires ont été ajoutées, les cellules *knockout* pour p62 seulement et les cellules *knockout* pour p62 et TRIM5 en même temps. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux obtenus avec le vecteur NL4-3_{DsRed} EC5-2. Dans les cellules contrôles ou *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO) ou p62 (p62 KO), il y avait une forte restriction de l'infectivité tandis que dans les cellules simple *knockout* pour TRIM5 (TRIM5 KO) ou double *knockout* (Atg5 KO/TRIM5 KO ou p62 KO/TRIM5 KO) démontraient un taux d'infectivité plus élevé (Figure 5.2C). Les protéines Atg5 et p62 ne sont donc pas impliquées dans la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α .

A



B



C

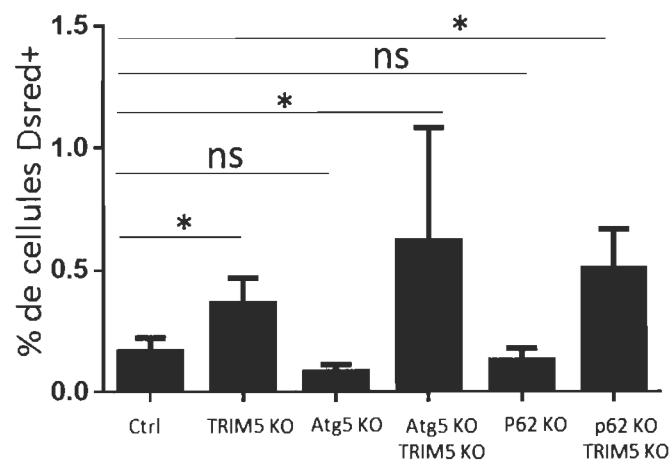


Figure 5.2 La suppression des protéines de l'autophagie Atg5 et p62 n'affecte pas la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α .

(A) Les THP-1 contrôles ou *knockout* (Atg5, TRIM5, ou Atg5-TRIM5) ont été prétraitées à l'IFN- β et ensuite infectées avec NL4-3_{DsRed} EC5-2. Les cellules ont été récoltées 48 h après l'infection et l'infectivité indiquée par le pourcentage de cellules DsRed-positives, a été mesurée par cytométrie en flux. (B) Trois expériences indépendantes ont été réalisées et les barres d'erreur représentent les écarts types des nombres de cellules DsRed-positives détectées. (C) Les THP-1 contrôles ou *knockout* pour

Atg5 et/ou TRIM5 ou pour p62 et/ou TRIM5 ont été prétraitées à l'IFN- β et ensuite infectées avec NL4-3_{DsRed} EC8-1. L'infectivité a été analysée comme décrit ci-dessus. Trois expériences indépendantes ont été menées et les barres d'erreur représentent les écarts types des nombres de cellules DsRed-positives détectées.

5.4 La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée NF κ B induite par TRIM5 α

Nous avons ensuite évalué si Atg5 était nécessaire à TRIM5 α pour l'activation de la voie immune NF- κ B. En réponse à une infection, TRIM5 α active la voie NF- κ B [126]. La phosphorylation de NF- κ B (p-p65) et son inhibiteur I κ B (p-I κ B) conduit à la dégradation de I κ B par le protéasome, libérant p-p65 qui est alors transporté au noyau et active la transcription de nombreux gènes, y compris ceux pour IFN-I [126]. Nous avons mesuré deux marqueurs de la voie NF- κ B, la protéine p-p65 et la protéine p-I κ B pour étudier la signalisation de NF- κ B par western blot suite à une infection par pNL4-3DsRed EC5-2. Le contrôle positif utilisé est le LPS qui peut conduire à l'activation de la voie NF- κ B. Cette approche a révélé une phosphorylation significative de la protéine I κ B dans les cellules THP-1 contrôles, mais qui est moins importante à celle induite par le LPS. Par ailleurs cette activation a été réduite dans les cellules *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO), TRIM5 (TRIM5 KO) ou les deux en même temps (Atg5 KO/TRIM5 KO) de façon similaire (Figure 5.3A et 5.3B). Par la même méthode, nous avons analysé un deuxième marqueur de la voie NF- κ B la protéine p-p65. Une phosphorylation significative de p65 dans les cellules contrôles infectées par le VIH-1 qui est semblable à celle induite par le LPS. En revanche cette phosphorylation est moins importante dans les cellules *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO) ou TRIM5 (TRIM5 KO), et elle est absente dans les cellules double *knockout* (Atg5 KO/TRIM5 KO) (Figure 5.4A et 5.4B). Nous avons aussi remarqué un niveau basal d'accumulation des protéines phosphorylées p-p65 et p-I κ B dans les puits sans traitement des cellules *knockout*. Il est possible que les protéines TRIM5 ou Atg5 soient impliquées dans la régulation des niveaux basaux de l'inflammation. L'origine de ce problème pourrait aussi être due à l'approche de *knockout* utilisée dans cette étude (voir perspectives).

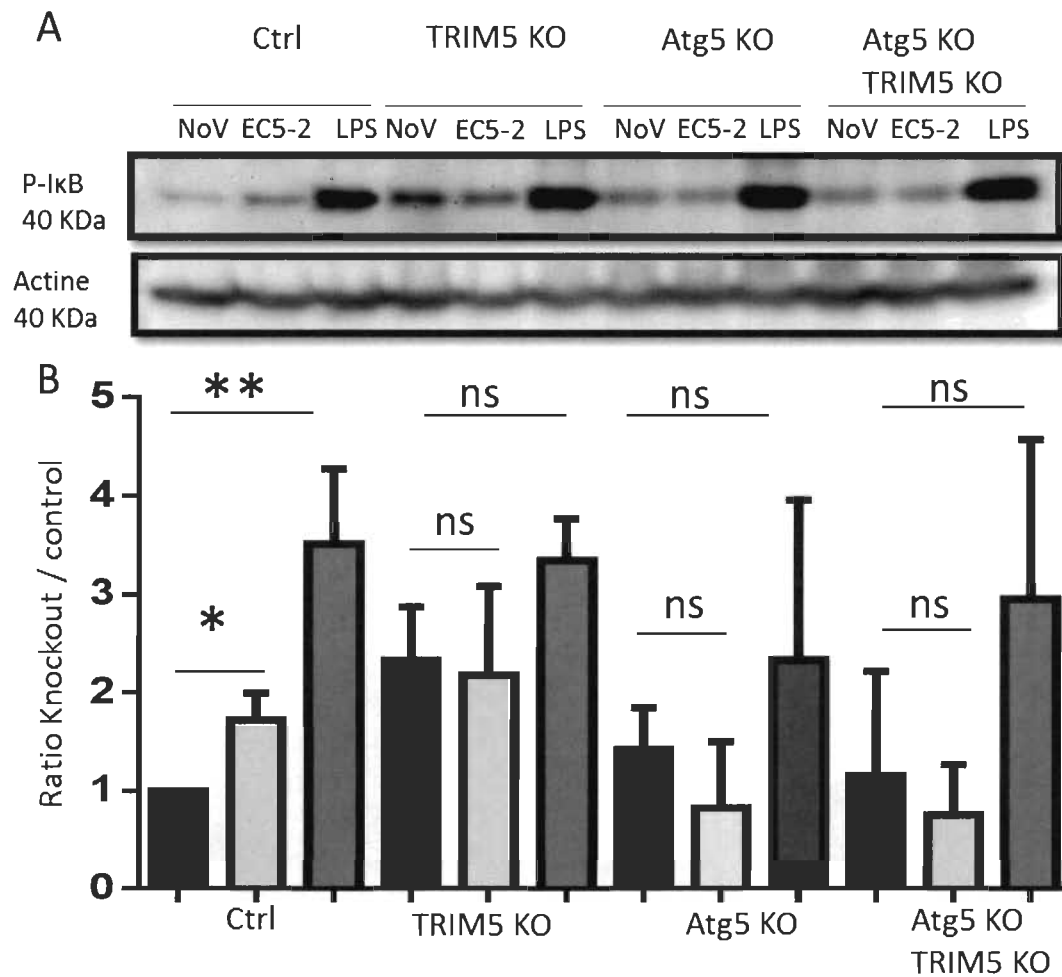


Figure 5.3 La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée NF- κ B induite par TRIM5 α (partie 1).

Les Cellules THP-1 contrôles et *knockout* (Atg5, TRIM5, ou les deux) ont été infectées par pNL4-3_{DsRed} EC5-2, ou traitement au LPS, pendant 2 heures, Ctrl = les puits sans aucun traitement. (A) L'activation de la voie NF- κ B a été mesurée par western blot en détectant phospho-I κ B et la α -actine. (B) Le graphe barre représente les ratios normalisés sur l'actine de 4 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent les écarts types. L'analyse statistique a été réalisée par t test.

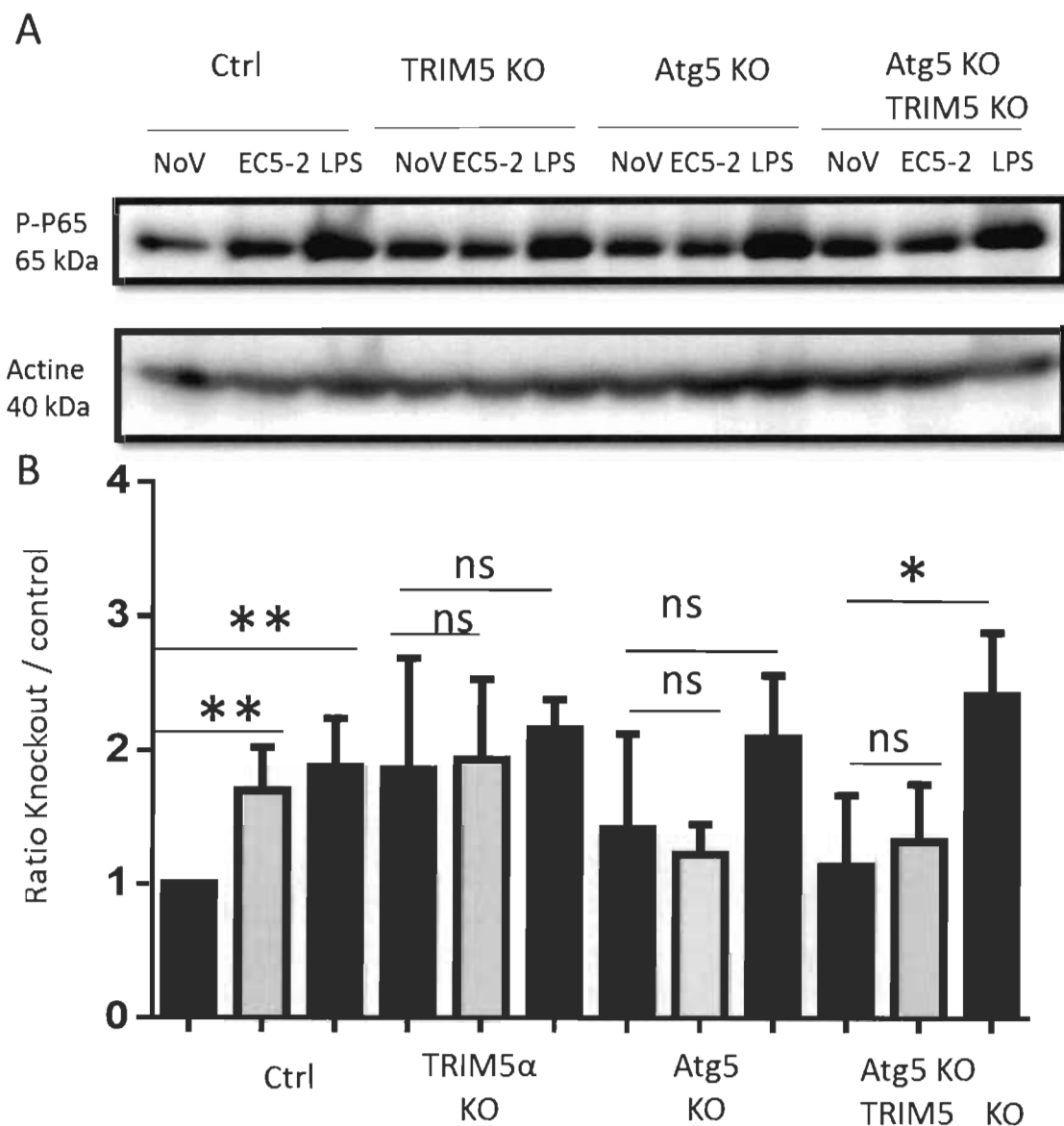
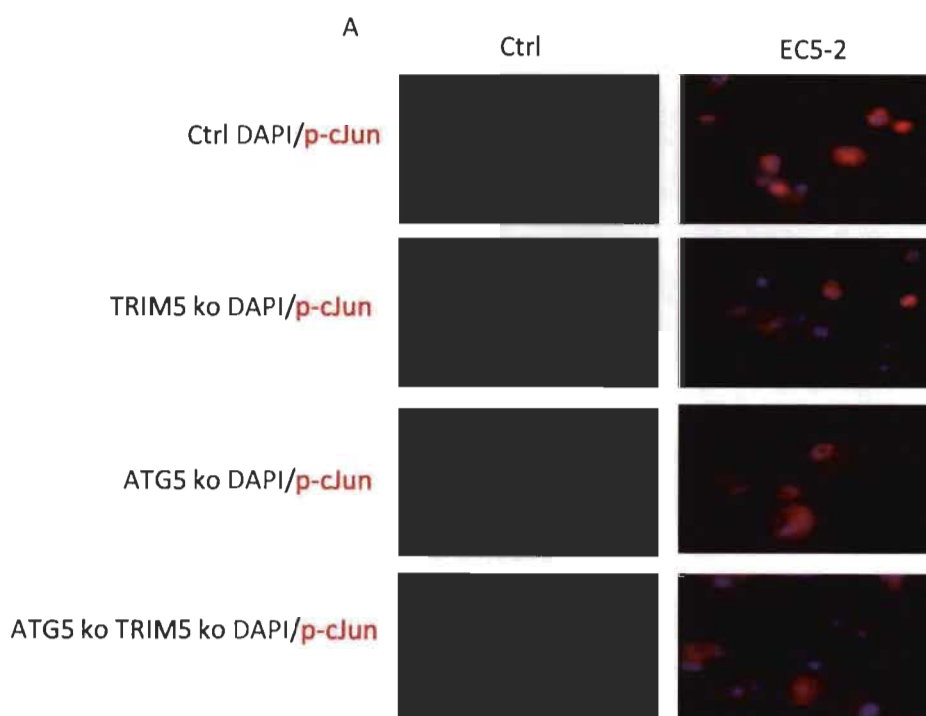


Figure 5.4. La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de l'immunité innée NF- κ B induite par TRIM5 α (partie 2).

Les Cellules THP-1 contrôles et *knockout* (Atg5, TRIM5, ou les deux) ont été infectées par pNL4-3_{DSRed} EC5-2, ou traitement au LPS, pendant 2 heures, Ctrl = les puits sans aucun traitement. (A) L'activation de la voie NF- κ B a été mesurée par western blot en détectant phospho-p65 et la α -actine. (B) Le graphe barre représente les ratios normalisés sur l'actine de 4 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent les écarts types. L'analyse statistique a été réalisée par t test.

5.5 Le double knockout de TRIM5 α et Atg5 réduit significativement l'activation de AP-1

TRIM5 α est aussi impliquée dans l'activation de la voie AP-1. Spécifiquement, TRIM5 α stimule la phosphorylation de c-Jun. Sous cette forme phosphorylée, c-Jun transloque au noyau et conduit à la transcription de nombreux gènes, y compris ceux codant pour IFN-I [126]. Nous avons alors étudié si Atg5 était impliquée dans cette activation. Nous avons analysé la signalisation de AP-1 par microscopie au cours de l'infection par NL4-3_{GFP} EC5-2, avec un anticorps qui cible la forme phosphorylée de c-Jun. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le LPS qui conduit à l'activation de la voie AP-1. Les résultats montrent une phosphorylation significative de la protéine c-Jun au niveau nucléaire dans les cellules THP-1 contrôles après infection comparable à celle induite par le LPS. Par ailleurs cette activation a été légèrement réduite dans les cellules *knockout* pour TRIM5 (TRIM5 KO), mais pas dans les cellules *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO) (Figure 5.5A et 5.5B). Les cellules double *knockout* quant à elle présentaient une absence de phosphorylation de la protéine cJun.



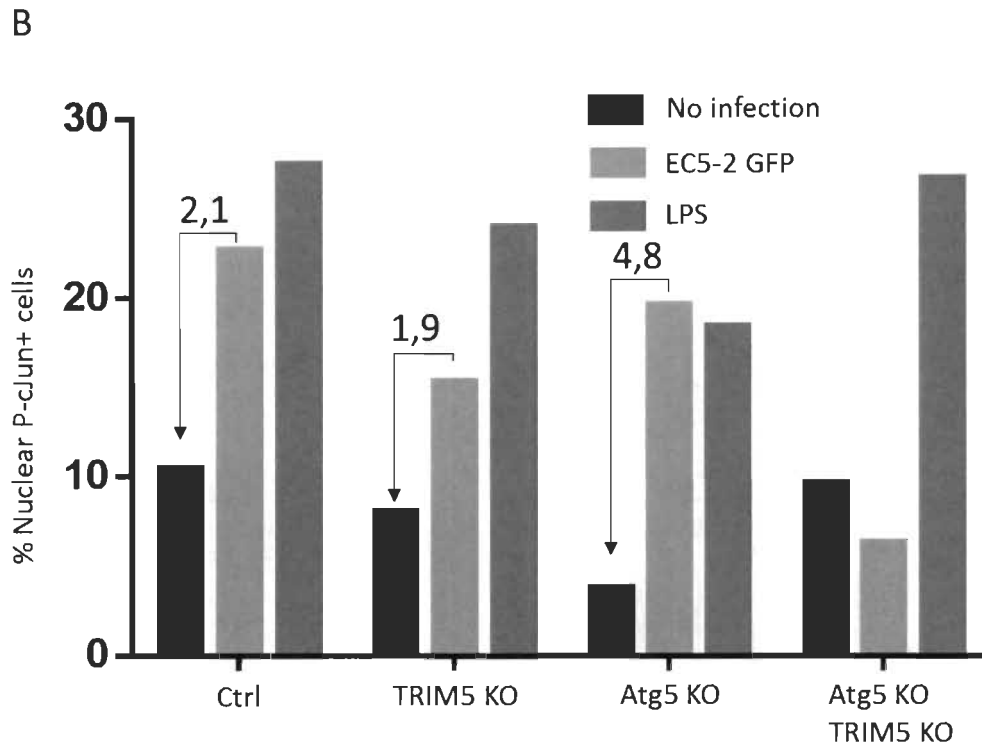


Figure 5.5 La suppression de la protéine Atg5 inhibe l'activation de la voie de l'immunité innée AP-1 induite par TRIM5 α .

Les Cellules THP-1 contrôles et *knockout* (Atg5, TRIM5, ou les deux) ont été infectées par le vecteur NL4-3_{GFP} EC5-2 (MOI = 5), ou traitées au LPS, pendant 2 heures, Ctrl = les puits sans aucun traitement. (A) L'activation de la voie AP-1 a été mesurée par microscopie. (B) quantification des cellules p-cJun positives au niveau nucléaire (un seul réplica). Chaque barre représente le pourcentage de cellules positives quantifiées à partir de plusieurs images avec un total en moyenne de 150 cellules pour chaque condition.

5.6 Le double knockout de TRIM5 α et Atg5 réduit la transcription de l'IFN- β

L'IFN- β fait partie des gènes régulés par NF- κ B et AP-1. Nous avons quantifié l'expression du transcrit IFN- β par qRT-PCR au cours d'une infection par NL4-3_{DsRed} EC5-2. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le LPS. Les résultats montraient une expression significative de l'IFN- β dans les cellules THP-1 contrôles après infection. Par ailleurs cette activation a été réduite dans les cellules *knockout* pour TRIM5 (TRIM5 KO). Les cellules *knockout* pour Atg5 (Atg5 KO) et les cellules double knockout ne montraient aucune expression du transcrit (Figure 5.6).

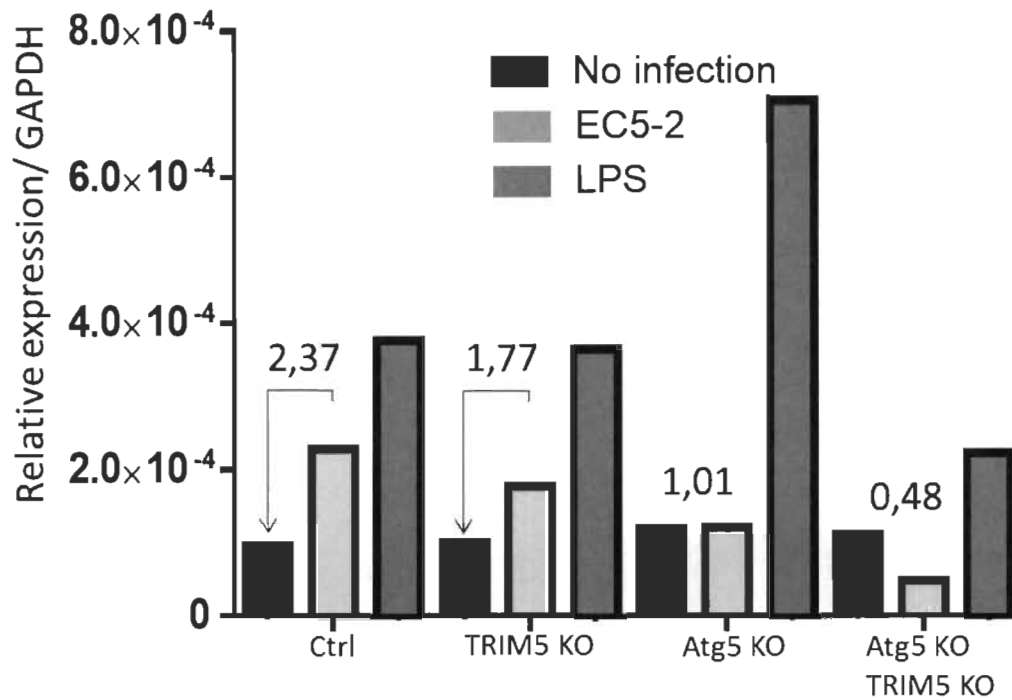


Figure 5.6 La suppression de la protéine Atg5 et TRIM5 α réduit la transcription de l'IFN- β .

Les cellules THP-1 contrôles et *knockout* (Atg5, TRIM5, ou les deux) ont été infectées par pNL4-3_{DsRed} EC5-2, ou traitées au LPS, pendant 6 heures. L'ARN a été extrait et utilisé pour quantifier l'IFN- β par qPCR, Ctrl = aucun traitement. L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode ΔC_t avec GAPDH pour la normalisation ($2^{-(C_t(\text{cible}) - C_t(\text{GAPDH}))}$) (un seul réplica).

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSION

TRIM5 α est une protéine cytoplasmique antirétrovirale qui stimule l'autophagie et joue le rôle de récepteur autophagique. Cette association suggère une relation fonctionnelle entre la voie de l'autophagie et la restriction par TRIM5 α . Pour explorer l'effet de l'autophagie sur les fonctions antirétrovirales de TRIM5 α , notre première approche était d'inhiber l'autophagie en ciblant les facteurs clés de l'autophagie Atg5 et p62 en plus de TRIM5 α avec CRISPR/Cas9 dans des lignées cellulaires dérivées de monocyte, afin d'obtenir des cellules déficientes pour l'autophagie et/ou en TRIM5 α . Nous avons ensuite infecté ces cellules modifiées avec des vecteurs VIH-1 sensibles à TRIM5 α (EC5-2 et EC8-1), dérivés de virus isolés de contrôleurs élites, naturellement résistants à la progression de la maladie[136].

Suite à l'infection par EC5-2, nous avons d'abord observé que la déplétion d'Atg5 n'avait pas d'effet sur la restriction induite par TRIM5 α . Nous avons aussi analysé la restriction en infectant avec un autre vecteur de VIH-1 EC8-1 dans les cellules *knockout* pour Atg5, p62 et/ou TRIM5. De manière semblable, aucun soulagement de la restriction rétrovirale n'a été noté dans les cellules dépourvues d'Atg5 ou de p62. Nos résultats contredisent ceux de l'équipe de Mandell *et al.* qui ont décrit que l'épuisement de l'expression d'Atg7, de Beclin1 et de p62 par *knockdown* avait une incidence sur la restriction rétrovirale par TRIM5 α lors d'une infection des fibroblastes primaires du macaque rhésus par le VIH-1[132]. De plus, Ribeiro *et al.* ont démontré en 2016 que TRIM5 α restreignait le VIH-1 en le conduisant vers la voie autophagique dans les cellules de Langerhans [144]. Par contre, bien que nous ne puissions pas écarter la possibilité que les petites quantités restantes de ces médiateurs après le *knockout* soient suffisantes pour préserver la restriction médiée par TRIM5 α , nos observations corroborent avec les résultats d'Imam *et al.* qui ont observé que la diminution des protéines adaptatrices de

l'autophagie Atg5 et Beclin1 n'abrogeait pas la restriction du VIH-1 induite par TRIM5 α dans les cellules HeLa [145].

Nous soupçonnons que les différences observées entre ces études sont dues aux modèles cellulaires singuliers utilisés. En outre, Mandell *et al.* ont utilisé des cellules de singe, donc il pourrait y avoir des effets spécifiques à l'espèce [126]. De plus l'infectivité a été mesurée par des tests de luciférase. Le problème avec la luciférase est que ça ne donne pas le pourcentage de cellules infectées puisque c'est dépendant du niveau d'expression de l'enzyme, ce qui ne reflète pas directement la capacité de restriction de TRIM5 α et sa relation avec l'autophagie. De plus, l'entrée du VIH-1 dans les cellules de Langerhans se fait par un mécanisme d'entrée distinct de celui dans les cellules principalement ciblées par le VIH-1 qui impliquent CD4 et un corécepteur. Le VIH-1 infecte les cellules de Langerhans via le récepteur de lectine de type C langerin, qui à son tour facilite la liaison de TRIM5 α au virus internalisé [144]. Par la suite, TRIM5 α dirige le complexe central vers la voie de l'autophagie pour la dégradation [144].

Finalement, il est possible que l'association entre TRIM5 α et l'autophagie réside plutôt dans l'activation de réponses immunitaires par le facteur de restriction lors d'une infection virale.

De ce fait, nous avons examiné l'implication d'Atg5 dans l'activation des voies NF- κ B et AP-1 par TRIM5 α . Suite à l'infection par EC5-2, nous avons procédé à l'étude de l'immunité innée par des approches variées, telles que la quantification de la phosphorylation et de la translocation nucléaire de NF- κ B et AP-1 et la quantification d'ARNm transcrits à partir de gènes régulés par NF- κ B et AP-1. Nos résultats montrent que l'activation des voies pro-inflammatoires par le VIH-1 est médiée au moins en partie par la protéine Atg5. Les cellules *knockout* pour Atg5, TRIM5 ou Atg5 et TRIM5 simultanément ne présentaient aucune accumulation significative des protéines phosphorylées I κ B et p65 impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B. L'analyse de la voie AP-1 quant à elle a montré que les cellules *knockout* pour TRIM5 montraient une activation de l'expression de la protéine phosphorylée cJun suite à une infection par

EC5-2, et que l'augmentation de l'expression était beaucoup plus significative dans les cellules *knockout* pour Atg5, tandis que les cellules *knockout* simultanément pour Atg5 et TRIM5 ne présentaient aucune accumulation de la protéine phosphorylée cJun. Par la suite, nous avons quantifié le transcrite de l'IFN- β suite à l'infection par EC5-2. Dans les cellules *knockout* pour Atg5 ou TRIM5, nous avons observé une réduction significative des niveaux d'expression du transcrite et une absence d'expression dans les cellules double *knockout*. Nos résultats montrent que l'activation des voies pro-inflammatoires suite à une infection par le VIH-1 en plus d'être médiée par TRIM5 α comme proposé par Pertel *et al.* [126], elle est aussi médiée par Atg5.

Grâce à son domaine N-terminal, TRIM5 α active le complexe kinase TAK1 et stimule la signalisation des voies inflammatoires AP-1 et NF- κ B, ce qui conduit à la production de l'IFN-I [128-131]. Certaines études montrent que l'entrée du VIH-1 améliore à la fois le renouvellement de TRIM5 α [146] et la signalisation immunitaire par le facteur de restriction [126]. Le renouvellement de TRIM5 α se fait en partie par l'autophagie [145] et la protéine Atg5 est essentielle à la formation de l'autophagosome [147], son absence conduisant à la perte de cette structure et à l'interruption du processus de l'autophagie. Ces observations pourraient expliquer le rôle d'Atg5 dans l'activation de l'immunité innée médiée par TRIM5 α lors d'une infection par le VIH-1. Suite à une infection par le VIH-1, le renouvellement de TRIM5 α se fait par autophagie, ce qui pourrait présenter un stimulus pour l'activation de l'immunité innée.

Ces résultats démontrent collectivement que les protéines de l'autophagie Atg5 et p62 ne sont pas nécessaires à la restriction rétrovirale par TRIM5 α . Néanmoins, nous suggérons pour la première fois qu'Atg5 est impliquée dans l'activation de la réponse pro-inflammatoire NF- κ B et AP-1 par TRIM5 α . En conclusion, TRIM5 α solliciterait la protéine de l'autophagie Atg5 pour induire une réponse antirétrovirale contre des virus à faible restriction.

6.1 Perspectives

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer notre hypothèse selon laquelle l'association de l'autophagie et TRIM5 α avait un effet sur l'activation de l'immunité innée médiée par TRIM5 α lors d'une infection par le VIH-1. Néanmoins, ce projet devra être poursuivi pour pouvoir établir le rôle de la protéine Atg5 dans l'activation de l'immunité innée par TRIM5 α . Premièrement, il vaut la peine de confirmer ce résultat en analysant d'autres transcrits activés par AP-1 et NF- κ B tels que : IL-6, IL-1B, IFIT1, TNFA. Il faudra aussi rétablir l'expression de TRIM5 α et Atg5 ensemble et séparément dans les cellules *knockout* afin de restaurer la réponse immunitaire par transduction stable. L'utilisation de l'approche des siRNA pour inhiber les protéines de l'autophagie serait intéressante aussi. De plus, il sera important de déterminer si cet effet est dû à la protéine de l'autophagie Atg5 ou à l'interruption du processus de l'autophagie. Pour ce faire, il faudra effectuer le même genre d'expériences en déplétant par *knockout* d'autres protéines clés de l'autophagie telles que Beclin1, Ulk1 et Atg7. Il est aussi important de déterminer si l'effet de cette association entre l'autophagie et TRIM5 α sur l'immunité innée est propre au VIH-1 ou à d'autres lentivirus. Enfin l'utilisation d'un autre moyen de déplétion serait d'un grand intérêt pour ce projet afin d'affecter le moins possible l'immunité innée. En effet, les vecteurs lentiviraux utilisés dans cette étude entraînent l'intégration de leur contenu dans le génome de la cellule. Pour contrer cet effet non souhaité, l'utilisation des AAV (virus adéno-associé) peut être une solution [148]. Ceux-ci peuvent contenir une grande quantité d'ADN (jusqu'à 4,8 kb) tout en évitant l'effet cytotoxique [149], car ils permettent une expression transitoire du matériel génétique (sans intégration) avec une bonne efficacité de transduction [150].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Plettenberg A, Reisinger E, Lenzner U, Listemann H, Ernst M, Kern P *et al.* Oral candidosis in HIV-infected patients. Prognostic value and correlation with immunological parameters. *Mycoses* 1990;33(9-10):421-25.
2. Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases* 1988;158(2):449-56.
3. Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A *et al.* The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine* 1990;322(3):161-65.
4. Luburich P, Bru C, Ayuso M, Azon A, Condom E. Hepatic Kaposi sarcoma in AIDS: US and CT findings. *Radiology* 1990;175(1):172-74.
5. Owen J, Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J, Punt J *et al.* Effector Responses: Cell-and Antibody-Mediated Immunity. *Kuby Immunology 7th ed* New York: WH Freeman 2013:427-44.
6. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225(4664):840-42.
7. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980;77(12):7415-19.
8. Barré-Sinoussi F, Chermann J-C, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):868-71.
9. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224(4648):497-500.
10. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N *et al.* What to call the AIDS virus? *Nature* 1986;321(6065):10.
11. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011;1(1):a006841.

12. Clavel F, Brun-Vezinet F, Guetard D, Chamaret S, Laurent A, Rouzioux C *et al.* LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 1986;302(13):485-88.
13. Hirsch VM, Dapolito G, McGann C, Olmsted RA, Purcell RH, Johnson PR. Molecular cloning of SIV from sooty mangabey monkeys. *Journal of medical primatology* 1989;18(3-4):279-85.
14. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(21):7552-57.
15. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet* 2014;384(9939):258-71.
16. Visseaux B, Damond F, Matheron S, Descamps D, Charpentier C. Hiv-2 molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 2016;46:233-40.
17. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 2010;7(1):96.
18. Health NIo. How HIV causes aids. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes ...; 2004.
19. Larrouy L, Brun-Vézinet F, Descamps D. Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase. *Virologie* 2010;14(2):119-28.
20. Bharmal R, Tiwari R. HIV and AIDS: basic elements and priorities: Springer; 2007.
21. Lin L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Richard YZ. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell research* 2005;15(11):923-34.
22. Fackler OT. Spotlight on HIV-1 Nef: SERINC3 and SERINC5 identified as restriction factors antagonized by the pathogenesis factor. *Viruses* 2015;7(12):6730-38.
23. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Früh K, Moses AV. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β TrCP-dependent mechanism. *Journal of virology* 2009;83(16):7931-47.
24. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312(5996):763-67.

25. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;312(5996):767-68.
26. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272(5270):1955-58.
27. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381(6584):661-66.
28. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC *et al.* A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85(7):1149-58.
29. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381(6584):667-73.
30. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272(5263):872-77.
31. Matreyek KA, Engelman A. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses* 2013;5(10):2483-511.
32. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988;242(4882):1171-73.
33. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13(8):484-96.
34. Health UDo, Services H. AIDS info Glossary of HIV/AIDS-Related Terms. 2018.
35. De Leys R, Vanderborght B, Haesevelde MV, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C *et al.* Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of virology* 1990;64(3):1207-16.
36. Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, Von Brunn A, Knapp S, Zekeng L *et al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of virology* 1994;68(3):1581-85.
37. Yamaguchi J, Bodelle P, Vallari AS, Coffey R, McArthur CP, Schochetman G *et al.* HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Research & Human Retroviruses* 2004;20(9):944-57.

38. Maucière P, Loussert-Ajaka I, Damond F, Fagot P, Souquière S, Lobe MM *et al.* Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids* 1997;11(4):445-53.
39. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C *et al.* Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* 1997;11(4):493-98.
40. Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* 1998;4(9):1032-37.
41. Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembi N, Mbanya D *et al.* Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS research and human retroviruses* 2010;26(1):109-15.
42. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 2009;15(8):871-72.
43. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F *et al.* Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology* 2011;85(3):1403-07.
44. Drake AL, Wagner A, Richardson B, John-Stewart G. Incident HIV during pregnancy and postpartum and risk of mother-to-child HIV transmission: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2014;11(2):e1001608.
45. Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS (London, England)* 2014;28(10):1509.
46. Donegan E, Stuart M, Niland JC, Sacks HS, Azen SP, Dietrich SL *et al.* Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations. *Annals of internal medicine* 1990;113(10):733-39.
47. Koulinska IN, Villamor E, Msamanga G, Fawzi W, Blackard J, Renjifo B *et al.* Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus research* 2006;120(1-2):191-98.
48. Leroy V, Newell M-L, Dabis F, Peckham C, Van de Perre P, Bulterys M *et al.* International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. *The Lancet* 1998;352(9128):597-600.
49. Yeni P. Rapport 2006: prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Flammarion, Paris, France 2006.
50. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 2012;37(3):377-88.

51. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011;1(1):a007096.
52. Hashida S, Hashinaka K, Nishikata I, Oka S, Saito A, Takamizawa A *et al.* Shortening of the window period in diagnosis of HIV-1 infection by simultaneous detection of p24 antigen and antibody IgG to p17 and reverse transcriptase in serum with ultrasensitive enzyme immunoassay. *Journal of virological methods* 1996;62(1):43-53.
53. Call SA, Heudebert G, Saag M, Wilcox CM. The changing etiology of chronic diarrhea in HIV-infected patients with CD4 cell counts less than 200 cells/mm³. *The American journal of gastroenterology* 2000;95(11):3142-46.
54. Bhatti AB, Usman M, Kandi V. Current scenario of HIV/AIDS, treatment options, and major challenges with compliance to antiretroviral therapy. *Cureus* 2016;8(3).
55. Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun T-W, Metcalf JA, Dewar R *et al.* HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96(26):15109-14.
56. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278(5341):1295-300.
57. McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Experimental eye research* 2013;117:53-61.
58. Le Page C, Genin P, Baines M, Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. *Reviews in immunogenetics* 2000;2(3):374.
59. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *New England Journal of Medicine* 2000;343(5):338-44.
60. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
61. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 2011;19(4):447-59.
62. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010;11(5):373.
63. Loo Y-M, Gale Jr M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34(5):680-92.
64. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327(5963):291-95.

65. Paz S, Sun Q, Nakhaei P, Romieu-Mourez R, Goubau D, Julkunen I *et al.* Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2006;52(1):17-28.
66. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006;25(3):373-81.
67. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011;472(7344):481-85.
68. Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 2009;30(6):766-75.
69. Welsh RM, Bahl K, Marshall HD, Urban SL. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog* 2012;8(1):e1002352.
70. Tough DF. Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunology and cell biology* 2012;90(5):492-97.
71. Merindol N, Berthoux L. Restriction factors in HIV-1 disease progression. *Current HIV research* 2015;13(6):448-61.
72. Sasada A, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Kobayashi M, Abudu A, Hishizawa M *et al.* APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* 2005;2(1):1-10.
73. Delebecque F, Suspene R, Calattini S, Casartelli N, Saïb A, Froment A *et al.* Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *Journal of virology* 2006;80(2):605-14.
74. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN *et al.* DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003;113(6):803-09.
75. Köck J, Blum HE. Hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G, APOBEC3C and APOBEC3H. *Journal of general virology* 2008;89(5):1184-91.
76. An P, Johnson R, Phair J, Kirk GD, Yu X-F, Donfield S *et al.* APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of infectious diseases* 2009;200(7):1054-58.
77. 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(6898):646-50.
78. Koning FA, Newman EN, Kim E-Y, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Malim MH. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *Journal of virology* 2009;83(18):9474-85.

79. Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG *et al.* Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2007;110(1):393-400.
80. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics* 2010;26(3):119-31.
81. Berger G, Durand S, Fargier G, Nguyen X-N, Cordeil S, Bouaziz S *et al.* APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathog* 2011;7(9):e1002221.
82. Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M *et al.* Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *Journal of virology* 2007;81(14):7776-85.
83. Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T *et al.* Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 2013;502(7472):559-62.
84. Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, Kutluay SB, Zang T, Wilson SJ *et al.* MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 2013;502(7472):563-66.
85. Busnadiego I, Kane M, Rihn SJ, Preugschas HF, Hughes J, Blanco-Melo D *et al.* Host and viral determinants of Mx2 antiretroviral activity. *Journal of virology* 2014;88(14):7738-52.
86. Fricke T, White TE, Schulte B, Vieira DAdSA, Dharan A, Campbell EM *et al.* MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology* 2014;11(1):68.
87. Liu Z, Pan Q, Liang Z, Qiao W, Cen S, Liang C. The highly polymorphic cyclophilin A-binding loop in HIV-1 capsid modulates viral resistance to MxB. *Retrovirology* 2015;12(1):1.
88. Matreyek KA, Wang W, Serrao E, Singh PK, Levin HL, Engelman A. Host and viral determinants for MxB restriction of HIV-1 infection. *Retrovirology* 2014;11(1):1-20.
89. Liu Z, Pan Q, Ding S, Qian J, Xu F, Zhou J *et al.* The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. *Cell host & microbe* 2013;14(4):398-410.
90. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E *et al.* HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 2011;480(7377):379-82.
91. White TE, Brandariz-Nunez A, Valle-Casuso JC, Amie S, Nguyen L, Kim B *et al.* Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* 2013;436(1):81-90.

92. Aviv T, Lin Z, Lau S, Rendl LM, Sicheri F, Smibert CA. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nature Structural & Molecular Biology* 2003;10(8):614-21.
93. Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4⁺ T-cells. *Retrovirology* 2012;9(1):1-8.
94. Diamond TL, Roshal M, Jamburuthugoda VK, Reynolds HM, Merriam AR, Lee KY *et al.* Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(49):51545-53.
95. Manel N, Hogstad B, Wang Y, Levy DE, Unutmaz D, Littman DR. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 2010;467(7312):214-17.
96. Baldauf H-M, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4⁺ T cells. *Nature medicine* 2012;18(11):1682-88.
97. St Gelais C, de Silva S, Amie SM, Coleman CM, Hoy H, Hollenbaugh JA *et al.* 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* 2012;9(1):105.
98. Brandariz-Nuñez A, Valle-Casuso JC, White TE, Laguette N, Benkirane M, Brojatsch J *et al.* Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* 2012;9(1):49.
99. Rehwinkel J, Maelfait J, Bridgeman A, Rigby R, Hayward B, Liberatore RA *et al.* SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *The EMBO journal* 2013;32(18):2454-62.
100. Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim S-Y *et al.* The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nature medicine* 2014;20(8):936-41.
101. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E *et al.* SAMHD1 is the dendritic-and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011;474(7353):654-57.
102. Goujon C, Rivière L, Jarrosson-Wuilleme L, Bernaud J, Rigal D, Darlix J-L *et al.* SIV SM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* 2007;4(1):2.

103. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL *et al.* HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 2015;526(7572):212-17.
104. Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 2015;526(7572):218-23.
105. Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T. Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(42):35776-83.
106. Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *The Journal of Immunology* 2006;177(5):3260-65.
107. Jiménez VC, Booiman T, De Taeye SW, Van Dort KA, Rits MA, Hamann J *et al.* Differential expression of HIV-1 interfering factors in monocyte-derived macrophages stimulated with polarizing cytokines or interferons. *Scientific reports* 2012;2(1):1-7.
108. Amet T, Byrd D, Hu N, Sun Q, Li F, Zhao Y *et al.* BST-2 expression in human hepatocytes is inducible by all three types of interferons and restricts production of hepatitis C virus. *Current molecular medicine* 2014;14(3):349-60.
109. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y *et al.* Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *Journal of virology* 2009;83(4):1837-44.
110. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 2003;4(10):694-709.
111. Galão RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NF κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell host & microbe* 2012;12(5):633-44.
112. Le Tortorec A, Willey S, Neil SJ. Antiviral inhibition of enveloped virus release by tetherin/BST-2: action and counteraction. *Viruses* 2011;3(5):520-40.
113. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH *et al.* Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell host & microbe* 2014;16(5):639-50.
114. McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog* 2013;9(4):e1003299.

115. Sivaramakrishnan G, Sun Y, Tan SK, Lin VC. Dynamic localization of tripartite motif-containing 22 in nuclear and nucleolar bodies. *Experimental cell research* 2009;315(8):1521-32.
116. Herr A-M, Dressel R, Walter L. Different subcellular localisations of TRIM22 suggest species-specific function. *Immunogenetics* 2009;61(4):271-80.
117. Gao B, Duan Z, Xu W, Xiong S. Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. *Hepatology* 2009;50(2):424-33.
118. Barr SD, Smiley JR, Bushman FD. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS pathogens* 2008;4(2):e1000007.
119. Singh R, Gaiha G, Werner L, McKim K, Mlisana K, Luban J *et al.* Association of TRIM22 with the type 1 interferon response and viral control during primary HIV-1 infection. *Journal of virology* 2011;85(1):208-16.
120. Tissot C, Mehti N. Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(25):14891-98.
121. Carthagena L, Bergamaschi A, Luna JM, David A, Uchil PD, Margottin-Goguet F *et al.* Human TRIM gene expression in response to interferons. *PloS one* 2009;4(3):e4894.
122. Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Type I interferon-dependent and-independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *European journal of immunology* 2008;38(3):619-30.
123. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004;427(6977):848-53.
124. Münk C, Brandt SM, Lucero G, Landau NR. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99(21):13843-48.
125. Nisole S, Stoye JP, Saïb A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(10):799.
126. Pertel T, Hausmann S, Morger D, Züger S, Guerra J, Lascano J *et al.* TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 2011;472(7343):361.
127. Fletcher AJ, Christensen DE, Nelson C, Tan CP, Schaller T, Lehner PJ *et al.* TRIM5 α requires Ube2W to anchor Lys63-linked ubiquitin chains and restrict reverse transcription. *The EMBO journal* 2015;34(15):2078-95.

128. Nepveu-Traversy M-É, Berthoux L. The conserved sumoylation consensus site in TRIM5 α modulates its immune activation functions. *Virus research* 2014;184:30-38.
129. Nepveu-Traversy M-É, Demogines A, Fricke T, Plourde MB, Riopel K, Veillette M *et al.* A putative SUMO interacting motif in the B30. 2/SPRY domain of rhesus macaque TRIM5 α important for NF- κ B/AP-1 signaling and HIV-1 restriction. *Heliyon* 2016;2(1):e00056.
130. Yudina Z, Roa A, Johnson R, Biris N, Vieira DAdSA, Tshiperson V *et al.* RING dimerization links higher-order assembly of TRIM5 α to synthesis of K63-linked polyubiquitin. *Cell reports* 2015;12(5):788-97.
131. Uchil PD, Hinz A, Siegel S, Coenen-Stass A, Pertel T, Luban J *et al.* TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *Journal of virology* 2013;87(1):257-72.
132. Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins C *et al.* TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Developmental cell* 2014;30(4):394-409.
133. Keown JR, Black MM, Ferron A, Yap M, Barnett MJ, Pearce FG *et al.* A helical LC3-interacting region mediates the interaction between the retroviral restriction factor Trim5 α and mammalian autophagy-related ATG8 proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2018;293(47):18378-86.
134. Masroori N, Merindol N, Berthoux L. The interferon-induced antiviral protein PML (TRIM19) promotes the restriction and transcriptional silencing of lentiviruses in a context-specific, isoform-specific fashion. *Retrovirology* 2016;13(1):19.
135. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S *et al.* CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997;385(6617):645-49.
136. Merindol N, El-Far M, Sylla M, Masroori N, Dufour C, Li J-x *et al.* HIV-1 capsids from B27/B57+ elite controllers escape Mx2 but are targeted by TRIM5 α , leading to the induction of an antiviral state. *PLoS pathogens* 2018;14(11):e1007398.
137. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 2013;8(11):2281-308.
138. Stringer BW, Day BW, D'Souza RC, Jamieson PR, Ensbey KS, Bruce ZC *et al.* A reference collection of patient-derived cell line and xenograft models of proneural, classical and mesenchymal glioblastoma. *Scientific reports* 2019;9(1):1-14.

139. Xu J, Feng HT, Wang C, Yip KH, Pavlos N, Papadimitriou JM *et al.* Effects of Bafilomycin A1: An inhibitor of vacuolar H (+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts. *Journal of cellular biochemistry* 2003;88(6):1256-64.
140. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods* 2014;11(8):783.
141. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of biological chemistry* 2007;282(33):24131-45.
142. O'Connor C, Pertel T, Gray S, Robia SL, Bakowska JC, Luban J *et al.* p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5 α . *Journal of virology* 2010;84(12):5997-6006.
143. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular cell* 2014;55(2):238-52.
144. Ribeiro CM, Sarrami-Forooshani R, Setiawan LC, Zijlstra-Willems EM, van Hamme JL, Tigchelaar W *et al.* Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5 α in dendritic cell subsets. *Nature* 2016;540(7633):448-52.
145. Imam S, Talley S, Nelson RS, Dharan A, O'Connor C, Hope TJ *et al.* TRIM5 α degradation via autophagy is not required for retroviral restriction. *Journal of virology* 2016;90(7):3400-10.
146. Rold CJ, Aiken C. Proteasomal degradation of TRIM5 α during retrovirus restriction. *PLoS pathog* 2008;4(5):e1000074.
147. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* 2011;27:107-32.
148. Kwarteng A, Ahuno ST, Kwakye-Nuako G. The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. *AIDS Research and Therapy* 2017;14(1):32.
149. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy* 2016;24(3):430-46.
150. Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C *et al.* Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic acids research* 2013;41(5):e63-e63.