

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

L'ÉDITION GÉNOMIQUE DE TRIM5ALPHA
COMME STRATÉGIE ANTIVIRALE CONTRE LE VIH-1

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

PAR
KEVIN DÉSAULNIERS

AOÛT 2021

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.

À pèpère Lessard

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr Lionel Berthoux d'avoir voulu m'accepter dans son laboratoire en tant que stagiaire et étudiant à la maîtrise. Je le remercie de m'avoir donné l'occasion de travailler sur un sujet qui me passionnait depuis si longtemps et sur un projet pour lequel j'avais beaucoup d'intérêt. Sans lui rien de ceci n'aurait été possible, je le remercie de m'avoir poussé à dépasser mes limites en croyant en moi plus que je le faisais moi-même.

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai eu droit à un accueil chaleureux, j'ai tout de suite remarqué l'amabilité et la qualité de toutes les personnes qui y travaillent. J'aimerais remercier Natacha Mérindol, elle a eu la gentillesse de m'accepter dans son projet pour mon stage et pour son aide avec mon projet de maîtrise. Tout au long de mon cursus, elle a été une excellente mentore, grâce à elle j'ai beaucoup appris sur le monde de la recherche, elle a toujours été de précieux conseils, elle est généreuse de son temps et je la remercie pour son important soutien. J'aimerais aussi exprimer ma reconnaissance à toutes mes collègues du laboratoire pour avoir rendu cette aventure qu'est la maîtrise mémorable. Votre présence, l'entraide et votre appui ont été inestimables lors de mon cheminement.

Mon parcours au baccalauréat ne fut pas sans embuches, des difficultés financières ont mis mon parcours en péril et elles m'ont obligé à remettre mes études en question. Le laboratoire d'anatomie humaine m'a aidé à surmonter ces difficultés grâce à un emploi étudiant comme aide-technicien au laboratoire. J'aimerais remercier le directeur du département d'anatomie Dr Gilles Bronchti d'aider de nombreux étudiants en leur offrant des opportunités d'emplois. En plus de l'aspect pécuniaire, cet emploi m'a permis de travailler dans un autre domaine qui me passionnait et de connaître la merveilleuse équipe de travail du laboratoire. J'aimerais remercier l'équipe de techniciennes de laboratoire pour tout leur soutien, pour tous ces bons moments passés au laboratoire, j'ai été choyé de travailler avec vous et vous êtes devenue comme une deuxième famille.

J'aimerais aussi témoigner toute ma reconnaissance à la Fondation communautaire du Saint-Maurice/ Shawinigan pour avoir retenu ma candidature pour l'obtention de la bourse Paul Désaulniers. Durant mon parcours, j'ai relevé plusieurs défis, notamment celui du financement de mes études et pour moi cette bourse a été une récompense pour avoir su rester debout durant ce parcours de combattant.

Finalement, je remercie la Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières d'avoir soutenu ce projet en le finançant par une subvention.

AVANT-PROPOS

Les virus sont retrouvés dans tous les écosystèmes de la terre et ils sont la forme biologique la plus abondante. Chaque jour, nous respirons, nous avalons des milliards de virus et tous les êtres vivants sont infectés par des virus. Les virus ont un potentiel pathogène variable, certains vivent en symbiose avec leur hôte alors que d'autres peuvent le détruire. L'omniprésence des virus et leur pouvoir pathogène variable font en sorte qu'il est très important de les étudier.

Au cours de ma formation en technologie d'analyse biomédicale, j'ai découvert plusieurs passions, dont celles pour la virologie et la biologie moléculaire. Le cours que j'ai le plus adoré pendant cette formation est le cours de biologie moléculaire, l'enseignant était très optimiste face à l'effervescence dans le domaine de la biologie moléculaire. Cette effervescence était en grande partie due au nouvel outil d'édition génomique qui venait de voir le jour et qui allait révolutionner le futur : CRISPR-Cas9. Dès ma formation collégiale, j'étais fasciné par la portée que pourrait avoir l'utilisation de l'outil CRISPR-Cas9 face à certaines maladies sanguines et contre certains types de virus, dont le VIH-1.

Sur le marché du travail, j'ai vite réalisé que travailler en milieu hospitalier a un prix, celui de côtoyer la souffrance et d'avoir un sentiment d'impuissance face à cette souffrance que les patients vivent. J'ai décidé de poursuivre vers la recherche avec le rêve un peu naïf de vouloir mettre fin à la souffrance de beaucoup de gens avec l'édition génomique. Je me suis informé sur la recherche se faisant dans ce domaine dans ma région. Les travaux du Dr Lionel Berthoux œuvrant au laboratoire d'immunité antivirale de l'UQTR m'ont accroché. En lisant ses publications, j'ai trouvé très brillante et révolutionnaire l'idée de travailler sur les facteurs de restriction et leurs mutations. Il était un pionnier dans la recherche sur la très prometteuse TRIM5 α .

Je me suis inscrit à l'UQTR dans le programme de baccalauréat en biologie médicale avec son choix de cours qui donne une solide préparation théorique pour la maîtrise. J'ai approché Dr Berthoux afin de savoir s'il voulait m'accepter dans son laboratoire comme étudiant à la maîtrise et il m'a offert d'effectuer un stage dans son laboratoire sur une base volontaire, offre que j'ai certainement acceptée.

Finalement à l'hiver 2019, j'ai amorcé ma maîtrise dans le laboratoire de Dr Berthoux. Pendant cette maîtrise, j'ai travaillé sur mon projet de rêve : éditer un gène humain. Mon projet a permis de valider le concept que l'édition génomique de cellules humaines pour le gène TRIM5 procure aux cellules un phénotype de résistance contre une infection au VIH-1.

RÉSUMÉ

Jusqu'à présent, les tentatives pour développer une thérapie curative contre le virus d'immunodéficience humaine (VIH-1) ont été infructueuses. Le VIH-1 est le virus responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), caractérisé par un affaiblissement du système immunitaire. Les personnes infectées par le VIH-1 sont traitées par des chimiothérapies antirétrovirales qui sont efficaces pour limiter la réplication virale, mais n'éradiquent pas complètement le virus, en particulier lorsqu'il est à l'état latent. Lorsqu'un patient cesse de prendre son traitement, l'effet rebond est observable et le virus devient détectable dans le sang en quelques jours. Par ailleurs, les effets secondaires liés à ces thérapies sont non négligeables.

L'approche antivirale présentée dans ce mémoire est une modification génique du gène humain codant pour le facteur de restriction TRIM5 α . TRIM5 α est une protéine cytoplasmique qui peut lier la capsid virale juste après son entrée dans la cellule. Cette interaction avec la capsid virale favorise la dimérisation et la multimérisation de TRIM5 α . Les protéines TRIM5 α forment ainsi un filet autour de la capsid, déstabilisant le processus de décapsidation. Le VIH-1 n'est généralement pas inhibé par huTRIM5 α , car le virus parvient à échapper à la détection par ce facteur de restriction. Des études ont identifié deux mutations critiques pouvant rétablir cette capacité de détection. Lorsque TRIM5 α portant ces mutations est surexprimée, elle inhibe la propagation du VIH-1 et offre un avantage de survie par rapport aux cellules non modifiées. Jusqu'à présent, les protéines mutées avaient été exprimées par surexpression d'un transgène. L'édition génomique n'avait jamais été utilisée à cette fin.

Dans ce projet de maîtrise, nous avons édité le gène TRIM5 dans une lignée de lymphocytes T afin d'introduire les mutations d'intérêt par recombinaison homologue. Nous avons pu isoler et caractériser des clones cellulaires contenant les modifications désirées dans TRIM5, mais nous n'avons isolé qu'un seul clone dans lequel les deux allèles étaient modifiés par recombinaison homologue. La modification monoallélique ou bi-allélique du gène TRIM5 conférait une activité de restriction du VIH-1 dans des cellules humaines. Cependant, l'inhibition était beaucoup plus forte dans le clone cellulaire portant les modifications dans les deux allèles. Dans le protocole utilisé, la modification bi-allélique était donc un événement peu fréquent, et il sera nécessaire d'augmenter l'efficacité d'édition génomique par recombinaison homologue avant de considérer des applications cliniques de cette approche. La restriction par TRIM5 α modifiée était fortement augmentée par un traitement à l'IFN-I, comme on s'y attendrait de la part de TRIM5 α endogène. Nos données démontrent le potentiel de cibler le gène de TRIM5 α par édition génomique afin de conférer la résistance au VIH-1. Cette approche pourrait être utilisée dans le développement d'une thérapie génique contre le VIH-1, de façon alternative ou complémentaire aux protocoles existants qui ciblent le co-récepteur viral CCR5.

Mots-clés : HIV-1, TRIM5 α , CRISPR-Cas9, Édition génomique, Facteur de restriction.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS.....	v
RÉSUMÉ.....	vii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations, sigles et acronymes	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les virus.....	1
1.1.1 Définition.....	1
1.1.2 Structure.....	1
1.2 VIH-1.....	2
1.2.1 Historique.....	2
1.2.2 État actuel	3
1.2.3 Génomique.....	4
1.2.4 Structure.....	6
1.2.5 Cycle viral.....	7
1.2.5.1 Attachement et entrée.....	7
1.2.5.2 Transcription inverse.....	9
1.2.5.3 Décapsidation	10
1.2.5.4 Importation nucléaire	15
1.2.5.5 Intégration	17
1.2.5.6 Transcription	19
1.2.5.7 Traduction	20
1.2.5.8 Assemblage	20
1.2.5.9 Libération	22
1.2.5.10 Maturation.....	23
1.3 Relation virus-hôte.....	23
1.3.1 Physiopathologie de l'infection	23
1.3.2 Résistance innée et naturelle.....	25

1.3.3	Immunité adaptative	28
1.3.4	Les facteurs de restriction	29
1.3.4.1	TRIM5 α	30
1.3.4.2	La tétherine.....	36
1.3.4.3	APOBEC3G	36
1.3.5	Traitements	37
1.3.6	Thérapie génique.....	38
1.3.6.1	La nucléase à doigts de zinc.....	40
1.3.6.2	TALEN.....	41
1.3.6.3	CRISPR.....	41
1.3.6.4	Cas9 et Cpf1	42
1.3.6.5	L'édition de base	43
1.3.6.6	<i>Le prime editing</i>	45
1.3.6.7	Les réservoirs de VIH-1 latent	46
1.3.6.8	Stratégies vers une guérison définitive	48
1.3.6.9	Les facteurs de restriction	49
1.4	Problématique et hypothèse de recherche.....	51
1.4.1	Objectif : Déterminer l'impact sur la réponse contre le VIH-1 résultant de l'édition génomique du gène humain du facteur de restriction TRIM5 α	51

CHAPITRE II

EDITING OF THE TRIM5 GENE DECREASES THE PERMISSIVENESS OF HUMAN T LYMPHOCYTIC CELLS TO HIV-1

2.1	Contribution des auteurs.....	53
2.2	Résumé de l'article	54
2.3	Article complet en anglais : Editing of TRIM5 gene decreases the permissiveness of human T lymphocytic cells to HIV-1.....	55
2.3.1	Abstract.....	55
2.3.2	Introduction.....	55
2.3.3	Materials and methods.....	59
2.3.3.1	Cell culture	59
2.3.3.2	TRIM5 Editing.....	59
2.3.3.3	Isolation and Screening of Cell Clones.....	60
2.3.3.4	HaeIII Screening of Edited Clones and Deep Sequencing.....	60

2.3.3.5	Viral Challenges.....	61
2.3.3.6	Knockdowns.....	61
2.3.3.7	HIV-1 cDNA Quantification.....	62
2.3.4	Results.....	62
2.3.4.1	TRIM5 Editing.....	62
2.3.4.2	HIV-1 Restriction Activity in TRIM5-Edited Clones.....	65
2.3.4.3	Knockdown Validation of TRIM5 α Antiviral Function.....	67
2.3.4.4	Mechanism of Inhibition by Edited TRIM5 α	68
2.3.5	Discussion.....	71
2.3.6	Supplementary Materials.....	73
2.3.7	Author Contributions.....	77
2.3.8	Funding.....	77
2.3.9	Institutional Review Board Statement.....	78
2.3.10	Informed Consent Statement.....	78
2.3.11	Data Availability Statement.....	78
2.3.12	Conflicts of Interest.....	78
2.3.13	References.....	78
CHAPITRE III		
DISCUSSION ET CONCLUSION.....		86
3.1	Contributions de cette maîtrise à l'avancement des connaissances.....	86
3.2	Perspectives d'avenir.....	88
3.2.1	Cible pour la thérapie génique.....	88
3.2.2	Limites de la méthode.....	89
3.2.2.1	Toxicité.....	90
3.2.2.2	Événements hors cible.....	90
3.2.2.3	Choix de l'orthologue de Cas9 et vecteur de livraison.....	90
3.2.3	L'édition de base.....	91
3.2.4	Le <i>prime editing</i>	96
3.2.5	Promotion des voies de réparation de l'ADN.....	97
3.3	Conclusion.....	99
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		101
ANNEXE A		
FIGURE SUPPLÉMENTAIRE.....		127

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schéma illustrant la morphologie des virus	2
1.2	Génome viral du VIH-1 et modèle d'épissage.....	5
1.3	Structure du VIH-1	7
1.4	Mécanisme d'entrée du VIH-1.....	9
1.5	Modèle de décapsidation.....	11
1.6	Modèle de transport intracellulaire	14
1.7	Modèle d'importation nucléaire.....	16
1.8	Réactions sur l'ADN viral et intégration	18
1.9	Modèle d'assemblage de la particule virale.....	22
1.10	Mécanisme de transmission d'une cellule à une autre.....	24
1.11	Interaction entre l'IFN-I, l'immunité innée et adaptative.....	26
1.12	Les facteurs de restriction	30
1.13	Propriétés structurelles et fonctionnelles de TRIM5 α	31
1.14	Mécanismes de la restriction induite par TRIM5 α	35
1.15	Chimiothérapie antirétrovirale.....	38
1.16	Édition génomique dépendante de DSB	40
1.17	Édition génomique indépendante de DSB	44
2.1	Tripartite-motif-containing protein 5 (TRIM5) editing strategy and outcome.....	63
2.2	Permissiveness of HDR-edited and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-1NL-GFP.....	66

2.3	Permissiveness of HDR-edited, retrovirally transduced and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-INL-GFP	67
2.4	TRIM5 α knockdown rescues HIV-1 from restriction in gene-edited cells ...	70
2.5	HIV-1 cDNA synthesis is inhibited in TRIM5-edited clone 6 Jurkat cells but is rescued by MG132 treatment	71
3.1	Technique d'édition génomique	92
3.2	Fenêtre d'activité pour l'édition de base.....	95
3.3	Comparatif entre les BE et les PE pour modifier TRIM5 α	97
3.4	Médiateurs des voies de réparation de l'ADN	98
A1	Résumé du projet	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAG	<i>Alkyl adenine DNA glycosylase</i>
AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
ABE	<i>Adenine base editor</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ALR	<i>AIM2-like receptors</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BE	<i>Base editor</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
Cas9n	<i>Cas9nickase</i>
CBE	<i>Cytosine base editor</i>
CCR5	<i>C-C chemokine Receptor type 5</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
Cyp	<i>Cyclophilin C-terminal</i>

dCas9	<i>deadCas9</i>
DDX3	<i>DEAD-box protein 3</i>
DSB	<i>Double strand break</i>
eIF4F	<i>eukaryotic initiation factor 4F</i>
Env	Enveloppe
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
Gag	<i>Group antigen</i>
Gag-pol	<i>gag-polymerase</i>
Gp120	<i>Glycoprotein 120</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
gRNA	<i>Guide RNA</i>
HDGF	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>
HNH	<i>Histidine-asparagine-histidine</i>
HR	Recombinaison homologue
HRP	<i>HDGF related protein</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HTLV-I	<i>Human T-cell leukemia/lymphoma virus I</i>
IFN	Interféron
Indel	Insertion ou délétion
INNTI	Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteur de la protéase
ISG	<i>Interferon stimulated gene</i>

LB	Lymphocyte B
LEDGF	<i>Lens epithelium-derived growth factor</i>
LT	Lymphocyte T
LTh	Lymphocyte T auxiliaire
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Nef	<i>Negative factor</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NHEJ	<i>Non homologous end-joining</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat – containing receptors</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
Nup358	<i>Nucleoprotein 358</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Primer binding site</i>
PE	<i>Prime editor</i>
pegRNA	<i>Prime-editing gRNA</i>
PIC	<i>Preintegration complex</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
Prgp160	<i>Precursor of glycoprotein 160</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PtdIns (4,5)P2	<i>Phosphoinositide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
RanBP2	<i>RAN binding protein 2</i>

RBE	<i>RNA base editor</i>
Rev	<i>Regulator of viral expression</i>
rhTRIM5 α	<i>Rhesus TRIM5α</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RTC	<i>Reverse transcription complex</i>
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus Cas9</i>
SIDA	<i>Syndrome de l'immunodéficience acquise</i>
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes Cas9</i>
TadA	<i>tARN adenosine desaminase</i>
TALE	<i>Transcription activator-like effector</i>
TALEN	<i>TALE-nuclease</i>
Tat	<i>Trans-activator of transcription</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
tracrRNA	<i>Transactivating CRISPR RNA</i>
TRIM5 α	<i>Tripartite motif containing protein 5 isoform alpha</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
UGI	<i>Uracil glycosylase inhibitor</i>
UNG	<i>Uracil N-glycosylate</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VIH-1	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
ZFN	<i>Zinc finger nuclease</i>

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les virus

1.1.1 Définition

Les virus sont des agents infectieux de petite taille dont le génome est un élément d'acide nucléique. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires, ils se reproduisent à l'intérieur des cellules vivantes en détournant à leur profit le métabolisme cellulaire pour synthétiser les virions contenant le génome viral. Ce sont des parasites pour les procaryotes et les eucaryotes, tous les êtres vivants sont des hôtes pour un ou plusieurs virus. Leur pouvoir pathogène est très variable, ils peuvent détruire leur hôte ou au contraire vivre en symbiose avec celui-ci. Dans la cellule, ils sont considérés comme des êtres vivants, ils se multiplient et assurent leur propre descendance. En dehors de la cellule, ce sont des nucléoprotéines ou des particules inertes.

1.1.2 Structure

Les virus sont constitués d'un seul type d'acide nucléique portant l'information génétique, l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'acide ribonucléique (ARN). Certains acides nucléiques peuvent présenter des structures inhabituelles qui ne sont pas rencontrées chez les procaryotes ou les eucaryotes. La structure de l'ARN viral peut être soit sous forme double brin, soit sous forme simple brin, de polarité positive, négative ou circulaire. La structure de l'ADN viral peut être sous forme double brin ou simple brin (Louten, 2016).

La capside est le constituant principal du virus, elle renferme son génome et a pour fonction de le protéger. Chez le virus sans enveloppe, elle a également une fonction de

reconnaissance de la cellule cible. La capside est composée de sous-unités protéiques codées par le génome viral. Les deux morphologies les plus courantes sont la structure hélicoïdale et la structure icosaédrique (Louten, 2016).

Cependant, certains virus possèdent une enveloppe qui provient le plus souvent d'une membrane cellulaire (Figure 1.1). L'enveloppe porte des glycoprotéines à sa surface qui remplissent la fonction de reconnaissance du récepteur de la cellule cible. L'enveloppe est sensible à la dessiccation, à la chaleur et aux détergents. Les virus enveloppés ne peuvent pas persister dans l'environnement et un bris dans l'enveloppe provoque une perte de pouvoir infectieux (Louten, 2016).

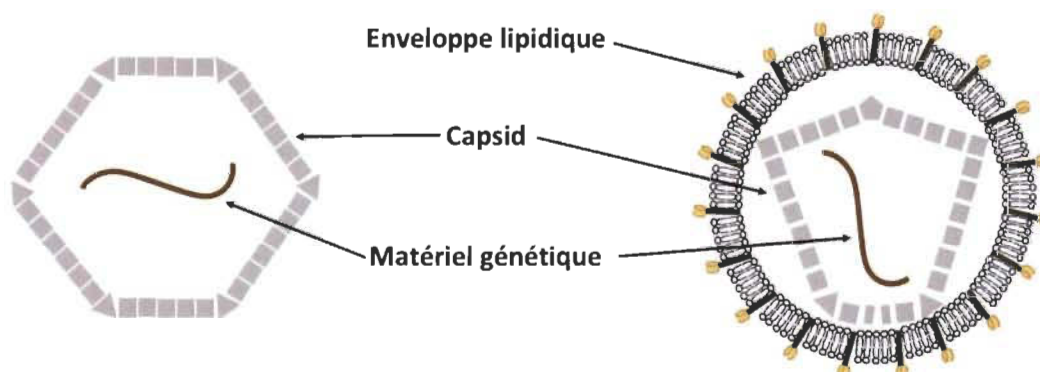


Figure 1.1 Schéma illustrant la morphologie des virus.

Schéma illustrant la morphologie des virus nus et enveloppés. Certains virus possèdent une enveloppe lipidique provenant d'une membrane cellulaire et cette membrane porte des glycoprotéines virales à sa surface. Tous les virus possèdent du matériel génétique, ADN ou ARN et une capsid pour le protéger.

1.2 VIH-1

1.2.1 Historique

En 1981, un jeune patient masculin sans antécédents médicaux notables souffrait d'une pneumonie induite par l'agent infectieux *Pneumocystis carinii*. La pneumonie à *Pneumocystis carinii* est une pathologie exceptionnelle pour un jeune homme en bonne

santé, cette pathologie est rencontrée chez les immunodéprimés. Le patient présentait un effondrement d'un type de lymphocyte, ceux portant le récepteur cluster of differentiation 4 (CD4), les lymphocytes T auxiliaires (LTh). En quelques semaines, plusieurs autres cas de pneumocystose vont être répertoriés chez des hommes jeunes qui sont tous homosexuels. La pathologie fut nommée le « Gay syndrome » et elle a fait l'objet d'une publication dans le Mortality and Morbidity Reports du Centers for Disease Control (CDC) (« Pneumocystis pneumonia--Los Angeles », 1981). Après enquête, le CDC a confirmé l'émergence de pneumocystose chez des patients homosexuels à partenaires multiples, ils présentaient aussi des signes d'infections opportunistes. Ce syndrome fut nommé syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). La première hypothèse soulevée était qu'un produit présent dans la drogue était toxique pour les LTh. D'autres cas de SIDA sont apparus chez des polytransfusés, des héroïnomanes et des Haïtiens, invalidant donc la première hypothèse. Une autre hypothèse va être soulevée, celle d'un agent infectieux transmissible par le sang et les relations sexuelles. Un chercheur de Washington DC, R. Gallo, a longtemps été convaincu que l'agent viral responsable du SIDA était un virus proche du *Human T-cell leukemia/lymphoma virus I* (HTLV-I). Le HTLV-I a un effet totalement opposé, il entraîne une augmentation du nombre de LT CD4. En 1983, le virus responsable du SIDA a été isolé pour la première fois à partir de cellules d'un ganglion lymphatique prélevé chez un patient présentant des lymphopathies en plus du SIDA (Barré-Sinoussi et al., 1983). Ce virus a été baptisé *Lymphadenopathy-associated virus* (LAV) (Barré-Sinoussi et al., 1983). En 1984, l'équipe de R. Gallo isole le virus responsable du SIDA et elle le nomma *Human T-cell leukemia/lymphoma virus III* (HTLV-III) puisqu'il était toujours convaincu que cet agent viral était proche du virus HTLV-I. Durant la même année, une autre équipe isole le virus qu'elle nomma *AIDS-related virus* (ARV). Pour éviter la confusion, un consensus a été établi sur *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1).

1.2.2 État actuel

En 2018, on estimait le nombre de personnes infectées par le VIH-1 à 37,9 millions, parmi ceux-ci figurent 36,2 millions d'adultes, 1,7 million d'enfants de moins de 15 ans

et seulement 23,3 millions ont accès à un traitement (<https://www.unaids.org/>). Malgré la hausse importante du nombre de personnes ayant accès à un traitement, il y a eu 770 000 décès liés au VIH-1 en 2018. Dans les pays occidentaux la prise en charge des patients atteints du virus est rapide, des moyens importants ont permis son optimisation, permettent un suivi étroit des patients et un accès au traitement. Cependant, dans les pays en développement la diffusion de la prise en charge thérapeutique avec des molécules antirétrovirales a du retard, mais l'accès aux soins se met progressivement en place. Il n'existe actuellement pas de vaccin contre ce virus.

1.2.3 Génomique

Le génome viral code pour 10 gènes qui sont exprimés de façon différente (Figure 1.2). Le transcrit complet non épissé code pour les polyprotéines *group antigen* (gag) et *gag-polymerase* (gag-pol). Les protéines restantes sont traduites par plus de 40 variants d'ARNm générés par la machinerie cellulaire de la cellule hôte (Stoltzfus, 2009). Environ la moitié des transcrits complets initiaux restent non épissés, ils servent soit d'ARN génomique, soit d'ARNm pour les polyprotéines gag et gag-pol et la moitié restant des transcrits complet initiaux est épissé (Purcell & Martin, 1993). Tous les ARN épissés utilisent le même site donneur qui est situé dans la région non codante en 5' et utilisent un des 10 sites accepteurs en aval (Purcell & Martin, 1993). Environ la moitié des ARN épissés subissent un double épissage pour éliminer l'intron enveloppe (env), ces ARN sont dans la classe des 1,8 kb et ils codent pour les protéines régulatrices *regulator of viral expression* (Rev) et *negative factor* (Nef) (Purcell & Martin, 1993). Les ARN épissés gardant l'intron env sont dans la classe des 4 kb et ils sont considérés comme monoépissés. Les transcrits de 1,8 kb sont exportés du noyau par les voies cellulaires de l'ARNm tandis que les ARN monoépissés et de pleines longueurs nécessitent la protéine régulatrice Rev. La protéine virale Rev se lie aux ARN contenant un *Rev-responsive element* (RRE) situé dans l'intron env favorisant l'exportation, la stabilité, la traduction ou son empaquetage dans un virion (Emery, Zhou, Pollom & Swanstrom, 2017).

Les transcrits de VIH-1 épissés et non épissés possèdent une région 5' non codante ou *untranslated region* (UTR) présentant plusieurs motifs hautement structurés (de Breyne, Soto-Rifo, López-Lastra & Ohlmann, 2013).

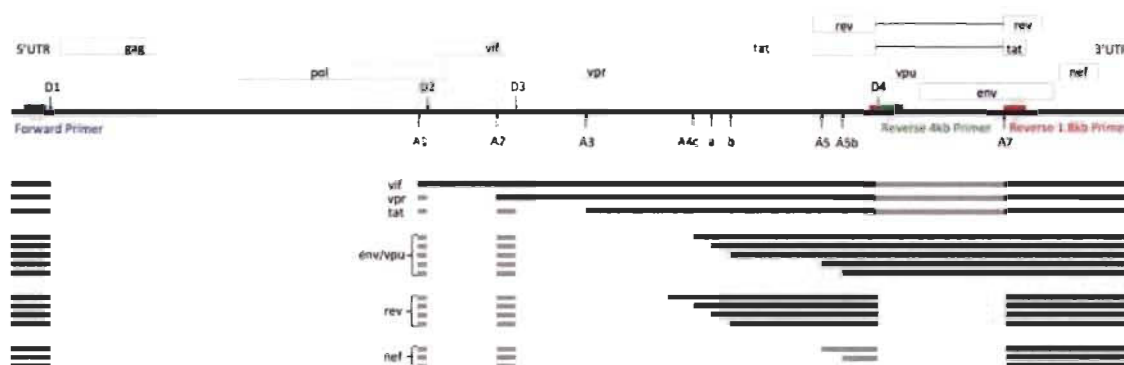


Figure 1.2 Génome viral du VIH-1 et modèle d'épissage.

Le génome viral du VIH-1 comporte 10 gènes et plusieurs stratégies d'expression sont utilisées pour exprimer ces gènes. Tous les ARN épissés utilisent le site donneur D1 et un des sites accepteurs en aval (Emery et al., 2017).

L'ARNm vpu-env est bicistronique et il code pour les protéines *viral protein U* (Vpu) et Env. L'*open reading frame* (ORF) de Vpu précède la séquence codante de Env. La protéine Env est synthétisée par un mécanisme ignorant le codon de démarrage de Vpu associé avec une valeur Kozak faible (Schwartz, Felber, Fenyö & Pavlakis, 1990). La séquence consensus de Kozak a été définie par Marilyn Kozak, elle précède le codon AUG et elle est la séquence optimale favorisant l'initiation par les ribosomes (Kozak, 1986). Des mutations du codon d'initiation de Vpu améliorant sa valeur Kozak inhibent la traduction de Env (Schwartz et al., 1990). Les isoformes de la région 5'UTR de 16 ARNm produits par un épissage alternatif influencent la production de Vpu par un mécanisme d'inclusion d'exons qui excluent l'AUG de Rev en amont (Anderson, Johnson, Howard & Purcell, 2007). La ligature de l'exon en 5' à divers exons distaux produits des isoformes de la région 5'UTR de longueur entre 350 à 775 nucléotides (Anderson et al., 2007). Quatre isoformes d'ARNm Env contenant l'exon 5E produisent 4 fois plus de protéines Vpu par rapport aux isoformes contenant l'AUG de Rev (Anderson et al., 2007). L'ARNm couvrant env est traduit en une glycoprotéine *Precursor of glycoprotein 160* (PrGp160), elle sera clivée par des protéases cellulaires furine et

similaires en une glycoprotéine de surface *glycoprotein 120* (Gp120) et une glycoprotéine transmembranaire Gp41 (Hallenberger et al., 1992).

L'ARNm non épissé peut initier la traduction des polyprotéines Gag et Gag-Pol par un mécanisme classique dépendant de la coiffe. La polyprotéine Gag-Pol est synthétisée dans un rapport d'approximativement 1/10 par rapport à Gag et elle est traduite par un décalage de cadre de lecture de -1 nucléotide (Brierley & Dos Ramos, 2006). Le décalage place le codon de terminaison de gag en dehors du cadre de lecture et la traduction se poursuit vers la séquence pol (Giedroc & Cornish, 2009). L'ARNm couvrant gag et pol est traduit en une protéine précurseur de Gag et Pol de 160kDa nommé Pr160GagPol. Cette protéine sera clivée par la protéase virale en une protéine précurseur de gag Pr55Gag, en p10 pour la protéase, p32 pour l'intégrase, p66 qui est clivé en p51 pour former un hétérodimère de p66 et p51 (Schulze, Nawrath, & Moelling, 1991). Le précurseur de Gag Pr55Gag est clivé par la protéase virale en une protéine de la capsid p24, une protéine de la matrice p17, une nucléoprotéine p7 et p6.

1.2.4 Structure

Le VIH-1 est de forme ronde, il mesure environ 100 nm de diamètre et il est muni d'une enveloppe. L'enveloppe est composée d'une bicouche lipidique émanant de la membrane cytoplasmique. Elle porte des assemblages protéiques viraux composés de trimères de protéine gp120 ancrés à la membrane par des trimères de protéine transmembranaire gp41 (Gelderblom, 1991). Les protéines de la matrice p17 recouvrent la surface interne de l'enveloppe virale (Turner & Summers, 1999). La structure protéique de la capsid est composée de protéines p24 situées au centre de la particule virale (Niedrig et al., 1994). La protéine p7 liée à l'ARN génomique viral forme un complexe nucléoprotéine-ARN. Deux molécules identiques d'ARN génomique viral sont situées à l'intérieur de la capsid, les enzymes virales RT et intégrase sont liées à l'acide nucléique (Figure 1.3).

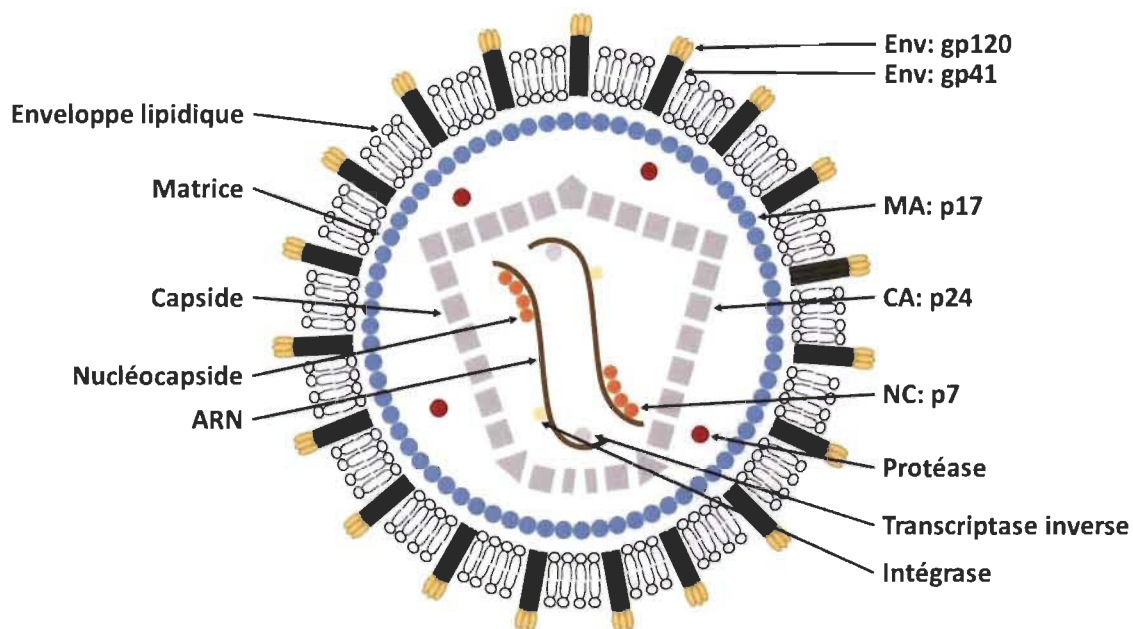


Figure 1.3 Structure du VIH-1.

L'enveloppe lipidique provient de la membrane cytoplasmique et elle porte les glycoprotéines virales. Les glycoprotéines virales sont assemblées en trimères de protéines gp120 ancrées à la membrane par des trimères de protéines transmembranaires gp41. Les protéines de la matrice p17 recouvrent la surface interne de l'enveloppe virale. Les protéines p24 forment le cœur de la capside et les protéines p7 forment la nucléocapside. Deux molécules d'ARN viral sont encapsidées liées avec les protéines p7 et avec les protéines enzymatiques.

1.2.5 Cycle viral

1.2.5.1 Attachement et entrée

La première phase du cycle de réplication virale commence par l'adhésion du virus à la cellule hôte. Les cellules qui expriment la glycoprotéine CD4 à leurs surfaces sont les principales cibles des complexes structuraux formés par gp120 et gp41. Ces cellules sont principalement les LTh, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. L'adhésion du virus à la cellule hôte a lieu par l'intermédiaire de la protéine virale Env ou par divers facteurs de fixation cellulaire présents sur la membrane de la cellule hôte incorporé dans le virion. L'attachement peut être non spécifique (Saphire, Bobardt, Zhang, David & Gally, 2001) ou peut résulter d'interaction spécifique (Cicala et al., 2009).

L'attachement à la cellule hôte par un de ces facteurs amène le virion à proximité d'un récepteur CD4 et d'un corécepteur (Orloff, Orloff, Kennedy, Maddon & McDougal, 1991). La particule virale se déplace en utilisant les voies de transport cellulaire vers le site où se produit la fusion membranaire la plus efficace (Sherer, Jin & Mothes, 2010). Les facteurs d'attachement diffèrent selon les cellules et ils ne sont pas essentiels même s'ils augmentent l'efficacité de l'infection (Orloff et al., 1991). L'élément absolument requis pour l'infection est la liaison de la sous-unité gp120 de Env à son récepteur principal le CD4 (Kwong et al., 1998). La liaison de Env à CD4 provoque des réarrangements structurels dans la sous-unité gp120 (Kwong et al., 1998).

La liaison avec un corécepteur est l'élément déclencheur qui active le potentiel de fusion membranaire d'Env. Les souches de VIH peuvent être distinguées en fonction de leur utilisation des corécepteurs. Certaines souches utilisent le récepteur des chimiokines *C-C chimiokine receptor type 5* (CCR5), elles sont appelées souche à tropisme CCR5, celles qui utilisent *C-X-C chimiokine receptor type 4* (CXCR4) sont appelées souche à tropisme CXCR4 et celles qui peuvent utiliser les deux corécepteurs sont appelées VIH R5X4 (Berger et al., 1998). La liaison du corécepteur induit l'exposition du peptide de fusion hydrophobe de gp41, le peptide s'insère dans la membrane de la cellule hôte et il provoque un attachement entre la membrane virale et hôte. Le changement de conformation de gp41 induit la formation d'un faisceau de six hélices (Chan, Fass, Berger & Kim, 1997). Cette formation engendre une force motrice, elle amène les membranes opposées en apposition étroite, entraînant la formation d'un pore de fusion et la livraison du contenu viral dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 1.4).

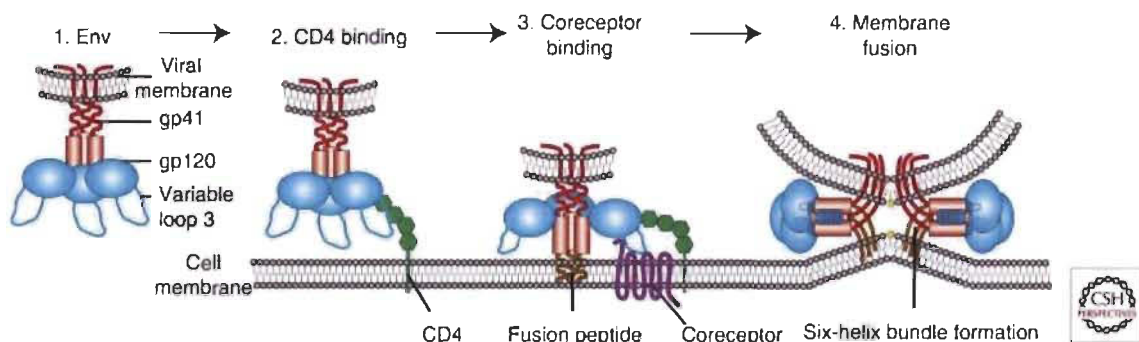


Figure 1.4 Mécanisme d'entrée du VIH-1.

La liaison de la sous-unité gp120 de Env au récepteur CD4 induit un réarrangement de gp120 et permet la liaison du corécepteur. La liaison au corécepteur induit un changement de conformation dans Env, le peptide hydrophobe de gp41 s'insère dans la membrane cellulaire et provoque un changement de conformation de gp41. Il y a ensuite formation du faisceau de six hélices qui procure une force motrice et induit la formation du pore de fusion (Wilensky, Tilton & Doms, 2012).

Les étapes de la transcription inverse et de la décapsidation seront traitées séparément même si les deux événements se produisent parallèlement. Le moment et l'emplacement précis de ces événements font toujours l'objet de débat. Beaucoup d'études ont été menées sur ces processus intimement liés et cruciaux pour le cycle viral. Un défaut dans un de ces processus conduit à l'échec de l'infection, ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix.

1.2.5.2 *Transcription inverse*

Le lieu et le moment exact où la transcription inverse se produit sont toujours inconnus mais elle a lieu dans la capsid intacte. La capsid est primordiale pour maintenir une stœchiométrie élevée de l'enzyme RT par rapport au génome viral (Charneau et al., 1994) et pour contrer sa tendance à se dissocier de sa matrice (Klarmann, Schaubert & Preston, 1993). La dilution de la RT dans le cytoplasme conduirait à une transcription inverse très inefficace. La transcription inverse implique tout d'abord la formation de l'ADN d'arrêt fort du brin négatif, un transfert de brin, la synthèse de l'ADN du brin négatif avec dégradation concomitante de la matrice d'ARN par la RNase H et finalement le déplacement du brin central conduisant à la formation du lambeau d'ADN central.

La formation du lambeau d'ADN central est le dernier événement associé à la transcription inverse, laissant supposer une fonction de contrôle viral de la réussite de la transcription inverse avant de déclencher la maturation du RTC en *preintegration complex* (PIC) couplé avec la décapsidation (Arhel et al., 2007).

1.2.5.3 Décapsidation

Bien que la plupart conviennent que la décapsidation se produit après l'entrée dans le cytoplasme et avant l'importation nucléaire, le moment et l'emplacement précis de cet événement demeurent toujours inconnus. La capsid protège, organise le génome et les protéines virales du VIH-1. Elle est imperméable aux grosses molécules comme les senseurs d'ADN de l'hôte ou d'autres facteurs de restriction, mais est perméable aux petites macromolécules du cytoplasme. Le réseau structural de la capsid est ouvert et présente des espacements interanneaux de 10 nm. Ces espacements permettent à de petites macromolécules, comme les nucléotides triphosphates et les inhibiteurs pharmacologiques de la transcriptase inverse, d'accéder au RTC dans le cytoplasme des cellules infectées (Arhel et al., 2007). Il existe trois modèles pour expliquer la décapsidation: la décapsidation rapide, la décapsidation cytoplasmique et la décapsidation au *nuclear pore complex* (NPC) (Figure 1.5).

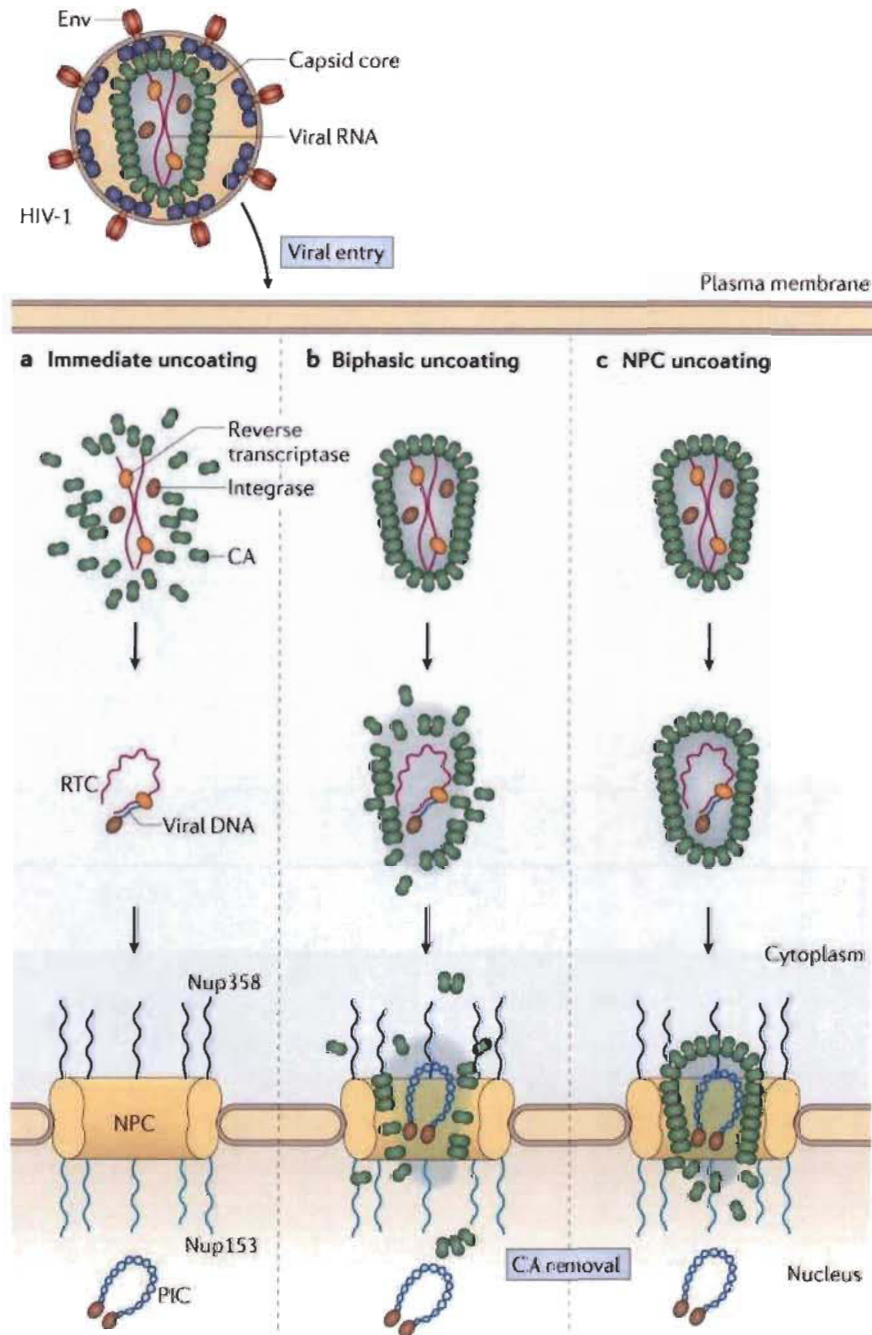


Figure 1.5 **Modèle de décapsidation.**

Schéma illustrant les 3 modèles de décapsidation, la décapsidation rapide, la décapsidation cytoplasmique et la décapsidation aux pores nucléaires. En a, dans le modèle de décapsidation rapide, l'événement se produit près de la membrane plasmique immédiatement après la fusion membranaire. En b, dans le modèle de décapsidation cytoplasmique, la perte des protéines de la capsid se fait progressivement dans le cytoplasme. En c, dans le modèle de décapsidation au NPC, la capsid reste intacte jusqu'au NPC (Campbell & Hope, 2015).

Le principal litige avec le modèle de décapsidation au NPC implique des analyses biochimiques des RTC intracellulaires qui ont conduit à la conclusion qu'il y a une perte importante des protéines de la capsidie peu après l'infection (Fassati & Goff, 2001; Miller, Farnet & Bushman, 1997) et que cette perte est associée au transport par les microtubules (Lukic, Dharan, Fricke, Diaz-Griffero & Campbell, 2014). Ces études suggèrent qu'une certaine forme de décapsidation ou un remodelage de la capsidie se produit rapidement après l'entrée du virus dans le cytoplasme des cellules cibles. Cependant, l'assemblage protéique de la capsidie est fragile, il est possible que l'isolement ait conduit à des bris au niveau de la capsidie et à une perte protéique. Il est clair que des protéines de la capsidie restent liées au RTC puisque celle-ci permet l'importation nucléaire du génome viral (Lee et al., 2010; Zhou et al., 2011).

La délétion ou la mutation de l'intégrase virale abrogent complètement la transcription inverse et l'assemblage protéique de la capsidie de ces virus est moins stable qu'avec la version d'intégrase de type sauvage (Briones, Dobard & Chow, 2010). De plus, l'inhibition de la transcription inverse a elle aussi un effet sur l'assemblage protéique de la capsidie en retardant la décapsidation (Hulme, Perez & Hope, 2011). Ces données suggèrent que les interactions entre la RT et l'intégrase stabilisent la capsidie par coopération (Zhu, Dobard & Chow, 2004). Les mutations dans les protéines de la capsidie formant des assemblages hyperstables présentent un grave défaut dans la transcription inverse (Forshey, von Schwedler, Sundquist & Aiken, 2002). L'ARN simple brin est flexible comparativement à l'ADN double brin qui est davantage rigide. Un certain degré de remodelage de la capsidie pendant la transcription inverse est nécessaire pour accueillir le génome viral puisque la formation de l'ADN viral naissant induit un stress sur la structure depuis l'intérieur du noyau.

Le mécanisme par lequel la capsidie perd des protéines doit inclure la protection du génome viral des senseurs d'ADN cellulaires tels que cGAS. La capsidie doit subir un remodelage tout en restant imperméable aux grosses molécules jusqu'à ce que le désassemblage se produise au NPC. Plusieurs mécanismes de décapsidation au niveau des pores ont été observés chez d'autres virus. Un de ces mécanismes est associé aux moteurs

cellulaires, ils induisent la décapsidation en fournissant une force mécanique tirant l'assemblage protéique dans des directions opposées. En conséquence, l'inactivation d'une kinésine appliquant une force motrice dans le sens contraire aux dynéines provoque une réduction des niveaux d'infection du VIH-1 de 50 % (Arhel et al., 2006). Des observations semblables ont été rapportées lors de la décapsidation du virus *herpes simplex virus 1* (HSV-1) (Radtke et al., 2010). Le mécanisme de décapsidation lors de l'infection à adénovirus implique une interaction avec la nucléoporine *nucleoprotein 358* (Nup358) et la protéine motrice kinésine-1 (Strunze et al., 2011).

Lorsque le virus VIH-1 pénètre dans une cellule, il traverse et interagit avec le squelette d'actine sous-jacent à la membrane plasmique (Arhel et al., 2006; Campbell, Nunez & Hope, 2004). Les complexes viraux transitent du squelette d'actine sous-jacent à la membrane plasmique vers les microtubules, ils subissent un mouvement rapide et dirigé vers le compartiment nucléaire (Arhel et al., 2006; McDonald et al., 2002). À proximité du compartiment nucléaire, les RTC subissent une transition des microtubules aux filaments d'actine et ils subissent un mouvement lent dirigé vers la membrane nucléaire (Figure 1.6) (Arhel et al., 2006). Le déplacement des protéines de la capsidite a été évalué par immunofluorescence, elles passent de la membrane plasmique à la membrane nucléaire et elles forment un anneau périnucléaire 2 heures après l'infection (Arhel et al., 2007). Cet anneau est formé de capsidites intactes présentes sur les filaments d'actine au niveau des pores nucléaires, mais légèrement décentrés par rapport à la lumière du pore et l'ADN viral rétrotranscrit colocalise avec les protéines de la capsidite (Arhel et al., 2007).

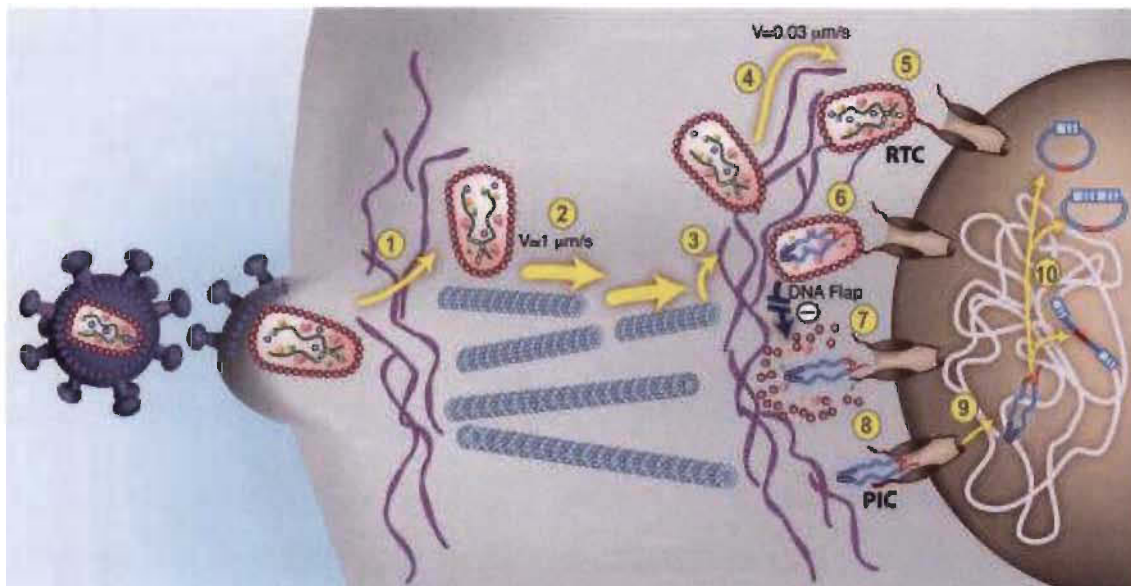


Figure 1.6 Modèle de transport intracellulaire.

Le VIH-1 pénètre dans la cellule cible par fusion membranaire, la capside interagit avec le cortex d'actine sous-jacent et transite sur les microtubules. À proximité de la membrane nucléaire, la capside subit un mouvement lent dirigé vers la membrane nucléaire par l'intermédiaire des filaments d'actine. Le complexe viral s'amarre au NPC et la décapsidation se produit après la formation du flap d'ADN central (Arhel et al., 2007).

Nup358 est une protéine nucléaire également appelée *RAN binding protein 2* (RanBP2), elle a été cartographiée sur le côté cytoplasmique du NPC et elle possède des filaments cytoplasmiques flexibles de 50 à 100 nm de long émanant du NPC dans le cytoplasme (Walther et al., 2002). NUP358 contient un domaine *cyclophilin C-terminal* (Cyp), NUP358Cyp interagit avec la boucle de liaison CypA présente sur les protéines de la capside du VIH-1 et amarre les RTC au NPC (Di Nunzio et al., 2012; Schaller et al., 2011). Des expériences ont démontré que la capside du VIH-1 est un substrat pour NUP358Cyp et NUP358Cyp qui catalyse son isomérisation plus efficacement que CypA (Bichel et al., 2013).

L'absence du flap d'ADN central conduit à une accumulation périnucléaire stable de capsides intactes contenant de l'ADN viral rétrotranscrit qui ne traversent pas la membrane nucléaire (Arhel et al., 2007). La taille de l'assemblage protéique de la capside du VIH-1 dépasse le diamètre maximum du pore nucléaire et une étape de maturation est

nécessaire avant la translocation. L'anneau périnucléaire formé de capsides intactes est présent jusqu'à 24 h après infection, indépendamment de la présence ou non du flap d'ADN central (Arhel et al., 2007) et les protéines de la capsidie se dissocient progressivement entre 24 et 48 h après infection (Arhel et al., 2007). Cependant, lorsque l'ADN viral est dépourvu du flap d'ADN central, l'anneau périnucléaire persiste jusqu'à 72 heures après infection (Arhel et al., 2007). Par conséquent, l'étape de décapsidation n'est pas un événement post-amarrage immédiat lors de l'interaction entre la boucle de liaison CypA présente sur les protéines de la capsidie du VIH-1 et NUP358Cyp. Contrairement à l'infection par adénovirus, l'amarrage des protéines de la capsidie au pore nucléaire n'est pas suffisant pour déclencher immédiatement la décapsidation, l'amarrage précède la translocation de 10 à 20 h. L'interaction de la boucle de liaison CypA présente sur les protéines de la capsidie avec NUP358Cyp catalyse l'isomérisation de la liaison peptidique de la capsidie G89-P90. Cette réaction affaiblit la structure déjà fragile de la capsidie et la formation du 3^e brin d'ADN viral induit un stress sur la structure depuis l'intérieur de la capsidie. La décapsidation est régie par la formation du lambeau d'ADN central, elle marque la fin de la transcription inverse et déclenche la maturation du RTC en PIC (Arhel et al., 2007).

1.2.5.4 Importation nucléaire

Nup153 est une protéine nucléaire, elle se situe principalement du côté nucléaire du NPC et elle est impliquée dans le transport nucléoplasmique (Figure 1.7). Nup153 est ancrée à l'intérieur du panier nucléaire du NPC par son domaine N-terminal (Enarson, Enarson, Bastos & Burke, 1998). Elle possède un domaine enrichi en FG en C-terminal qui est déplié d'une longueur de 200 nm dans sa forme native, très flexible et atteint potentiellement le côté cytoplasmique du NPC (Fahrenkrog et al., 2002; Liam et al., 2006). Nup153 est impliquée dans la translocation du PIC à travers le NPC et un défaut de son expression conduit à un défaut dans l'importation nucléaire du VIH-1 (Di Nunzio et al., 2012). La nucléoprotéine peut lier grâce à son domaine enrichi en FG une poche hydrophobe située sur la capsidie du VIH-1 (Matreyek, Yücel, Li & Engelman, 2013). La mutation des résidus Asn57, Lys70 ou Asn74 flanquant la poche hydrophobe entre les

hélices α 3 et 4 de la capsid est connue pour perturber cette liaison (Matreyek et al., 2013). De plus, les mutations de la capsid la rendant hyperstable perturbent aussi cette liaison (Matreyek et al., 2013). Lorsque la capsid est oligomérisée, le domaine C-terminal de la sous-unité adjacente couvre le bord inférieur de la poche hydrophobe, le résultat est une restriction stérique limitant l'accès à la poche et nécessitant un certain degré de décapsidation ou remaniement de la capsid pour permettre la liaison. La demi-vie relativement courte de Nup153 au NPC pourrait être responsable de la libération du PIC dans le nucléoplasme (Rabut, Doye & Ellenberg, 2004). La translocation nucléaire est aussi assistée par *lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF/p75). LEDGF/p75 est un membre de la famille des protéines *hepatoma-derived growth factor* (HDGF) *related protein* (HRP) et sert de protéine de liaison entre le PIC et les chromosomes de l'hôte. LEDGF/p75 et HRP2 sont deux HRP ayant une affinité pour l'intégrase du VIH-1 (Cherepanov, Devroe, Silver & Engelman, 2004). En absence de LEDGF/p75, l'intégrase est localisée dans le cytoplasme cellulaire (Maertens et al., 2003).

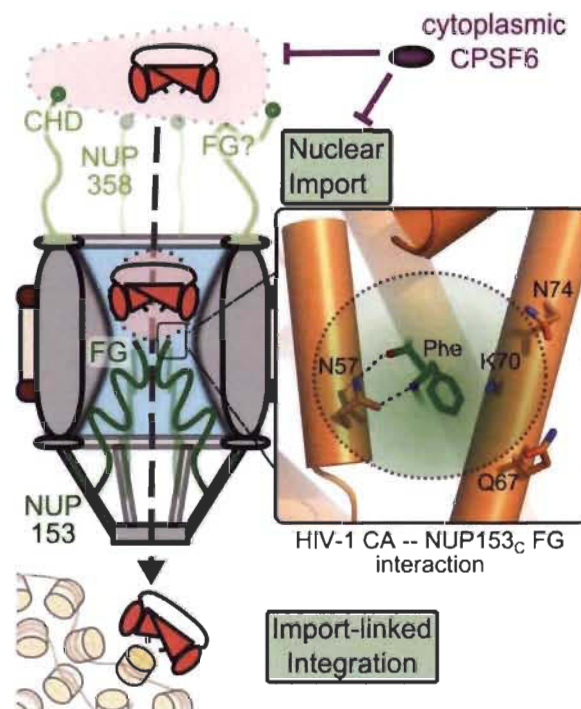


Figure 1.7 **Modèle d'importation nucléaire.**

Nup358 interagit avec les protéines de la capsid virale pour amarrer la capsid au NPC. Nup153 interagit avec les protéines de la capsid pour importer le complexe viral dans le noyau (Matreyek et al., 2013).

1.2.5.5 Intégration

L'intégrase présente dans le PIC catalyse deux réactions (Figure 1.8) (Miller et al., 1997). La première réaction est appelée traitement de l'extrémité 3'. Cette réaction est caractérisée par une hydrolyse d'un dinucléotide à chaque extrémité de l'ADN du virus et génère un intermédiaire réactif nucléophile contenant un groupe 3'-OH (Pauza, 1990). La liaison à l'ADN hôte est suivie d'une réaction de transestérification, l'intégrase utilise les groupes 3'-OH créés lors de la première réaction pour attaquer les liaisons phosphodiester du brin opposé séparé par 4 à 6 bases dans la direction 5' et relie de manière covalente les extrémités 3' de l'ADN viral aux coupures 5' phosphate générées (Engelman, Mizuuchi & Craigie, 1991). L'intermédiaire de recombinaison d'ADN résultant contient des discontinuités monocaténares laissant les extrémités 5' du virus restant non attachées au chromosome (Fujiwara & Mizuuchi, 1988). La réparation de l'ADN est nécessaire pour terminer le processus d'intégration et trois activités enzymatiques différentes sont requises pour effectuer cette réparation. La première est effectuée par une ADN polymérase, elle comble les discontinuités monocaténares en dupliquant l'ADN de l'hôte flanquant le virus, une endonucléase est nécessaire pour éliminer les dinucléotides des extrémités 5' du virus et une ADN ligase pour lier les joints monocaténares (Yoder & Bushman, 2000).

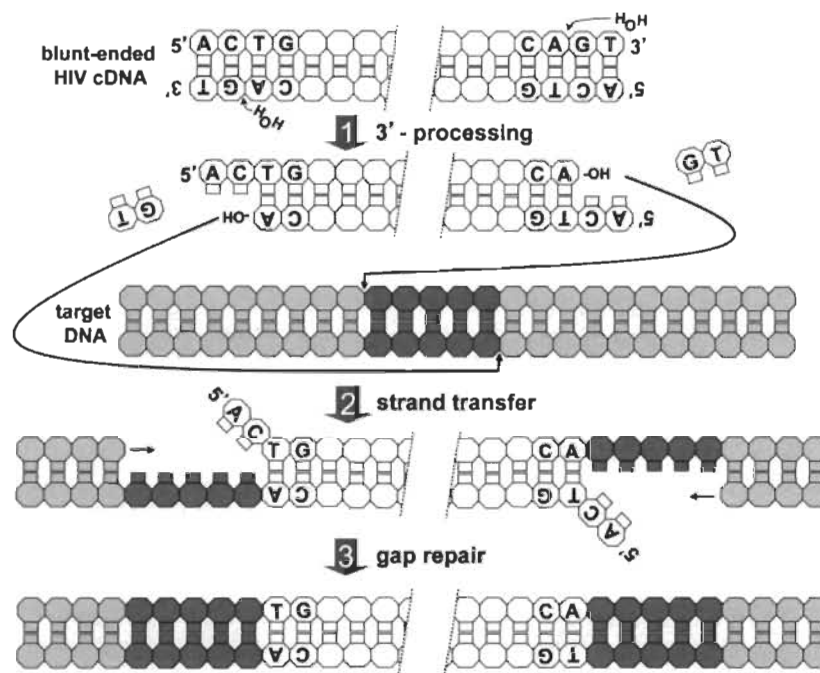


Figure 1.8 Réactions sur l'ADN viral et intégration.

L'ADN viral doit subir des modifications catalysées par l'intégrase pour pouvoir être intégré dans l'ADN hôte. Tout d'abord, l'intégrase hydrolyse un dinucléotide à chaque extrémité de l'ADN viral pour générer un groupe 3'-OH. L'intégrase catalyse une réaction de transestérification et joint l'ADN viral à celui de l'hôte. L'intermédiaire d'ADN généré contient des discontinuités et il doit être réparé (Poeschla, 2008).

Cependant, l'ADNc viral peut également subir plusieurs réactions de circularisation, les circularisations ne conduisent pas à une réplication ultérieure, elles persistent sous forme d'épisomes et représentent des impasses pour le virus (Farnet & Haseltine, 1991). Les deux extrémités de l'ADN viral peuvent être reliées l'une à l'autre et former des cercles comportant deux copies de *long terminal repeat* (LTR). L'inactivation des composants de la *non homologous end-joining* (NHEJ) tel que Ku70/80, la ligase IV et XRCC4 a pour effet de bloquer la formation de cercles 2-LTR (Li et al., 2001). Des cercles comportant une copie de LTR peuvent également être formés par une recombinaison entre les LTR (Kilzer et al., 2003) ou lorsque la RT n'a pas réussi à terminer l'étape finale (Hu & Hughes, 2012). De plus, l'ADN viral peut s'utiliser comme cible d'intégration et produire des cercles avec un segment inversé ou des paires de cercles plus petits (Farnet & Haseltine, 1991). La formation des cercles de 2-LTR est augmentée par l'appauvrissement en LEDGF/p75 (Llano et al., 2006).

1.2.5.6 Transcription

Après son intégration dans le génome de l'hôte, un grand nombre d'ARNm viraux sont produits à partir de l'ADN double brin (ADNdb) viral intégré dans les chromosomes de l'hôte (Ott, Geyer & Zhou, 2011). Après l'infection, le VIH-1 produit des ARNm longs rapidement doublement épissés codants pour les protéines régulatrices virales (Kim, Byrn, Gropman & Baltimore, 1989). Les protéines Tat et Rev possèdent des NLS et elles sont transportées dans le noyau. Au cours du processus d'élongation, Tat se lie à l'élément transactivation response (TAR), une structure tige-boucle d'ARN hautement conservée se formant spontanément aux extrémités 5' des transcrits viraux naissants. Le complexe positive transcription elongation factor (P-TEFb) est recruté dans la région de l'élément TAR (Peterlin & Price, 2006). P-TEFb est constitué de la protéine kinase cyclin dépendent kinase (CDK9), de son partenaire régulateur Cyclin T (CycT) et des cofacteurs/coactivateurs AFF4, ENL, AF9 et ELL2 (He et al., 2010; Marshall et al., 1996). La liaison de Tat à P-TEFb induit des changements de conformation significatifs dans CDK9 l'activant de manière constitutive (Isel & Karn, 1999).

Les transcrits de 1.8 kb sont exportés du noyau par les voies cellulaires endogènes de l'ARNm tandis que les ARN incomplètement épissés et de pleines longueurs nécessitent la protéine régulatrice Rev. La protéine virale Rev se lie aux ARN contenant le RRE, un élément ARN hautement structuré situé dans le gène *env* favorisant l'exportation (Malim, Hauber, Le, Maizel & Cullen, 1989; Mann et al., 1994). La protéine virale Rev liée au RRE interagit avec l'exportine 1 via un *nuclear exportation signal* (NES) situé à l'extrémité C-terminal de Rev. Après l'exportation nucléaire, RanGap hydrolyse le GTP de l'exportine 1, déstabilise le complexe avec Rev et libère Rev (Fischer, Huber, Boelens, Mattaj & Lührmann, 1995). Les ARN qui se retrouvent dans le cytoplasme peuvent donc être traduits ou empaquetés dans un virion.

1.2.5.7 Traduction

La stratégie de balayage de fuite est utilisée pour la synthèse des protéines Vpu et Env à partir d'un seul ARNm bicistronique (Schwartz et al., 1990). La traduction d'Env dépend d'un faible consensus de Kozak autour du codon AUG de Vpu, le AUG de Vpu n'initiera pas la traduction par le ribosome qui continuera de scanner pour atteindre le AUG de Env et initier la traduction de Env (Schwartz, Felber & Pavlakis, 1992).

L'ARNm non épissé peut initier la traduction des polyprotéines Gag et Gag-Pol par un mécanisme classique dépendant de la coiffe. L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe dépend de la reconnaissance de la structure de la coiffe 5'UTR par le complexe cellulaire *eukaryotic initiation factor 4F* (eIF4F). La structure de la coiffe du VIH-1 conduit à la traduction de Pr55Gag et de Pr160Gag-pol. Les gènes Pro et Pol sont distants de l'ORF de Gag et ils sont dans un cadre de lecture différent (Jacks et al., 1988). L'ARNm contient une combinaison de séquences répétitives appelées séquence glissante et une structure secondaire stable qui met en pause le ribosome et mène à un changement de cadre de lecture de l'ARNm (Léger, Dulude, Steinberg & Brakier-Gingras, 2007). Un décalage de -1 du cadre de lecture du ribosome est nécessaire pour la synthèse de la polyprotéine Gag-Pro-Pol (Jacks et al., 1988). Le décalage est influencé par l'activité de la protéine *protein kinase R* (PKR) (Gendron et al., 2008). Lorsque les niveaux d'ARN contenant la région TAR sont élevés, l'activité de la PKR est diminuée et le décalage du cadre de lecture est moins efficace (Gendron et al., 2008). L'ARNm viral non épissé sert également d'ARN génomique encapsidé dans les virions (Butsch & Boris-Lawrie, 2002). Gag module la traduction de l'ARNm non épissé en se liant au signal d'encapsidation dans la région 5'UTR pour favoriser l'encapsidation aux dépens de la traduction (Anderson & Lever, 2006).

1.2.5.8 Assemblage

La protéine Pr55Gag se dirige vers la membrane plasmique après sa synthèse dans le cytosol. Pr55Gag possède un domaine NC contenant une structure en doigt de zinc et

cette structure se lie au signal d'encapsidation présent dans la région 5'UTR de l'ARN viral. Pr55Gag agit comme chaperonne d'acide nucléique, elle favorise l'empaquetage et l'incorporation dans le virion (Levin, Guo, Rouzina & Musier-Forsyth, 2005). La dimérisation de l'ARN est favorisée par le signal de dimérisation présent au niveau du 5'UTR et elle se produit dans le cytosol ou au niveau de la membrane plasmique (Moore et al., 2009). La région 5'UTR de l'ARN génomique contient également un site de liaison d'amorce *primer binding site* (PBS) permettant la liaison avec une molécule tARN^{Lys} pour qu'elle soit intégrée dans le virion (Lu, Heng & Summers, 2011). Les particules de VIH-1 s'assemblent principalement au niveau de la paroi interne de la membrane plasmique, dans les zones enrichies en *phosphoinositide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PtdIns (4,5) P2) (Ono, Ablan, Lockett, Nagashima & Freed, 2004), en cholestérol et en sphingolipides appelés radeaux lipidiques (Hogue, Grover, Soheilian, Nagashima & Ono, 2011). PtdIns (4,5) P2 est un phospholipide contenant un groupement inositol chargé négativement, il interagit avec le domaine MA de Pr55Gag et favorise l'exposition du fragment lié à l'extrémité N de MA pour faciliter l'insertion dans la partie interne de la membrane plasmique (Saad et al., 2006).

Le complexe Gag-ARN s'assemble avec le précurseur GagPol pour former la particule virale naissante immature (Figure 1.9). La multimérisation de Gag est dirigée par son domaine CA qui entraîne un alignement des molécules de Gag et une compaction radiale (Alfadhli, Barklis & Barklis, 2009). Le domaine MA est lié à la paroi interne de la membrane plasmique, les protéines Gag sont assemblées dans les virions sous forme trimérique et elles forment des hexamères de trimères (Alfadhli et al., 2009). La structure en trimères de MA est importante pour l'incorporation de Env (Tedbury, Ablan & Freed, 2013). Les glycoprotéines Env possèdent de très longues queues cytoplasmiques, elles interagissent avec le domaine MA et elles sont incorporées dans le réseau Gag (Checkley, Luttge & Freed, 2011).

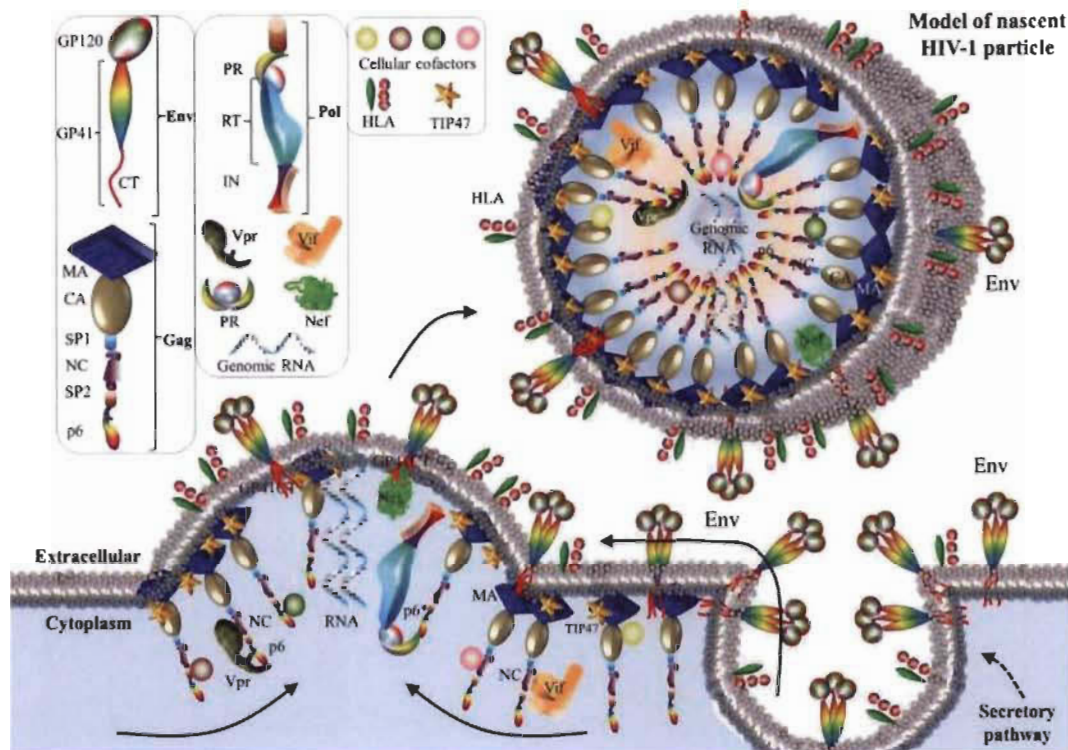


Figure 1.9 Modèle d'assemblage de la particule virale.

Les complexes Gag-ARN et GagPol ciblent les radeaux lipidiques pour former la particule virale naissante. Les protéines Env sont exportées à la membrane plasmique par la voie sécrétoire et elles interagissent avec le domaine MA des protéines Gag multimérisé en trimères (Li & De Clercq, 2016).

1.2.5.9 Libération

Après l'assemblage du virion immature au niveau de la membrane plasmique, la particule naissante doit subir une scission membranaire pour être libérée de la cellule. Le domaine p6 de Pr55Gag possède un motif PTAP hautement conservé qui interagit avec la protéine cellulaire *tumor susceptibility gene 101* (TSG101). TSG101 fait partie du complexe *Endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT), ESCRT est l'acteur principal d'une variété de processus de bourgeonnement et de scission de la membrane cellulaire (VerPlank et al., 2001). Le domaine p6 de Pr55Gag possède également un motif de liaison YPXL qui interagit avec la protéine *programmed cell death 6-interacting protein* (PDCD6IP) nécessaire à la libération du virus (Fujii et al., 2009). L'ubiquitination associée avec le domaine p6 favorise le recrutement du complexe

ESCRT-III (Sette, Nagashima, Piper & Bouamr, 2013), ESCRT-III recrute VSPS4 pour fournir de l'énergie nécessaire à la scission de la membrane et au recyclage des composants du complexe ESCRT (Bleck et al., 2014). ESCRT-III s'assemble en réseaux circulaires pour resserrer la membrane au niveau du col du bourgeon et entraîner la scission (Hanson, Roth, Lin & Heuser, 2008).

1.2.5.10 Maturation

Après la libération, le virion immature est non infectieux et il nécessite l'activité protéolytique de la protéase virale pour le rendre infectieux. Lors de la libération du virus, la protéase clive plusieurs sites dans les polyprotéines Pr55Gag et GagPol pour déclencher la maturation du virus (Kaplan et al., 1993; Pettit et al., 1994). La maturation du virion s'accompagne d'un changement majeur dans sa morphologie, dans la particule immature les protéines Gag sont assemblées de manière radiale et après le clivage, les domaines CA de Gag se rassemblent pour former un assemblage conique (Frank et al., 2015).

1.3 Relation virus-hôte

1.3.1 Physiopathologie de l'infection

Le VIH-1 est transmissible par le sang lors d'une transfusion sanguine, d'une greffe d'organes ou lors de l'utilisation d'aiguilles/seringues contaminées. La transmission d'une mère infectée à son fœtus (maternofoetale) est également possible par la voie transplacentaire pendant la grossesse et par la voie périnatale au moment de la naissance. L'infection par le VIH-1 est transmissible sexuellement, il peut être transmis par le sperme et les sécrétions vaginales qui sont des contaminants par l'intermédiaire de cellules infectées. Les lymphocytes T (LT) CD4 (Zhang et al., 1999) et les macrophages (Shen et al., 2009) des muqueuses génitales sont les principales cellules infectées lors de la primo-infection (Figure 1.10). Les cellules dendritiques des muqueuses génitales peuvent être infectées par l'intermédiaire d'une lectine appelée langerin (Hladik et al., 2007) et elles transportent le virus aux organes lymphoïdes. Le VIH-1 entraîne une déplétion

lymphocytaire due à l'effet cytolytique du virus, à l'effet cytolytique des LT CD8 sur les cellules CD4 recouvertes de gp120 et à l'apoptose. Le VIH-1 infecte les monocytes/macrophages par l'intermédiaire du récepteur CD4 et de façon indirecte par l'intermédiaire des immunoglobulines anti-VIH-1 fixées aux protéines virales (Takeda, Tuazon, & Ennis, 1988). Parallèlement à l'infection lytique, le virus infecte de manière latente des LT CD4 et des macrophages tissulaires formant des réservoirs cellulaires de virus, ce qui entraîne la progression de la maladie (Crowe, Zhu & Muller, 2003). Ainsi, lors de la primo-infection la charge virale est élevée, elle diminue en réponse à la réaction immunitaire de type cytotoxique et s'installe une période de latence clinique (Shaw & Hunter, 2012).

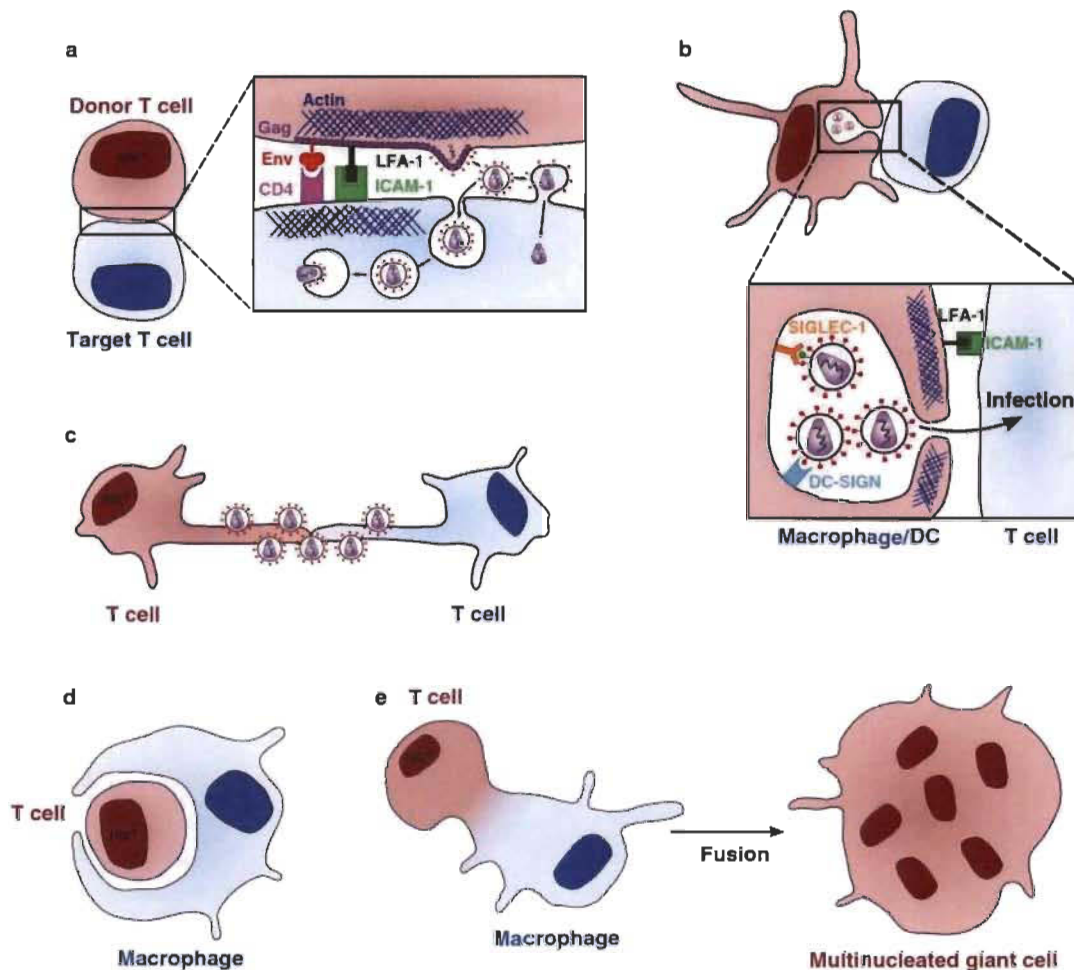


Figure 1.10 Mécanisme de transmission d'une cellule à une autre.

En a, un LT infecté entre en contact avec un LT non infecté et le virus se transmet par fusion directe au niveau de la membrane plasmique ou après

une endocytose. En b, un macrophage ou une cellule dendritique emmagasine la particule virale dans un compartiment interne en réaction à la liaison avec le récepteur DC-SIGN ou SIGLEC-1 et le phagocyte peut infecter un LT CD4. En c, le VIH-1 se transmet par les nanotubes entre un LT infecté et un LT non infecté. En d, un macrophage est infecté après la phagocytose d'un LT CD4 infecté. En e, un LT CD4 fusionne avec un macrophage et ils fusionnent avec d'autres macrophages pour former une cellule géante multinucléée (Dufloo, Bruel & Schwartz, 2018).

1.3.2 Résistance innée et naturelle

L'humain vit dans un environnement contenant une pléthore de microbes pathogènes et non pathogènes, de virus, de substances toxiques et d'allergènes qui défient chaque jour le système immunitaire. Parmi ces pathogènes, certains sont nuisibles et ils doivent être éliminés tandis que d'autres sont bénéfiques pour l'homme, ils doivent être tolérés et contrôlés pour assurer une fonction normale des tissus et des organes. Les agents pathogènes de l'environnement se heurtent à la première ligne de défense, la barrière anatomique. Les composantes de la barrière anatomique incluent la peau intacte/muqueuse et les barrières physiologiques sont le pH, la température et les médiateurs chimiques comme les lysozymes contenus dans les larmes. La protection offerte par les barrières anatomiques et physiologiques est améliorée par l'immunité innée.

L'immunité innée est responsable de la protection initiale contre les infections. Elle est constituée de mécanismes existants avant l'infection, capables de réponses rapides et réagissant de façon identique. En effet, le système immunitaire inné est composé d'un répertoire limité de récepteurs invariants, les *pattern-recognition receptors* (PRR). Les PRR sont classés en cinq familles, les récepteurs *Toll-like receptors* (TLR), *C-type lectin receptors* (CLR), *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat – containing receptors* (NLR), *RIG-I-like receptors* (RLR) et *AIM2-like receptors* (ALR) (Kumar, Kawai & Akira, 2011). Les PRR sont séparés en deux classes, les récepteurs liés à la membrane et les récepteurs intracellulaires non liés (Brubaker, Bonham, Zanoni & Kagan, 2015). Les TLR et les CLR sont liés à la membrane, ils interagissent avec des ligands extracellulaires et dans les endosomes. Les NLR, RLR et ALR sont situés dans le cytoplasme et ils interagissent avec des ligands intracellulaires. Les PRR ciblent les

composantes conservées et partagées par de grands groupes de molécules/pathogène indésirables les *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) (Kawai & Akira, 2010). Lorsqu'ils détectent des PAMP, les PRR induisent la transcription de diverses cytokines telles que l'interféron (Figure 1.11) (Kumar et al., 2011).

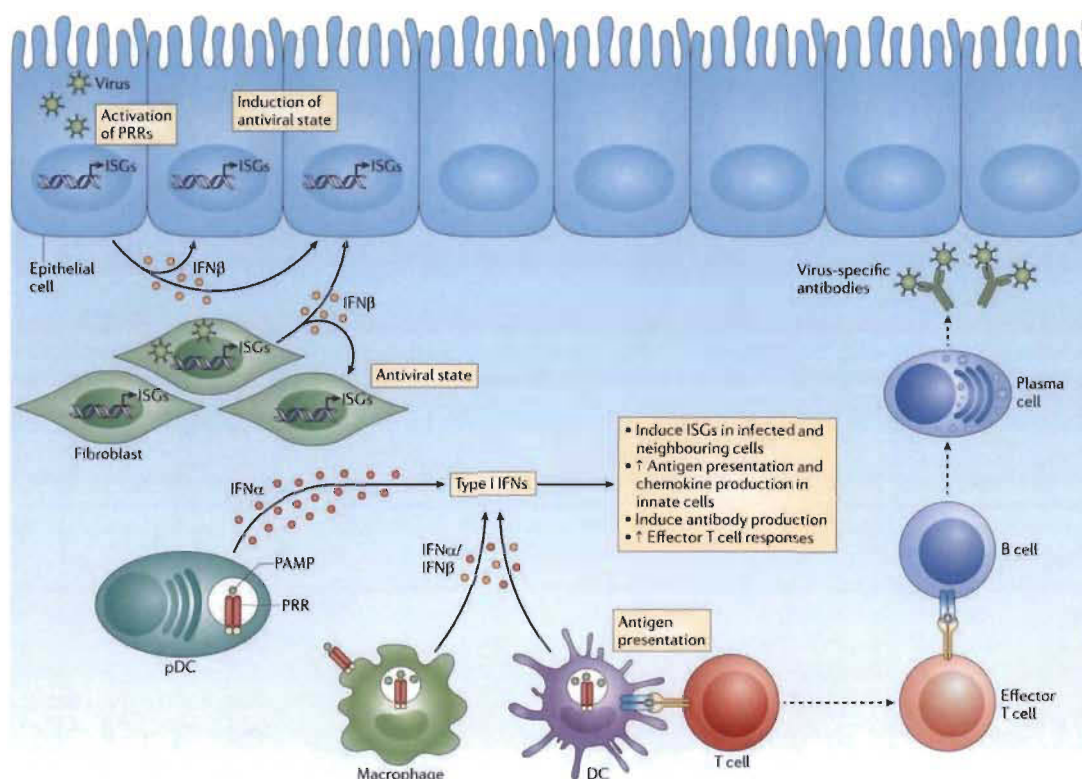


Figure 1.11 Interaction entre l'IFN-I, l'immunité innée et adaptative.

Lors de la détection du PAMP par un PRR, la cellule infectée produit de l'IFN-I. Les fibroblastes et les cellules épithéliales sont des cellules non immunitaires et elles produisent principalement de l'IFN β . Les macrophages et les cellules dendritiques font partie des cellules immunitaires innées et elles produisent principalement de l'IFN α et de l'IFN β . Dans les cellules infectées et dans les cellules voisines l'IFN-I induit un état antiviral par la production d'ISG. L'IFN-I agit également sur les cellules immunitaires innées en améliorant la présentation de l'antigène, en induisant l'expression des ISG et en induisant la production de diverses cytokines et chimiokines. L'IFN-I agit également sur la réponse immunitaire adaptative en augmentant la production d'anticorps par les LB et en amplifiant la fonction effectrice de LT (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Les cytokines sont de petites protéines sécrétées, agissant comme médiateurs des réactions immunitaires et inflammatoires. Les interférons (IFN) sont une classe de

cytokines produites lors d'une infection virale. Les IFN sont divisés en trois classes, l'IFN-I, l'IFN-II et l'IFN-III (Vilcek, 2006). Tous les IFN partagent la capacité commune d'avoir une activité antivirale (Vilcek, 2006). L'IFN-III est aussi appelé IFN λ , c'est la classe la moins bien connue, la distribution est limitée et l'IFN λ agit principalement sur les surfaces épithéliales (Iversen & Paludan, 2010; Lazear, Nice & Diamond, 2015). L'IFN-II est aussi appelé IFN γ , il produit son effet antiviral en agissant sur les cellules NK et les cellules T actives (Takaoka et al., 2000). Les IFN-I sont principalement exprimés par les cellules immunitaires innées (Hervas-Stubbs et al., 2011). L'IFN-I est divisé en plusieurs sous-classes, l'IFN α et l'IFN β sont les mieux caractérisés et les plus largement exprimés (Hervas-Stubbs et al., 2011). L'IFN β est codé par un seul gène alors que l'IFN α est codé par 14 gènes produisant des isoformes distincts (Hervas-Stubbs et al., 2011). Les IFN-I ont trois principales fonctions antivirales (Figure 1.11) (Ivashkiv & Donlin, 2014). Ils limitent la propagation en induisant un état antiviral aux cellules infectées et aux cellules voisines. Ils modulent les réponses immunitaires innées, ils favorisent la présentation de l'antigène, ils favorisent les fonctions des cellules *natural killer* (NK), ils diminuent les voies pro-inflammatoires et la production de certaines cytokines. Ils activent le système immunitaire adaptatif en augmentant la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB) et en amplifiant la réponse des LT effecteurs.

La reconnaissance du PAMP par les PRR initie également des réponses non transcriptionnelles telles que l'induction de la phagocytose (Moretti & Blander, 2014). De nombreuses cellules sont impliquées dans la réponse immunitaire innée incluant principalement les monocytes qui se différencient en macrophages et les neutrophiles. Les monocytes/macrophages et les neutrophiles sont des phagocytes, ils partagent la fonction de phagocytose des microbes indésirables suivis de leur destruction par de multiples voies biochimiques. Le contact du PAMP microbien avec le TLR d'un leucocyte phagocytaire enclenche la phagocytose (Kawai & Akira, 2010). Une fois le microbe ingéré, les macrophages présentent à leurs surfaces certains morceaux du microbe et ils remplissent le rôle de présenter l'antigène aux cellules T de l'immunité adaptative. L'immunité innée joue un rôle central dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative ultérieure.

1.3.3 Immunité adaptative

Les lymphocytes sont les principales cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative. Pour ne pas attaquer les cellules corporelles saines de l'hôte, les lymphocytes doivent savoir distinguer le soi du non-soi. Pour ce faire, deux éléments doivent être présents simultanément pour les activer, un antigène étranger (non-soi) et il doit être présenté sur une structure du soi appelé le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Huston, 1997). L'immunité adaptative est divisée en deux volets, l'immunité adaptative cellulaire et l'immunité adaptative humorale. Les lymphocytes T sont les principaux acteurs de l'immunité adaptative cellulaire. Ils sont classifiés principalement en deux sous-groupes selon une protéine à leur surface. En fonction de cette protéine, ils sont nommés soit CD4, soit CD8 et possèdent des fonctions distinctes (Chaplin, 2010). Les LT CD4, aussi appelés helpers ou auxiliaires, aident les phagocytes à détruire les pathogènes phagocytés et ils aident les LB à produire des anticorps (Chaplin, 2010). Les lymphocytes CD8 aussi appelés cytotoxiques ont la fonction de détruire les cellules infectées ainsi que les cellules anormales ou cancéreuses.

Le volet humoral de l'immunité adaptative est assuré principalement par les LB, lorsqu'ils se sont différenciés en plasmocytes et produisent des anticorps. Chaque LB produit une seule classe d'anticorps et reconnaît un seul antigène précis (Huston, 1997). Les anticorps s'attachent à l'antigène complémentaire, ils agissent en contrecarrant son action, perturbant le processus infectieux et ils ont aussi le rôle d'opsonine consistant à favoriser la phagocytose (Chaplin, 2010). Les anticorps ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules, l'immunité humorale agit donc sur les molécules extracellulaires et peuvent recouvrir un virus. Un lymphocyte est considéré comme naïf lorsqu'il n'a pas rencontré d'antigène et il prend le terme de cellule effectrice après en avoir rencontré un (Chaplin, 2010). Il prolifère après le contact en se multipliant en de multiples copies de lui-même, porteuse et sécrétrices d'anticorps similaire (Chaplin, 2010). Chaque LB produit un seul type d'anticorps spécifique, il produit des anticorps considérés comme monoclonaux. Un pathogène possède généralement plusieurs antigènes différents stimulant la prolifération de plusieurs lymphocytes porteurs d'anticorps différents et on

obtient un mélange d'anticorps considéré comme polyclonal. Un faible pourcentage de LB deviendra des cellules B mémoires, les cellules mémoires acquièrent la possibilité de vivre longtemps et elles ont la capacité de se souvenir d'avoir déjà rencontré un antigène spécifique (Tangye & Tarlinton, 2009). La fabrication de cellules mémoires fait en sorte que le système immunitaire réagira plus rapidement et plus fortement lors d'une exposition subséquente à ce même antigène (Tangye & Tarlinton, 2009). C'est le principe qui sert de base à la vaccination.

1.3.4 Les facteurs de restriction

Les facteurs de restrictions sont codés par les *interferon stimulated gene* (ISG) et la production des ISG est stimulée par l'IFN-I. Ce sont des protéines cellulaires effectrices de l'immunité innée, elles fonctionnent de manière autonome pour inhiber la réplication des rétrovirus (Merindol & Berthoux, 2015). Les facteurs de restriction agissent à différents stades de réplication du VIH-1 (Figure 1.12), de manière spécifique au type de cellule, à l'espèce et à la souche virale (Merindol & Berthoux, 2015). Pour qu'un rétrovirus parvienne à briser la barrière interespèce, il doit s'être adapté à cette nouvelle espèce en acquérant des mécanismes de résistance contre les facteurs de restriction présents chez cette espèce.

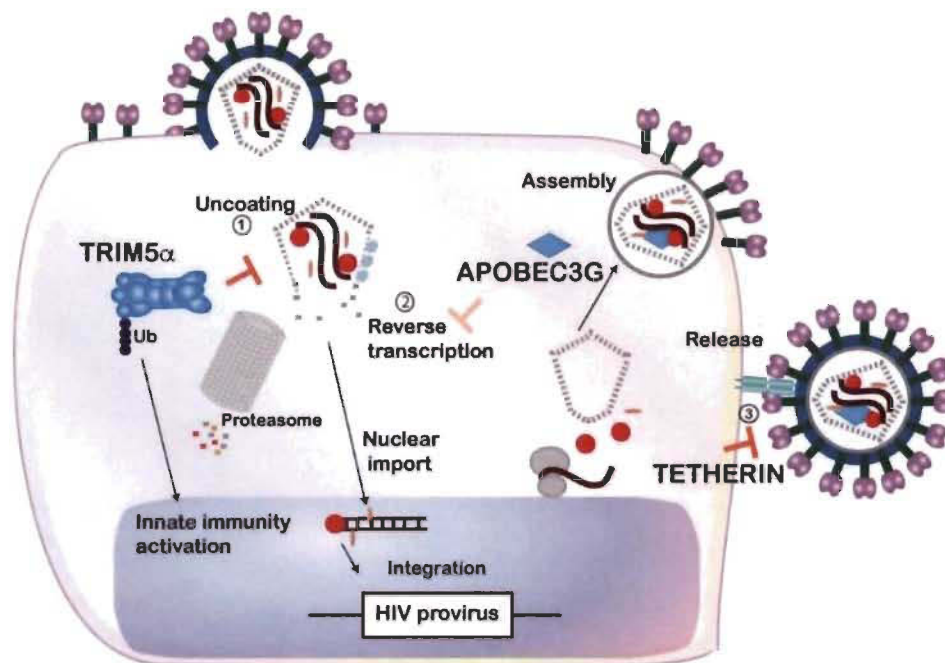


Figure 1.12 Les facteurs de restriction.

Les facteurs de restriction agissent à différents stades de réplication du VIH-1. TRIM5 α lie les protéines de la capsid virale immédiatement après l'entrée dans la cellule et perturbe le processus de décapsidation. APOBEC3G provoque une hypermutation génomique du VIH-1. La tétérine empêche la libération des virions. (Adaptée de Merindol et al., 2018.)

1.3.4.1 TRIM5 α

Tripartite motif containing protein5 isoform α (TRIM5 α) est une protéine cytoplasmique, elle fait partie de la famille de protéine TRIM et elle est codée par l'ISG *TRIM5* (Carthagna et al., 2008). TRIM5 α possède un motif tripartite composé des domaines RING, B-box et Coiled-coil (Figure 1.13a) (Rajsbaum, García-Sastre & Versteeg, 2014). Le motif TRIM est suivi d'un domaine C-terminal appelé B30.2/SPRY (Ozato, Shin, Chang & Morse, 2008). Chacun des domaines possède des fonctions distinctes dans la restriction antivirale.

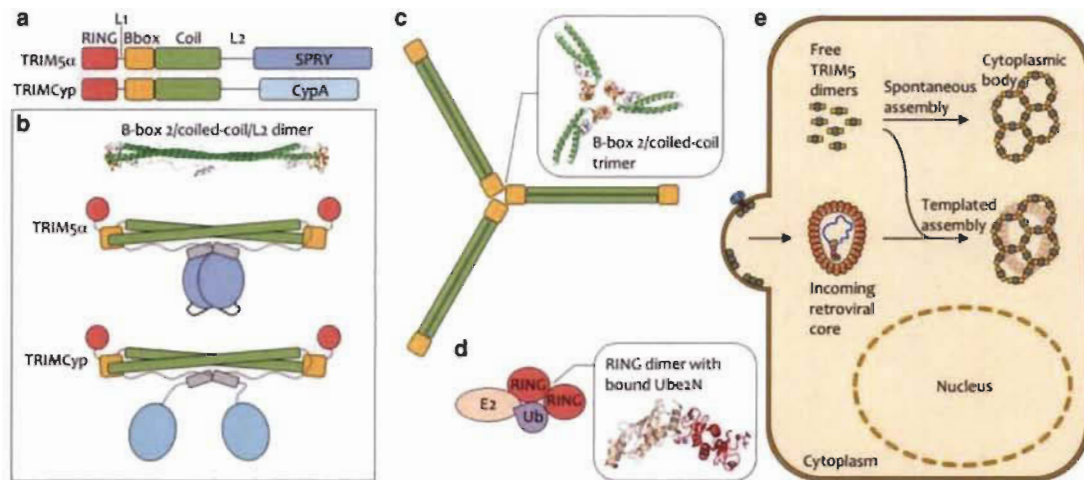


Figure 1.13 Propriétés structurales et fonctionnelles de TRIM5 α .

En a, TRIM5 α et TRIMCyp partagent le motif TRIM composé du domaine RING, B-box et coiled-coil. Le domaine RING est à l'extrémité N terminale, il est lié au domaine B-box par le connecteur L1. Le domaine coiled-coil est lié au domaine SPRY pour TRIM5 et au domaine CypA pour TRIMCyp. En b, TRIM5 α sous forme de dimères présente deux domaines Coiled-coil associés de façon antiparallèle, ils forment une tige allongée se terminant par un domaine B-box à chaque extrémité. Les domaines RING sont situés sur une face et les domaines SPRY sont situés sur la face opposée. En c, les domaines B-box forment des trimères et ils connectent 3 dimères de TRIM5 α . En d, le domaine RING dimérisé permet la liaison à l'enzyme de conjugaison E2 et il catalyse l'ubiquitination. En e, TRIM5 α peut se multimériser spontanément pour former des corps cytoplasmiques ou se multimériser sur la capsid virale (Ganser-Pornillos & Pornillos, 2019).

Le domaine RING se trouve à l'extrémité N-terminale de TRIM5 α , il possède la fonction d'ubiquitine ligase et il restreint le virus en dirigeant certains composants viraux ainsi que TRIM5 α vers la dégradation protéasomale (Rold & Aiken, 2008). De plus, les chaînes d'ubiquitine liées à K63 formées dans le domaine RING activent les voies immunitaires innées médiées par NF-KB, AP-1 et IFN-I (Pertel et al., 2011). La suppression du domaine RING ne supprime pas totalement l'activité antivirale, mais elle la diminue partiellement (Javanbakht, Diaz-Griffero, Stremlau, Si & Sodroski, 2005). Le domaine RING est relié au domaine B-box par un court domaine de liaison appelé L1. Le domaine B-box permet la dimérisation de façon indépendante via son interface qui peut former à la fois des dimères et des trimères (Diaz-Griffero et al., 2009; Wagner et al., 2016). Le domaine B-box améliore la liaison de TRIM5 α à la capsid (Li & Sodroski,

2008). Le domaine B-box est lié au domaine Coiled-coil, leur oligomérisation forme des oligomères d'ordre supérieur et des corps cytoplasmiques (Li & Sodroski, 2008). Certaines mutations dans le domaine B-box empêchent la multimérisation et perturbent la fonction de restriction (Li & Sodroski, 2008). Le domaine Coiled-coil est responsable de la dimérisation de TRIM5 α (Maillard, Ecco, Ortiz & Trono, 2010; Zhao et al., 2011). Le domaine de liaison L2 relie le domaine Coiled-coil au domaine SPRY. Le domaine de liaison L2 se replie le long du domaine Coiled-coil et positionne le domaine SPRY près du milieu du dimère.

Le domaine variable SPRY est situé à l'extrémité C terminale de TRIM5 α . Il est responsable de la spécificité envers le virus (Stremlau, Perron, Welikala & Sodroski, 2005). Lorsque le domaine SPRY est interchangé avec un orthologue, la spécificité de la restriction change elle aussi (Sawyer, Wu, Emerman & Malik, 2005). Certaines espèces de singe possèdent un domaine CypA à l'extrémité C-terminale. Le domaine CypA est le produit d'un événement de rétrotransposition par l'intermédiaire LINE1 d'un ADNc de CypA dans le gène TRIM5 (Sayah, Sokolskaja, Berthoux & Luban, 2004). CypA est une protéine cellulaire capable de liaison avec la capsid du VIH-1 (voir la sous-sous-section 1.2.5.3 Décapsidation). Par conséquent, la protéine TRIMCyp chez le singe-hibou peut lier la capsid virale et restreindre le VIH-1 (Sayah et al., 2004). La capacité de détection de la capsid du VIH-1 par l'orthologue humain de TRIM5 α est très faible, mais de nombreux orthologues primates de TRIM5 α , notamment celui du macaque rhésus (rhTRIM5 α), peuvent restreindre le VIH-1 (Sawyer et al., 2005; Song et al., 2005).

La protéine TRIM5 α ne se lie pas à une protéine de la capsid isolée, les protéines de la capsid doivent être assemblées en hexamère (Stremlau et al., 2006). Lors de l'interaction avec la capsid virale, TRIM5 α s'oligomérisent en hexamère pour former un réseau hexamérique (Yang et al., 2012). L'assemblage d'ordre supérieur génère un puissant effet d'avidité due à la symétrie entre le réseau hexamérique de TRIM5 α et le réseau hexamérique de la capsid (Ganser-Pornillos et al., 2011; Li et al., 2016; Yang et al., 2012). Chaque bord de l'hexagone correspond à un dimère de TRIM5 α et chaque

sommet correspond à un trimère de domaine B-box (Li et al., 2016). Les domaines RING sont situés sur une face de ce réseau et les domaines SPRY sont situés sur la face opposée permettant la liaison simultanée de plusieurs sites sur la surface de la capsid (Figure 1.13b) (Ganser-Pornillos & Pornillos, 2019). Le domaine SPRY contient quatre boucles variables orientées vers le même côté (Yang et al., 2012). Les boucles variables peuvent agir indépendamment ou en collaboration pour lier les protéines de la capsid (Yang et al., 2012). La boucle V1 est flexible et elle contient les principaux déterminants de la spécificité de liaison de la capsid (Stremlau et al., 2005; Yang et al., 2012). La structure flexible de la boucle V1 permet des assemblages de conformations transitoires pouvant lier différentes cibles telles que la capsid du VIH-1 et de N-MLV (Kovalskyy & Ivanov, 2014).

TRIM5 α est considérée comme une composante du système immunitaire inné, elle agit comme un récepteur PRR cytoplasmique et elle détecte la capsid rétrovirale comme un PAMP (voir la sous-section 1.3.2 Résistance innée et naturelle). Après l'entrée dans la cellule, la capsid rétrovirale est libérée dans le cytoplasme, c'est à ce moment que TRIM5 α peut entrer en contact avec la surface de la capsid et se lier au réseau de protéines de la capsid (Ambrose & Aiken, 2014; Yamashita & Engelman, 2017). Les mutations dans la capsid formant des assemblages hyperstables présentent un grave défaut dans la transcription inverse (voir la sous-sous-section 1.2.5.3 Décapsidation), la stabilité de l'assemblage protéique de la capsid est directement liée avec le processus de transcription inverse. TRIM5 α se lie à la capsid pour former un complexe stable et induire une rigidification globale de l'assemblage protéique de la capsid (Quinn et al., 2018).

Pour assurer la fonction d'ubiquitine ligase, le domaine RING interagit avec une protéine de conjugaison E2 chargée d'ubiquitine (Yudina et al., 2015). Pour que cette interaction soit possible, le domaine RING doit être sous la forme dimérique (Yudina et al., 2015). La conformation de TRIM5 α sous forme de dimères présente deux domaines Coiled-coil associés de façon antiparallèle, ils forment une tige allongée se terminant par un domaine B-box à chaque extrémité (Figure 1.13b) (Goldstone et al., 2014). L1 n'a pas

une portée suffisante pour permettre la dimérisation de deux domaines RING présents à chaque extrémité (Goldstone et al., 2014). En présence de la capside, la formation du réseau hexagonal de TRIM5 α génère des trimères de domaine B-box et regroupe trois domaines RING (Figure 1.13c) (Fletcher et al., 2018). Le regroupement des domaines RING permet à l'enzyme E2 Ubc13 d'attacher des chaînes de polyubiquitine liées par K63 à la monoubiquitine (Fletcher et al., 2018). Les chaînes de polyubiquitine liées à K63 activent les voies AP1 et NF- κ B pour produire de l'IFN (Fletcher et al., 2018).

La dimérisation de TRIM5 dépendante du domaine B-box recrute l'enzyme de conjugaison E2 Ube2W et E2 Ube2W attache sélectivement une ubiquitine dans le domaine RING à l'extrémité N-terminale TRIM5 α (Fletcher et al., 2015). L'auto-ubiquitination de TRIM5 α permet également le recrutement du protéasome (Lukic et al., 2011). Le protéasome induit un désassemblage prématuré (Figure 1.14) (Sastri & Campbell, 2011) et il diminue les produits de rétrotranscription (Roa et al., 2012; Stremlau et al., 2006). TRIM5 α peut également provoquer la dégradation du virus en se liant et en activant les principaux effecteurs de l'autophagie (Figure 1.14) (Mandell et al., 2014). De plus, les particules virales peuvent être séquestrées à l'intérieur des corps cytoplasmiques (Campbell, Perez, Anderson & Hope, 2008).

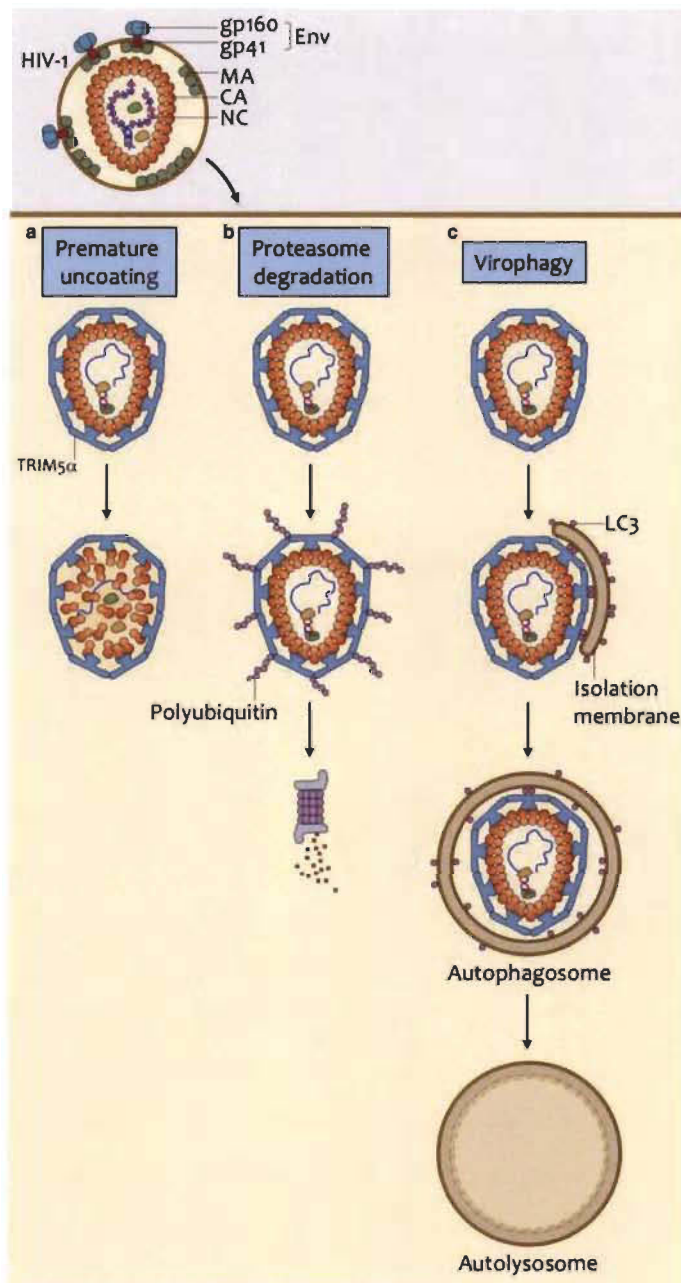


Figure 1.14 Mécanismes de la restriction induite par TRIM5 α .

En a, TRIM5 α se lie à la capside, elle se multimérise en réseau hexamérique de TRIM5 α formant un filet autour de la capside et induisant une décapsidation prématurée. En b, la multimérisation en réseau hexamérique de TRIM5 α permet l'ubiquitination du domaine RING. L'ubiquitination du domaine RING induit le recrutement du protéasome et conduit à la dégradation des composants viraux ainsi que TRIM5 α . En c, TRIM5 α provoque la dégradation du virus par un mécanisme appelé virophagie. TRIM5 α lié au virus peut lier et activer les principaux effecteurs de l'autophagie pour diriger le virus vers la dégradation lysosomale (Ganser-Pornillos & Pornillos, 2019).

1.3.4.2 La tétherine

La tétherine est une protéine transmembranaire, elle possède un domaine N-terminal, un domaine transmembranaire, un ectodomaine et un *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) (Kupzig et al., 2003). Les protéines tétherines forment des oligomères, elles sont situées à l'intérieur des radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique et dans le réseau trans-Golgi (Kupzig et al., 2003). La tétherine empêche la libération des particules virales en infiltrant l'enveloppe virale avec son domaine d'ancrage GPI tandis que l'autre domaine d'ancrage reste lié à la membrane plasmique attachant les particules du VIH-1 à la membrane cellulaire (Neil, Zang & Bieniasz, 2008; Van Damme et al., 2008). Les particules attachées à la membrane plasmique peuvent ensuite subir une endocytose et être dégradées (Neil et al., 2008; Van Damme et al., 2008). La spécificité de la tétherine est faible, car sa cible est la bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte (Jouvenet et al., 2009). Cependant, son effet antiviral est antagonisé par la protéine spécialisée Vpu, une protéine transmembranaire du VIH-1 qui interagit directement avec la tétherine au niveau du réseau trans-Golgi et qui favorise sa dégradation protéasomale ou lysosomale (Dubé et al., 2009).

1.3.4.3 APOBEC3G

Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) est une cytidine désaminase polynucléotidique qui cible l'ADN rétroviral nouvellement synthétisé, provoque la désamination de la base cytosine, la convertit en uridine (U) et entraîne un phénotype d'hypermutation (Harris et al., 2003). Le VIH-1 a développé une stratégie pour contrer APOBEC3G par l'intermédiaire de la protéine virale spécialisée Vif. La protéine spécialisée Vif favorise la dégradation d'APOBEC3G et l'empêche donc de pouvoir exercer son effet antiviral (Mariani et al., 2003; Stopak, de Noronha, Yonemoto & Greene, 2003).

1.3.5 Traitements

Les médicaments antirétroviraux ciblent plusieurs étapes du cycle de réplication (Figure 1.15). Ces médicaments sont répartis en six classes distinctes en fonction de leur mécanisme moléculaire et selon la phase du cycle viral qu'ils inhibent (Kemnic & Gulick, 2021). Ces classes sont composées des inhibiteurs nucléosidiques de la RT (INTI), des inhibiteurs non-nucléosidique de la RT (INNTI), des inhibiteurs de l'intégrase, des inhibiteurs de protéase (IP), des inhibiteurs de fusion et des antagonistes des corécepteurs (Kemnic & Gulick, 2021). Le traitement initial anti-VIH comprend typiquement une combinaison de trois médicaments d'un minimum de deux classes. Les combinaisons les plus fréquentes incluent deux INTI et un INNTI, un IP ou un inhibiteur de l'intégrase. Les INTI ont été la première classe de médicament anti-VIH approuvé par la FDA (Young, 1988). Les INTI sont incorporés dans la chaîne d'ADN par la RT et bloquent l'élongation pendant la synthèse (Balzarini, Herdewijn & De Clercq, 1989). Les INNTI agissent directement sur la RT. La liaison d'un INNTI à la RT induit un changement de conformation dans le site de liaison au substrat (Kohlstaedt, Wang, Friedman, Rice & Steitz, 1992). Les IP agissent en se fixant au site actif de la protéase et ils perturbent l'activité catalytique de l'enzyme (Miller, 2001). Les inhibiteurs de l'intégrase ciblent la réaction de transfert de brin catalysé par l'intégrase. Ils agissent en se liant au complexe spécifique entre l'intégrase et l'ADN viral, ils interagissent avec deux cofacteurs essentiels dans le site actif de l'intégrase et avec l'ADN (Espeseth et al., 2000; McColl & Chen, 2010). La chimiothérapie anti-VIH-1 n'élimine pas complètement le VIH-1, l'objectif est de freiner la transmission, de réduire la charge virale et de maintenir cette réduction le plus longtemps possible (Kemnic & Gulick, 2021). Lorsqu'un patient cesse de prendre son traitement, l'effet rebond est observable en raison de la persistance du réservoir viral formé par les cellules latentes (Cohn, Chomont & Deeks, 2020). Le provirus silencieux et latent parvient à contourner la surveillance du système immunitaire, mais les nouveaux virus générés par l'activation du provirus sont réprimés par la thérapie.

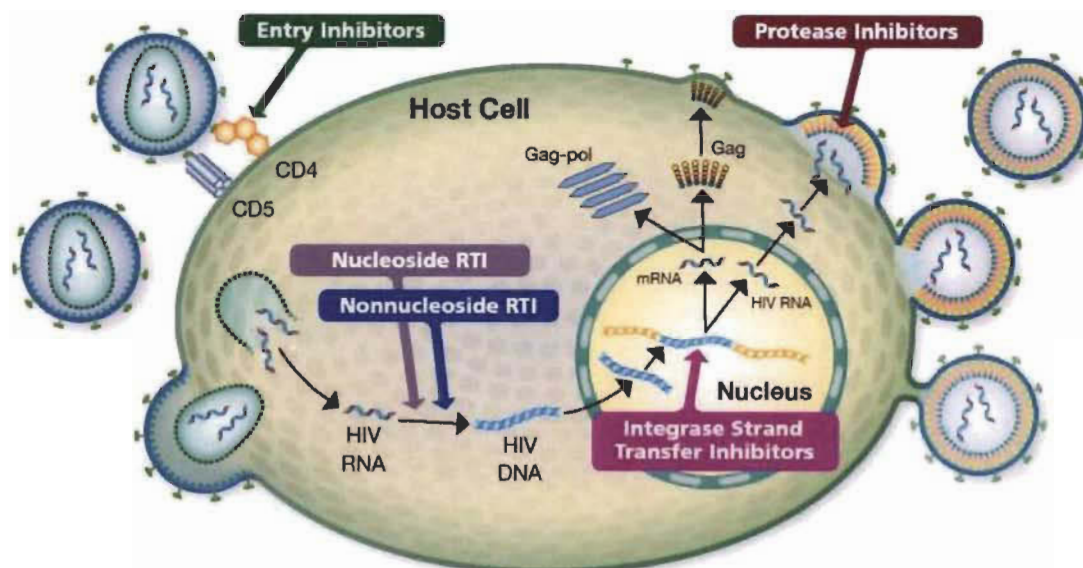


Figure 1.15 Chimiothérapie antirétrovirale.

Les médicaments antirétroviraux ciblent plusieurs étapes du cycle de réplication. Les inhibiteurs de l'entrée ciblent le récepteur cellulaire CD4. Deux types de molécules perturbent le processus de transcription inverse, les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non nucléosidiques. Les IP se lient au site actif de la protéase pour l'inactiver. Les inhibiteurs de l'intégrase ciblent la réaction de transfert de brin catalysé par l'intégrase (Saag, 2019).

1.3.6 Thérapie génique

La définition de la thérapie génique a évolué de pair avec l'accroissement de la connaissance des technologies de manipulation de l'ADN. Au départ, on la voyait comme une technologie de l'ADN recombinant dans laquelle un ADN exogène dépourvu de mutation indésirable était utilisé pour remplacer l'ADN génomique ayant des mutations délétères (Friedmann & Roblin, 1972). De nos jours, nous la définissons comme la capacité d'amélioration du patrimoine génétique par la correction de gène muté ou par la modification spécifique à un site visant à procurer un traitement thérapeutique (Gonçalves & Paiva, 2017). Initialement, la thérapie génique visait à introduire des transgènes thérapeutiques avec des vecteurs viraux. L'édition génomique est une thérapie génique visant à corriger directement les aberrations génétiques existantes. La *recombinaison homologue* (HR) entre un ADN introduit contenant des séquences homologues et la cible chromosomique peut se produire naturellement, mais le phénomène est très rare

(Capecchi, 1989). Cependant, une coupure double brin *double strand break* (DSB) dans le locus cible permet d'augmenter jusqu'à 1000 fois ou plus le taux de recombinaison induit par HR (Bibikova et al., 2001; Elliott, Richardson, Winderbaum, Nickoloff & Jasin, 1998). Les DSB peuvent survenir spontanément et elles peuvent être induites par des dommages à l'ADN (Takata et al., 1998). Les DSB sont généralement réparées par une des deux voies de réparation, la *homology directed repair* (HDR) ou la voie de NHEJ (Figure 1.16a) (Hsu, Lander & Zhang, 2014; Takata et al., 1998). Ces deux voies diffèrent en fonction de leurs exigences de la présence d'une séquence homologue d'ADN. Indépendamment de la présence d'une séquence homologue, les DSB peuvent être réparés par la voie NHEJ et cette voie est caractérisée par l'introduction de mutations d'insertions ou de délétion (indel) (Bibikova, Golic, Golic & Carroll, 2002). Les hétérodimères Ku se lient aux extrémités des DSB et servent de protéine de liaison à l'ADN pour les protéines de la NHEJ tel que DNA-PK, XRCC4 et l'ADN ligase IV (Hsu et al., 2014; Takata et al., 1998). Les indels sont introduits quand le brin complémentaire subit une résection à son extrémité et en conséquence d'un mauvais alignement lors de la réparation en raison de la micro-homologie (Hsu et al., 2014). Souvent les indels conduisent à des mutations de décalage de cadre et à un *knockout* (KO) de gène (Hsu et al., 2014). La réparation par HDR nécessite la présence d'une séquence homologue ailleurs dans le génome ou provenant d'un ADN exogène (Takata et al., 1998). Les protéines Rad51 peuvent se lier aux extrémités des DSB et elles recrutent les protéines qui dirigent la HDR (Hsu et al., 2014). Dans l'optique de développer des nucléases avec une spécificité de reconnaissance, des nucléases chimériques ont été créées.

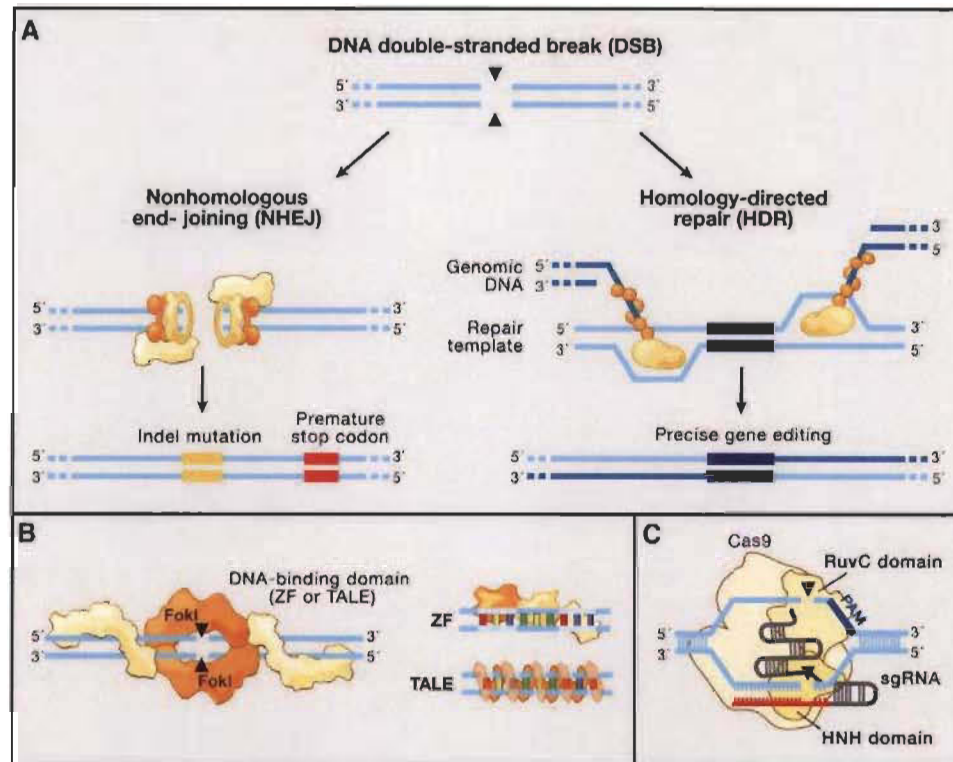


Figure 1.16 Édition génomique dépendante de DSB.

En a, les DSB sont généralement réparées par une des deux voies de réparation de l'ADN, la HDR ou la NHEJ. Lors de la réparation par la voie de NHEJ, les hétérodimères Ku se lient aux extrémités des DSB et ils servent de protéines de liaison à l'ADN pour les protéines de la NHEJ. Cependant la voie de NHEJ est sujette aux erreurs, des indels peuvent être introduits au site de réparation. Souvent les indels conduisent à des mutations de décalage de cadre et à un codon stop prématuré. Lors de la réparation par la voie de HDR, les protéines Rad51 peuvent se lier aux extrémités DSB et recruter les protéines qui dirigent la HDR. En b, les protéines ZF et TALE peuvent lier l'ADN et lorsqu'elles sont fusionnées à l'endonucléase FokI, elles peuvent générer des DSB à un site spécifique programmable. En c, la nucléase Cas9 peut se lier à des séquences d'ADN spécifiques définies par la séquence de l'ARN guide (gARN). La liaison du PAM en aval du locus cible aide à diriger le DSB (Hsu et al., 2014).

1.3.6.1 La nucléase à doigts de zinc

La nucléase à doigts de zinc ou *Zinc finger nuclease* (ZFN) est une enzyme hybride contenant un domaine nucléase compétent provenant du domaine catalytique de l'endonucléase FokI et un domaine de liaison à l'ADN fait de trois doigts de zinc

(Figure 1.16b) (Chandrasegaran & Smith, 1999; Kim, Cha & Chandrasegaran, 1996). La reconnaissance de l'ADN par les doigts de zinc est modulable, chaque doigt entre en contact avec trois paires de bases consécutives et seulement quelques résidus permettent ce contact (Greisman & Pabo, 1997).

1.3.6.2 TALEN

Les principes posés par une décennie d'utilisation des ZFN ont pavé la route pour la création d'autres outils d'édition génomique. Les *transcription activator-like effector* (TALE) sont des protéines capables de lier l'ADN de façon spécifique (Boch et al., 2009). Les TALE possèdent des répétitions de 33 à 35 acides aminés hautement conservés liant chacune une seule paire de bases d'ADN et elles sont hautement spécifiques (Moscou & Bogdanove, 2009). Ces répétitions sont modulables et peuvent être liées entre elles pour créer des spécificités de liaison à l'ADN personnalisées (Miller et al., 2011). Comme pour les ZFN, les TALE ont été fusionnés au domaine catalytique de l'endonucléase FokI pour créer une enzyme hybride appelé TALE-*nuclease* (TALEN) capable de cliver l'ADN à un endroit spécifique (Figure 1.16b) (Miller et al., 2011).

1.3.6.3 CRISPR

Le système *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) associé à la nucléase CRISPR *associated protein 9* (Cas9) est une approche efficace pour la manipulation génétique. Cette méthode simple est issue du système de défense immunitaire chez les procaryotes (Brouns et al., 2008). La protéine Cas est une hélicase pouvant se lier à l'ARN transcrit à partir de répétitions palindromiques d'ADN et à l'ADN clivé apparié avec des espaceurs d'ARN (Barrangou & Marraffini, 2014). Dans la majorité des systèmes, l'ARN transcrit à partir de répétitions palindromiques d'ADN est appelé *transactivating* CRISPR RNA (tracrRNA) et l'ADN clivé apparié avec des espaceurs est appelé CRISPR RNA (crRNA) (Jinek et al., 2012). TracrRNA et crRNA sont liés ensemble en laboratoire pour former l'ARN guide (gRNA) et gRNA dirige Cas9 pour produire une DSB dans la région du *protospacer adjacent motif* (PAM) (Cong et al.,

2013). La protéine Cas9 possède deux domaines nucléase importants, le domaine RuvC et le domaine *histidine-asparagine-histidine* (HNH) (Figure 1.16c) (Nishimasu et al., 2014). Ces deux domaines sont essentiels pour le clivage des brins complémentaires et non complémentaires de l'ADN cible. La mutation D10A dans le domaine RuvC et la mutation H840A dans le domaine HNH de la Cas9 provenant du *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) permettent de convertir le système en un système produisant une coupure simple brin par *Cas9nickase* (Cas9n) (Jinek et al., 2012). De plus, une version de SpCas9 peut être inactive *deadCas9* (dCas9) lorsqu'elle possède les mutations D10A et H840A, cette version peut se lier à l'ARN guide et à l'ADN cible sans produire de clivage et réguler l'expression génique (Qi et al., 2013).

1.3.6.4 Cas9 et Cpf1

Plusieurs outils peuvent être utilisés pour délivrer le système CRISPR-Cas9 à l'intérieur de la cellule. La taille de SpCas9 est d'environ 4,5 kb et elle peut être délivrée par des vecteurs adénoviraux ou lentiviraux. Cependant, le vecteur lentiviral peut être intégré dans le génome de l'hôte et présente un facteur de risque d'induction de carcinogénèse (Nienhuis, Dunbar & Sorrentino, 2006; Nowrouzi, Glimm, von Kalle & Schmidt, 2011). Le principal désavantage du vecteur adénoviral est associé à l'immunité antivirale préexistante qui mène à une forte réponse immunitaire (Bulcha, Wang, Ma, Tai & Gao, 2021; Gonçalves & Paiva, 2017). Une alternative intéressante est la Cas9 provenant de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), SaCas9 a une taille d'environ 3,5 kb et peut être délivré dans un vecteur *adeno-associated virus* (AAV) (Ran et al., 2015). Le vecteur AAV possède une spécificité cellulaire, le risque oncogène est réduit et il a un faible potentiel immunogène (Mingozzi & High, 2013). Cpf1 est une endonucléase distincte de SpCas9 et de SaCas9, elle est guidée par un ARN unique sans tracrRNA. Seulement deux enzymes Cpf1 se sont avérées capables de manipuler le génome de cellules humaines, AsCpf1 et LbCpf1 (Kim et al., 2016; Zetsche et al., 2015). Cpf1 peut être délivrée par un vecteur AAV (Zetsche et al., 2015).

1.3.6.5 L'édition de base

L'édition de base est une approche d'édition génomique consistant à convertir avec précision un nucléotide en un autre sans induire de DSB. Dans cette approche, CRISPR-Cas9 utilise la nucléase dCas9 ou Cas9n ainsi qu'une désaminase nucléosidique pour introduire une mutation ponctuelle (Komor, Kim, Packer, Zuris & Liu, 2016). Le système comportant la Cas9 mutante et la désaminase nucléosidique est appelé *base editor* (BE) (Figure 1.17a). Il existe trois groupes principaux de BE, les *cytosine base editor* (CBE), les *adenine base editor* (ABE) et les *RNA base editor* (RBE).

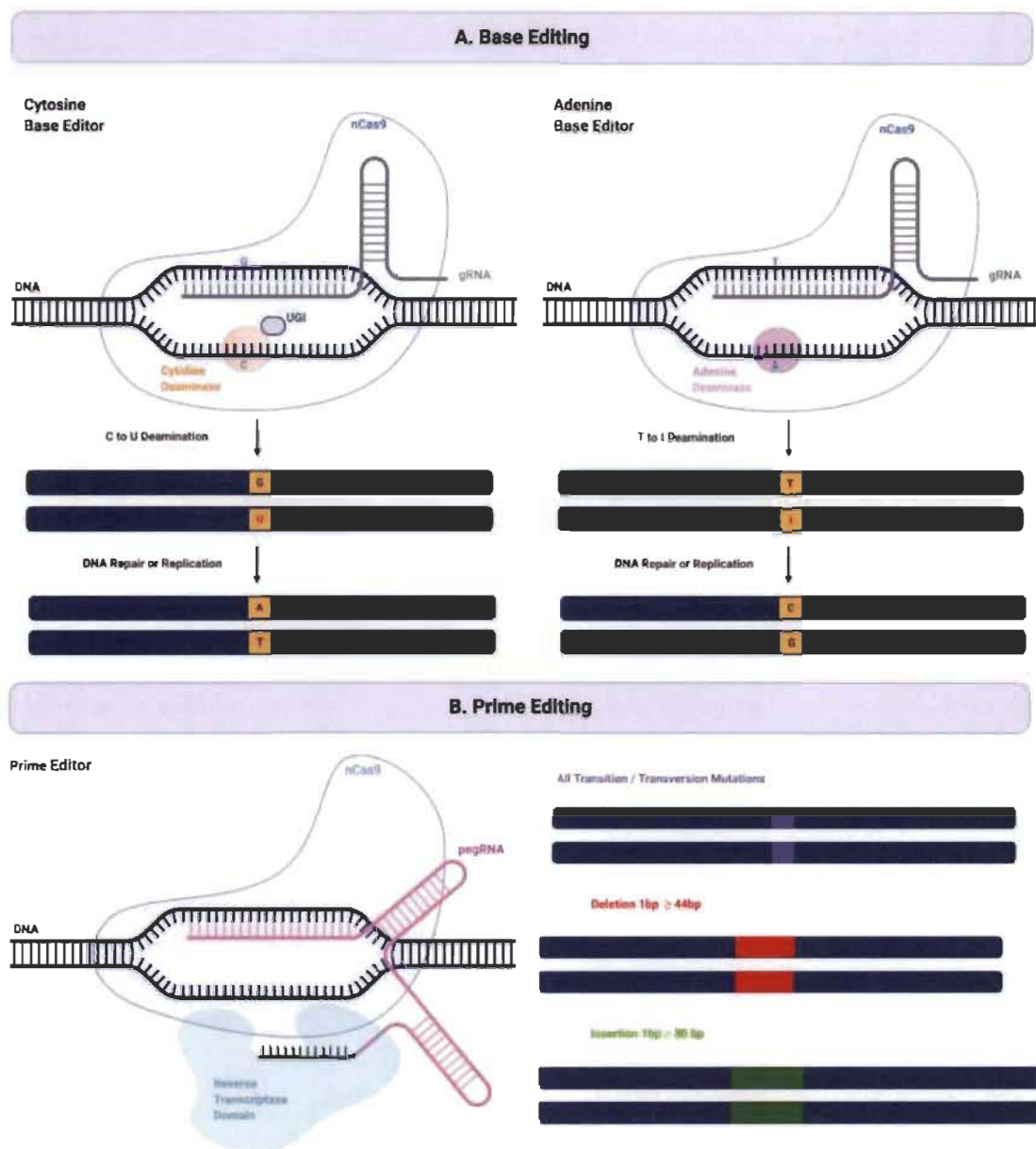


Figure 1.17 Édition génomique indépendante de DSB.

En a, l'édition génomique par édition de base peut être réalisée par des CBE ou par des ABE. Les BE sont composés d'une nucléase dCas9 ou Cas9n associé avec une désaminase nucléosidique. La désamination d'une cytosine par CBE génère un uracile, l'uracile est perçu par la machinerie de réplication cellulaire comme une thymine et entraîne une conversion en T-A. La fusion de UGI aux CBE inhibe l'activité de UGN et augmente l'efficacité de l'édition de base. La désamination de l'adénosine par ABE génère une inosine, l'inosine est perçue par la machinerie de réplication cellulaire comme une guanosine et entraîne une conversion en G-C. En b, l'édition génomique par *prime editing* est réalisée par un PE.

Les PE sont produits en fusionnant une RT modifiée avec une nucléase Cas9n et avec un pegRNA. Le pegRNA contient la séquence complémentaire au site cible et une matrice d'ARN codant pour l'édition souhaitée. Le *prime editing* permet toutes les mutations de transition et de transversion, ainsi que de petites mutations d'insertion et de suppression (Kantor, McClements & MacLaren, 2020).

Les CBE peuvent convertir le nucléotide C en T et G en A sur le brin opposé (Nishida et al., 2016). Les CBE de premières générations ont été développées en fusionnant la cytosine désaminase APOBEC1 à la Cas9 mutante dCas9 (Komor et al., 2016). Le nucléotide C est désaminé en U par APOBEC1 et forme un mauvais appariement (Eid, Alshareef & Mahfouz, 2018). L'uracile est perçu par la machinerie de réplication cellulaire comme une thymine et entraîne une conversion en T-A (Eid et al., 2018). La CBE de première génération n'est pas efficace dans les cellules humaines, l'intermédiaire contenant l'uracile peut être réparé par la voie *base excision repair* (BER) (Komor et al., 2016). La réparation médiée par BER est initiée par l'*uracil N-glycosylate* (UNG) qui reconnaît le mauvais appariement U-G (Krokan & Bjørås, 2013). UNG clive la liaison uracile-ADN et entraîne le retour à l'appariement de départ (Krokan & Bjørås, 2013). La deuxième génération de CBE a été optimisée en fusionnant l'*uracil glycosylase inhibitor* (UGI) pour inhiber UNG (Komor et al., 2016).

Les ABE sont utilisés pour convertir le nucléotide A en G et T en C sur le brin opposé (Gaudelli et al., 2017). Les ABE de premières générations sont le produit de la fusion de dCas9 avec l'enzyme de *Escherichia coli tARN adenosine desaminase* (TadA) ayant subi une évolution dirigée TadA* (Gaudelli et al., 2017). Dans les ABE de première génération TadA* catalyse la désamination de l'adénine en inosine (Gaudelli et al., 2017). L'inosine est traité comme une guanosine par la polymérase et le résultat de la réplication est une conversion de A-T en G-C (Gaudelli et al., 2017).

1.3.6.6 Le *prime editing*

Le *prime editing* est une technique d'édition génomique sans induction de DSB effectuée par CRISPR (Figure 1.17b). Le *prime editing* permet d'insérer des mutations de

transition et de transversion, des suppressions allant jusqu'à 80 pb et des insertions allant jusqu'à 44 pb (Anzalone et al., 2019). Les *prime editor* (PE) utilisent une RT modifiée fusionnée à Cas9n et à un *prime-editing* gRNA (pegRNA). Le pegRNA est différent des gRNA standard, il contient une séquence qui dirige la Cas9 vers la cible complémentaire, un site de liaison d'amorce et une matrice d'ARN codant pour l'édition souhaitée (Anzalone et al., 2019). Le pegRNA se lie à l'ADN et il expose le brin complémentaire. L'ADN du brin contenant le PAM est non lié, il est clivé par la Cas9 et le clivage produit une amorce pour la RT. La RT se lie à l'amorce créée et elle polymérise un fragment en utilisant la région du pegRNA contenant la matrice codant pour l'édition souhaitée (Anzalone et al., 2019). Un intermédiaire ramifié contenant deux flap d'ADN PAM redondants est ainsi créé. Le flap 5' contient la séquence d'ADN non éditée et le flap 3' contient la séquence éditée à partir du pegRNA. Le flap 5' est excisé préférentiellement, le flap 3' est lié à l'ADN pour incorporer la séquence éditée et il y a création d'un hétéroduplex contenant un brin modifié et un brin non modifié. La réparation de l'ADN pour résoudre les mauvais appariements incorpore les modifications en dupliquant le brin édité.

1.3.6.7 Les réservoirs de VIH-1 latent

Il y a eu un regain d'enthousiasme vis-à-vis la thérapie génique pour traiter le SIDA lorsqu'un patient américain atteint de leucémie et du VIH-1 a vu sa charge virale être supprimée après avoir reçu une greffe de moelle osseuse d'un donneur possédant la mutation homozygote CCR5 Δ 32 (Hütter et al., 2009). L'exploit a été reproduit avec un deuxième patient atteint d'une leucémie et du VIH-1 (Gupta et al., 2019). Des cellules souches pluripotentes ont été modifiées avec le système TALEN et CRISPR-Cas pour générer la mutation CCR5 Δ 32. La modification biallélique a été introduite dans 14 % des cellules modifiées avec TALEN et dans 33 % des cellules modifiées avec CRISPR-Cas9 (Ye et al., 2014). Les cellules souches modifiées ont pu se différencier in vitro en monocytes/macrophages et elles ont démontré une résistance contre la souche de VIH-1 à tropisme CCR5 (Ye et al., 2014). Des vecteurs adénoviraux chimériques codant pour SpCas9 ont été utilisés pour générer un knockout (KO) de CCR5 dans la lignée des

LT CD4 et les cellules modifiées résultantes étaient résistantes au VIH-1 (Li et al., 2015). Une approche avec deux ARNg a été utilisée pour améliorer la mutagenèse dans les LT CD4 et dans les cellules souches CD34+ (Mandal et al., 2014). L'approche avec deux ARNg a amélioré l'efficacité de la mutagenèse pour les deux types cellulaires et la modification n'a pas affecté la capacité des cellules souches à se différencier (Mandal et al., 2014).

Lors d'essai *in vivo* chez la souris, des cellules souches CD34 modifiées ont été transplantées et elles ont repeuplé la moelle osseuse tout en gardant la modification génique. Les cellules ont aussi gardé la capacité de se différencier et plus important encore les souris étaient résistantes au VIH-1 (Mandal et al., 2014). Un essai clinique de thérapie génique a été réalisé chez 12 patients, on leur a donné une dose de LT CD4 modifié par ZFN pour créer un KO du récepteur CCR5 (Tebas et al., 2014). L'objectif principal de cette étude était d'évaluer les effets secondaires liés à la thérapie, l'objectif secondaire était d'évaluer le système immunitaire et la résistance au VIH-1. Un seul patient a présenté un effet secondaire indésirable grave lié à une réaction transfusionnelle. Néanmoins, cette étude a permis de démontrer que l'approche est sécuritaire et elle a permis de démontrer une diminution de la quantité d'ARN viraux dans le sang de la plupart des patients (Tebas et al., 2014).

Cependant, certaines souches du VIH-1 peuvent infecter les cellules par le corécepteur CXCR4. Des LT CD4 ont été modifiés par CRISPR-Cas9 pour générer un KO de CXCR4 et les cellules modifiées étaient résistantes aux souches à tropisme CXCR4 du VIH-1 (Hou et al., 2015). Des LT CD4 ont été modifiés par l'électroporation de complexes RNP CRISPR-Cas9 visant à générer un KO des corécepteurs CCR5 ou CXCR4 et les cellules modifiées ont démontré une résistance dépendante au tropisme du VIH-1 (Hultquist et al., 2016). Finalement, des LT CD4 ont démontré une résistance indépendamment du tropisme lorsque les cellules ont été modifiées pour générer des KO de CCR5 et CXCR4 simultanés (Yu et al., 2018).

SaCas9 découverte récemment a été utilisée pour modifier les corécepteurs du VIH-1. Elle a l'avantage d'être plus petite que SpCas9 et elle peut être incorporée dans un vecteur AAV (Ran et al., 2015). Les AAV sont très attrayants en thérapie génique puisqu'ils sont faiblement immunogènes, peu toxiques, facilement transduits, ne s'insèrent pas dans le génome et sont sélectifs (Mingozzi & High, 2013). Des LT CD4 et des cellules souches CD34 ont été modifiés avec SaCas9 visant à générer un KO de CCR5 et les cellules modifiées ont démontré un phénotype de résistance au VIH-1 (Xiao et al., 2019). De plus, le corécepteur CXCR4 de LT CD4 a été modifié et les cellules modifiées résultantes étaient résistantes à la souche à tropisme CXCR4 du VIH-1 (Wang et al., 2017).

1.3.6.8 Stratégies vers une guérison définitive

La recherche pour une guérison définitive visant à éliminer toute trace du provirus a elle aussi pris l'avenue de la thérapie génique. Le provirus réussit à contourner la détection par le système immunitaire humain grâce au réservoir de virus latent. Cependant, lorsque le virus sort de sa latence, les cellules productrices de virus peuvent être reconnues et éliminées par le système immunitaire.

Par conséquent, la méthode de *shock and kill* est une approche intéressante pour éradiquer les cellules infectées et latentes (Deeks, 2012). Cette stratégie consiste à activer la transcription du virus avec des agents d'inversion de latence (LRA). In vitro, il est possible d'augmenter l'expression des gènes viraux dans des cellules latentes en utilisant des LRA tels que les inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC), les inhibiteurs d'histone méthyltransférase (HMT), les inhibiteurs d'ADN méthyltransférase, les inhibiteurs de bromodomaine, les agonistes de la protéine kinase C (PKC) et plusieurs agonistes des récepteurs TLR (Rasmussen & Lewin, 2016). De plus, il est possible d'utiliser le mutant de SpCas9 liant l'ADN sans la cliver pour induire l'expression du provirus à l'intérieur de cellules latentes. La sortie de la latence est accompagnée d'une activation des cellules immunitaires et elles pourront détruire les cellules infectées par le VIH-1. In vitro, il a été possible de réactiver le promoteur du VIH-1 localisé dans le LTR des lignées cellulaires

latentes (Limsirichai, Gaj & Schaffer, 2016; Y. Zhang et al., 2015). Cependant, la livraison des composantes CRISPR demeure un défi *in vivo* et l'approche thérapeutique *shock and kill* n'a pour l'instant pas abouti à l'élimination du VIH-1.

Une autre approche consiste à cibler le provirus latent intégré dans le génome par un KO ou une excision par le système CRISPR-Cas9. Des LT CD4⁺ exprimant des composantes CRISPR-Cas9 ciblant la région LTR ont démontré une perte d'expression significative induite par les LTR (Ebina, Misawa, Kanemura & Koyanagi, 2013). Il a été possible d'éliminer le virus en culture cellulaire par CRISPR-Cas9 ciblant le virus (Wang et al., 2016). De plus, des cellules souches CD34 exprimant de manière stable CRISPR-Cas9 ciblant l'ADN viral intégré a pour effet de perturber le génome viral intégré, l'expression de CRISPR-Cas9 fournit une défense à long terme contre le VIH-1 et les cellules gardent leur pouvoir de différenciation (Liao et al., 2015).

1.3.6.9 Les facteurs de restriction

Les cellules humaines ont développé un système de défense pouvant perturber les étapes clés du cycle de réplication virale. Les rétrovirus peuvent être restreints par une famille d'effecteurs immunitaires innés, les facteurs de restriction. Le VIH-1 possède des mécanismes d'évasion contre les facteurs de restriction, lui permettant de se propager dans les cellules humaines et d'établir des infections persistantes chez les patients. Cependant, l'introduction de mutations dans les gènes humains des facteurs de restriction peut contrecarrer les mécanismes d'évasion du VIH-1. Tout d'abord, en introduisant la mutation D128K dans la protéine APOBEC3G, il est possible de la rendre insensible à Vif et donc d'empêcher sa dégradation. De plus, en surexprimant la protéine APOBEC3G mutée, il est possible d'augmenter le niveau de restriction contre le VIH-1 (Schröfelbauer, Chen & Landau, 2004; Xu et al., 2004). Ensuite, l'introduction de la mutation T45I dans la protéine tétherine, la rend insensible à Vpu et donc empêche sa dégradation (Gupta et al., 2009; McNatt et al., 2009). Finalement, la protéine tétherine mutée augmente le niveau de restriction face au VIH-1 (Gupta et al., 2009; McNatt et al., 2009).

Pour rétablir la capacité de détection de la capsid virale de TRIM5 α humain (huTRIM5 α), des versions chimériques contenant de petits segments de rhTRIM5 α ont été produites (Sawyer et al., 2005; Walker et al., 2012). Des analyses génétiques de rhTRIM5 α ont été menées pour cartographier les mutations déterminantes liées à la restriction du VIH-1 et elles ont mené à la découverte de la mutation R332G dans huTRIM5 α qui peut rétablir sa capacité de détection (Li, Li, Stremlau, Lee & Sodroski, 2006; Yap, Nisole & Stoye, 2005). Pour trouver des déterminants clés qui rétabliraient la capacité de restriction de TRIM5 α , notre laboratoire a généré une large bibliothèque de mutants dans la région SPRY de huTRIM5 α (Pham, Bouchard, Grütter & Berthoux, 2010). Ces mutants ont été criblés en fonction de leurs restrictions contre le VIH-1 et la mutation R335G a été identifiée comme inhibant le VIH-1 (Pham et al., 2010; Pham et al., 2013). De plus, lorsque la mutation R332G est combinée avec la mutation R335G, les niveaux de restriction sont plus élevés qu'avec les mutations simples (Pham et al., 2010; Pham et al., 2013). Lorsqu'elle est surexprimée, la protéine huTRIM5 α R332G-R335G inhibe la propagation du VIH-1 et offre un avantage de survie par rapport aux cellules de type sauvage, mais cette inhibition est moins restrictive par rapport aux cellules surexprimant rhTRIM5 α (Jung et al., 2015; Pham et al., 2010; Pham et al., 2013).

Précédemment, notre laboratoire avait tenté d'éditer le gène TRIM5 dans la lignée HEK293T. Les cellules HEK293T ont été utilisées en raison de leur très grande permissivité à la transfection d'ADN. Cependant, pendant le projet, nous avons découvert que huTRIM5 α était très faiblement restrictif dans cette lignée cellulaire, y-compris contre le N-MLV, un virus qui est normalement très efficacement ciblé par huTRIM5 α . Des plasmides codant pour les composants CRISPR avec un ADN donneur portant les mutations R332G-R335G avaient été transfectés dans des cellules HEK293T (Dufour et al., 2018). Plusieurs clones cellulaires contenant un allèle corrigé ont été obtenus, mais aucun ne contenait deux allèles modifiés (Dufour et al., 2018). Une forte cytotoxicité avait été observée lors de l'édition génomique, elle pourrait être expliquée par l'utilisation de vecteurs lentiviraux et pourrait expliquer le faible taux d'efficacité de 10 %. De plus, aucun effet antiviral n'a été observé dans les clones hétérozygotes (Dufour et al., 2018). L'absence d'effet antiviral par TRIM5 α modifiée pourrait être expliquée par les niveaux

de restriction sous-optimal par cette protéine dans la lignée HEK293T. L'absence d'effet antiviral pourrait aussi être expliquée par la conformation qu'adopte TRIM5 α lors de la restriction du VIH-1. Pour générer un puissant effet d'avidité, TRIM5 α sous forme de dimère s'oligomérisent en hexamère pour former un réseau hexamérique symétrique avec le réseau hexamérique de CA. La coexpression des protéines TRIM5 α modifiées et non modifiées pourrait interférer avec cet effet d'avidité.

1.4 Problématique et hypothèse de recherche

Un patient infecté par le VIH-1 doit prendre une chimiothérapie antirétrovirale durant toute sa vie, le traitement ne cible pas le réservoir viral formé par le provirus silencieux et latent. Le but de ce traitement est de réduire la charge virale et de maintenir cette réduction le plus longtemps possible. Cependant, la toxicité et les effets secondaires liés à cette thérapie sont non négligeables. Les rétrovirus peuvent être restreints par une famille d'effecteurs immunitaires innés, les facteurs de restriction agissant à différents stades de réplication du VIH-1. Le VIH-1 possède des mécanismes d'évasion lui permettant de neutraliser les facteurs de restrictions. Cependant, l'introduction de mutations connues dans les gènes humains des facteurs de restriction pourrait contrecarrer les mécanismes d'évasion du VIH-1. L'hypothèse de recherche est que certaines mutations connues que nous pourrions introduire dans les gènes des facteurs de restriction pourraient augmenter significativement le niveau de restriction des cellules contre une infection par le VIH-1.

1.4.1 Objectif : Déterminer l'impact sur la réponse contre le VIH-1 résultant de l'édition génomique du gène humain du facteur de restriction TRIM5 α

Notre hypothèse de travail est que l'introduction des mutations R332G et R335G dans le gène du facteur de restriction TRIM5 α pourrait augmenter significativement le niveau de restriction des cellules contre une infection par le VIH-1. Les mutations R332G et R335G rétablissent la capacité de TRIM5 α à reconnaître la capsid virale et augmentent le niveau de restriction envers le VIH-1 des cellules humaines surexprimant cette protéine

modifiée. Nous avons électroporé des lymphocytes T CD4 par des complexes ribonucléoprotéiques CRISPR-Cas9 avec l'ADN donneur. Nous sommes parvenus à introduire une mutation dans 13 % des clones isolés. Les clones positifs ont été soumis au séquençage Miseq et 5 présentaient une édition monoallélique contenant les mutations R332G et R335G. Un clone présentait un allèle avec les mutations R332G et R335G alors que l'autre allèle incluait seulement la mutation R332G. Nous avons caractérisé l'effet antiviral résultant de l'édition génomique en effectuant des tests d'infection en présence et en absence d'IFN-I. Nos résultats démontrent que la restriction par le clone contenant les deux allèles mutés procure un avantage de survie contre le VIH-1 jusqu'à 50 fois supérieures par rapport aux cellules non modifiées.

CHAPITRE II

EDITING OF THE TRIM5 GENE DECREASES THE PERMISSIVENESS OF HUMAN T LYMPHOCYTIC CELLS TO HIV-1

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'une publication en anglais publiée le 25 décembre 2020 dans la revue *Viruses*. La référence de cet article est la suivante : (Désaulniers et al., 2020).

2.1 Contribution des auteurs

Kevin Désaulniers a conçu et effectué la majorité des expériences de ce projet, il a créé les figures et a participé à la rédaction du manuscrit. Levine Ortiz, Caroline Dufour et Alix Claudel ont conçu et exécuté une partie des manipulations expérimentales. Natacha Mérindol a participé à la conception des expériences, à l'analyse et a effectué quelques manipulations. Mélodie B. Plourde a participé à la conception des expériences et à l'analyse. Lionel Berthoux, directeur de recherche et superviseur du projet, a exécuté une partie des manipulations, a participé à la conception des expériences, à l'analyse et à la rédaction du manuscrit.

2.2 Résumé de l'article

TRIM5 α est un effecteur antirétroviral cytoplasmique régulé à la hausse par les interférons de type I. Nous avons précédemment montré que deux mutations ponctuelles, R332G et R335G, dans la région de liaison de la capsidre rétrovirale confèrent à TRIM5 α humaine la capacité de cibler et de restreindre fortement le VIH-1 lors de la surexpression de la protéine mutée. Ici, nous avons utilisé la réparation dirigée par homologie médiée par CRISPR-Cas9 (HDR) pour introduire ces deux mutations dans le gène humain endogène TRIM5. Nous avons trouvé 6 clones de cellules isolées sur 47 contenant au moins un allèle édité par HDR. Un clone (clone 6) avait les deux allèles contenant R332G, mais un seul des deux allèles contenant R335G. Lors d'une infection avec un vecteur VIH-1, le clone 6 était significativement moins permissif par rapport aux cellules non modifiées, tandis que les clones cellulaires avec des modifications monoalléliques n'étaient que légèrement moins permissifs. Après le traitement par IFN- β , l'inhibition de l'infection par le VIH-1 dans le clone 6 a été significativement renforcée (inhibition d'environ 50 fois). Le knockdown TRIM5 α a confirmé que le VIH-1 était inhibé par les produits géniques TRIM5 modifiés. La quantification des produits de transcription inverse du VIH-1 a montré que l'inhibition s'est produite par le biais du mécanisme attendu. En conclusion, nous démontrons la faisabilité de l'inhibition puissante d'une infection virale grâce à l'édition de gènes effecteurs innés. Nos résultats soulignent également l'importance de la modification biallélique afin d'atteindre des niveaux significatifs d'inhibition par TRIM5 α .

2.3 Article complet en anglais : Editing of TRIM5 gene decreases the permissiveness of human T lymphocytic cells to HIV-1

2.3.1 Abstract

Tripartite-motif-containing protein 5 isoform α (TRIM5 α) is a cytoplasmic antiretroviral effector upregulated by type I interferons (IFN-I). We previously showed that two points mutations, R332G/R335G, in the retroviral capsid-binding region confer human TRIM5 α the capacity to target and strongly restrict HIV-1 upon overexpression of the mutated protein. Here, we used clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9-mediated homology-directed repair (HDR) to introduce these two mutations in the endogenous human TRIM5 gene. We found 6 out of 47 isolated cell clones containing at least one HDR-edited allele. One clone (clone 6) had both alleles containing R332G, but only one of the two alleles containing R335G. Upon challenge with an HIV-1 vector, clone 6 was significantly less permissive compared to unmodified cells, whereas the cell clones with monoallelic modifications were only slightly less permissive. Following interferon (IFN)- β treatment, inhibition of HIV-1 infection in clone 6 was significantly enhanced (~40-fold inhibition). TRIM5 α knockdown confirmed that HIV-1 was inhibited by the edited TRIM5 gene products. Quantification of HIV-1 reverse transcription products showed that inhibition occurred through the expected mechanism. In conclusion, we demonstrate the feasibility of potently inhibiting a viral infection through the editing of innate effector genes. Our results also emphasize the importance of biallelic modification in order to reach significant levels of inhibition by TRIM5 α .

2.3.2 Introduction

Individuals infected with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are treated with combination antiretroviral therapy (cART). Despite successfully reducing viral loads to undetectable levels in a large fraction of the treated patients (Angel et al., 2001), drugs administered under cART have significant side effects (Hagos, Fessehay & Anand, 2019), complicating adherence. Moreover, they are not curative, as they do not target latently integrated HIV-1 that constitute the main reservoir (Cohn et al., 2020),

and are inefficient in some anatomical sanctuaries such as the central nervous system (Rose et al., 2018). Genetic interventions offer the potential to durably suppress HIV-1 while avoiding the need for lifelong pharmacological treatments. The HIV-1 entry co-receptor CCR5 has been the most studied target for HIV-1 gene therapy. The goal is to phenotypically mimic the CCR5 Δ 32/ Δ 32 genotypes of the donor used for the “Berlin patient” (Allers et al., 2011). Zinc finger nucleases (ZFNs) have been designed to knock out the CCR5 gene, and phase I clinical trials demonstrated that patient-derived ZFN-engineered CCR5-knockout T cells were effective in controlling HIV-1 viral loads in some patients following treatment interruption (Tebas et al., 2014). Several clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-based approaches have also been developed to edit the CCR5 gene (Kang et al., 2015; Qi et al., 2018; Xu et al., 2017). However, results from a patient in whom CXCR4-tropic HIV-1 rebounded the following transplantation with CCR5 Δ 32/ Δ 32 cells suggest that this approach alone may not be successful for patients that harbor even very small amounts of HIV-1 that can use the CXCR4 co-receptor for entry into cells (Kordelas et al., 2014; Verheyen et al., 2019).

Retrovirus infections may be inhibited by a family of innate immune effectors, also called restriction factors (Merindol & Berthoux, 2015; Schoggins & Rice, 2011). These proteins may show some level of efficacy without external stimulation (“intrinsic immunity”), but their expression is typically stimulated by IFN-I. Restriction factors act at different stages of retroviral replication and through a variety of mechanisms (reviewed in (Colomer-Lluch, Ruiz, Moris & Prado, 2018)). Tripartite-motif-containing protein 5 isoform α (TRIM5 α) is a cytoplasmic restriction factor encoded by the interferon-stimulated gene (ISG) *TRIM5* (Carthagen et al., 2008; Stremlau et al., 2004) (reviewed in (Ganser-Pornillos & Pornillos, 2019)).

TRIM5 α targets retroviruses shortly after their entry into the cell’s cytoplasm (Passerini, Keckesova & Towers, 2006). TRIM5 α , like other members of the TRIM protein family, has RING, B-box and Coiled-coil domains at its N-terminus (Rajsbaum et al., 2014). The RING domain-associated ubiquitin ligase activity is instrumental in the restriction mechanism, as it directs some viral components as well as TRIM5 α itself to

proteasomal degradation (Kutluay, Perez-Caballero & Bieniasz, 2013; Rold & Aiken, 2008). The RING domain also promotes the formation of K63-linked ubiquitin chains that play a role in the restriction process (Fletcher et al., 2015; Imam et al., 2019) and activate innate immune pathways mediated by NF- κ B, AP-1 and IFN-I (Merindol et al., 2018; Na, Tang, Wang, Liu & Wang, 2018; Nepveu-Traversy & Berthoux, 2014; Pertel et al., 2011). At its C-terminus, TRIM5 α has a SPRY/B30.2 domain whose sequence determines retroviral target specificity, i.e., which viruses are inhibited (Perez-Caballero, Hatzioannou, Yang, Cowan & Bieniasz, 2005; Stremlau et al., 2005). Upon intercepting incoming retroviral cores, TRIM5 α binds to the capsid protein lattice that forms the outer side of the core. This, in turn, promotes the multimerization of TRIM5 α , greatly enhancing the avidity of TRIM5 α -capsid interactions (Ganser-Pornillos et al., 2011; Yu et al., 2020). The dimerization of TRIM5 α and formation of higher-order multimers involve its central B-box and Coiled-coil domains (Keown, Yang, Douglas & Goldstone, 2016; Li, Yeung, Fiegen & Sodroski, 2011). As a result, the viral core is destabilized and undergoes premature disassembly (Black & Aiken, 2010; Sastri & Campbell, 2011; Stremlau et al., 2006; Zhao & Zhang, 2014), which disrupts reverse transcription of the viral genome (Campbell et al., 2016; Roa et al., 2012; Wu, Anderson, Campbell, Joseph & Hope, 2006). The restriction mechanism also includes the sequestration of viral particles in cytoplasmic bodies (Campbell et al., 2008; Nepveu-Traversy et al., 2016).

Restriction by TRIM5 α is species-specific, cell-type-specific and virus-specific (Bérubé, Bouchard, & Berthoux, 2007; Hatzioannou, Perez-Caballero, Yang, Cowan & Bieniasz, 2004; Sawyer et al., 2005). Some HIV-1 strains are significantly restricted by human TRIM5 α (huTRIM5 α), in particular in HLA: B27+ or B57+ elite controller patients, because of evolutionary pressure from cytotoxic T lymphocytes in these patients results in the emergence of capsid mutants that increase sensitivity to TRIM5 α (Battivelli, Migraine, Lecossier, Yeni, et al., 2011; Granier et al., 2013; Merindol et al., 2018). However, most HIV-1 strains are poorly sensitive to huTRIM5 α (<2-fold). In contrast, many nonhuman primate orthologs of TRIM5 α , such as rhesus macaque TRIM5 α (rhTRIM5 α), restrict HIV-1 by 10- to 100-fold (Song et al., 2005; Wilson et al., 2008). Attempts have been made to generate mutants of huTRIM5 α able to efficiently target HIV-1. For instance, investigators

have produced chimeric versions of huTRIM5 α containing small motifs of the rhTRIM5 α SPRY domain (Sawyer et al., 2005; Walker et al., 2012). Other studies introduced smaller changes in the SPRY domain based on the rhTRIM5 α sequence, leading to the discovery that mutations abrogating the positive charge at Arg332 increased huTRIM5 α targeting of HIV-1 (Li et al., 2006; Yap et al., 2005). Taking a different approach, our laboratory generated huTRIM5 α SPRY domain mutant libraries that were screened for their capacity to restrict HIV-1. This led us to isolate the HIV-1 inhibitory mutation R335G, among other mutations (Pham et al., 2010; Pham et al., 2013). Furthermore, combining the R332G and R335G mutations yielded higher restriction levels compared with single mutations (Pham et al., 2010; Pham et al., 2013). When overexpressed through retroviral transduction, R332G-R335G huTRIM5 α inhibits the spread of HIV-1 by 20- to 40-fold and provides a survival advantage compared to untransduced cells (Jung et al., 2015; Pham et al., 2010).

Overexpressing TRIM5 α may have detrimental consequences *in vivo*, as this protein is involved in processes such as inflammation (Merindol et al., 2018; Pertel et al., 2011) and autophagy (Ribeiro et al., 2016). Another caveat of lentiviral vector-mediated TRIM5 α transduction is the continued expression of the endogenous, wild-type WT protein. TRIM5 α proteins interact with each other, and the presence of the nonrestrictive WT protein may interfere with the antiviral activity of the restrictive mutant (Battivelli, Migraine, Lecossier, Matsuoka, et al., 2011; Berthoux, Sebastian, Sayah & Luban, 2005). Introducing the desired mutations in TRIM5 by gene editing represents an attractive alternative, as the therapeutic gene will be expressed at physiological levels and in an IFN-I-dependent fashion. Assuming biallelic gene editing, no WT protein would be co-expressed along with the therapeutical mutant. Previously, we transfected plasmids encoding CRISPR components (Cas9 and guide RNA, gRNA) into HEK293T cells, along with a donor DNA for HDR that bear the desired mutations (Kan, Ruis, Takasugi & Hendrickson, 2017), and obtained several cell clones containing corrected alleles (Dufour et al., 2018). However, no antiviral effect was observed, which was due to several possible reasons, including the fact that in this cell line, *TRIM5* bears a high number of mutations that may inactivate its antiviral properties (see <http://hek293genome.org/v2/>) (Dufour et al., 2018). In this paper, we electroporated CRISPR ribonucleoprotein (RNP)

complexes and a mutation donor DNA into Jurkat T cells in order to introduce the R332G and R335G mutations. Our results demonstrate that successfully *TRIM5*-edited cells have decreased permissiveness to HIV-1 and that restriction is stimulated by IFN-I as expected.

2.3.3 Materials and methods

2.3.3.1 Cell culture

Jurkat T lymphocytic cells were maintained in RPMI 1640 medium (HyClone, Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). HEK293T cells were maintained in DMEM medium (HyClone). The medium was switched to RPMI at the time of virus production as the virus was used to infect cells growing in RPMI. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (HyClone) and low-concentration Plasmocin (InvivoGen, San Diego, CA). The Jurkat cells stably transduced with a lentivirus overexpressing R332G-R335G *TRIM5* α were described before (Pham et al., 2010). Briefly, these cells were exposed to an HIV-1 vector containing both the hu*TRIM5* α mutant and the gene of resistance to puromycin, followed by puromycin treatment to kill untransduced cells.

2.3.3.2 *TRIM5* Editing

The CRISPR target within *TRIM5* (5'AGATAATATATGGGGCACGA) was selected using the Zhang Lab algorithm available online at crispr.mit.edu (Dufour et al., 2018). We used the Integrated DNA Technologies (IDT, Kanata, ON, Canada) ALT[®] CRISPR-Cas9 RNP system to edit *TRIM5*. The CRISPR RNA (crRNA) and transactivating CRISPR RNA (tracrRNA), which are the RNA components of the RNP complex, were synthesized by IDT. The previously described single-stranded donor DNA (ssDNA) that includes mutations encoding 332G and 335G as well as silent mutations (Dufour et al., 2018) was also synthesized by IDT. 1 μ L of the RNP complex contained 22 pmol of crRNA:tracrRNA duplex and 18 pmol of Cas9 enzyme. The electroporation enhancer was diluted in IDTE buffer at a final concentration of 10.8 μ M. We electroporated 3×10^5 cells with 100 pmol of the donor ssDNA, 1 μ L of the RNP

complex and 2 μ L of electroporation enhancer. Electroporations were done in the Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific) with the following parameters: 1323 V, 10 ms and 3 pulses. The electroporated cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 48 h.

2.3.3.3 Isolation and Screening of Cell Clones

To isolate single-cell clones, we seeded 6 \times 96-well plates with approximately 0.5 cells per well. For each well, we used 100 μ L of RPMI 1640 medium supplemented with 12% FBS, 10% of conditioned medium, penicillin/streptomycin and Plasmocin. The plates were grown for 2–4 weeks, and we obtained 47 surviving clonal cell populations. To screen clones for HDR-mediated TRIM5 editing, genomic DNA was extracted using 30 μ L of DirectPCR lysis reagent (Viagen Biotech, Los Angeles, CA) mixed with 30 μ L of water containing 12 μ g of proteinase K. Lysis was completed overnight at 55 °C, then the lysate was heated to 85 °C for 90 min to deactivate the proteinase K. HDR editing-specific PCR was performed on 2 μ L of samples using the OneTaq polymerase (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada) and primers T5a_mut_fwd (5'-AAATAATCTACGGGGCCGGCGGCACAG) and T5a_qPCR_rev (5'-CCAGCACATACCCCCAGGAT). PCR was performed using the following parameters: 30 s at 94 °C, 30 s at 61.5 °C, 30 s at 68 °C, 30 cycles. The reaction products were analyzed by electrophoresis on agarose gels.

2.3.3.4 HaeIII Screening of Edited Clones and Deep Sequencing

Genomic DNA was extracted using the EZ-10 spin column genomic DNA kit (BioBasic, Markham, ON, Canada) from the cell clones found to be positive in the first screen described above, resuspended in 50 μ L and quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). We first amplified the targeted TRIM5 region by PCR using the OneTaq polymerase, with 5 μ L of genomic DNA extraction and bar-labeled primers. Those primers, huTR5aGG_seq_FOR (5'-ACACTGACGACATGGTTCTACAATCCCTTAGCTGACCTGTTA) and huTR5aGG_seq_REV (5'-

TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCCCCCAGGATCCAAGCAGTT) bind outside the 200 nt regions aligning with the donor ssDNA. The PCR was run for 30 cycles using the following conditions: 94 °C for 30 s, 63 °C for 30 s and 68 °C for 60 s. An aliquot of each PCR product was digested with HaeIII (New England Biolabs) at 37 °C for 60 min. Reaction products were analyzed by performing electrophoresis on agarose gels. The PCR products (undigested) were sequenced on a MiSeq apparatus at Genome Quebec (McGill University, Montreal, Canada), and results were analyzed using Integrative Genomic Viewer, available online (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

2.3.3.5 Viral Challenges

Infections of Jurkat cells were performed in 96-well plates seeded at 10,000 cells per well the day before. Where applicable, treatment with IFN- β (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) at a final concentration of 10 ng/mL was initiated 16 h prior to infection [60]. The virus amounts used were determined so that we would obtain >0.1% infected cells (FACS analysis threshold in the conditions used) while staying below saturation concentrations (\approx 50% infected cells), based on preliminary titration experiments. 48 h post-infection, infected cells were fixed in 2.5% formaldehyde. The percentage of GFP-positive cells was determined using an FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with the FCS Express 6 analysis software (De Novo Software, Pasadena, CA, USA). The percentage of GFP+ cells among total intact cells was determined by gating them after excluding cell debris.

2.3.3.6 Knockdowns

Cells were knocked down for TRIM5 α , or luciferase as a control, by lentiviral transduction of pAPM vectors expressing miR30-based shRNAs (Pertel et al., 2011), as extensively described in previous publications (Malbec et al., 2010; Merindol et al., 2018). Transduced cells were treated with puromycin at 1 μ g/mL for one week; all mock-transduced cells were killed in those conditions.

2.3.3.7 HIV-1 cDNA Quantification

Seven hundred fifty thousand cells per well were seeded in 24-well plates using 0.6 mL of medium per well, 24 h prior to infection. Where applicable, IFN- β (10 ng/mL), MG132 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; 1 μ g/mL) and nevirapine (Sigma-Aldrich; 40 or 80 μ M) were added 16 h (IFN- β) or 4 h (MG132, nevirapine) prior to infection. Infection was done at a multiplicity of infection of 0.1 with HIV-1NL-GFP passed through 0.2 μ M filters (MilliporeSigma Durapore) and treated with 20 U/mL DNaseI (New England Biolabs) for 60 min at 37 °C. Cells were infected for 6 h; then, total cellular DNA was extracted using the EZ-10 spin column genomic DNA kit (BioBasic) and quantified using the NanoDrop spectrophotometer. HIV-1 cDNAs were amplified in quantitative PCR (qPCR) reactions using primers specific for GFP or for the cellular gene GAPDH as a control, as described before (Veillette et al., 2013). PCR reactions were done in a final volume of 20 μ L, containing 1X of SensiFast SYBR Lo-ROX kit (Bioline, Meridian Biosciences, Memphis, TN), 400 nM sense and antisense primers and between 150 to 400 ng of DNA. After 3 min of incubation at 95 °C, 40 cycles of amplification were achieved as follows: 5 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, 15 s at 72 °C in an Agilent Mx3000P instrument. Reactions were performed in duplicate, and the threshold cycle was determined using the MxPro software (Agilent). HIV-1 cDNA levels were normalized to those of GAPDH, which was amplified simultaneously with the same PCR parameters, using the Δ Ct method (cycle threshold for the sequence of interest minus cycle threshold for the control sequence). Relative HIV-1 cDNA copy numbers were then normalized to levels found in infected/untreated control (parental) cells, which were set at 100%.

2.3.4 Results

2.3.4.1 TRIM5 Editing

Previously, we had designed three gRNAs leading to Cas9-mediated DNA cuts in the vicinity of Arg332 and Arg335 in TRIM5 (Dufour et al., 2018). gRNA1 induces the cut closest to the desired mutations, specifically just upstream to the Arg332 triplet

(Figure 2.1), and was the one used in this study. The HDR donor ssDNA, which is antisense to the gRNA and 200 nts long with homology arms of similar size, was the same as in the previous study (Dufour et al., 2018). Its central section contains the mutations to be introduced, as represented in Figure 2.1. In addition to mutations substituting arginine residues into glycine at positions 332 and 335, silent mutations are introduced to prevent resection of the HDR-corrected DNA by Cas9 through changes in both the gRNA binding site and the protospacer-adjacent motif (PAM). The silent mutations also create a *HaeIII* restriction site to facilitate subsequent screening (Figure 2.1).

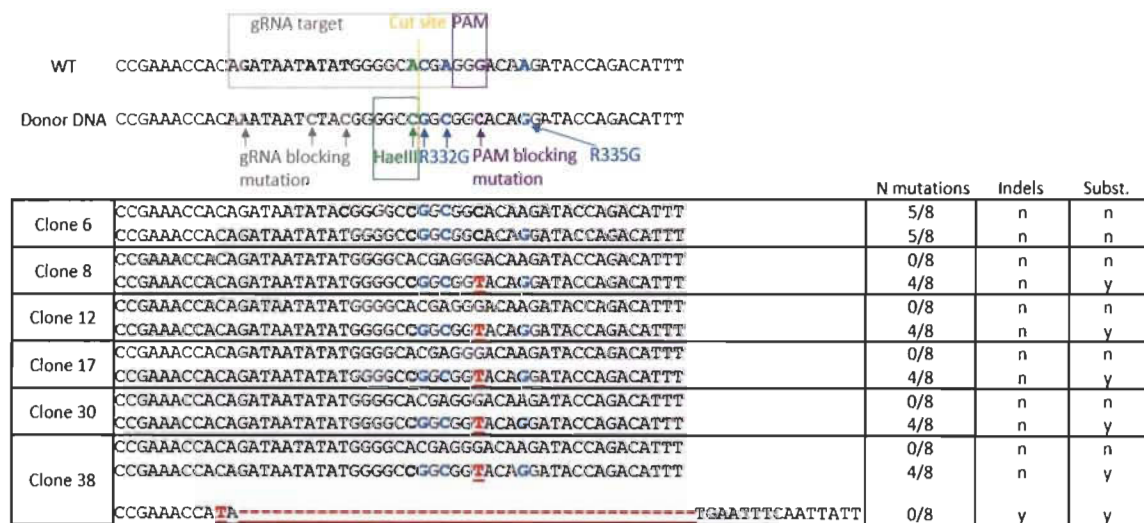


Figure 2.1 Tripartite-motif-containing protein 5 (TRIM5) editing strategy and outcome.

Tripartite-motif-containing protein 5 (TRIM5) editing strategy and outcome. Top, the TRIM5 region targeted for mutagenesis is aligned with the reverse-complement sequence of the donor single-stranded donor DNA (ssDNA) central region. The mutated nucleotides are shown in colors, and their purpose is indicated. Substitutions leading to R332G and R335G mutations are in blue. The PAM-blocking silent mutation is in purple. The silent mutation creating an *HaeIII* restriction cut site is in green. Additional silent mutations in the gRNA-binding region are in grey. Bottom, sequence of TRIM5 alleles found in clonal Jurkat populations following electroporation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) and the ssDNA and PCR-based screening. For each cell population, alleles were found in equal amounts, except for clone 38, in which the relative amounts were 44% (unedited parental (WT) allele), 24% (homology-directed repair (HDR)-edited allele) and 32% (indel-containing allele). Substituted nucleotides are in bold. Substitutions leading to R332G and R335G

mutations are in blue. Indels or undesirable substitutions are in red. The number of desired mutations for each allele is shown on the right, along with the presence (y) or absence (n) of insertions and deletions.

Jurkat cells were electroporated with CRISPR-RNP complexes along with the donor ssDNA. An aliquot of the transfected cells was subsequently analyzed for the presence of HDR-modified alleles. For this, we extracted DNA from the whole cell population and subjected it to PCR using primers designed to specifically amplify HDR-modified TRIM5 (Dufour et al., 2018). We detected a PCR product of the expected size (157 nt long), suggesting the presence of the desired modifications (not shown). To isolate cellular clones of edited cells, we seeded the transfected cells in 96-well plates at 0.5 cells per well. We obtained 47 clonal Jurkat cell populations that were individually analyzed. An aliquot of each population was lysed and subjected to the HDR-edited-specific PCR assay. We found that 6 clones (13%) were positive in this screen: clones 6, 8, 12, 17, 30, 38 (Figure S1). We then performed a second PCR-based analysis on the six positive clones as well as eight negative ones that were randomly selected. Specifically, we used PCR primers binding outside the genomic region complementary to the HDR, and the amplicons were then digested with HaeIII. We confirmed the presence of HDR-mediated mutations in the 6 positive clones, as the HaeIII cut site was present in all of them (Figure S2). Clone 6 did not show a 304 bp band corresponding to an undigested amplicon, but only a strong 152 bp band corresponding to the digestion products, suggesting that both alleles were HDR-corrected for this clone, but not for the other ones (Figure S2).

The 14 amplicons analyzed for the presence of the HaeIII cut site were also processed for MiSeq sequencing. All cellular clones had two TRIM5 alleles of approximately equal abundance ($\approx 50\%$), with the exception of clone 38 that seemingly had 3 alleles. Of the six positive clones after screening, five showed monoallelic editing, including the insertion of both R332G and R335G mutations as well as the formation of a HaeIII cut site, as expected (Figure 2.1). In each of these clones, a second TRIM5 allele had no mutation at all. In these monoallelically modified clones, only four of the eight intended mutations were found. None of the HDR-modified alleles had the three de-sired mutations upstream of the HaeIII-creating mutation, and all of them had an un-expected

substitution in the PAM, G→T instead of the intended G→C (both substitutions are silent). In addition to the modified and unmodified alleles, clone 38 had an allele of unclear genesis that contained a large deletion (Figure 2.1). Two of the 8 negative clones randomly selected (31 and 33) had a single nucleotide deletion at position -2 from the cut site (Figure S3). Clone 6 was the only clone to have both TRIM5 alleles edited by HDR. One of its alleles had five of the intended eight mutations (R332G, R335G, HaeIII and PAM sites). The other one also had five mutations, including R332G, but it lacked the R335G mutation (Figure 2.1).

2.3.4.2 *HIV-1 Restriction Activity in TRIM5-Edited Clones*

In order to determine permissiveness to HIV-1 of the gene-edited clones, as well as TRIM5 α stimulation by IFN-I, cells were infected in the absence or presence of IFN- β with increasing amounts of VSV-G-pseudotyped HIV-1_{NL-GFP}, a GFP-expressing, propagation-incompetent Δ Env/ Δ Nef version of the HIV-1 clone NL4-3 (He et al., 1997). The percentage of infected cells was determined by analyzing GFP expression using flow cytometry. The titration curves were remarkably grouped for the 7 screen-negative clones included in this experiment, suggesting an absence of strong clone-to-clone variation in permissiveness to lentiviral transduction in Jurkat cells. In the absence of IFN- β , only clone 6 showed a significant decrease (\approx 10-fold) in permissiveness to HIV-1_{NL-GFP}, compared with the rest of the clonal populations (Figure 2.2). In the presence of IFN- β , all cell populations showed decreased permissiveness to HIV-1_{NL-GFP}, indicating that one or more ISGs inhibited HIV-1, as expected [12]. IFN-I treatment resulted in significant restriction of HIV-1_{NL-GFP} in three clones (8, 12 and 30) that had monoallelic HDR editing, compared to screen-negative clones (\approx 5-fold), and restriction was strikingly strong in clone 6 cells (\approx 40-fold) (Figure 2.2). Clone 17 could not be included in this experiment, but we found it to behave similarly to clone 30 in a separate infection experiment (Figure S4).

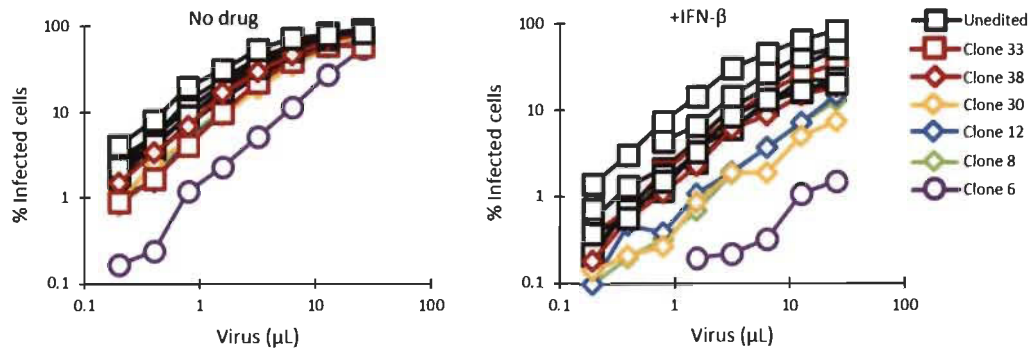


Figure 2.2 Permissiveness of HDR-edited and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-1NL-GFP.

Permissiveness of HDR-edited and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-1NL-GFP. Cells were infected with increasing amounts of HIV-1NL-GFP in the absence (left) or presence (right) of IFN- β (10 ng/mL), and the % of GFP-positive cells was determined 2 days later by FACS. Results are presented for 5 clonal populations containing HDR-edited alleles (diamond symbols and purple circles) and 7 randomly chosen negative clones (squares). Clones containing a deletion in one of the alleles are shown in red.

We then analyzed HIV-1 restriction in clones 6 and 8 side-by-side with Jurkat cells stably transduced with a retroviral vector expressing R332G-R335G huTRIM5 α (Pham et al., 2010). In the absence of IFN- β , HIV-1_{NL-GFP} was restricted in both clone 6 and in the retrovirally transduced cells expressing R332G-R335G huTRIM5 α , compared with the parental WT cells (Figure 2.3). In the presence of IFN- β , clone 6 showed a 50-fold reduction in permissiveness to infection compared to parental cells, and the monoallelically HDR-modified clone 8 also showed a modest restriction effect. In contrast, HIV-1 restriction in the cells retrovirally transduced with R332G-R335G TRIM5 α was not stimulated by IFN- β (Figure 2.3), consistent with the transgene being expressed from a non-IFN-I-inducible promoter.

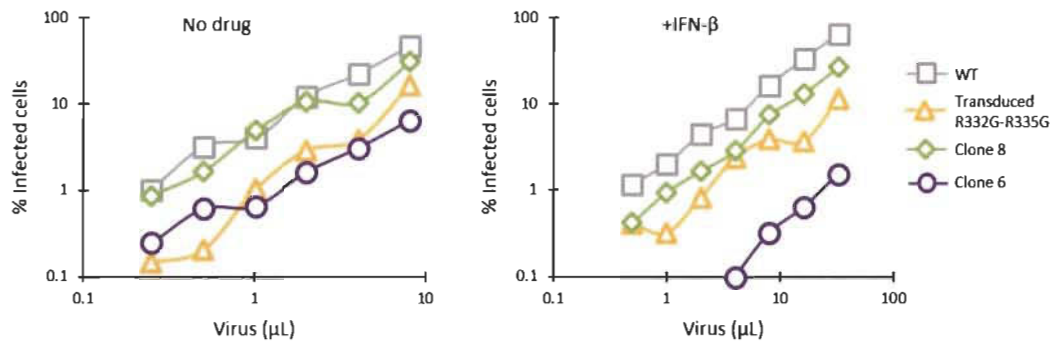


Figure 2.3 Permissiveness of HDR-edited, retrovirally transduced and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-1NL-GFP.

IFN- β treatment stimulates HIV-1 restriction by mutated endogenous TRIM5 α but has no effect on retrovirally transduced TRIM5 α . Parental Jurkat cells, clone 6 and clone 8 cells, and cells stably transduced with R332G-R335G were infected with increasing amounts of HIV-1NL-GFP in the absence or presence of IFN- β , and the % of GFP-positive cells was determined 2 days later by FACS.

2.3.4.3 Knockdown Validation of TRIM5 α Antiviral Function

A cellular clone might show reduced permissiveness to HIV-1 due to an IFN-I-inducible factor other than TRIM5 α . In order to ensure that the low permissiveness of clone 6 to HIV-1 was due to expression of the edited TRIM5 α , we knocked down TRIM5 α in these cells as well as in the unedited parental (WT) cells. The shRNA used here binds to a different TRIM5 α region than the one targeted for mutagenesis. Untransduced cells were eliminated by antibiotic selection. Two monoallelically TRIM5-edited clonal populations, clone 8 and clone 12, were also included in this experiment. Cells were infected with increasing doses of HIV-1NL-GFP in the presence or absence of IFN- β . We found that knocking down TRIM5 α rescued HIV-1NL-GFP infection of clone 6 cells, both in the absence and the presence of IFN- β , though the effect was stronger in the presence of IFN- β , as expected (Figure 2.4). In contrast, TRIM5 α knockdown had no effect on the infection of the unedited parental cells by HIV-1NL-GFP. The control shRNA used, which targets the nonhuman gene luciferase, did not affect permissiveness to HIV-1. Knocking down TRIM5 α also increased HIV-1NL-GFP infection of clones 8 and 12, which have only one R332G-R335G TRIM5 allele, but the effect was seen only in the presence of IFN- β and was smaller compared to clone 6. In summary,

TRIM5 α knock-down-mediated rescue of HIV-1 infectivity in clones 6, 8 and 12 correlated with the extent of HIV-1 restriction as seen in Figure 2.2, and also correlated with the enhancement of restriction by IFN- β . Thus, decreased permissiveness to HIV-1 in clones 6, 8 and 12 was due in large part to the antiviral effect of edited TRIM5 alleles in these clones. R332G-R335G huTRIM5 α retains the ability to restrict the N-tropic strains of murine leukemia virus (MLV), as shown previously (Pham et al., 2010), whereas B-tropic MLV is not restricted by either WT or mutated huTRIM5 α . Thus, cells were also infected with N-MLV_{GFP} and B-MLV_{GFP} in order to assess TRIM5 α restriction capabilities on a target other than HIV-1. N-MLV_{GFP} infection was strongly increased by knocking down TRIM5 α in all cell populations and in the absence or presence of IFN- β , indicating that all cell populations expressed restriction-competent TRIM5 α alleles (Figure 2.4). B-MLV_{GFP} infection of parental cells as well as clone 8 and clone 12 cells was slightly increased by knocking down TRIM5 α , and only in the presence of IFN- β . This suggests with WT huTRIM5 α , but not the R332G-R335G mutant, has weak inhibitory activity against B-MLV, which is revealed by the IFN-I treatment. Thus, TRIM5 editing to allow HIV-1 targeting had little or no impact on its capacity to restrict a different retrovirus.

2.3.4.4 Mechanism of Inhibition by Edited TRIM5 α

TRIM5 α -mediated restriction decreases retroviral cDNA synthesis by reverse transcription, and this mechanism of restriction is counteracted by the proteasome-inhibiting drug MG132 (Anderson et al., 2006; Wu et al., 2006). qPCR was used to analyze HIV-1 cDNA synthesis in clone 6 and in unmodified parental cells in the presence or absence of IFN- β and MG132 (Figure 2.5). Following a short exposure to HIV-1_{NL-GFP}, total cellular DNAs were prepared, and qPCR was performed using primers complementary to the HIV-1 vector-specific gene GFP, which is representative of late reverse transcription cDNA. To adjust for DNA amounts in the reactions, GAPDH DNA was quantified as well. Consistent with the known mechanism of action for TRIM5 α , we found HIV-1 cDNA amounts to be significantly smaller (\approx 6-fold) in clone 6 cells, as compared to the parental cells, in the absence of drug (Figure 2.5). In the presence of

IFN- β , this effect was more pronounced, consistent with the stimulation of TRIM5 α -mediated restriction by IFN-I. Conversely, the reduction in HIV-1 cDNA amounts in clone 6 was only 2.5-fold compared to WT in the presence of MG132, showing that MG132 attenuated this restriction phenotype, as expected. Accordingly, MG132 rescued HIV-1 cDNA synthesis by a larger magnitude in clone 6 (4.1-fold) than in the WT cells (1.7-fold), in the absence of IFN- β . Similar findings were observed in the presence of IFN- β (Figure 2.5). In conclusion, these results show that HIV-1 infection is inhibited via the expected mechanism in the *TRIM5*-edited clone 6 cells.

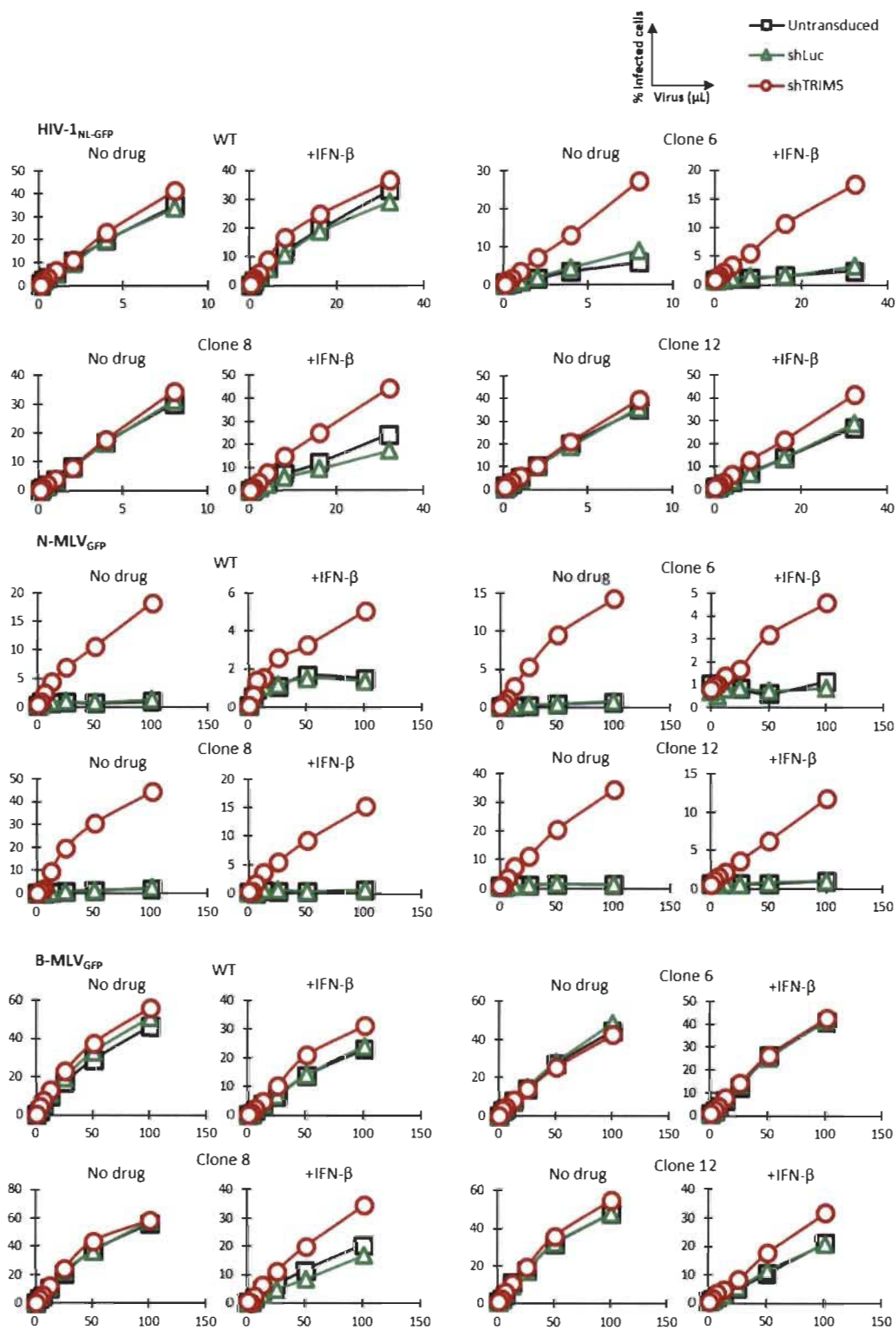


Figure 2.4 TRIM5 α knockdown rescues HIV-1 from restriction in gene-edited cells.

TRIM5 α knockdown rescues HIV-1 from restriction in gene-edited cells. Parental Jurkat cells and clone 6, 8 and 12 cells were lentivirally transduced

with shRNAs targeting TRIM5 α or Luc as control or left untransduced. Cells were then infected with increasing amounts of HIV-1NL-GFP, N-MLVGFP or B-MLVGFP in the absence or presence of IFN- β . The % of GFP-positive cells was determined 2 days later by FACS.

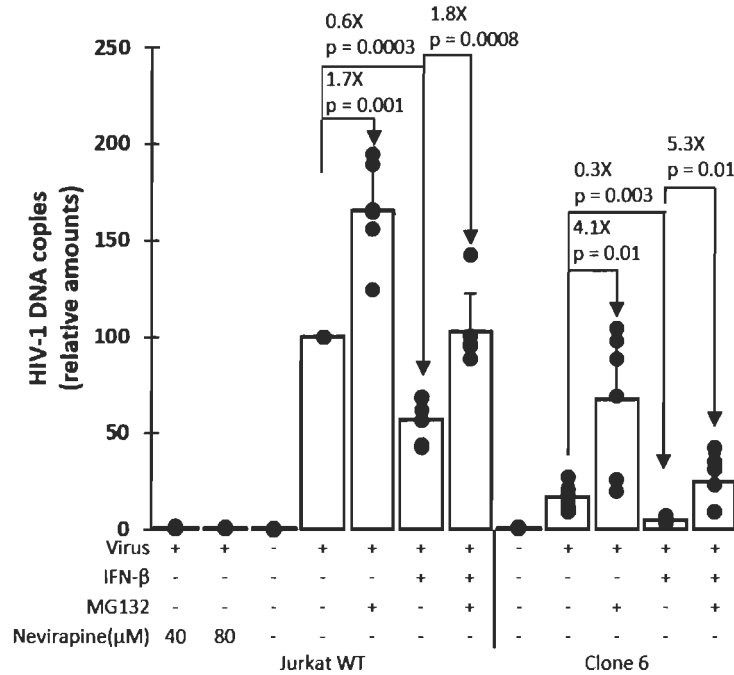


Figure 2.5 HIV-1 cDNA synthesis is inhibited in TRIM5-edited clone 6 Jurkat cells but is rescued by MG132 treatment.

HIV-1 cDNA synthesis is inhibited in TRIM5-edited clone 6 Jurkat cells but is rescued by MG132 treatment. Parental (WT) Jurkat cells and clone 6 cells were treated or not as indicated with IFN- β , MG132 or the reverse transcriptase inhibitor nevirapine (as a DNA contamination control). Cells were then infected for 6 h with HIV-1NL-GFP, followed by DNA extraction and qPCR with primers specific for HIV-1 vector cDNA (GFP sequence) and for the cellular gene GAPDH for normalization purposes. Results are presented as HIV-1 cDNA copy numbers adjusted according to GAPDH copy numbers and normalized to the no-drug WT cells control, which is set at 100%. p-values were calculated using the Student's t-test.

2.3.5 Discussion

Despite an increased focus from the HIV-1 research community on cure research in recent years (Margolis et al., 2020), aiming in particular at eliminating latent reservoirs

(Cohn et al., 2020), we are still far from a sterilizing or functional cure. Similarly, and despite some recent conceptual advances such as novel strategies to elicit the production of broadly neutralizing antibodies (Thomas, Ruggiero, Paxton & Pollakis, 2020), vaccine prospects remain seemingly out of reach (Del Moral-Sánchez & Sliepen, 2019; Stephenson, Wagh, Korber & Barouch, 2020). The field of HIV-1 drug research continues to show impressive progress, such as the ongoing emergence of long-acting antiviral drugs (Swindells et al., 2020) and of the HIV-1 capsid protein as a novel drug target (Bester et al., 2020). However, curative treatments are still elusive, and multidrug resistance is a persistent concern (Blair, 2020). Thus, the search for alternative strategies is still a priority. HIV-1 is one of the rare infectious diseases for which a genetic intervention is sensible. Indeed, it is a life-long infection whose treatment is expensive and which results in diminished life expectancy and lessened quality of life, even in successfully treated patients (Basavaraj, Navya & Rashmi, 2010; Katz & Maughan-Brown, 2017; Pozniak, 2014). If successful, a one-off genetic intervention would represent an attractive option for HIV-1 patients. Most genetic strategies presently explored with the aim of inhibiting HIV-1 involve the knockdown or knockout of the HIV-1 co-receptor CCR5, but this approach is not without caveats (see introduction).

In this study, we demonstrate that editing of the intrinsic, innate effector TRIM5 α protects human cells against infection by HIV-1. Although such an approach has been conceptualized before by us and others (Dufour et al., 2018; Koujah, Shukla & Naqvi, 2019), this study constitutes the first proof-of-concept for the protection against a pathogen provided by editing of an innate effector, to the best of our knowledge. Yet, we encountered a major difficulty in that biallelic modification seemed to be a rare event, with only one out of 6 HDR-edited clones having the desired mutations on both alleles. Clones with R332G-R335G introduced into only one of the two alleles showed a mild restriction phenotype, which necessitated IFN-I treatment to be revealed. Co-expression of restrictive and nonrestrictive TRIM5 α alleles is expected to lead to a weak restriction phenotype. Indeed, distinct TRIM5 α proteins can form heterodimers (Battivelli, Migraine, Lecossier, Matsuoka, et al., 2011; Berthoux et al., 2005), and a TRIM5 α lattice containing both capsid-targeting and -nontargeting monomers would

probably bind the viral core weakly. If TRIM5 α is to be pursued in gene editing approaches to suppress HIV-1, it is crucial to develop strategies that improve the rate of biallelic editing. When this project was initiated, co-transfection of CRISPR components and donor DNA was the only option available for precise genome editing. Methods for introducing discrete substitutions in eukaryotic genomes have vastly improved and diversified since and now include adeno-associated viral vector-mediated delivery of the donor DNA for HDR (Gaj et al., 2017); various pharmacological, physical or genetic methods to improve HDR rates (Canny et al., 2018; Guo et al., 2018; Kurihara et al., 2020; Li et al., 2020); and base editing, which does not require DNA cuts nor a donor DNA (Molla & Yang, 2019). Taking advantage of these recent innovations, we consider it likely that it will soon be possible to achieve efficient biallelic editing of *TRIM5*, along with other restriction factor genes, in human cells, resulting in a profound disruption of HIV-1 infectivity.

2.3.6 Supplementary Materials

The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: HDR editing-specific PCR screening of Jurkat cells transfected with CRISPR-Cas9 RNPs and donor ssDNA, Figure S2: HaeIII screening of selected Jurkat clones, Figure S3: MiSeq sequencing results for all clones analyzed, Figure S4: Permissiveness of HDR-edited clone 17 to HIV-1NL-GFP infection.

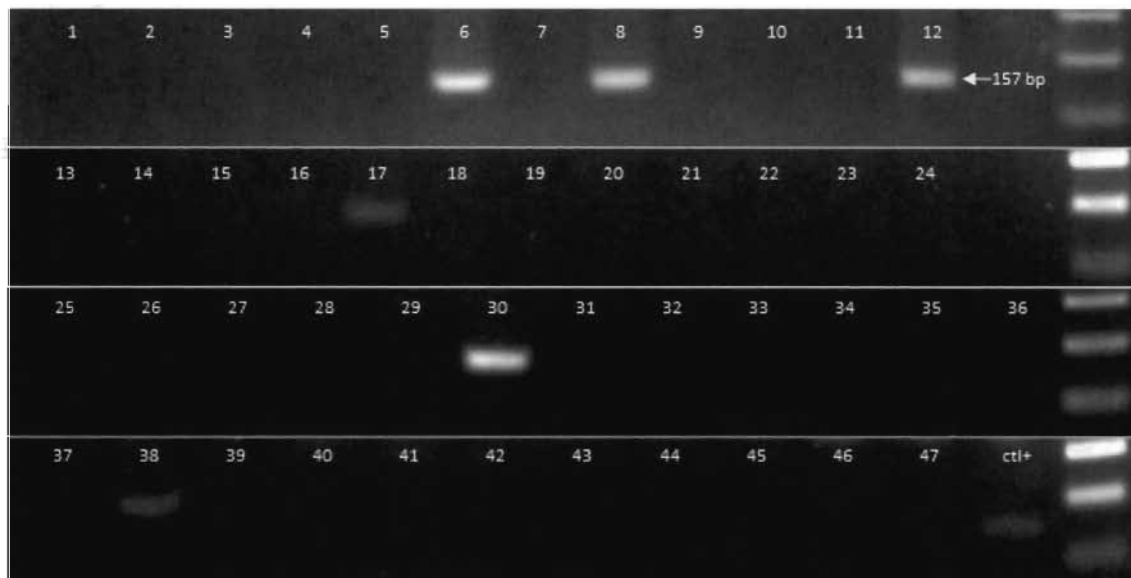


Figure S1 HDR editing-specific PCR screening of Jurkat cells transfected with CRISPR-Cas9 RNPs and donor ssDNA.

Forty-seven isolated Jurkat clones were screened for HDR-edited TRIM5 gene by PCR using a mutated TRIM5 specific primer. The presence of a 157 bp band indicates that the primer could bind and that the clone was modified. Six clones have passed this pre-screen step for 13% of modification.

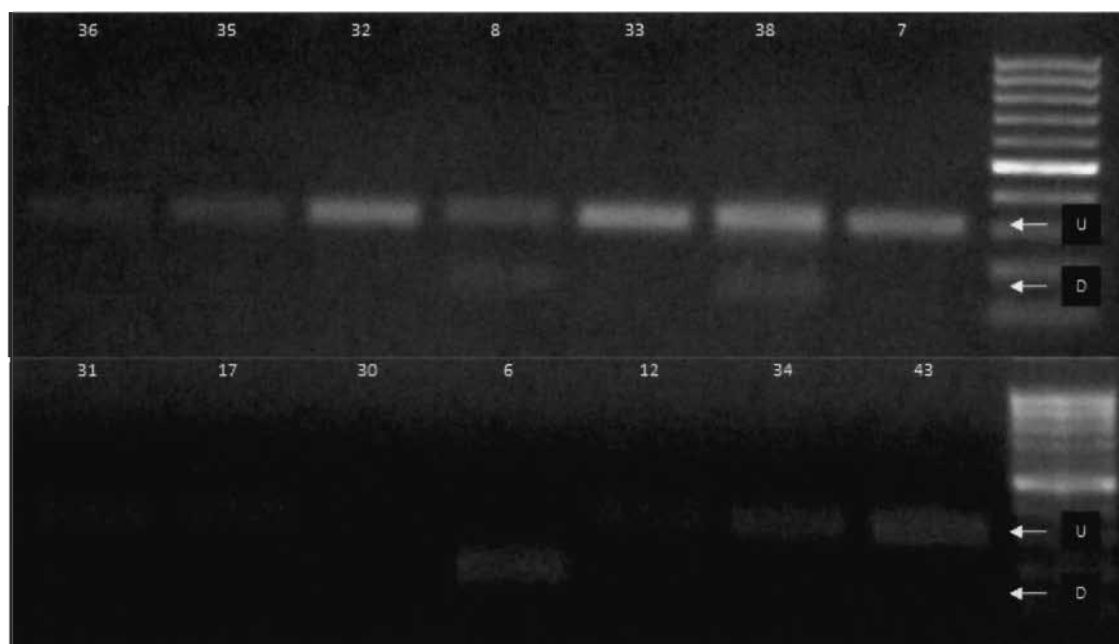


Figure S2 **HaeIII screening of selected Jurkat clones.**

A PCR for the targeted region followed by digestion with HaeIII was performed on 14 clones. The 304 bp band corresponds to an amplification without digestion (U band). Clones that were mutated with the silent mutation creating the HaeIII site show a 152 bp band (D band).

		N mutations	Indels	Subst.
Clone 6	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGCAAGATAACCAGACATTT	5/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGCAAGATAACCAGACATTT	5/8	n	n
Clone 7	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 8	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGTAAGATAACCAGACATTT	4/8	n	y
Clone 12	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGTAAGATAACCAGACATTT	4/8	n	y
Clone 17	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGTAAGATAACCAGACATTT	4/8	n	y
Clone 30	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGTAAGATAACCAGACATTT	4/8	n	y
Clone 31	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGG-CACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	y	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 32	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 33	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGG-CACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	y	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 34	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 35	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 36	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
Clone 38	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCAGGGGTAAGATAACCAGACATTT	4/8	n	y
Clone 43	COGAAACCATA-----TGAATTCATTAIT	0/8	y	y
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n
	COGAAACCACAGATAAATAATATGCGGGCACGAGGCAAGATAACCAGACATTT	0/8	n	n

Figure S3 MiSeq sequencing results for all clones analyzed.

At the top, the mutation strategy compared to the wild-type allele of the TRIM5 gene. The mutation strategy consists in 8 introduced substitutions, including 2 non-silent substitutions to mutate Arg332 into Gly (blue), 1 non-silent substitution to mutate Arg335 into Gly (blue), a silent mutation to disrupt the PAM sequence (purple), a silent mutation to create a HaeIII restriction site (green) and 3 silent mutations of the sequence targeted by gRNA1 (grey). The HDR-modified region was amplified by PCR and the PCR products were then analyzed by Illumina MiSeq sequencing.

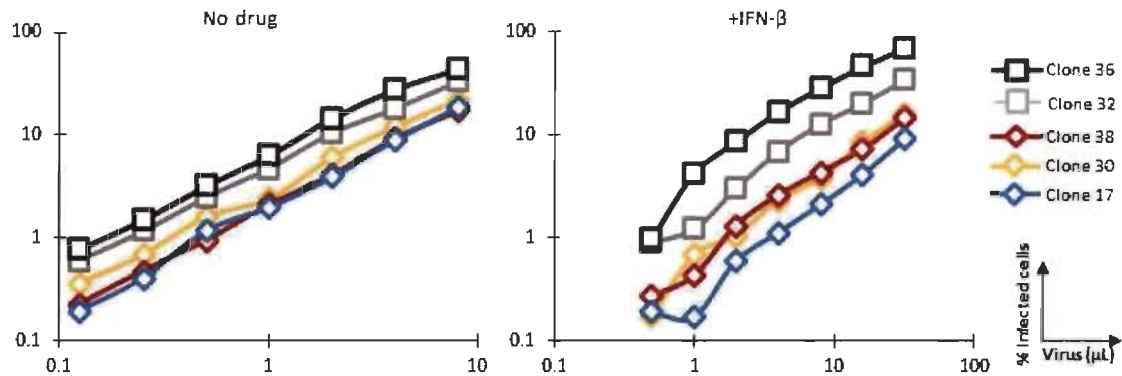


Figure S4 Permissiveness of HDR-edited clone 17 to HIV-1NL-GFP infection. Permissiveness of HDR-edited and unedited control Jurkat cell populations to infection with HIV-1NL-GFP. Cells were infected with increasing amounts of HIV-1NL-GFP in the absence (left) or presence (right) of IFN- β (10 ng/mL), and the % of GFP-positive cells was determined 2 days later by FACS. Results are presented for 3 clonal populations containing HDR-edited alleles (diamond symbols) and 2 negative clones (squares). Clone containing a deletion in one of the alleles is shown in red.

2.3.7 Author Contributions

Conceptualization, L.B.; methodology, K.D., L.O., L.B.; formal analysis, L.B., K.D., N.M., M.B.P., L.O.; investigation, K.D., L.B., L.O.; resources, C.D., A.C.; writing—original draft preparation, L.B. and K.D.; writing—review and editing, L.B., N.M. and K.D.; supervision, L.B., M.B.P. and N.M.; project administration, L.B.; funding acquisition, L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

2.3.8 Funding

This research was funded by a grant from Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières. L.O. was supported by a MITACS Globalink grant. C.D. received M.Sc. scholarships from Canadian Institutes of Health Research and from the Fonds de Recherche du Québec–Santé.

2.3.9 Institutional Review Board Statement

Not applicable.

2.3.10 Informed Consent Statement

Not applicable.

2.3.11 Data Availability Statement

The data presented in this study are openly available at FigShare: https://figshare.com/projects/D_saulniers_et_al_2021/93836.

2.3.12 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

2.3.13 References

- Allers, K., Hütter, G., Hofmann, J., Loddenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E. & Schneider, T. (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood*, 117(10), 2791-2799. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-09-309591>
- Anderson, J. L., Campbell, E. M., Wu, X., Vandegraaff, N., Engelman, A. & Hope, T. J. (2006). Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. *J Virol*, 80(19), 9754-9760. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01052-06>
- Angel, J. B., Parato, K. G., Kumar, A., Kravcik, S., Badley, A. D., Fex, C., . . . Cameron, D. W. (2001). Progressive human immunodeficiency virus-specific immune recovery with prolonged viral suppression. *J Infect Dis*, 183(4), 546-554. <http://dx.doi.org/10.1086/318547>

- Basavaraj, K. H., Navya, M. A. & Rashmi, R. (2010). Quality of life in HIV/AIDS. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*, 31(2), 75-80. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7184.74971>
- Battivelli, E., Migraine, J., Lecossier, D., Yeni, P., Clavel, F. & Hance, A. J. (2011). Gag cytotoxic T lymphocyte escape mutations can increase sensitivity of HIV-1 to human TRIM5alpha, linking intrinsic and acquired immunity. *J Virol*, 85(22), 11846-11854. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.05201-11>
- Bérubé, J., Bouchard, A. & Berthoux, L. (2007). Both TRIM5alpha and TRIMCyp have only weak antiviral activity in canine D17 cells. *Retrovirology*, 4, 68. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-4-68>
- Bester, S. M., Wei, G., Zhao, H., Adu-Ampratwum, D., Iqbal, N., Courouble, V. V., . . . Kvaratskhelia, M. (2020). Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor. *Science*, 370(6514), 360-364. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb4808>
- Black, L. R. & Aiken, C. (2010). TRIM5alpha disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J Virol*, 84(13), 6564-6569. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00210-10>
- Blair, H. A. (2020). Ibalizumab: A Review in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *Drugs*, 80(2), 189-196. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-020-01258-3>
- Campbell, E. M., Weingart, J., Sette, P., Opp, S., Sastri, J., O'Connor, S. K., . . . Bouamr, F. (2016). TRIM5 α -Mediated Ubiquitin Chain Conjugation Is Required for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization. *J Virol*, 90(4), 1849-1857. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01948-15>
- Canny, M. D., Moatti, N., Wan, L. C. K., Fradet-Turcotte, A., Krasner, D., Mateos-Gomez, P. A., . . . Durocher, D. (2018). Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 36(1), 95-102. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4021>
- Cohn, L. B., Chomont, N. & Deeks, S. G. (2020). The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell Host Microbe*, 27(4), 519-530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.014>
- Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A. & Prado, J. G. (2018). Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol*, 9, 2876. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>

- Del Moral-Sánchez, I. & Sliepen, K. (2019). Strategies for inducing effective neutralizing antibody responses against HIV-1. *Expert Rev Vaccines*, 18(11), 1127-1143. <http://dx.doi.org/10.1080/14760584.2019.1690458>
- Désaulniers, K., Ortiz, L., Dufour, C., Claudel, A., Plourde, M. B., Merindol, N. & Berthoux, L. (2020). Editing of the TRIM5 Gene Decreases the Permissiveness of Human T Lymphocytic Cells to HIV-1. *Viruses*, 13(1). <http://dx.doi.org/10.3390/v13010024>
- Fletcher, A. J., Christensen, D. E., Nelson, C., Tan, C. P., Schaller, T., Lehner, P. J., . . . Towers, G. J. (2015). TRIM5 α requires Ube2W to anchor Lys63-linked ubiquitin chains and restrict reverse transcription. *EMBO J*, 34(15), 2078-2095. <http://dx.doi.org/10.15252/embj.201490361>
- Gaj, T., Staahl, B. T., Rodrigues, G. M. C., Limsirichai, P., Ekman, F. K., Doudna, J. A. & Schaffer, D. V. (2017). Targeted gene knock-in by homology-directed genome editing using Cas9 ribonucleoprotein and AAV donor delivery. *Nucleic Acids Res*, 45(11), e98. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx154>
- Ganser-Pornillos, B. K., Chandrasekaran, V., Pornillos, O., Sodroski, J. G., Sundquist, W. I. & Yeager, M. (2011). Hexagonal assembly of a restricting TRIM5 α protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 534-539. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1013426108>
- Ganser-Pornillos, B. K. & Pornillos, O. (2019). Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nat Rev Microbiol*, 17(9), 546-556. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0225-2>
- Granier, C., Battivelli, E., Lécuroux, C., Venet, A., Lambotte, O., Schmitt-Boulanger, M., . . . Hance, A. J. (2013). Pressure from TRIM5 α contributes to control of HIV-1 replication by individuals expressing protective HLA-B alleles. *J Virol*, 87(18), 10368-10380. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01313-13>
- Guo, Q., Mintier, G., Ma-Edmonds, M., Storton, D., Wang, X., Xiao, X., . . . Feder, J. N. (2018). 'Cold shock' increases the frequency of homology directed repair gene editing in induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 8(1), 2080. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20358-5>
- Hagos, L., Fessehaye, S. & Anand, I. S. (2019). Nature and prevalence of adverse drug reaction of antiretroviral medications in Halibet National Referral Hospital: a retrospective study. *BMC Pharmacol Toxicol*, 20(1), 24. <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-019-0307-9>

- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S. & Bieniasz, P. D. (2004). Retrovirus resistance factors Ref1 and Lvl are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29), 10774-10779. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402361101>
- He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., . . . Gabuzda, D. (1997). CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*, 385(6617), 645-649. <http://dx.doi.org/10.1038/385645a0>
- Imam, S., Kömürlü, S., Mattick, J., Selyutina, A., Talley, S., Eddins, A., . . . Campbell, E. M. (2019). K63-Linked Ubiquitin Is Required for Restriction of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization by Rhesus TRIM5α. *J Virol*, 93(14). <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00558-19>
- Jung, U., Urak, K., Veillette, M., Nepveu-Traversy, M., Pham, Q. T., Hamel, S., . . . Berthoux, L. (2015). Preclinical Assessment of Mutant Human TRIM5α as an Anti-HIV-1 Transgene. *Hum Gene Ther*, 26(10), 664-679. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2015.059>
- Kan, Y., Ruis, B., Takasugi, T. & Hendrickson, E. A. (2017). Mechanisms of precise genome editing using oligonucleotide donors. *Genome Res*, 27(7), 1099-1111. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.214775.116>
- Kang, H., Minder, P., Park, M. A., Mesquitta, W. T., Torbett, B. E. & Slukvin, II. (2015). CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4, e268. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2015.42>
- Katz, I. T. & Maughan-Brown, B. (2017). Improved life expectancy of people living with HIV: who is left behind? *Lancet HIV*, 4(8), e324-e326. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018\(17\)30086-3](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018(17)30086-3)
- Keown, J. R., Yang, J. X., Douglas, J. & Goldstone, D. C. (2016). Characterisation of assembly and ubiquitylation by the RBCC motif of Trim5α. *Sci Rep*, 6, 26837. <http://dx.doi.org/10.1038/srep26837>
- Kordelas, L., Verheyen, J., Beelen, D. W., Horn, P. A., Heinold, A., Kaiser, R., . . . Esser, S. (2014). Shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 Delta32 mutation. *N Engl J Med*, 371(9), 880-882. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1405805>
- Koujah, L., Shukla, D. & Naqvi, A. R. (2019). CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy. *Semin Cell Dev Biol*, 96, 53-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semdb.2019.04.004>

- Kurihara, T., Kouyama-Suzuki, E., Satoga, M., Li, X., Badawi, M., Thiha, . . . Tabuchi, K. (2020). DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 524(3), 621-628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.132>
- Kutluay, S. B., Perez-Caballero, D. & Bieniasz, P. D. (2013). Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003214. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003214>
- Li, G., Zhang, X., Wang, H., Liu, D., Li, Z., Wu, Z. & Yang, H. (2020). Increasing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed DNA repair by histone deacetylase inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*, 125, 105790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105790>
- Li, X., Yeung, D. F., Fiegen, A. M. & Sodroski, J. (2011). Determinants of the higher order association of the restriction factor TRIM5alpha and other tripartite motif (TRIM) proteins. *J Biol Chem*, 286(32), 27959-27970. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.260406>
- Li, Y., Li, X., Stremlau, M., Lee, M. & Sodroski, J. (2006). Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J Virol*, 80(14), 6738-6744. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00270-06>
- Malbec, M., Pham, Q. T., Plourde, M. B., L  tourneau-Hogan, A., Nepveu-Traversy, M. E. & Berthoux, L. (2010). Murine double minute 2 as a modulator of retroviral restrictions mediated by TRIM5alpha. *Virology*, 405(2), 414-423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.021>
- Margolis, D. M., Archin, N. M., Cohen, M. S., Eron, J. J., Ferrari, G., Garcia, J. V., . . . Wahl, A. (2020). Curing HIV: Seeking to Target and Clear Persistent Infection. *Cell*, 181(1), 189-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.005>
- Merindol, N. & Berthoux, L. (2015). Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr HIV Res*, 13(6), 448-461. <http://dx.doi.org/10.2174/1570162x13666150608104412>
- Molla, K. A. & Yang, Y. (2019). CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. *Trends Biotechnol*, 37(10), 1121-1142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008>
- Na, L., Tang, Y. D., Wang, C., Liu, C. & Wang, X. (2018). Rhesus monkey TRIM5alpha protein SPRY domain contributes to AP-1 activation. *J Biol Chem*, 293(8), 2661-2674. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA117.000127>

- Nepveu-Traversy, M., Demogines, A., Fricke, T., Plourde, M. B., Riopel, K., Veillette, M., . . . Berthoux, L. (2016). A putative SUMO interacting motif in the B30.2/SPRY domain of rhesus macaque TRIM5 α important for NF- κ B/AP-1 signaling and HIV-1 restriction. *Heliyon*, 2(1), e00056. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00056>
- Passerini, L. D., Keckesova, Z. & Towers, G. J. (2006). Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5 α act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription. *J Virol*, 80(5), 2100-2105. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.80.5.2100-2105.2006>
- Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T., Yang, A., Cowan, S. & Bieniasz, P. D. (2005). Human tripartite motif 5 α domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J Virol*, 79(14), 8969-8978. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.14.8969-8978.2005>
- Pham, Q. T., Veillette, M., Brandariz-Nuñez, A., Pawlica, P., Thibert-Lefebvre, C., Chandonnet, N., . . . Berthoux, L. (2013). A novel aminoacid determinant of HIV-1 restriction in the TRIM5 α variable 1 region isolated in a random mutagenic screen. *Virus Res*, 173(2), 306-314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.013>
- Pozniak, A. (2014). Quality of life in chronic HIV infection. *Lancet HIV*, 1(1), e6-7. [http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018\(14\)70003-7](http://dx.doi.org/10.1016/s2352-3018(14)70003-7)
- Qi, C., Li, D., Jiang, X., Jia, X., Lu, L., Wang, Y., . . . Wei, M. (2018). Inducing CCR5 Δ 32/ Δ 32 Homozygotes in the Human Jurkat CD4⁺ Cell Line and Primary CD4⁺ Cells by CRISPR-Cas9 Genome-Editing Technology. *Mol Ther Nucleic Acids*, 12, 267-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.012>
- Ribeiro, C. M., Sarrami-Forooshani, R., Setiawan, L. C., Zijlstra-Willems, E. M., van Hamme, J. L., Tigchelaar, W., . . . Geijtenbeek, T. B. (2016). Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5 α in dendritic cell subsets. *Nature*, 540(7633), 448-452. <http://dx.doi.org/10.1038/nature20567>
- Rose, R., Nolan, D. J., Maidji, E., Stoddart, C. A., Singer, E. J., Lamers, S. L. & McGrath, M. S. (2018). Eradication of HIV from Tissue Reservoirs: Challenges for the Cure. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 34(1), 3-8. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2017.0072>
- Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M. & Malik, H. S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 α identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2832-2837. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409853102>

- Schoggins, J. W. & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*, 1(6), 519-525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>
- Stephenson, K. E., Wagh, K., Korber, B. & Barouch, D. H. (2020). Vaccines and Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention. *Annu Rev Immunol*, 38, 673-703. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-080219-023629>
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977), 848-853. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02343>
- Swindells, S., Andrade-Villanueva, J. F., Richmond, G. J., Rizzardini, G., Baumgarten, A., Masiá, M., . . . Spreen, W. R. (2020). Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine for Maintenance of HIV-1 Suppression. *N Engl J Med*, 382(12), 1112-1123. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1904398>
- Thomas, J., Ruggiero, A., Paxton, W. A. & Pollakis, G. (2020). Measuring the Success of HIV-1 Cure Strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 134. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00134>
- Veillette, M., Bichel, K., Pawlica, P., Freund, S. M., Plourde, M. B., Pham, Q. T., . . . Berthoux, L. (2013). The V86M mutation in HIV-1 capsid confers resistance to TRIM5 α by abrogation of cyclophilin A-dependent restriction and enhancement of viral nuclear import. *Retrovirology*, 10, 25. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-25>
- Verheyen, J., Thielen, A., Lübke, N., Dirks, M., Widera, M., Dittmer, U., . . . Esser, S. (2019). Rapid Rebound of a Preexisting CXCR4-tropic Human Immunodeficiency Virus Variant After Allogeneic Transplantation With CCR5 Δ 32 Homozygous Stem Cells. *Clin Infect Dis*, 68(4), 684-687. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy565>
- Walker, J. E., Chen, R. X., McGee, J., Nacey, C., Pollard, R. B., Abedi, M., . . . Anderson, J. S. (2012). Generation of an HIV-1-resistant immune system with CD34(+) hematopoietic stem cells transduced with a triple-combination anti-HIV lentiviral vector. *J Virol*, 86(10), 5719-5729. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.06300-11>
- Wilson, S. J., Webb, B. L., Maplanka, C., Newman, R. M., Verschoor, E. J., Heeney, J. L. & Towers, G. J. (2008). Rhesus macaque TRIM5 alleles have divergent antiretroviral specificities. *J Virol*, 82(14), 7243-7247. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00307-08>

- Xu, L., Yang, H., Gao, Y., Chen, Z., Xie, L., Liu, Y., . . . Deng, H. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Mol Ther*, 25(8), 1782-1789. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.027>
- Yap, M. W., Nisole, S. & Stoye, J. P. (2005). A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. *Curr Biol*, 15(1), 73-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.042>
- Yu, A., Skorupka, K. A., Pak, A. J., Ganser-Pornillos, B. K., Pornillos, O., & Voth, G. A. (2020). TRIM5 α self-assembly and compartmentalization of the HIV-1 viral capsid. *Nat Commun*, 11(1), 1307. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15106-1>
- Zhao, G. & Zhang, P. (2014). CryoEM analysis of capsid assembly and structural changes upon interactions with a host restriction factor, TRIM5 α . *Methods Mol Biol*, 1087, 13-28. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_2

CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

Malgré plusieurs décennies de recherche, nous n'avons toujours pas développé de traitement efficace permettant la guérison du VIH-1. Plusieurs défis dans le traitement du VIH-1 ont marqué la dernière décennie en particulier l'émergence de nouvelles résistances contre la chimiothérapie antirétrovirale (Blair, 2020; Shin, Park & Yoon, 2021). En revanche, de nombreux progrès ont été fait dans le domaine de la thérapie génique visant à traiter les infections par le VIH-1. La découverte de la technique utilisant les propriétés de CRISPR-Cas9 a grandement facilité l'édition génomique et provoqué un intérêt intense envers cette voie thérapeutique.

3.1 Contributions de cette maîtrise à l'avancement des connaissances

Actuellement, les personnes infectées sont traitées avec une chimiothérapie antirétrovirale et les coûts pour notre société associés à cette thérapie sont non négligeables. Cette thérapie n'éradique pas complètement le VIH-1, les patients prennent un cocktail de médicaments de façon journalière et toute leur vie. De plus, les patients sous cette thérapie sont affectés par de nombreux effets secondaires. Jusqu'ici, les tentatives de thérapie génique ont ciblé les corécepteurs CCR5 et CXCR4, certaines protéines hôtes nécessaires au cycle viral et la région LTR du provirus intégré. En utilisant l'édition génomique, mais une cible différente, ce projet a démontré que la thérapie génique est une avenue prometteuse pour traiter le VIH-1.

Les rétrovirus peuvent être restreints par une famille d'effecteurs immunitaires innés, les facteurs de restriction (Soliman, Srikrishna & Balagopal, 2017). Le VIH-1 possède des mécanismes d'évasion pour contrer les facteurs de restrictions lui permettant de se propager dans les cellules humaines et d'établir des infections persistantes chez les

patients. Récemment, les déterminants clés qui rétablissent la restriction du VIH-1 par huTRIM5 α ont été identifiés. En effet, en surexprimant huTRIM5 α portant les mutations R332G et R335G, il est possible d'augmenter le niveau de restrictions des cellules et de procurer un avantage de survie par rapport aux cellules sauvages (Jung et al., 2015; Pham et al., 2010). Jusqu'à présent, la méthode utilisée pour exprimer les protéines mutées était la surexpression par transduction à l'aide de vecteurs lentiviraux. Cette méthode n'est pas sans conséquence puisque la protéine n'est pas exprimée à des niveaux physiologiques. Les implications d'une surabondance de TRIM5 α ne sont pas connues et pourraient être non négligeables. TRIM5 α est impliquée dans des processus tels que l'inflammation (Nepveu-Traversy & Berthoux, 2014) et l'autophagie (Ribeiro et al., 2016). De plus, les vecteurs lentiviraux s'intégrant dans le génome génèrent de l'inflammation et pourraient avoir des effets néfastes sur le génome à long terme (Nowrouzi et al., 2011). L'avantage de l'édition génomique par rapport à la surexpression est que les effecteurs antiviraux mutés seraient exprimés à des niveaux physiologiques et ils seraient régulés en réponse à l'IFN-I *in vivo*.

Ce projet a permis de valider l'hypothèse que l'introduction de mutations connues dans le gène humain TRIM5 permet de rétablir la capacité de TRIM5 α à détecter la capsid du VIH-1. Ce projet a permis de démontrer *in vitro* le pouvoir antiviral résultant de l'édition génomique du gène codant pour la protéine TRIM5 α . En absence d'IFN, cette édition a procuré un niveau de restriction 10 fois supérieur par rapport aux cellules sauvages et un niveau de restriction semblable aux cellules surexprimant la protéine mutée. Plus encore, la régulation de TRIM5 α par l'IFN est non négligeable, elle procure un niveau de restriction jusqu'à 50 fois supérieur chez les cellules modifiées par rapport aux cellules sauvages et un niveau de restriction 10 fois supérieur par rapport aux cellules surexprimant la protéine mutée.

3.2 Perspectives d'avenir

3.2.1 Nouvelles cibles pour la thérapie génique

Le futur de ce projet réside dans la modification génique des cellules souches de patients VIH-1 positif lors d'essais cliniques. Ce travail a permis de générer des données sur l'efficacité de la restriction résultant de l'édition génomique du gène codant pour la protéine TRIM5 α . Cependant, des données doivent être générées pour évaluer l'efficacité résultant de l'édition génomique des autres facteurs de restriction de façon individuelle. Des expériences de combinaisons de facteurs de restriction mutés pourront être tentées afin d'obtenir un effet antiviral plus élevé. Une combinaison de facteurs de restriction mutés permet aussi d'éviter que certaines mutations du VIH-1 non sensible à la modification d'un facteur unique se propagent par pression sélective.

APOBEC3G et la tétherine sont des facteurs de restrictions capables de restreindre le VIH-1 en interférant avec différentes étapes du cycle viral. Le génome viral du VIH-1 code pour des protéines virales spécialisées telles que Vif et Vpu. Ces protéines virales spécialisées favorisent la dégradation des facteurs de restrictions et elles permettent au VIH-1 d'établir des infections persistantes chez l'humain. La protéine virale Vif favorise la dégradation d'APOBEC3G et l'empêche donc de pouvoir exercer son effet antiviral (Mariani et al., 2003; Stopak et al., 2003). La protéine virale Vpu favorise la dégradation de la tétherine et elle antagonise son effet antiviral (Dubé et al., 2009). L'introduction de mutations dans les gènes humains de ces facteurs de restriction peut contrecarrer les mécanismes d'évasion du VIH-1. L'insertion de la mutation D128K dans le gène humain du facteur de restriction APOBEC3G perturbe l'interaction avec Vif et diminue sa dégradation (Schröfelbauer et al., 2004; Xu et al., 2004). Lorsqu'elle est surexprimée, la protéine APOBEC3G mutée augmente le niveau de restriction face au VIH-1 (Schröfelbauer et al., 2004; Xu et al., 2004). L'insertion de la mutation T45I dans le gène humain du facteur de restriction de la tétherine perturbe l'interaction avec Vpu et diminue sa dégradation (Gupta et al., 2009; McNatt et al., 2009). Plus encore, une combinaison de la mutation T45I avec une délétion des deux acides aminés GI permettent au mutant d'être

complètement résistant à l'antagonisme Vpu tout en gardant son plein potentiel d'activité antivirale (McNatt et al., 2009).

En addition à CCR5, d'autres protéines cellulaires indispensables à la réplication du VIH-1 pourraient être ciblées (voir la sous-section 1.2.5 Cycle viral). La suppression de ces gènes auxiliaires peut être une stratégie pour bloquer l'infection par le VIH-1, tant que la perte de ces gènes n'a aucun effet sur la cellule et sur l'hôte. Avant la translocation nucléaire, le VIH-1 doit s'amarrer au pore nucléaire grâce à la protéine de l'hôte Nup358 et un KO de cette protéine perturbe le cycle viral (Schaller et al., 2011). Nup153 est une protéine de l'hôte impliquée dans la translocation du PIC à travers le pore nucléaire et un KO de cette protéine perturbe le cycle viral en bloquant l'importation nucléaire (Di Nunzio et al., 2012). La translocation nucléaire nécessite la protéine hôte LEDGF et la thérapie génique a été appliquée avec succès sur ce facteur pour créer une résistance au VIH-1 (Hultquist et al., 2016). Hultquist et al ont aussi effectué un KO de TNPO3, une protéine de l'hôte nécessaire à l'intégration virale et la perte de cette protéine a conduit à une inhibition (Hultquist et al., 2016).

3.2.2 Limites de la méthode

Avec un taux de modifications par HDR de 13 %, l'optimisation de notre processus d'édition génomique est cruciale. Nos résultats pour les clones hétérozygotes ont démontré qu'il est nécessaire que les deux allèles du gène du facteur de restriction TRIM5 α soient modifiés pour avoir un effet thérapeutique maximal lorsque le facteur est modifié de façon individuelle. Cependant, seulement un clone présentait les deux allèles modifiés soulignant le besoin criant d'optimiser le processus d'édition génomique. Cette optimisation doit prendre en compte les limites de l'édition génomique par HDR, elle doit inclure le vecteur de livraison et la méthode d'édition.

3.2.2.1 Toxicité

Les DSB induits par Cas9 peuvent être toxiques pour la cellule, l'activation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN déclenche souvent l'apoptose (Ihry et al., 2018). La toxicité immunogène due à la composante CRISPR-Cas9 et avec les vecteurs viraux est également possible. Une étude a démontré que plus de la moitié des sujets humains participant à l'étude possédaient des anticorps anti-Cas9 préexistants contre les deux orthologues de Cas9 les plus couramment utilisés, SpCas9 et SaCas9 (Charlesworth et al., 2019).

3.2.2.2 Événements hors cible

Une préoccupation majeure concernant l'édition génomique utilisant CRISPR-Cas9 est la génotoxicité induite par les événements hors cible. Lors de l'édition génomique utilisant CRISPR-Cas9, des événements hors cible peuvent être observés jusqu'à une fréquence d'environ 50 % (Zhang, Tee, Wang, Huang & Yang, 2015). Certains orthologues de Cas9 et certaines variantes de Cas9 de même que l'optimisation de la conception des gRNA peuvent réduire la fréquence des événements hors cible (X. H. Zhang et al., 2015). Les DSB peuvent provoquer des délétions importantes et des réarrangements complexes dans l'ADN cible (Kosicki, Tomberg & Bradley, 2018). Une stratégie qui minimise les événements hors cible utilise Cas9n avec une combinaison de gRNA ciblant les deux brins de l'ADN (X. H. Zhang et al., 2015).

3.2.2.3 Choix de l'orthologue de Cas9 et vecteur de livraison

L'exigence de la présence d'un motif PAM à proximité du site ciblé est une limite supplémentaire. SpCas9 est l'orthologue le plus largement utilisé, elle présente un motif de reconnaissance PAM court de séquence NGG (Lino, Harper, Carney & Timlin, 2018). La taille de SpCas9 est d'environ 4,5 kb et elle ne peut pas être délivrée dans un vecteur AAV (Lino et al., 2018). SaCas9 a une taille d'environ 3,5 kb, elle peut être délivrée dans un vecteur AAV et elle est plus spécifique, elle reconnaît une séquence PAM plus longue NNGRRT (Ran et al., 2015). Une alternative intéressante pour augmenter le taux de

modification et diminuer les événements hors cible serait d'utiliser SaCas9 dans un vecteur AAV (Ran et al., 2015). Les vecteurs AAV possèdent plusieurs avantages, ils sont faiblement immunogènes, ils ne s'intègrent pas, ils ont une bonne efficacité de transduction, ils sont spécifiques tout en permettant une expression transitoire du matériel génétique (Mingozzi & High, 2013). Le vecteur AAV6 codant pour SaCas9 a été utilisé avec succès pour modifier le corécepteur CCR5 des LT CD4 et des cellules souches CD34 qui ont conservé leur pouvoir de se différencier (Xiao et al., 2019). Cette méthodologie pourrait être utilisée pour évaluer le taux d'efficacité d'une modification par HDR de TRIM5 α dans des LT CD4 et des cellules souches CD34. Il serait intéressant d'évaluer le niveau de restriction après la différenciation de cellules souches modifiées pour la protéine TRIM5 α .

Précédemment, notre laboratoire avait utilisé la méthode par transfection des composantes CRISPR-Cas9 pour modifier des cellules HEK293T pour le gène TRIM5 et le taux d'efficacité avait été de 10 % (Dufour et al., 2018). Dans ce projet, pour limiter la cytotoxicité associée avec les vecteurs lentiviraux, le complexe Cas9 a été livré par une électroporation de complexes RNP. Cependant, le taux d'efficacité de la HDR a été de 13 % et aucun clone n'avait les 8 mutations désirées. Tous les nucléotides modifiés sont près du site de coupure, confirmant les limites de la méthode de modification par HDR et l'importance de la distance entre les nucléotides à modifier avec le site de coupure.

3.2.3 L'édition de base

Généralement, l'édition génomique implique la génération d'un DSB dans l'ADN, suivie d'une réparation par la voie de NHEJ lorsque l'objectif est de générer un KO ou par la voie de HDR pour introduire une mutation (Figure 3.1a). CRISPR-Cas9 est très efficace pour générer une coupure, mais la voie de réparation par HDR est très inefficace chez les cellules eucaryotes (Savic et al., 2018). La voie de NHEJ est en concurrence avec la voie par HDR pour réparer l'ADN et cette compétition conduit plus souvent à la production d'indels par rapport à l'introduction de mutations désirées (Lin, Stahl, Alla & Doudna, 2014). La technique d'édition de base permet une édition génomique efficace

sans créer de DSB (Figure 3.1b) et la génération d'indel est limitée. Le BE se lie à une séquence d'ADN cible programmée par l'ARN guide et le domaine désaminase nucléosidique catalyse la désamination. Comme pour l'édition génomique par HDR, l'efficacité de l'édition de base est influencée par le niveau d'expression du gène à modifier (Koblan et al., 2018).

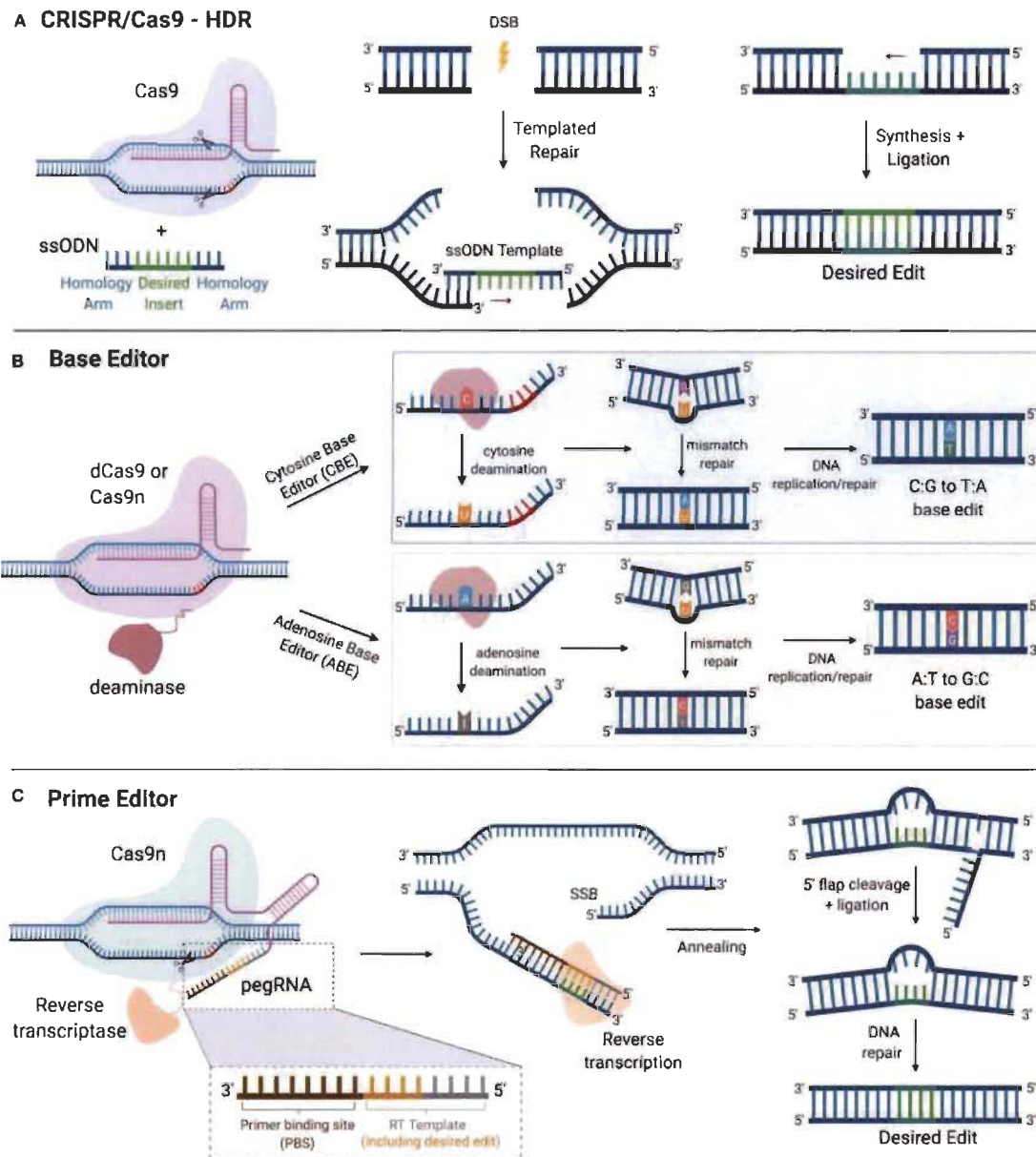


Figure 3.1 Technique d'édition génomique.

En a, la méthode classique d'édition génomique par CRISPR-Cas9 implique un DSB induit par Cas9 suivi par la réparation effectuée par HDR. En b, l'édition de base est effectuée par une nucléase dCas9 ou Cas9n

associée avec une désaminase nucléosidique. La cytosine désaminase catalyse la formation d'uracile à partir de la cytosine, l'uracile est perçu par la machinerie de réplication cellulaire comme une thymine et entraîne une conversion en T-A. L'adénosine désaminase catalyse la formation d'inosine à partir de l'adénosine, l'inosine est perçu par la machinerie de réplication cellulaire comme une guanosine et entraîne une conversion en G-C. En c, le *prime editing* utilise une Cas9n fusionnée avec une RT modifiée et avec un pegRNA. Le pegRNA contient la séquence complémentaire au site cible, un site de liaison d'amorce et une matrice codant pour l'édition souhaitée. Le pegRNA se lie au site de liaison de l'amorce sur l'ADN, l'ADN du brin contenant le PAM est non lié, il est clivé par la Cas9 et le clivage produit une amorce pour la RT. La RT se lie à son amorce et elle polymérise un fragment en utilisant la région du pegRNA contenant la matrice d'ARN codant pour l'édition souhaitée. (Uddin, Rudin & Sen, 2020).

Lors de l'édition d'ADN induite par une CBE, la cytosine est désaminée en uracile, la machinerie cellulaire perçoit l'uracile comme une thymine et entraîne une conversion en T-A (Eid et al., 2018). Cependant, la voie BER compétitionne pour réparer l'intermédiaire contenant l'uracile, elle entraîne le retour à l'appariement de départ CG et diminue l'efficacité des CBE (Komor et al., 2016). La deuxième génération de CBE a été optimisée pour augmenter de trois fois l'efficacité de l'édition en fusionnant UGI au complexe pour inhiber la BER (Komor et al., 2016). Pour augmenter l'efficacité, la troisième génération de CBE a été développée à partir de Cas9n contenant seulement la mutation dans le domaine RuvC pour permettre un clivage dans le brin contenant G de l'intermédiaire U-G (Komor et al., 2016). Le clivage perturbe la réparation causée par BER, il dirige la réparation de l'ADN vers le brin non édité et permet d'augmenter l'efficacité de l'édition de six fois comparativement aux CBE de deuxième génération (Komor et al., 2016).

Lors de l'édition d'ADN effectuée par ABE, l'adénine est désaminée en inosine, la machinerie cellulaire perçoit l'inosine comme une guanosine et entraîne une conversion en G-C (Gaudelli et al., 2017). L'enzyme connue pour reconnaître et éliminer l'inosine dans l'ADN est l'*alkyl adenine DNA glycosylase* (AAG) (Gaudelli et al., 2017). Cependant, l'AAG n'a pas d'effet sur l'efficacité de l'édition génomique causée par ABE et le produit de l'édition par ABE est plus pur avec moins de 0,1 % d'indels

comparativement aux CBE (Molla & Yang, 2019). L'optimisation des ABE a été effectuée en modifiant TadA* et les ABE de septièmes générations convertissent la cible A-T en G-C avec une efficacité de près de 50 % (Gaudelli et al., 2017).

Cependant, l'édition de base est limitée par la proximité entre le PAM de la Cas9 et la région à muter. Le nucléotide à muter doit se situer à l'intérieur d'une fenêtre d'activité de 5 bases (Figure 3.2) (Kim et al., 2017). Pour augmenter le nombre de bases à cibler, plusieurs versions de CBE ont été développées en incorporant différents orthologues de la nucléase Cas9 et plusieurs variants de Cas9 avec des séquences PAM modifiées (Hu et al., 2018; Kim et al., 2017). Les ABE ont montré une compatibilité limitée avec les orthologues de Cas9 d'une autre origine que SpCas9 (Richter et al., 2020). Les ABE de huitièmes générations ont été développées pour améliorer leurs compatibilités avec les divers orthologues de Cas9 (Richter et al., 2020).

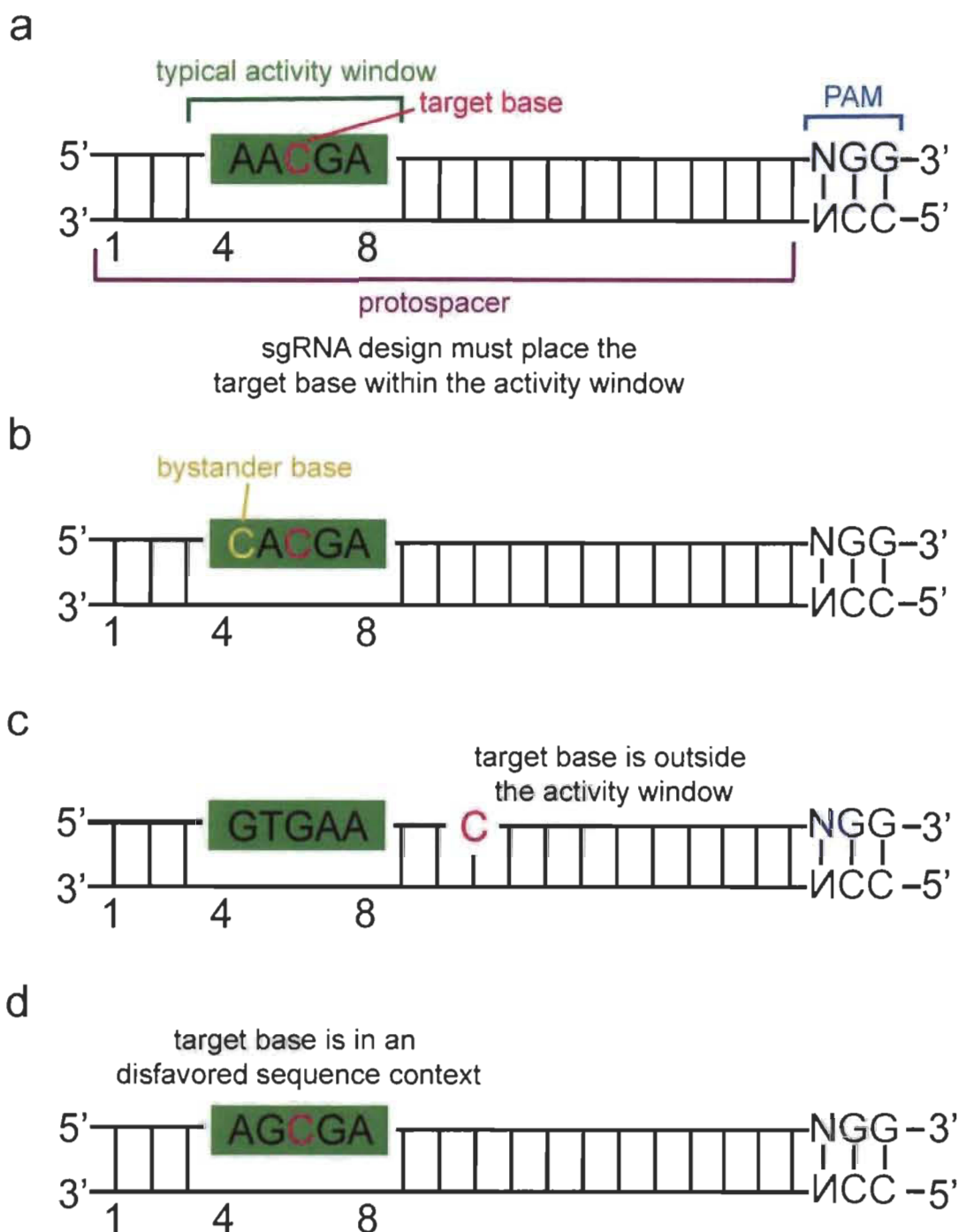


Figure 3.2 Fenêtre d'activité pour l'édition de base.

En a, la base cible idéale (en rouge) est située dans la fenêtre d'activité par rapport au site PAM et il n'y a qu'une seule cible potentielle dans la fenêtre d'activité. En b, une cytosine spectatrice (en jaune) est présente dans la fenêtre d'activité et elle pourrait être sujette à une modification non voulue. En c, la base cible est située à l'extérieur de la fenêtre d'activité. En d, la base cible est située dans un contexte de désamination inefficace (Rees & Liu, 2018).

3.2.4 Le *prime editing*

Malgré l'aptitude à modifier le génome de façon propre et efficace, l'édition de base présente des limites techniques importantes concernant le nombre de bases modifiables et la capacité de générer seulement quatre mutations de transition (Figure 3.3). Le *prime editing* permet de surmonter ces limites, la restriction liée au PAM est moins stricte en raison de la longueur variable de la région servant de matrice dans le pegRNA (Anzalone et al., 2019). Le PE permet une flexibilité par rapport au PAM en permettant des mutations ponctuelles dans la région allant de 3 pb en amont du PAM et jusqu'à 29 pb en aval (Anzalone et al., 2019). De plus, le PE permet d'effectuer des insertions jusqu'à 44 pb, des délétions jusqu'à 80 pb et des mutations ponctuelles incluant toutes les mutations de transition et de transversion (Anzalone et al., 2019).

La technologie de PE utilise une Cas9n à laquelle a été fusionnée une RT et un gARN appelé pegRNA (Figure 3.1c). La Cas9n se lie à une séquence d'ADN cible programmée par pegRNA et clive un brin d'ADN pour produire une amorce pour la RT. La RT utilise pegRNA comme matrice pour synthétiser un fragment contenant les modifications souhaitées. Le fragment synthétisé est incorporé dans le génome et le brin non édité est supprimé par la machinerie cellulaire qui duplique le brin édité. La première génération de PE a démontré une faible efficacité (Anzalone et al., 2019). Pour améliorer l'efficacité, la RT a été optimisée lors de la conception des PE de deuxième génération (Anzalone et al., 2019). L'introduction d'un sgRNA induit un clivage simple brin dans le brin non édité, le clivage dirige la réparation de l'ADN vers ce brin, le brin édité est utilisé comme modèle. L'ajout du sgRNA a permis d'augmenter l'efficacité des PE de troisième génération à 33 % (Anzalone et al., 2019).

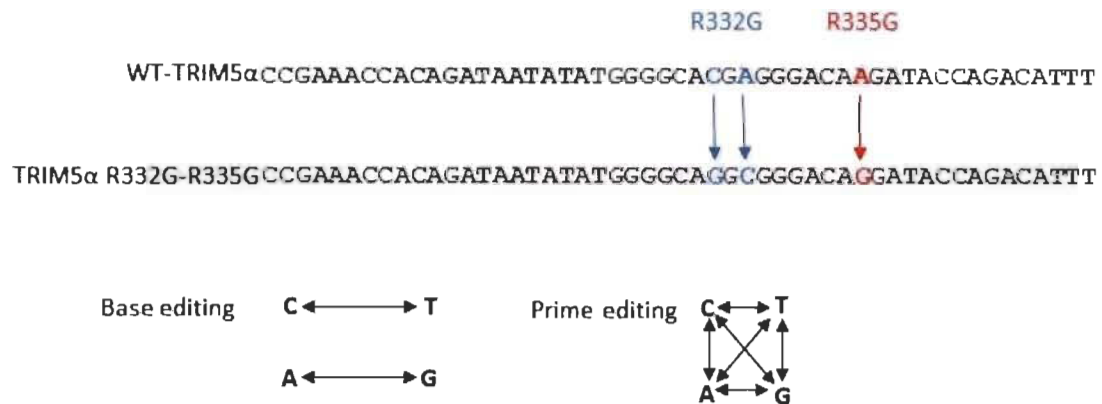


Figure 3.3 Comparatif entre les BE et les PE pour modifier TRIM5α.

La mutation R332G de trim5α nécessite deux mutations incompatibles avec l'édition par base editing mais compatible avec le *prime editing*. La mutation R335G nécessite une mutation de transition, elle peut être effectuée par base editing et par *prime editing*. Le base editing permet quatre mutations de transition. Le *prime editing* permet toutes les mutations de transition et de transversion. De plus, la distance entre les nucléotides à modifier est de 10 pb, le *prime editing* permet d'introduire les 3 mutations ponctuelles en une seule intervention.

3.2.5 Promotion des voies de réparation de l'ADN

Lors du processus de réparation d'ADN, les mécanismes de réparation par HDR et par NHEJ sont en compétition sur chaque allèle afin de le réparer. Plusieurs avenues différentes peuvent être empruntées afin d'augmenter le taux de réparation par HDR. Il est possible d'utiliser des traitements inhibant la NHEJ (Arras & Fraser, 2016; Chu et al., 2015) et il est possible d'utiliser des traitements favorisant le mécanisme de réparation par HDR (Yu et al., 2015). Plusieurs protéines ont un rôle dans la promotion du mécanisme de réparation par HDR dont RAD51 (Figure 3.4). La surexpression de RAD51 à l'intérieur de cellules souches humaines permet d'augmenter le taux d'efficacité de la réparation par HDR (Takayama et al., 2017). De plus, l'acide valproïque a un effet sur les HDAC, augmentant le niveau de transcription des gènes et le taux d'efficacité de la réparation par HDR (Göttlicher et al., 2001). La surexpression de RAD51 associée à un traitement avec l'acide valproïque augmente le taux de modifications bialléliques de façon significative, le taux de modifications bialléliques passe de 0 % à plus de 25 %, et ce, quel que soit le niveau d'activité transcriptionnel (Takayama et al., 2017).

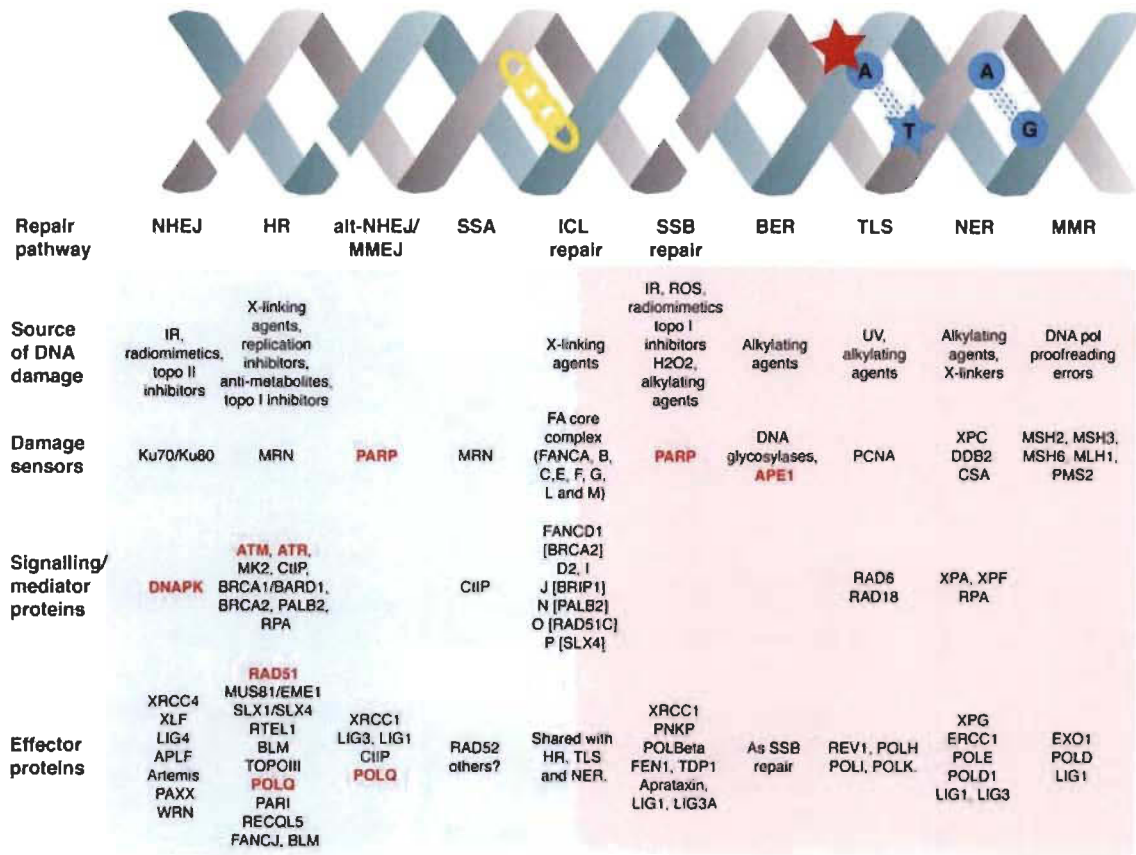


Figure 3.4 Médiateurs des voies de réparation de l'ADN.

Figure illustrant les différentes voies de réparation de l'ADN et leurs médiateurs associés. Plusieurs médiateurs dont RAD51 peuvent être utilisés pour promouvoir la voie de réparation d'ADN par HDR (Brown, O'Carrigan, Jackson & Yap).

Finalement, générer une coupure à deux endroits différents pourrait être intéressant pour surmonter la limite induite par la distance entre le site de coupure et les modifications à apporter. En utilisant une combinaison de deux ARNg, il est possible de générer une délétion génomique et de former un exon hybride (Duchêne et al., 2018). Il serait donc possible d'exciser une partie de la région à modifier et d'utiliser un ADN donneur comme matrice pour modifier par HDR la partie excisée. Il serait intéressant de combiner cette approche avec la surexpression de RAD51 et un traitement avec de l'acide valproïque pour augmenter le taux d'efficacité de la HDR et augmenter le taux de modifications bialléliques.

3.3 Conclusion

L'objectif général du projet effectué lors de cette maîtrise était de déterminer l'impact sur la réponse contre le VIH-1 résultant de l'édition génomique du gène humain du facteur de restriction TRIM5 α . L'étude présentée dans ce mémoire a permis de démontrer qu'il est faisable d'éditer le gène humain de la protéine TRIM5 α . Cependant, nous avons rencontré un problème majeur, notre taux de modifications par HDR a été de 13 % et nous sommes parvenus à obtenir un seul clone contenant une modification biallélique. De plus, le clone portant une modification biallélique ne contient pas tous les nucléotides destinés à être modifiés, il présente la mutation R332G sur les deux allèles, mais seulement un allèle contient la modification R335G.

Lorsque nous avons caractérisé l'effet antiviral résultant de l'édition génomique, nos résultats indiquent qu'il y a un pouvoir antiviral résultant et la restriction par TRIM5 α modifié est efficace dans la lignée Jurkat. En effet, les clones présentant un allèle contenant TRIM5 α R332G-R335G démontrent une légère diminution d'infectivité en absence d'IFN- β en comparaison aux cellules non modifiées. Le clone contenant TRIM5 α R332G-R335G sur un allèle et TRIM5 α R332G sur l'autre démontre une réduction de permissivité d'environ 8 fois en comparaison aux cellules non modifiées. En présence d'IFN- β , les clones présentant un allèle modifié ont démontré une diminution d'infectivité d'environ 6 fois en comparaison aux cellules non modifiées. Pour le clone contenant deux allèles modifiés, l'effet est plus important, la réduction de la permissivité est de 46 fois en comparaison aux cellules non modifiées. Ces résultats démontrent l'efficacité de l'édition génomique du gène codant pour TRIM5 α à restreindre un agent pathogène infectieux, mais il est nécessaire que la modification soit biallélique pour avoir un effet thérapeutique maximal.

Les clones contenant un seul allèle thérapeutique nécessitent une régulation à la hausse par l'IFN- β pour avoir une restriction efficace. Cette faible restriction en absence d'IFN peut être expliquée par la nature des protéines TRIM5 α qui forment des dimères. Lorsqu'il y a une population hétérogène de TRIM5 α , une protéine thérapeutique peut s'associer avec une protéine non modifiée et se lier faiblement au réseau de protéine de la

capside. Il pourrait être bénéfique d'avoir des mutations hétérozygotes pour certains facteurs de restriction, pour cibler plus d'un variant du VIH-1, mais nos résultats indiquent que ce n'est pas le cas de TRIM5 α .

Finalement, le phénomène d'émergence d'une mutation d'échappement dans la capsid virale la rendant insensible à la restriction par TRIM5 α R332G-R335G est très probable. Comme c'est le cas pour les contrôleurs élites qui sont des patients caractérisés comme capables de ralentir la progression de l'infection, la pression immunitaire favorise l'émergence de mutations d'échappement dans la capsid virale (Merindol et al., 2018). Il est crucial d'améliorer le taux de modifications bialléliques pour TRIM5 α et de combiner l'édition génomique de TRIM5 α avec l'édition d'autres facteurs de restrictions tels que APOBEC3G et la tétherine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alfadhli, A., Barklis, R. L. & Barklis, E. (2009). HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *Virology*, 387(2), 466-472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.048>
- Ambrose, Z. & Aiken, C. (2014). HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*, 454-455, 371-379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.004>
- Anderson, E. C. & Lever, A. M. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J Virol*, 80(21), 10478-10486. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02596-05>
- Anderson, J. L., Johnson, A. T., Howard, J. L. & Purcell, D. F. (2007). Both linear and discontinuous ribosome scanning are used for translation initiation from bicistronic human immunodeficiency virus type 1 env mRNAs. *J Virol*, 81(9), 4664-4676. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01028-06>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., . . . Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149-157. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K. A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J. C., . . . Charneau, P. (2006). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods*, 3(10), 817-824. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth928>
- Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., . . . Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J*, 26(12), 3025-3037. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601740>
- Arras, S. D. & Fraser, J. A. (2016). Chemical Inhibitors of Non-Homologous End Joining Increase Targeted Construct Integration in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 11(9), e0163049. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0163049>
- Balzarini, J., Herdewijn, P. & De Clercq, E. (1989). Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem*, 264(11), 6127-6133.

- Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 54(2), 234-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Battivelli, E., Migraine, J., Lecossier, D., Matsuoka, S., Perez-Bercoff, D., Saragosti, S., . . . Hance, A. J. (2011). Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *J Virol*, 85(15), 7828-7835. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00648-11>
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyő, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., . . . Weiss, R. A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature*, 391(6664), 240. <http://dx.doi.org/10.1038/34571>
- Berthoux, L., Sebastian, S., Sayah, D. M. & Luban, J. (2005). Disruption of human TRIM5alpha antiviral activity by nonhuman primate orthologues. *J Virol*, 79(12), 7883-7888. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.12.7883-7888.2005>
- Bichel, K., Price, A. J., Schaller, T., Towers, G. J., Freund, S. M. & James, L. C. (2013). HIV-1 capsid undergoes coupled binding and isomerization by the nuclear pore protein NUP358. *Retrovirology*, 10, 81. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-81>
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y. G. & Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 21(1), 289-297. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.1.289-297.2001>
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169-1175.
- Bleck, M., Itano, M. S., Johnson, D. S., Thomas, V. K., North, A. J., Bieniasz, P. D. & Simon, S. M. (2014). Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(33), 12211-12216. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1321655111>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., . . . Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178811>
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J. L. & Sonenberg, N. (2003). The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol*, 77(7), 3939-3949. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.77.7.3939-3949.2003>

- Brierley, I., & Dos Ramos, F. J. (2006). Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res*, *119*(1), 29-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2005.10.008>
- Briones, M. S., Dobard, C. W. & Chow, S. A. (2010). Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. *J Virol*, *84*(10), 5181-5190. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02382-09>
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., . . . van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, *321*(5891), 960-964. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159689>
- Brown, J. S., O'Carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. (2159-8290 (Electronic)).
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*, *33*, 257-290. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Buck, C. B., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M. & Siliciano, R. F. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol*, *75*(1), 181-191. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.1.181-191.2001>
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*, *6*(1), 53. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Butsch, M. & Boris-Lawrie, K. (2002). Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion? *J Virol*, *76*(7), 3089-3094. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.76.7.3089-3094.2002>
- Campbell, E. M. & Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*, *13*(8), 471-483. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3503>
- Campbell, E. M., Perez, O., Anderson, J. L. & Hope, T. J. (2008). Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha. *J Cell Biol*, *180*(3), 549-561. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200706154>

- Campbell, E. M., Nunez, R. & Hope, T. J. (2004). Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol*, 78(11), 5745-5755. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.11.5745-5755.2004>
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244(4910), 1288-1292. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2660260>
- Carthagen, L., Parise, M. C., Ringard, M., Chelbi-Alix, M. K., Hazan, U. & Nisole, S. (2008). Implication of TRIM alpha and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities. *Retrovirology*, 5, 59. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-5-59>
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 89(2), 263-273. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80205-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80205-6)
- Chandrasegaran, S. & Smith, J. (1999). Chimeric restriction enzymes: what is next? *Biol Chem*, 380(7-8), 841-848. <http://dx.doi.org/10.1515/bc.1999.103>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Charlesworth, C. T., Deshpande, P. S., Dever, D. P., Camarena, J., Lemgart, V. T., Cromer, M. K., . . . Porteus, M. H. (2019). Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med*, 25(2), 249-254. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0326-x>
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H. & Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol*, 241(5), 651-662. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1542>
- Checkley, M. A., Luttge, B. G. & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*, 410(4), 582-608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042>
- Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P. A. & Engelman, A. (2004). Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, 279(47), 48883-48892. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406307200>

- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K. & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 33(5), 543-548. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Cicala, C., Martinelli, E., McNally, J. P., Goode, D. J., Gopaul, R., Hiatt, J., . . . Arthos, J. (2009). The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(49), 20877-20882. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911796106>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., . . . Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1231143>
- Crowe, S., Zhu, T., & Muller, W. A. (2003). The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol*, 74(5), 635-641. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0503204>
- D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E. & Pavlakis, G. N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol*, 12(3), 1375-1386. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.12.3.1375>
- de Breyne, S., Soto-Rifo, R., López-Lastra, M. & Ohlmann, T. (2013). Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs. *Virus Res*, 171(2), 366-381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.006>
- Deeks, S. G. (2012). HIV: Shock and kill. *Nature*, 487(7408), 439-440. <http://dx.doi.org/10.1038/487439a>
- Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., . . . Arhel, N. J. (2012). Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PLoS One*, 7(9), e46037. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046037>
- Diaz-Griffero, F., Qin, X. R., Hayashi, F., Kigawa, T., Finzi, A., Sarnak, Z., . . . Sodroski, J. (2009). A B-box 2 surface patch important for TRIM5alpha self-association, capsid binding avidity, and retrovirus restriction. *J Virol*, 83(20), 10737-10751. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01307-09>

- Dubé, M., Roy, B. B., Guiot-Guillain, P., Mercier, J., Binette, J., Leung, G. & Cohen, E. A. (2009). Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J Virol*, 83(9), 4574-4590. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01800-08>
- Duchêne, B. L., Cherif, K., Iyombe-Engembe, J. P., Guyon, A., Rousseau, J., Ouellet, D. L., . . . Tremblay, J. P. (2018). CRISPR-Induced Deletion with SaCas9 Restores Dystrophin Expression in Dystrophic Models In Vitro and In Vivo. *Mol Ther*, 26(11), 2604-2616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.010>
- Dufloo, J., Bruel, T. & Schwartz, O. (2018). HIV-1 cell-to-cell transmission and broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology*, 15(1), 51. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-018-0434-1>
- Dufour, C., Claudel, A., Joubarne, N., Merindol, N., Maisonnnet, T., Masroori, N., . . . Berthoux, L. (2018). Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1. *PLoS One*, 13(1), e0191709. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191709>
- Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y. & Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 3, 2510. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02510>
- Eid, A., Alshareef, S. & Mahfouz, M. M. (2018). CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. *Biochem J*, 475(11), 1955-1964. <http://dx.doi.org/10.1042/bcj20170793>
- Elliott, B., Richardson, C., Winderbaum, J., Nickoloff, J. A. & Jasin, M. (1998). Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 18(1), 93-101. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.18.1.93>
- Emery, A., Zhou, S., Pollom, E., & Swanstrom, R. (2017). Characterizing HIV-1 Splicing by Using Next-Generation Sequencing. *J Virol*, 91(6). <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02515-16>
- Enarson, P., Enarson, M., Bastos, R. & Burke, B. (1998). Amino-terminal sequences that direct nucleoporin Nup153 to the inner surface of the nuclear envelope. *Chromosoma*, 107(4), 228-236. <http://dx.doi.org/10.1007/s004120050301>
- Engelman, A., Mizuuchi, K. & Craigie, R. (1991). HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*, 67(6), 1211-1221. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90297-c](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90297-c)

- Espeseth, A. S., Felock, P., Wolfe, A., Witmer, M., Grobler, J., Anthony, N., . . . Hazuda, D. J. (2000). HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(21), 11244-11249. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.200139397>
- Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A. M., Köser, J., Sauder, U., Ullman, K. S. & Aebi, U. (2002). Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J Struct Biol*, *140*(1-3), 254-267. [http://dx.doi.org/10.1016/s1047-8477\(02\)00524-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00524-5)
- Farnet, C. M., & Haseltine, W. A. (1991). Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *J Virol*, *65*(12), 6942-6952. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.65.12.6942-6952.1991>
- Fassati, A. & Goff, S. P. (2001). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, *75*(8), 3626-3635. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.8.3626-3635.2001>
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, *82*(3), 475-483. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90436-0](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90436-0)
- Fletcher, A. J., Vaysburd, M., Maslen, S., Zeng, J., Skehel, J. M., Towers, G. J. & James, L. C. (2018). Trivalent RING Assembly on Retroviral Capsids Activates TRIM5 Ubiquitination and Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe*, *24*(6), 761-775 e766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.007>
- Forshey, B. M., von Schwedler, U., Sundquist, W. I. & Aiken, C. (2002). Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol*, *76*(11), 5667-5677. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.76.11.5667-5677.2002>
- Frank, G. A., Narayan, K., Bess, J. W., Jr., Del Prete, G. Q., Wu, X., Moran, A., . . . Subramaniam, S. (2015). Maturation of the HIV-1 core by a non-diffusional phase transition. *Nat Commun*, *6*, 5854. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6854>
- Friedmann, T. & Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science*, *175*(4025), 949-955. <http://dx.doi.org/10.1126/science.175.4025.949>
- Fujii, K., Munshi, U. M., Ablan, S. D., Demirov, D. G., Soheilian, F., Nagashima, K., . . . Freed, E. O. (2009). Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology*, *391*(2), 284-292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.016>

- Fujiwara, T. & Mizuuchi, K. (1988). Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell*, 54(4), 497-504. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90071-2](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90071-2)
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I. & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464-471. <http://dx.doi.org/10.1038/nature24644>
- Gelderblom, H. R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*, 5(6), 617-637.
- Gendron, K., Charbonneau, J., Dulude, D., Heveker, N., Ferbeyre, G. & Brakier-Gingras, L. (2008). The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 36(1), 30-40. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm906>
- Giedroc, D. P. & Cornish, P. V. (2009). Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Res*, 139(2), 193-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.06.008>
- Goldstone, D. C., Walker, P. A., Calder, L. J., Coombs, P. J., Kirkpatrick, J., Ball, N. J., . . . Taylor, I. A. (2014). Structural studies of postentry restriction factors reveal antiparallel dimers that enable avid binding to the HIV-1 capsid lattice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(26), 9609-9614. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1402448111>
- Gonçalves, G. A. R. & Paiva, R. M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, 15(3), 369-375. <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., . . . Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 20(24), 6969-6978. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Greatorex, J., Gallego, J., Varani, G. & Lever, A. (2002). Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. *J Mol Biol*, 322(3), 543-557. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00776-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00776-3)
- Greisman, H. A. & Pabo, C. O. (1997). A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*, 275(5300), 657-661. <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5300.657>

- Groom, H. C. T., Anderson, E. C., Dangerfield, J. A. & Lever, A. M. L. (2009). Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Gen Virol*, 90(Pt 5), 1141-1147. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.007963-0>
- Gupta, R. K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L. E., Mok, H. P., Peppas, D., Salgado, M., . . . Olavarria, E. (2019). HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 568(7751), 244-248. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- Gupta, R. K., Hué, S., Schaller, T., Verschoor, E., Pillay, D. & Towers, G. J. (2009). Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000443. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000443>
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D., & Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*, 360(6402), 358-361. <http://dx.doi.org/10.1038/360358a0>
- Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y. & Heuser, J. E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*, 180(2), 389-402. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200707031>
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., . . . Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, 113(6), 803-809. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00423-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00423-9)
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A. & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res*, 17(9), 2619-2627. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-10-1114>
- Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D. & McElrath, M. J. (2007). Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*, 26(2), 257-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.007>
- Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. & Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol*, 85(19), 9749-9766. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00743-11>

- Hou, P., Chen, S., Wang, S., Yu, X., Chen, Y., Jiang, M., . . . Guo, D. (2015). Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep*, 5, 15577. <http://dx.doi.org/10.1038/srep15577>
- Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hu, J. H., Miller, S. M., Geurts, M. H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., . . . Liu, D. R. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556(7699), 57-63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature26155>
- Hu, W. S. & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(10). <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Hulme, A. E., Perez, O. & Hope, T. J. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24), 9975-9980. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014522108>
- Hultquist, J. F., Schumann, K., Woo, J. M., Manganaro, L., McGregor, M. J., Doudna, J., . . . Marson, A. (2016). A Cas9 Ribonucleoprotein Platform for Functional Genetic Studies of HIV-Host Interactions in Primary Human T Cells. *Cell Rep*, 17(5), 1438-1452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.080>
- Huston, D. P. (1997). The biology of the immune system. *JAMA*, 278(22), 1804-1814.
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., . . . Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 360(7), 692-698. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Ihry, R. J., Worringer, K. A., Salick, M. R., Frias, E., Ho, D., Theriault, K., . . . Kaykas, A. (2018). p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 24(7), 939-946. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>
- Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 36-49. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3581>
- Iversen, M. B. & Paludan, S. R. (2010). Mechanisms of type III interferon expression. *J Interferon Cytokine Res*, 30(8), 573-578. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2010.0063>
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. & Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 331(6153), 280-283. <http://dx.doi.org/10.1038/331280a0>

- Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Stremlau, M., Si, Z. & Sodroski, J. (2005). The contribution of RING and B-box 2 domains to retroviral restriction mediated by monkey TRIM5alpha. *J Biol Chem*, 280(29), 26933-26940. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502145200>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jouvenet, N., Neil, S. J., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., . . . Bieniasz, P. D. (2009). Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol*, 83(4), 1837-1844. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02211-08>
- Jung, U., Urak, K., Veillette, M., Nepveu-Traversy, M., Pham, Q. T., Hamel, S., . . . Berthoux, L. (2015). Preclinical Assessment of Mutant Human TRIM5 α as an Anti-HIV-1 Transgene. *Hum Gene Ther*, 26(10), 664-679. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2015.059>
- Kantor, A., McClements, M. E. & MacLaren, R. E. (2020). CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *Int J Mol Sci*, 21(17). <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21176240>
- Kaplan, A. H., Zack, J. A., Knigge, M., Paul, D. A., Kempf, D. J., Norbeck, D. W. & Swanstrom, R. (1993). Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J Virol*, 67(7), 4050-4055. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.67.7.4050-4055.1993>
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kemnic, T. R. & Gulick, P. G. (2021). HIV Antiretroviral Therapy *StatPearls*. Treasure Island FL: © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Kilzer, J. M., Stracker, T., Beitzel, B., Meek, K., Weitzman, M. & Bushman, F. D. (2003). Roles of host cell factors in circularization of retroviral dna. *Virology*, 314(1), 460-467. [http://dx.doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00455-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00455-0)
- Kim, D., Kim, J., Hur, J. K., Been, K. W., Yoon, S. H. & Kim, J. S. (2016). Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 34(8), 863-868. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3609>

- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. & Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*, 63(9), 3708-3713. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.63.9.3708-3713.1989>
- Kim, Y. B., Komor, A. C., Levy, J. M., Packer, M. S., Zhao, K. T. & Liu, D. R. (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol*, 35(4), 371-376. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3803>
- Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3), 1156-1160. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Klarmann, G. J., Schaubert, C. A. & Preston, B. D. (1993). Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. *J Biol Chem*, 268(13), 9793-9802.
- Koblan, L. W., Doman, J. L., Wilson, C., Levy, J. M., Tay, T., Newby, G. A., . . . Liu, D. R. (2018). Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 36(9), 843-846. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4172>
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256(5065), 1783-1790. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1377403>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420-424. <http://dx.doi.org/10.1038/nature17946>
- Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*, 36(8), 765-771. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4192>
- Kovalskyy, D. B. & Ivanov, D. N. (2014). Recognition of the HIV capsid by the TRIM5 α restriction factor is mediated by a subset of pre-existing conformations of the TRIM5 α SPRY domain. *Biochemistry*, 53(9), 1466-1476. <http://dx.doi.org/10.1021/bi4014962>
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283-292. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)

- Krokan, H. E. & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a012583. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A. & Banting, G. (2003). Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic*, 4(10), 694-709. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00129.x>
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393(6686), 648-659. <http://dx.doi.org/10.1038/31405>
- Lai, M. C., Wang, S. W., Cheng, L., Tarn, W. Y., Tsai, S. J. & Sun, H. S. (2013). Human DDX3 interacts with the HIV-1 Tat protein to facilitate viral mRNA translation. *PLoS One*, 8(7), e68665. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068665>
- Lazear, H. M., Nice, T. J. & Diamond, M. S. (2015). Interferon-λ: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity*, 43(1), 15-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.001>
- Lee, K., Ambrose, Z., Martin, T. D., Oztop, I., Mulky, A., Julias, J. G., . . . KewalRamani, V. N. (2010). Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe*, 7(3), 221-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.007>
- Léger, M., Dulude, D., Steinberg, S. V. & Brakier-Gingras, L. (2007). The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res*, 35(16), 5581-5592. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm578>
- Levin, J. G., Guo, J., Rouzina, I. & Musier-Forsyth, K. (2005). Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 80, 217-286. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6603\(05\)80006-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6603(05)80006-6)
- Li, C., Guan, X., Du, T., Jin, W., Wu, B., Liu, Y., . . . Hu, Q. (2015). Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J Gen Virol*, 96(8), 2381-2393. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.000139>

- Li, G. & De Clercq, E. (2016). HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 679-731. <http://dx.doi.org/10.1128/mmlbr.00065-15>
- Li, L., Olvera, J. M., Yoder, K. E., Mitchell, R. S., Butler, S. L., Lieber, M., . . . Bushman, F. D. (2001). Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J*, 20(12), 3272-3281. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.12.3272>
- Li, X. & Sodroski, J. (2008). The TRIM5alpha B-box 2 domain promotes cooperative binding to the retroviral capsid by mediating higher-order self-association. *J Virol*, 82(23), 11495-11502. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01548-08>
- Li, Y. L., Chandrasekaran, V., Carter, S. D., Woodward, C. L., Christensen, D. E., Dryden, K. A., . . . Sundquist, W. I. (2016). Primate TRIM5 proteins form hexagonal nets on HIV-1 capsids. *Elife*, 5. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.16269>
- Liao, H. K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., . . . Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 6, 6413. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7413>
- Lim, R. Y., Huang, N. P., Köser, J., Deng, J., Lau, K. H., Schwarz-Herion, K., . . . Aebi, U. (2006). Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25), 9512-9517. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0603521103>
- Limsirichai, P., Gaj, T. & Schaffer, D. V. (2016). CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression. *Mol Ther*, 24(3), 499-507. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.213>
- Lin, S., Stahl, B. T., Alla, R. K. & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 3, e04766. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.04766>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P. & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*, 25(1), 1234-1257. <http://dx.doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S. & Poeschla, E. M. (2006). Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Mol Biol*, 360(4), 760-773. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.073>

- Louten, J. (2016). Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology*, 19-29. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>
- Lu, K., Heng, X. & Summers, M. F. (2011). Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol*, 410(4), 609-633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.029>
- Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F. & Campbell, E. M. (2014). HIV-1 uncoating is facilitated by dynein and kinesin 1. *J Virol*, 88(23), 13613-13625. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02219-14>
- Lukic, Z., Hausmann, S., Sebastian, S., Rucci, J., Sastri, J., Robia, S. L., . . . Campbell, E. M. (2011). TRIM5 α associates with proteasomal subunits in cells while in complex with HIV-1 virions. *Retrovirology*, 8, 93. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-93>
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. & Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem*, 278(35), 33528-33539. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M303594200>
- Maillard, P. V., Ecco, G., Ortiz, M. & Trono, D. (2010). The specificity of TRIM5 alpha-mediated restriction is influenced by its coiled-coil domain. *J Virol*, 84(11), 5790-5801. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02413-09>
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, 338(6212), 254-257. <http://dx.doi.org/10.1038/338254a0>
- Mandal, P. K., Ferreira, L. M., Collins, R., Meissner, T. B., Boutwell, C. L., Friesen, M., . . . Cowan, C. A. (2014). Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 15(5), 643-652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.004>
- Mandell, M. A., Jain, A., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Kimura, T., Dinkins, C., . . . Deretic, V. (2014). TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell*, 30(4), 394-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.013>
- Mann, D. A., Mikaélian, I., Zimmel, R. W., Green, S. M., Lowe, A. D., Kimura, T., . . . Karn, J. (1994). A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J Mol Biol*, 241(2), 193-207. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1994.1488>

- Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., . . . Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, *114*(1), 21-31. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00515-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00515-4)
- Matreyek, K. A., Yücel, S. S., Li, X. & Engelman, A. (2013). Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity. *PLoS Pathog*, *9*(10), e1003693. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003693>
- McCull, D. J. & Chen, X. (2010). Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral Res*, *85*(1), 101-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.004>
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M. & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, *159*(3), 441-452. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200203150>
- McNatt, M. W., Zang, T., Hatziioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I. B., Johnson, W. E., . . . Bieniasz, P. D. (2009). Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog*, *5*(2), e1000300. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000300>
- Merindol, N., & Berthoux, L. (2015). Restriction Factors in HIV-1 Disease Progression. *Curr HIV Res*, *13*(6), 448-461. <http://dx.doi.org/10.2174/1570162x13666150608104412>
- Merindol, N., El-Far, M., Sylla, M., Masroori, N., Dufour, C., Li, J. X., . . . Berthoux, L. (2018). 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*, *14*(11), e1007398. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007398>
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., . . . Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, *29*(2), 143-148. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1755>
- Miller, M. D., Farnet, C. M. & Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, *71*(7), 5382-5390. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.71.7.5382-5390.1997>
- Miller, V. (2001). International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *26 Suppl 1*, S34-50. <http://dx.doi.org/10.1097/00042560-200103011-00005>

- Mingozzi, F. & High, K. A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*, 122(1), 23-36. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-01-306647>
- Molla, K. A. & Yang, Y. (2019). CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. *Trends Biotechnol*, 37(10), 1121-1142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.008>
- Moore, M. D., Nikolaitchik, O. A., Chen, J., Hammarskjöld, M. L., Rekosh, D., & Hu, W. S. (2009). Probing the HIV-1 genomic RNA trafficking pathway and dimerization by genetic recombination and single virion analyses. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000627. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000627>
- Moretti, J., & Blander, J. M. (2014). Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes. *Curr Opin Immunol*, 26, 100-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.11.003>
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), 1501. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178817>
- Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425-430. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06553>
- Niedrig, M., Gelderblom, H. R., Pauli, G., März, J., Bickhard, H., Wolf, H. & Modrow, S. (1994). Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol*, 75 (Pt 6), 1469-1474. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1469>
- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. & Sorrentino, B. P. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther*, 13(6), 1031-1049. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.001>
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., . . . Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353(6305). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., . . . Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>

- Nowrouzi, A., Glimm, H., von Kalle, C. & Schmidt, M. (2011). Retroviral vectors: post entry events and genomic alterations. *Viruses*, 3(5), 429-455. <http://dx.doi.org/10.3390/v3050429>
- Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. & Freed, E. O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14889-14894. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405596101>
- Orloff, G. M., Orloff, S. L., Kennedy, M. S., Maddon, P. J. & McDougal, J. S. (1991). Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. *J Immunol*, 146(8), 2578-2587.
- Ott, M., Geyer, M. & Zhou, Q. (2011). The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe*, 10(5), 426-435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.11.002>
- Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H. & Morse, H. C., 3rd. (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 8(11), 849-860. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2413>
- Pauza, C. D. (1990). Two bases are deleted from the termini of HIV-1 linear DNA during integrative recombination. *Virology*, 179(2), 886-889. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90161-j](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(90)90161-j)
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1985). Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, 40(3), 515-526. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90200-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(85)90200-4)
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., . . . Luban, J. (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature*, 472(7343), 361-365. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09976>
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A. H., Nantermet, P. V., Klein, C. A. & Swanstrom, R. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol*, 68(12), 8017-8027. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.68.12.8017-8027.1994>
- Pham, Q. T., Bouchard, A., Grütter, M. G. & Berthou, L. (2010). Generation of human TRIM5alpha mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther*, 17(7), 859-871. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.40>

- Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. (1981). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30(21), 250-252.
- Poeschla, E. M. (2008). Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cell Mol Life Sci*, 65(9), 1403-1424. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-7540-5>
- Purcell, D. F. & Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, 67(11), 6365-6378. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.67.11.6365-6378.1993>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Quinn, C. M., Wang, M., Fritz, M. P., Runge, B., Ahn, J., Xu, C., . . . Polenova, T. (2018). Dynamic regulation of HIV-1 capsid interaction with the restriction factor TRIM5 α identified by magic-angle spinning NMR and molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(45), 11519-11524. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1800796115>
- Rabut, G., Doye, V. & Ellenberg, J. (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol*, 6(11), 1114-1121. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1184>
- Radtke, K., Kieneker, D., Wolfstein, A., Michael, K., Steffen, W., Scholz, T., . . . Sodeik, B. (2010). Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog*, 6(7), e1000991. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000991>
- Rajsbaum, R., García-Sastre, A. & Versteeg, G. A. (2014). TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J Mol Biol*, 426(6), 1265-1284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.005>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., . . . Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186-191. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14299>
- Rasmussen, T. A., & Lewin, S. R. (2016). Shocking HIV out of hiding: where are we with clinical trials of latency reversing agents? *Curr Opin HIV AIDS*, 11(4), 394-401. <http://dx.doi.org/10.1097/coh.0000000000000279>

- Reddy, T. R., Xu, W., Mau, J. K., Goodwin, C. D., Suhasini, M., Tang, H., . . . Wong-Staal, F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med*, 5(6), 635-642. <http://dx.doi.org/10.1038/9479>
- Rees, H. A. & Liu, D. R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 19(12), 770-788. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-018-0059-1>
- Richter, M. F., Zhao, K. T., Eton, E., Lapinaite, A., Newby, G. A., Thuronyi, B. W., . . . Liu, D. R. (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol*, 38(7), 883-891. <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0453-z>
- Roa, A., Hayashi, F., Yang, Y., Lienlaf, M., Zhou, J., Shi, J., . . . Diaz-Griffero, F. (2012). RING domain mutations uncouple TRIM5 α restriction of HIV-1 from inhibition of reverse transcription and acceleration of uncoating. *J Virol*, 86(3), 1717-1727. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.05811-11>
- Rold, C. J. & Aiken, C. (2008). Proteasomal degradation of TRIM5 α during retrovirus restriction. *PLoS Pathog*, 4(5), e1000074. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000074>
- Rosen, C. A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1988). Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(7), 2071-2075. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.7.2071>
- Saad, J. S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R. H. & Summers, M. F. (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(30), 11364-11369. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602818103>
- Saag, M. S. (2019). HIV 101: fundamentals of antiretroviral therapy. *Top Antivir Med*, 27(3), 123-127.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32(4), 347-355. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. & Gallay, P. A. (2001). Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol*, 75(19), 9187-9200. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.19.9187-9200.2001>

- Sastri, J. & Campbell, E. M. (2011). Recent insights into the mechanism and consequences of TRIM5 α retroviral restriction. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27(3), 231-238. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2010.0367>
- Savic, N., Ringnalda, F. C., Lindsay, H., Berk, C., Bargsten, K., Li, Y., . . . Schwank, G. (2018). Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. *Elife*, 7. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.33761>
- Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M. & Malik, H. S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 α identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2832-2837. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409853102>
- Sayah, D. M., Sokolskaja, E., Berthoux, L. & Luban, J. (2004). Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature*, 430(6999), 569-573. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02777>
- Schaller, T., Ocwieja, K. E., Rasaiyaah, J., Price, A. J., Brady, T. L., Roth, S. L., . . . Towers, G. J. (2011). HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathog*, 7(12), e1002439. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002439>
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B. K. & Pavlakis, G. N. (1997). Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol*, 71(7), 4892-4903. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.71.7.4892-4903.1997>
- Schröfelbauer, B., Chen, D. & Landau, N. R. (2004). A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(11), 3927-3932. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307132101>
- Schulze, T., Nawrath, M., & Moelling, K. (1991). Cleavage of the HIV-1 p66 reverse transcriptase/RNase H by the p9 protease in vitro generates active p15 RNase H. *Arch Virol*, 118(3-4), 179-188. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01314028>
- Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyö, E. M. & Pavlakis, G. N. (1990). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol*, 64(11), 5448-5456. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.64.11.5448-5456.1990>
- Schwartz, S., Felber, B. K. & Pavlakis, G. N. (1992). Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol*, 12(1), 207-219. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.12.1.207>

- Sette, P., Nagashima, K., Piper, R. C. & Bouamr, F. (2013). Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology*, 10, 79. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-79>
- Shaw, G. M. & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimeczok, D., . . . Smith, P. D. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 83(7), 3258-3267. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01796-08>
- Sherer, N. M., Jin, J. & Mothes, W. (2010). Directional spread of surface-associated retroviruses regulated by differential virus-cell interactions. *J Virol*, 84(7), 3248-3258. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02155-09>
- Shin, Y. H., Park, C. M. & Yoon, C.-H. (2021). An Overview of Human Immunodeficiency Virus-1 Antiretroviral Drugs: General Principles and Current Status. *Infection & Chemotherapy*, 53(1), 29-45. <http://dx.doi.org/10.3947/ic.2020.0100>
- Soliman, M., Srikrishna, G. & Balagopal, A. (2017). Mechanisms of HIV-1 Control. *Curr HIV/AIDS Rep*, 14(3), 101-109. <http://dx.doi.org/10.1007/s11904-017-0357-9>
- Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Park, D. H., Stremlau, M. & Sodroski, J. (2005). Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. *J Virol*, 79(7), 3930-3937. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.7.3930-3937.2005>
- Stoltzfus, C. M. (2009). Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Adv Virus Res*, 74, 1-40. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(09\)74001-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(09)74001-1)
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*, 12(3), 591-601. [http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00353-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00353-8)
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., . . . Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14), 5514-5519. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509996103>

- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S. & Sodroski, J. (2005). Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5 α determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J Virol*, 79(5), 3139-3145. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.5.3139-3145.2005>
- Strunze, S., Engelke, M. F., Wang, I. H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., . . . Greber, U. F. (2011). Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host Microbe*, 10(3), 210-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.010>
- Takaoka, A., Mitani, Y., Suemori, H., Sato, M., Yokochi, T., Noguchi, S., . . . Taniguchi, T. (2000). Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science*, 288(5475), 2357-2360. <http://dx.doi.org/10.1126/science.288.5475.2357>
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., . . . Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, 17(18), 5497-5508. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.18.5497>
- Takayama, K., Igai, K., Hagihara, Y., Hashimoto, R., Hanawa, M., Sakuma, T., . . . Mizuguchi, H. (2017). Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res*, 45(9), 5198-5207. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx130>
- Takeda, A., Tuazon, C. U., & Ennis, F. A. (1988). Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science*, 242(4878), 580-583. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2972065>
- Tangye, S. G., & Tarlinton, D. M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol*, 39(8), 2065-2075. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939531>
- Tedbury, P. R., Ablan, S. D. & Freed, E. O. (2013). Global rescue of defects in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation: implications for matrix structure. *PLoS Pathog*, 9(11), e1003739. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003739>
- Turner, B. G. & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, 285(1), 1-32. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354>
- Uddin, F., Rudin, C. M. & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol*, 10, 1387. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>

- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., . . . Guatelli, J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*, 3(4), 245-252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001>
- VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. & Carter, C. A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), 7724-7729. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.131059198>
- Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity*, 25(3), 343-348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.008>
- Wagner, J. M., Roganowicz, M. D., Skorupka, K., Alam, S. L., Christensen, D., Doss, G., . . . Pornillos, O. (2016). Mechanism of B-box 2 domain-mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5 α . *Elife*, 5. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.16309>
- Walther, T. C., Pickersgill, H. S., Cordes, V. C., Goldberg, M. W., Allen, T. D., Mattaj, I. W. & Fornerod, M. (2002). The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol*, 158(1), 63-77. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200202088>
- Wang, Q., Chen, S., Xiao, Q., Liu, Z., Liu, S., Hou, P., . . . Guo, D. (2017). Genome modification of CXCR4 by Staphylococcus aureus Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*, 14(1), 51. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-017-0375-0>
- Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., . . . Liang, C. (2016). CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep*, 15(3), 481-489. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>
- Wilén, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(8). <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Wu, Y. & Marsh, J. W. (2001). Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, 293(5534), 1503-1506. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1061548>

- Xiao, Q., Chen, S., Wang, Q., Liu, Z., Liu, S., Deng, H., . . . Guo, D. (2019). CCR5 editing by *Staphylococcus aureus* Cas9 in human primary CD4(+) T cells and hematopoietic stem/progenitor cells promotes HIV-1 resistance and CD4(+) T cell enrichment in humanized mice. *Retrovirology*, *16*(1), 15. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-019-0477-y>
- Xu, H., Svarovskaia, E. S., Barr, R., Zhang, Y., Khan, M. A., Strebel, K. & Pathak, V. K. (2004). A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(15), 5652-5657. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400830101>
- Yamashita, M. & Engelman, A. N. (2017). Capsid-Dependent Host Factors in HIV-1 Infection. *Trends Microbiol*, *25*(9), 741-755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.004>
- Yang, H., Ji, X., Zhao, G., Ning, J., Zhao, Q., Aiken, C., . . . Xiong, Y. (2012). Structural insight into HIV-1 capsid recognition by rhesus TRIM5 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(45), 18372-18377. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1210903109>
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A. I., Teque, F., Cradick, T. J., Qi, Z., . . . Kan, Y. W. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(26), 9591-9596. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1407473111>
- Yoder, K. E. & Bushman, F. D. (2000). Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol*, *74*(23), 11191-11200. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.23.11191-11200.2000>
- Young, F. E. (1988). The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep*, *103*(3), 242-245.
- Yu, C., Liu, Y., Ma, T., Liu, K., Xu, S., Zhang, Y., . . . Qi, L. S. (2015). Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *16*(2), 142-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.003>
- Yu, S., Yao, Y., Xiao, H., Li, J., Liu, Q., Yang, Y., . . . Chen, X. (2018). Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther*, *29*(1), 51-67. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.032>

- Tsiperson, V., . . . Ivanov, D. N. (2015). RING Dimerization Links Higher-Order Assembly of TRIM5 α to Synthesis of K63-Linked Polyubiquitin. *Cell Rep*, 12(5), 788-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.072>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., . . . Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759-771. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S. & Yang, S. H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4(11), e264. <http://dx.doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T., Li, F., Yang, W., Kaminski, R., . . . Hu, W. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep*, 5, 16277. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16277>
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., . . . Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, 286(5443), 1353-1357. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5443.1353>
- Zhao, G., Ke, D., Vu, T., Ahn, J., Shah, V. B., Yang, R., . . . Zhang, P. (2011). Rhesus TRIM5 α disrupts the HIV-1 capsid at the inter-hexamer interfaces. *PLoS Pathog*, 7(3), e1002009. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002009>
- Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S. A. & Fassati, A. (2011). Transportin 3 promotes a nuclear maturation step required for efficient HIV-1 integration. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002194. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002194>
- Zhu, K., Dobard, C. & Chow, S. A. (2004). Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J Virol*, 78(10), 5045-5055. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.10.5045-5055.2004>

ANNEXE A

FIGURE SUPPLÉMENTAIRE

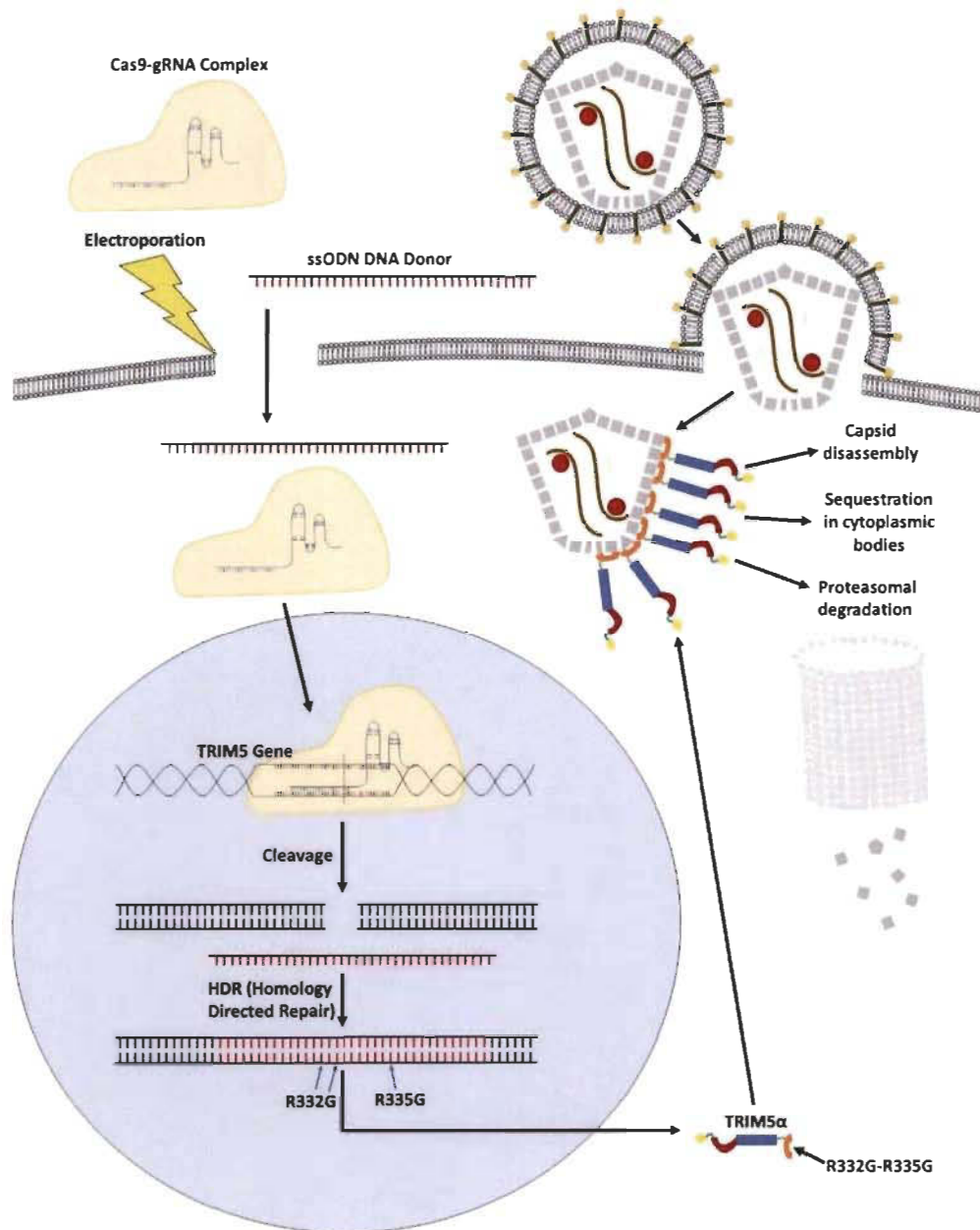


Figure A1 Résumé du projet.

Le complexe RNP Cas9 est électroporé dans des cellules Jurkat avec un ADN donneur simple brin. Le complexe RNP avec l'ADN donneur

effectue une translocation au noyau de la cellule. Cas9 induit une coupure double brin de l'ADN dans le gène TRIM5 et la coupure est réparé par HDR en utilisant l'ADN donneur. La protéine résultante porte les modifications R332G et R335G. La TRIM5 α modifiée intercepte le VIH-1 après l'entrée à l'intérieur de la cellule et se lie à la capsid virale. TRIM5 α induit un désassemblage précoce de la capsid virale, une dégradation protéasomique et une séquestration à l'intérieur des corps cytoplasmiques.