

Université de Montréal

**Étude de l'interactome et identification de nouvelles cibles de la  
protéine virale Vpr du VIH-1**

*Par*

Jérémy A. Ferreira Barbosa

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

Avril 2020

© Jérémy Ferreira Barbosa, 2020

## Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique du SIDA, un rétrovirus complexe encodant les protéines accessoires : Nef, Vif, Vpr et Vpu. La fonction principale de ces protéines est de moduler l'environnement cellulaire afin de promouvoir la réplication virale. Les travaux présentés dans cette thèse portent sur la protéine virale Vpr, une protéine bien connue pour son activité d'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules en division et pour l'avantage répliatif qu'elle confère au virus durant l'infection de cellules myéloïdes. Les événements sous-jacents à ces deux activités restent pour l'heure mal compris.

Le but des travaux regroupés dans cet ouvrage est d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires pouvant éventuellement expliquer les activités de Vpr précédemment décrites. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche d'identification des partenaires de proximité par biotinylation, appelée BioID. L'avantage du BioID est de permettre un marquage *in cellulo* des protéines à proximité de la protéine d'intérêt. La mise en place et la caractérisation de cette approche font l'objet de la première section de cette thèse.

En utilisant cette approche, nous avons défini un réseau de 352 partenaires cellulaires de la protéine Vpr. Parmi ces partenaires de Vpr, plusieurs sont organisés sous forme de complexes ou réseaux protéiques incluant notamment le complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome (APC/C) et les centrosomes. Étant donné que le complexe APC/C est l'un des principaux régulateurs du cycle cellulaire, nous avons décidé d'analyser sa relation avec Vpr. Nous avons découvert que Vpr formait un complexe non seulement avec APC1, une sous-unité essentielle du complexe APC/C, mais aussi avec les coactivateurs (CDH1 et CDC20) de ce complexe. Nous avons par la suite démontré que Vpr induisait la dégradation d'APC1 et que celle-ci pouvait être prévenue par une double-mutation N28S-G41N de Vpr. Cette dégradation d'APC1 ne semblerait pas être reliée aux activités précédemment décrites de Vpr. Ces travaux font l'objet de la seconde section de cette thèse.

Enfin, dans une troisième section, des travaux effectués en collaboration et analysant la relation entre les centrosomes et Vpr sont présentés.

Cette thèse identifie 200 nouveaux partenaires de Vpr, ouvrant la porte à l'exploration de nouvelles cibles et activités de Vpr. Elle décrit également une nouvelle cible de Vpr : le complexe APC/C. Globalement nos résultats contribuent à une meilleure compréhension de la façon dont le VIH-1 manipule l'environnement cellulaire de l'hôte à travers la protéine virale Vpr.

**Mots-clés** : virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1); protéine virale R (Vpr); marquage de proximité; BioID; protéomique; complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome (APC/C); APC1.

## Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV-1) is the AIDS causal agent. This complex retrovirus encodes several accessory proteins; namely Nef, Vif, Vpr and Vpu; whose functions are to manipulate the cellular host environment in order to favor HIV-1 viral replication. This thesis focused on Vpr whose main activities are to induce a cell cycle arrest in the G2/M phase in dividing cells and to provide a replicative advantage to HIV-1 during infection of myeloid cells such as macrophages. The cellular mechanisms underlying these two activities are up to now misunderstood.

The main goal of the work presented in this thesis is to identify new cellular factors that could potentially explain the previously described Vpr activities. To do so, we used the proximity labelling approach called BioID. The main strength of BioID is to tag *in cellulo* partners of the protein of interest. The development as well as optimization of the BioID approach is presented in the thesis first section.

Using BioID, we defined a network containing 352 cellular partners in close proximity with the viral protein Vpr. Amongst these cellular partners, several were organized into protein complexes or networks such as the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) or the centrosome. Given that APC/C is a cell cycle master-regulator, we analyzed the interplay governing Vpr and APC/C interactions. We first demonstrated that Vpr could form a complex containing the scaffolding subunit APC1. APC/C coactivators, namely CDH1 and CDC20, could also be found in association with Vpr. We next showed that Vpr was inducing APC1 degradation and that Vpr residues N28 and G41 were essential to this activity. Surprisingly, the APC1-Vpr interplay does not relate to previously described Vpr activities. This work is presented in the second section of this thesis.

Lastly, in the third section, a work done in collaboration analyzed the interplay between Vpr and the centrosomes.

In this thesis we identified 200 new potential partners of Vpr, opening the doors to discover novel Vpr targets and activities. This thesis also defined APC/C as new Vpr target.

Taken together our results allow a better understanding on how HIV-1 modulates the cellular environment by using the viral accessory protein Vpr.

**Keywords** : human immunodeficiency virus (HIV-1); viral protein R (Vpr); proximity labelling; BioID; proteomic; anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C); APC1.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des sigles et abréviations .....</b>	<b>15</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>23</b>
<b>Préface.....</b>	<b>25</b>

## Chapitre 1

### Revue de la littérature

1. La découverte du VIH-1.....	29
2. Transmission, pathogénèse et traitements: où en sommes-nous?.....	29
2.1. Épidémiologie du VIH/SIDA.....	29
2.2. Transmission du virus.....	30
2.3. Outils prophylactiques et traitements.....	30
2.4. Pathogénèse du VIH-1.....	32
3. Organisation génomique, structurelle et cycle répliatif du VIH.....	35
3.1. Organisation génomique et structurelle.....	35

3.2. Cycle répliatif du VIH .....	37
4. Les protéines accessoires du VIH et leurs rôles dans le soutien à la réplication virale .....	45
4.1. Vif .....	46
4.2. Nef et Vpu .....	47
4.3. Vpr et Vpx.....	48
5. Problématique et objectifs de recherche .....	65

## **Chapitre 2**

### **Développement de la technique de BiOLD afin de définir un réseau de partenaires de proximité de la protéine Vpr du VIH-1**

1. Introduction spécifique .....	69
1.1. L'approche de double-hybride .....	69
1.2. L'approche AP-MS .....	69
1.3. Les approches de marquage de proximité.....	70
1.4. Avantages et inconvénients des approches de protéomiques .....	72
2. Mise en contexte du chapitre .....	74
2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre.....	74
2.2. Contribution au chapitre .....	75
3. Matériels et méthodes.....	75
4. Résultats .....	78
5. Discussion du chapitre .....	92

## Chapitre 3

### **Analyse des réseaux d'interactions de la protéine Vpr du VIH-1 & identification de la protéine APC1 comme une nouvelle cible de la protéine Vpr du VIH-1**

1. Introduction spécifique .....	97
1.1. Structure et activation du complexe APC/C.....	97
1.2. Régulation du cycle cellulaire par le complexe APC/C.....	100
1.3. Autres fonctions du complexe APC/C .....	107
1.4. Manipulation du complexe APC/C par les virus.....	108
2. Mise en contexte du chapitre .....	116
2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre.....	116
2.2. Contribution au chapitre .....	117
3. Article #1 .....	118

## Chapitre 4

### **La protéine Vpr du VIH-1 module l'homéostasie des centrosomes**

1. Introduction spécifique .....	161
1.1. Les centrosomes.....	161
1.2. Centrosomes et VIH-1 .....	162
2. Mise en contexte du chapitre .....	164
2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre.....	164
2.2. Contribution au chapitre .....	164
3. Article #2 .....	165



## Chapitre 5

### Discussion & Conclusion

1. Discussion des résultats .....	197
1.1. Comprendre la protéine Vpr du VIH-1 en explorant ses partenaires cellulaires.....	197
1.2. Identification de la sous-unité APC1 du complexe APC/C comme une cible de la protéine Vpr du VIH-1 .....	199
1.3. Recrutement des complexes d'E3 ubiquitine ligase par Vpr .....	206
2. Limites et perspectives des approches protéomiques .....	207
2.1. Les limites principales du BioID.....	207
2.2. Perspectives concernant les analyses protéomiques .....	208
2.2. Perspectives sur les candidats identifiés par l'approche BioID .....	210
3. Conclusion et contributions de la thèse.....	212
3.1. Conclusion .....	212
3.2. Contributions de la thèse .....	213
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>215</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>328</b>

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1. Liste non-exhaustive des partenaires et cibles rapportés de la protéine Vpr du VIH-1.....	61
--	----

## Chapitre 2

Tableau 2. Avantages et inconvénients des approches d'identification d'interactions entre protéines.....	73
--	----

## Chapitre 3

Tableau 3. Liste des sous-unités et des coactivateurs du complexe APC/C chez l'humain .....	99
Tableau 4. Liste non-exhaustive des cibles et partenaires connus du complexe APC/C.....	101
Tableau 5. Manipulation du complexe APC/C par des protéines virales.....	109



# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1.1. Exemple d'évolution de l'infection par le VIH chez un individu infecté et non-traité.	34
Figure 1.2. Organisation génomique et structurale du VIH-1.....	36
Figure 1.3. Cycle réplcatif du VIH .....	38
Figure 1.4. Rétrotranscription du VIH .....	40
Figure 1.5. Structure de la protéine Vpr du VIH-1 .....	50
Figure 1.6. Représentation de la conservation en acides aminés de la protéine Vpr du VIH-1 ....	51
Figure 1.7. Structure du complexe Vpr-DCAF1com en complexe avec une cible de Vpr .....	53

## Chapitre 2

Figure 2.1. Structure des enzymes utilisées dans le cadre des approches de marquage de proximité.....	71
Figure 2.2.1. La fusion de BirA1 à Vpr altère sa capacité à médier un arrêt du cycle cellulaire....	79
Figure 2.2.2. Localisation différentielle des fusions BirA-Vpr par rapport à HA-Vpr .....	81
Figure 2.2.3. L'introduction d'un signal NLS permet de relocaliser les protéines de fusion au noyau mais ne restaure pas la capacité de celles-ci à médier un arrêt du cycle cellulaire.....	83
Figure 2.2.4. Comparaison de la fusion de deux protéines de taille différente sur l'activité de Vpr .....	86
Figure 2.2.5. Production et caractérisation de lignées stables inductibles exprimant les protéines de fusion .....	87
Figure 2.2.6. Les protéines de fusion sont capables d'induire la biotinylation de protéines cellulaires .....	90

## Chapitre 3

Figure 3.1. Structure du complexe APC/C en complexe avec CDH1 et EMI1 .....	98
Figure 3.2. Régulation du cycle cellulaire par les complexes APC/C et SCF.....	105
Figure 3.3.1. The Large-Scale HIV-1 Vpr Proximity Interaction Network.....	125
Figure 3.3.2. Comparative and Gene Ontology Analysis of the HIV-1 Vpr Proximity Interaction Network.....	128
Figure 3.3.3. APC1 Forms Nuclear Foci and Colocalizes with HIV-1 Vpr.....	131
Figure 3.3.4. APC1 Depletion and G2/M Cell Cycle Arrest are Two Independent Biological Activities of HIV-1 Vpr.....	132
Figure 3.3.5. HIV-1 Vpr Induces APC1 Degradation Through a Process that Requires the DCAF1com and a Functional Proteasome .....	135
Figure 3.3.6. HIV-1 Vpr Forms a Physical Complex with APC/C Independently of DCAF1com.....	138
Figure 3.3.7. HIV-1 Vpr Primary Variants Mediate APC1 Degradation .....	141
Figure 3.3.8. Double-Mutation N28S-G41N in Vpr Impedes its Ability to Mediate APC1 Degradation.....	143
Figure 3.3.9. HIV-1 Vpr Double-Mutation N28S-G41N does not Affect HIV-1 Replication in Primary CD4 <sup>+</sup> T Cells or Macrophages.....	146

## Chapitre 4

Figure 4.1.1. Vpr Interacts with CEP78 and EDD-DYRK2-DDB1 <sup>DCAF1</sup> Through DCAF1 .....	170
Figure 4.1.2. Vpr but not VprQ65R Localizes to the Centrosome.....	171
Figure 4.1.3. Vpr Enhances Ubiquitination and Degradation of CP110 but not CEP78 .....	173
Figure 4.1.4. Vpr Induces CP110 Loss, Centriole Elongation and Centrosome Amplification .....	175
Figure 4.1.5. Vpr-Induced Proteasomal Degradation of CP110 Occurs in a DCAF1-Dependent Manner.....	176
Figure 4.1.6. Vpr Centrosomal Localization and Vpr-Induced Ubiquitination and Degradation of CP110 are Independent of G2/M Arrest .....	179

Figure 4.1.7. Vpr-Induced Centrosome Amplification, but not CP110 Loss or Centriole Elongation, is Dependent of G2/M arrest.....181

Figure 4.1.8. Degradation of CP110 Induced by Vpr or VprR80A can be Overcome by CEP78 Expression .....182

Figure 4.1.9. HIV-1 Vpr Induces CP110 Loss, Centriole Elongation and Centrosome Amplification in Infected T Cells.....185

Figure 4.1.10. Depletion of CP110 or Expression of Vpr Enhances Microtubule Nucleation.....186



## Liste des sigles et abréviations

### A

ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Agm	Singe vert africain
APC/C	Complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome
AP-MS	Approche de purification par affinité
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert

### B

BER	Voie de réparation par excision de bases
BFVpr	BirA-Flag-Vpr
BioAMP	Biotinoyl-5'-AMP
BirA	Biotine ligase

### C

CA	Capside virale
cART	Antirétrovirothérapie
CAV	Virus de l'anémie du poulet
CDC	Centre pour le contrôle et la prévention des maladies
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Cpz	Chimpanzé

### D

DC	Cellule dendritique
----	---------------------



DCAF1com Complexe d'E3 ubiquitine ligase Cul4a-DDB1-DCAF1

dN Désoxynucléotides

dNTP Déoxynucleotides triphosphates

## E

*e.g.* *exempli gratia* (par exemple)

EBV Virus d'Epstein-Barr

Env Glyco-polyprotéine de l'enveloppe virale

ERAD Voie de dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique

ESCRT Complexes de tri endosomaux nécessaires au transport

EV Vecteur vide

## F

FNB Flag-NLS-BirA

## G

Gag Polyprotéine de la capsid virale

GFP Protéine fluorescente verte

Gor Gorille

## H

HAART Antirétrovirothérapie hautement active

HBV Virus de l'hépatite B

HCMV Cytomégalovirus humain

HGyV Gyrovirus humain

HPV Papillomavirus humain

HR Voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue

HRP Péroxydase

HTLV	Virus T-lymphotropique humain
<b>I</b>	
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (incluant)
IL	Interleukine
IN	Intégrase virale
<b>K</b>	
KSHV	Virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi
<b>L</b>	
LTR	Séquence terminale répétée
<b>M</b>	
MA	Matrice virale
MBVpr	Myc-BirA-Vpr
MCC	Complexe du point de contrôle mitotique
MDDC	Cellule dendritique dérivée de monocyte
MDM	Macrophage dérivé de monocyte
MR	Récepteur au mannose
<b>N</b>	
NC	Nucléocapside virale
NER	Voie de réparation de l'ADN par excision des nucléotides
NES	Séquence d'export nucléaire
NHEJ	Mécanisme de réparation non-homologue
NK	Cellules tueuses
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NPC	Nucléopore (ou complexe des pores nucléaires)

## O

ONUSIDA Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA

ORFV Virus ORF

## P

PBS Site de liaison de l'amorce

PCM Matrice péricentriolaire

PCP Approche de profilage de corrélation des protéines

PIC Complexe de pré-intégration

PKA Protéine kinase A

PML Protéine proleucémie myéloïde

Pol Précurseur des enzymes virales

PPT Séquence polypurine

PR Protéase virale

PrEP Prophylaxie pré-exposition

PVAV Personne vivant avec le VIH

## R

RNR Ribonucléotide réductase

RRE Élément de réponse à Rev

RT Rétrotranscriptase (ou transcriptase inverse)

RTC Complexe de rétrotranscription

## S

SAC Point de contrôle mitotique

shRNA Approches d'interférence par des petits ARNs de type épingle à cheveux

SILAC Marquage des acides aminés par des isotopes stables en culture cellulaire

siRNA Approche de type ARN interférent

Smm Mangabey enfumé

snRNP Petite ribonucléoprotéine nucléaire

## **T**

TAR Élément de réponse à Tat

## **V**

VIH Virus de l'immunodéficience humaine

VIS Virus de l'immunodéficience simienne

Vpr Protéine virale R

VSV-G Glycoprotéine G de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire



*Je dédicace cette thèse à ma mère qui m'a toujours poussé à me dépasser*

*Je ne te remercierais jamais assez*



## Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Éric A. Cohen, de m'avoir accepté dans son laboratoire pour que j'y fasse ma thèse. Merci pour ta supervision, ta rigueur scientifique et bien évidemment, ton soutien financier et l'aide sur mes nombreuses demandes de bourse. Merci d'ailleurs à la Fondation de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) et au Département de microbiologie, infectiologie et immunologie pour le soutien financier. Éric, cela fait un peu plus de 5 ans et demi que je suis dans ton laboratoire, il y aura eu des hauts et des bas ainsi que des visions et opinions différentes, mais à un certain point, c'est normal. Je prends conscience que j'ai grandement évolué personnellement et scientifiquement. Je me souviendrai particulièrement de deux faits. Le premier dans les premiers mois de thèse dans le contexte que l'on connaît ou tu m'avais dit « *Les scientifiques ne sont pas tous des idiots et ne travaillent pas pour ça; la grande majorité le font pour le bien commun.* » ; aujourd'hui je peux le dire... c'est cette phrase qui a fait que j'ai choisi de rester dans ton laboratoire alors que la situation n'allait nulle part. Le second, c'est toutes ces réunions que l'on aura eu les fins de semaines et jours fériés; avoir une réunion avec son directeur de recherche dans ces circonstances était motivant pour moi.

Je voudrais également remercier Dr Jean-François Côté et Dr Nicolas Chomont pour leur soutien, d'avoir siégé sur mon comité de suivi et pour leurs conseils judicieux. Merci également à Dr Guy Lemay, Dr Javier Marcelo Di Noia, Dr Jose Teodoro et Dr Philippe P. Roux d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Merci également aux membres actuels et anciens du laboratoire que j'aurai croisé durant ces années. Un énorme merci à Dre Cynthia Torresilla pour son soutien, son écoute, sa motivation et ses précieux conseils dans les premières années de ma thèse; à Dre Mariana Bego pour son soutien, son écoute mais aussi pour ses bons conseils; et à Dr Robert Lodge pour son soutien, son écoute, ses conseils mais aussi pour les opportunités de travailler avec toi (ça a été un plaisir sincère). Je souhaite une bonne continuation à Dre Isa Muñoz-Arias et Dre Samantha Sparapani.



Merci à la Fondation de l'IRCM qui m'aura permis de m'impliquer et de voir autre chose que le laboratoire. Merci notamment aux membres du Comité de la relève de la Fondation de l'IRCM pour m'avoir fait découvrir un monde différent et d'une richesse incroyable.

Sur une note plus personnelle, merci à Fanny, Sean, Marc, Julie & Cédric, Yahya & Ibtissem, Emma & JF. Merci aussi membres du CCUM, CAUM et CAM avec qui je me serai vidé la tête pour quelques heures. Merci à tous ceux que j'aurais oublié.

Enfin, merci à ma famille de m'avoir supporté, motivé, remotivé et re-remotivé durant ces années. Merci également d'avoir accepté que je sois loin de vous. Enfin et non le moindre merci à ma partenaire de vie, Stéphanie, pour ta patience, ton énergie et ta douce folie. Écrire cette thèse alors que toi-même écrivais la tienne, le tout sous fond de crise sanitaire, était à la fois une épreuve et un plaisir.

Merci.

## Préface

Les virus et leurs hôtes sont des entités biologiques ayant co-évolué au fil du temps. Les virus se sont adaptés à leurs hôtes et ont développé diverses stratégies afin de pouvoir se répliquer et infecter les hôtes; alors que ces derniers se sont adaptés aux virus et ont développé une panoplie d'outils afin d'éviter que ces derniers ne les infectent et ne se répliquent. C'est ce que nous définirons comme des relations hôtes-pathogènes.

Il y a bientôt de cela quarante ans que le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été identifié chez des patients, qui étaient alors atteints de maladies peu communes et développaient une immunodéficience sévère. Cette immunodéficience sera appelée syndrome d'immunodéficience acquise, ou SIDA, une maladie causant d'antan une mort rapide et inévitable. Depuis, la recherche a fait son œuvre et des traitements antirétroviraux (ART) ont été développés de manière à prévenir l'infection virale. Grâce à ces traitements, le VIH/SIDA n'est aujourd'hui plus aussi mortel qu'il l'était et les patients infectés ont une espérance de vie relativement semblable à celle de la population générale.

Cet ouvrage présentera et regroupera des travaux portant sur la protéine virale R, Vpr, du VIH-1. Ces travaux avaient pour objectif global d'explorer la relation hôte-pathogène au niveau moléculaire afin de mieux comprendre la protéine virale Vpr et de permettre ultimement le développement d'outils thérapeutiques contre le VIH. Malgré quelques avancées notables et trois décennies après sa découverte, cette protéine importante à la réplication virale reste encore pour l'heure très mal comprise. Il s'agit probablement de la protéine la plus énigmatique de ce virus.

Durant ma thèse, j'aurais appris que la recherche n'est pas conduite par un seul et unique individu mais qu'elle l'est plutôt par une communauté dont les membres fournissent ensemble l'effort nécessaire à la résolution des problèmes. J'espère que ce travail permettra d'ajouter une pierre à l'édifice et ouvrira sur de nouvelles pistes de réflexion concernant la protéine virale Vpr du VIH et ses activités.



## **Chapitre 1**

### **Revue de la littérature**



## **1. La découverte du VIH-1**

En 1981, un rapport épidémiologique du centre pour le contrôle et la prévention des maladies américain (CDC) portant sur la morbidité et la mortalité aux États-Unis, rapporte qu'un diagnostic de sarcome de Kaposi, une tumeur habituellement maligne rarement signalée dans ce pays, avait été établi pour vingt-six patients masculins homosexuels. Huit de ces patients décèderont dans les deux ans suivant le diagnostic de la maladie (1). Comme les patients étaient immunosupprimés, il était alors spéculé que l'apparition du sarcome de Kaposi pouvait être causée par l'activation de virus oncogènes comme le virus de l'herpès humain 8, également appelé virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi ou KSHV (2). Le CDC nomma cette maladie : immunodéficience liée à l'homosexualité, puis la renomma par la suite sous son nom actuel de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Dans les années qui suivirent, des cas de sarcome de Kaposi et d'autres infections opportunistes rares furent rapportés à travers le monde (3, 4). Le travail des groupes des professeurs Luc Montagnier et Robert C. Gallo mena en 1983/1984 à l'identification d'un nouveau rétrovirus – le VIH-1 – comme l'agent étiologique du SIDA (5-8). Cette découverte valut à Professeur Luc Montagnier et Dr Françoise Barré-Sinoussi, non sans controverse, le prix Nobel partagé de physiologie ou médecine 2008 (9, 10).

## **2. Transmission, pathogénèse et traitements: où en sommes-nous?**

### **2.1. Épidémiologie du VIH/SIDA**

Le VIH a initialement été transmis à l'homme par le singe en Afrique centrale alors que ceux-ci étaient chassés, par exemple, pour leur viande ou pour en faire des animaux de compagnie. En effet, le VIH-1 est phylogénétiquement proche du virus de l'immunodéficience simienne que l'on retrouve chez certains singes comme le chimpanzé ou le gorille, respectivement appelés VIS<sup>cpz</sup> et VIS<sup>gor</sup> (11, 12). Au moins trois événements de transmission entre le chimpanzé et l'homme ont eu lieu et ces événements sont responsables de la naissance des groupes M, N et O du VIH-1 (13). Notons une répartition phylogénétique en sous-types – aussi appelés clades – du groupe M, groupe ayant contribué de manière prédominante à l'épidémie, soit les

sous-types: A – D, F – H, J et K. Un autre évènement de transmission, cette fois ci entre le gorille et l'homme, a donné naissance au groupe P. Ce dernier groupe ne représente toutefois que deux cas d'infection (14, 15). Il a été rapporté qu'en plus des quatre évènements de transmission entre chimpanzé/gorille et l'homme précédemment introduits, d'autres évènements ont mené à la naissance du VIH de type 2 (VIH-2). Celui-ci n'origine pas d'un virus provenant du chimpanzé ou du gorille mais plutôt du mangabey enfumé, appelé VIS<sup>smm</sup>. Il y aurait eu au moins huit évènements de transmission, menant aujourd'hui aux deux principaux groupes de VIH-2 que sont les groupes A et B (12). Nous discuterons de quelques différences entre les deux types de VIH dans une prochaine section.

Selon les derniers chiffres du programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA), en date de fin 2018, il y aurait ≈ 37,9 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde dont ≈ 24.5 millions sous médication. Annuellement, il est estimé à ≈ 1,7 million le nombre de nouvelles infections et à ≈ 770 000 le nombre de décès liés aux conséquences du SIDA dans le monde (16). Malgré la baisse globale des chiffres depuis le sommet de l'épidémie, une recrudescence inquiétante du nombre de cas a été noté dans certains pays (16).

## **2.2. Transmission du virus**

Le VIH-1 peut être transmis entre personnes de différentes manières. D'un côté par des transmissions horizontales : par contacts sexuels non protégés avec une personne vivant avec le VIH (PVAV) ou par le partage de matériel souillé par du sang contaminé (notons que les transfusions sanguines ont été à l'origine de nombreux cas de transmission au début de l'épidémie (17-19)). D'un autre côté, le VIH peut se transmettre verticalement : de la mère à l'enfant lors de la grossesse, de l'accouchement ou de l'allaitement (20-23).

## **2.3. Outils prophylactiques et traitements**

La meilleure des préventions étant d'éviter le contact direct avec le virus, l'utilisation des préservatifs se sera révélée un outil prophylactique relativement efficace contre le VIH et ce dès le début de l'épidémie (24, 25). Plus récemment, un nouveau concept prophylactique a vu le jour, il s'agit de la prophylaxie pré-exposition (PrEP). Ce concept est basé sur l'idée d'empêcher l'établissement de l'infection virale à l'aide d'un traitement antirétroviral chez des personnes

saines considérées à risque (26-29). Ces médicaments antirétroviraux sont capables d'inhiber le virus à chacune des étapes du cycle de réplication virale; nous reviendrons sur la notion de cycle de réplication dans un paragraphe subséquent. Dans le cas de la PrEP, un mélange de deux analogues nucléosidiques inhibe l'étape de rétrotranscription, prévenant ainsi l'infection productive de la cellule (26, 30).

Lorsqu'infectée, la personne vivant avec le VIH pourra être traitée avec une combinaison variable d'au moins trois médicaments antirétroviraux, c'est ce que l'on appelle l'antirétrovirothérapie (cART), également connu sous le nom d'antirétrovirothérapie hautement active ou l'acronyme HAART (31). Ce traitement permettra alors de diminuer progressivement la réplication et la charge virale jusqu'à ce qu'elle devienne indétectable par des essais cliniques conventionnels et que le virus devienne non-transmissible (32). Le traitement cART permet aux PVAVs de contrôler l'infection virale. Ce faisant, leur espérance de vie augmente et se rapproche de celle de la population non-infectées (33-36). Cependant, le traitement n'éliminera pas complètement le virus et celui-ci continuera de se répliquer à bas bruit (37), il sera alors latent et présent dans ce que l'on appelle des réservoirs viraux. Ces réservoirs viraux seront présents durant toute la vie de la PVAV et l'interruption du traitement relancera alors la réplication virale (38-44). Bien que rare, ces virus pourront éventuellement muter, acquérir des résistances aux molécules antirétrovirales et provoquer un rebond de la réplication virale (39, 45-48). Dans ce cas, il sera possible d'isoler puis de génotyper le virus afin d'identifier le mécanisme menant à la résistance afin d'ajuster le traitement antirétroviral grâce à la grande variété de molécules antirétrovirales disponibles (49-52).

Pour l'heure, deux cas de guérison complètes du VIH ont été rapportées. Il s'agit des patients de Berlin (Mr Timothy Brown) et de Londres (Mr Adam Castillejo). En plus de vivre avec le VIH, ces deux patients avaient été diagnostiqués respectivement d'une leucémie myéloïde aigue et d'un lymphome Hodgkinien. Ils ont tous deux subi des transplantations de cellules souches hématopoïétiques, à deux reprises pour le patient de Berlin et à une reprise pour le patient de Londres, provenant de donneurs portant la mutation  $\Delta 32$  sur le corécepteur CCR5. Cette mutation confère une résistance des cellules à l'infection par le VIH. Ces deux personnes ne présentent pas de virémie depuis respectivement  $\approx 13$  ans et 30 mois (53-57). Ces procédures



extrêmement risquées ne peuvent cependant pas être applicables à toutes les PVAVs (58). Néanmoins, ces deux hommes sont des indices que le VIH peut être vaincu.

## **2.4. Pathogénèse du VIH-1**

La glycoprotéine virale de l'enveloppe virale gp120 confère le tropisme au VIH en interagissant avec le récepteur cellulaire CD4 (59-63). Le VIH infectera donc les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés. Ces cellules sont ses principales cibles (5, 60, 62-66). Lors de l'établissement de l'infection, il est également possible que le virus infecte premièrement les cellules dendritiques (DCs) présentes au niveau des muqueuses puis les lymphocytes T folliculaires présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires (67-70). Les DCs ne sont pas connues pour contribuer abondamment à la production virale mais elles contribuent toutefois à l'établissement de l'infection (71-74). Notons qu'en plus d'infecter ces cellules, le virus peut aussi adhérer à la surface des DCs, grâce aux lectines de type C, notamment au récepteur DC-SIGN. Ceci permet au virus d'utiliser les DCs comme des vecteurs pour infecter à postériori les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (75-77). Bien que l'environnement cellulaire ne soit pas propice à la réplication du virus et que les cellules n'expriment que de très faibles niveaux de CD4, les monocytes sont des cellules pouvant également être infectées par le VIH (78-84). Enfin, le VIH peut aussi infecter les macrophages de manière productive, notamment grâce à une transmission de cellule à cellule en partie reliée à leur activité de phagocytose (70, 85-91).

La hausse importante de la réplication virale ainsi que la déplétion progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez la PVAV définissent la phase précoce de l'infection par le VIH (5, 66, 92-99), voir la Figure 1.1. Notons que la grande majorité des cellules déplétées ne sont alors pas infectées, mais que leur déplétion peut être notamment expliquée par une mort cellulaire induite par les protéines virales relâchées par les cellules infectées, incluant les glycoprotéines de l'enveloppe virale ainsi que les protéines Tat, Vpr et Nef (100-106); mais aussi par une hyperactivation du système immunitaire menant à l'épuisement de la capacité à se répliquer des cellules T CD4<sup>+</sup> (107-111); ou encore par l'inflammasome qui est responsable d'une forte inflammation conduisant au phénomène de pyroptose (112-115). Notons également qu'une

réponse immunitaire des cellules tueuses (NK) et des cellules T CD8<sup>+</sup> sera mise en place, tuant une certaine quantité de cellules infectées (116-124).

Mais la mise en place de la réponse adaptative spécifique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques permettra cependant de contrôler la réplication virale (120, 125, 126). La quantité de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> remontera alors légèrement puis une délicate balance s'établira alors entre la quantité de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la charge virale. C'est la phase asymptomatique. Notons que durant cette phase de latence clinique, le virus se répliquera à bas bruit et les cellules infectées par des virus latents continueront de se répliquer (37, 127-133).

En fonction de facteurs intrinsèques à l'individu et en l'absence de traitements, cette balance restera équilibrée pendant une période allant de plusieurs années à plusieurs décennies. Avec le temps, la balance finira par pencher en faveur du virus. D'un côté, les lymphocytes CD8<sup>+</sup> deviendront de plus en plus épuisés (134-137); et d'un autre côté, le virus développera des stratégies dans le but d'éviter le système immunitaire et notamment les cellules NK (138-143). Bien que le réservoir viral soit génétiquement relativement stable (129, 144-147), certaines études proposent également que le virus accumulerait certaines mutations notamment au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe virale, lui permettant d'échapper au contrôle immunitaire (128, 143, 148).

Avec un système immunitaire aussi affaibli, des maladies à pathogènes opportunistes se développeront. Elles seront alors difficiles à combattre. De plus, le virus induira directement ou non, des atteintes au niveau d'organe incluant notamment des reins, du tractus digestif, des poumons ou encore du cerveau contribuant à la pathogénèse du virus (149-154). C'est la phase SIDA. Elle mène au décès du patient.

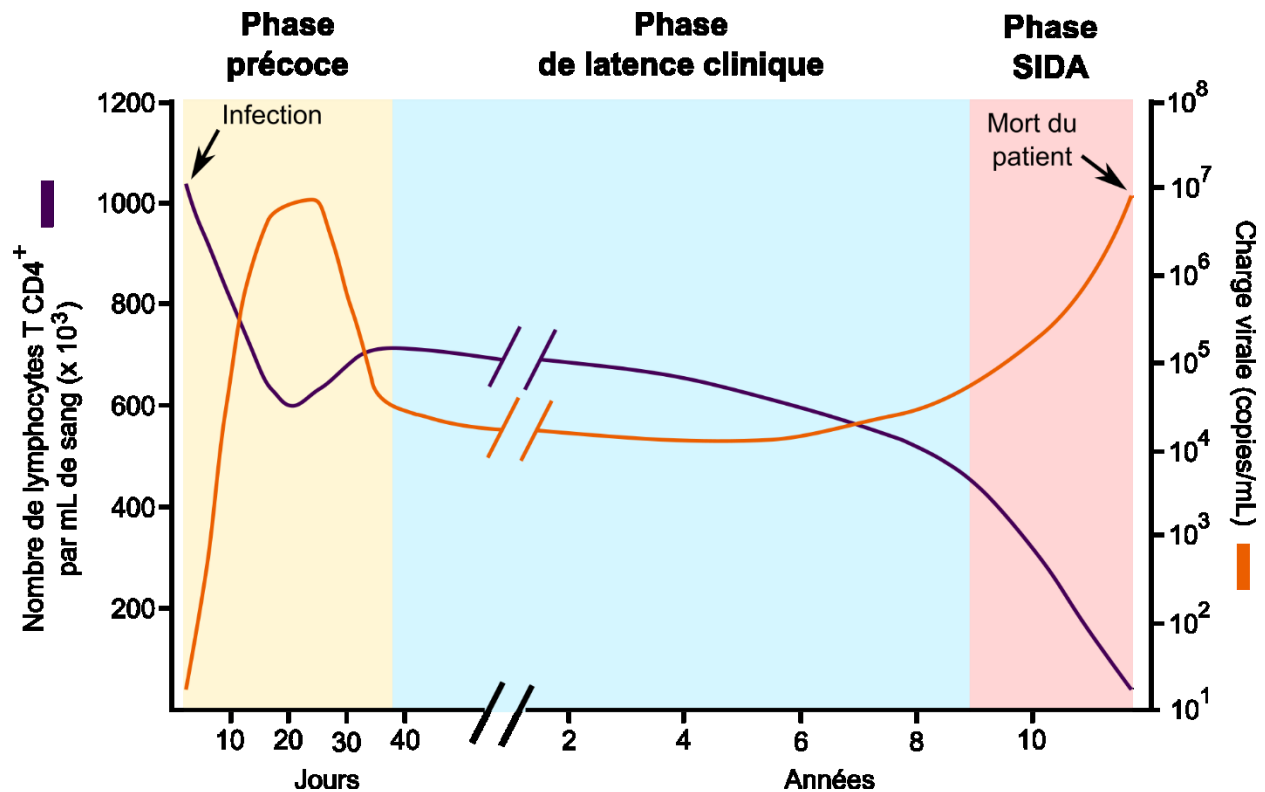


Figure 1.1. Exemple d'évolution de l'infection par le VIH chez un individu infecté et non-traité

La quantité de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> par mL de sang est représentée en violet, alors que le nombre de copies d'ARN viraux par mL (charge virale) est représenté en orange. La phase précoce (section du graphique en jaune) se déroule dans premières semaines et est caractérisée par une augmentation de la charge virale et une diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La phase asymptomatique (section du graphique en bleue) suivra la phase précoce et sera caractérisée par une relative stabilisation de la charge virale et du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La phase SIDA (section du graphique en rouge) débutera lorsque déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sera trop importante. Elle sera caractérisée par un déclin rapide de leur nombre ainsi que l'apparition de maladies à pathogènes opportunistes et d'autres complications (*e.g.* neurologiques, rénales) reliées au SIDA. La phase SIDA aboutira par le décès du patient. Figure reproduite, modifiée et basée sur une illustration provenant de (159).

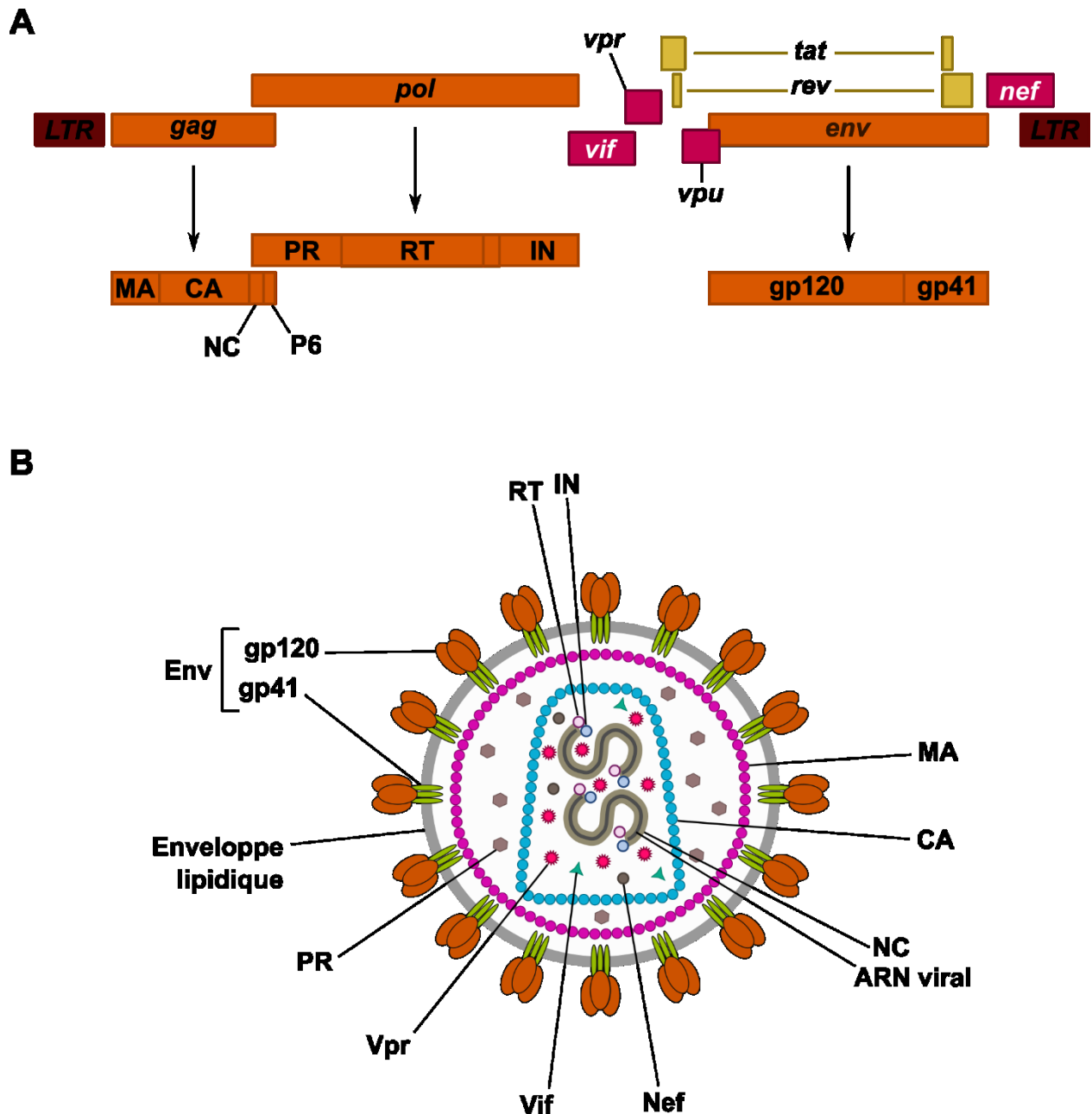
### 3. Organisation génomique, structurale et cycle répliatif du VIH

#### 3.1. Organisation génomique et structurale

Le VIH est composé d'une capsidie conique qui est enveloppée d'une couche lipidique provenant de la membrane cytoplasmique cellulaire et a une taille approximative de 100 nm (5, 155-158). Son génome, d'une taille approximative de 9 700 nucléotides, est composé de deux molécules identiques d'acide ribonucléique (ARN) simple brin à polarité positive qui seront rétro-transcrits en acide désoxyribonucléique (ADN) puis intégrés dans le génome cellulaire durant l'infection d'une cellule cible (160-165). Étant donné ces caractéristiques, le VIH est classé dans le groupe VI de la classification de Baltimore; il fait partie de la famille des *Retroviridae* et du genre *Lentivirus*.

Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH est encadré de deux séquences terminales répétées ou LTR (165, 166), voir la Figure 1.2. Il contient les gènes encodant pour les polyglycoprotéines structurales de l'enveloppe virale (Env) et de capsidie (Gag) ainsi que des enzymes virales (Pol). Ces polyprotéines seront clivées pour obtenir respectivement, Env : la protéine de surface gp120 et transmembranaire gp41; Gag : la protéine de la matrice (MA), de la capsidie (CA), de la nucléocapsidie (NC) et la protéine P6; Pol : la protéase virale (PR), la rétrotranscriptase (RT) et l'intégrase (IN) (161). En plus de ces trois gènes communs aux rétrovirus, le VIH possède deux gènes codants pour les protéines régulatrices Tat et Rev, ainsi que quatre autres codants pour des protéines dites accessoires, soit Nef, Vif, Vpu (uniquement retrouvée chez le VIH-1) ou Vpx (uniquement retrouvée chez le VIH-2) et Vpr (167-179). L'expression de ces différentes protéines est régulée par un mécanisme d'épissage dont nous discuterons plus tard dans cette revue de littérature (180, 181).

Le rôle des différentes protéines accessoires est de modifier l'environnement cellulaire afin de soutenir la répliation virale (182). Elles ont initialement été décrites comme accessoires car elles étaient dispensables dans certains systèmes d'infection, en culture cellulaire notamment (172, 183-187). Elles sont néanmoins essentielles à la répliation du VIH dans certains modèles de cellules primaires ou durant l'infection *in vivo* ainsi que pour la pathogénèse du VIH (167, 184, 186-193). Il a par exemple été rapporté, chez un personnel de laboratoire de recherche qui s'était



**Figure 1.2. Organisation génomique et structurale du VIH-1**

(A) Représentation génomique du VIH-1. Les gènes *gag*, *pol*, et *env* encodent pour des glyco-polyprotéines qui seront clivées comme indiqué. Les gènes en orange codent pour des protéines essentielles; les gènes en jaune codent pour des protéines régulatrices; les gènes en rouge codent pour des protéines accessoires. (B) Représentation schématique de la structure d'une particule virale mature.

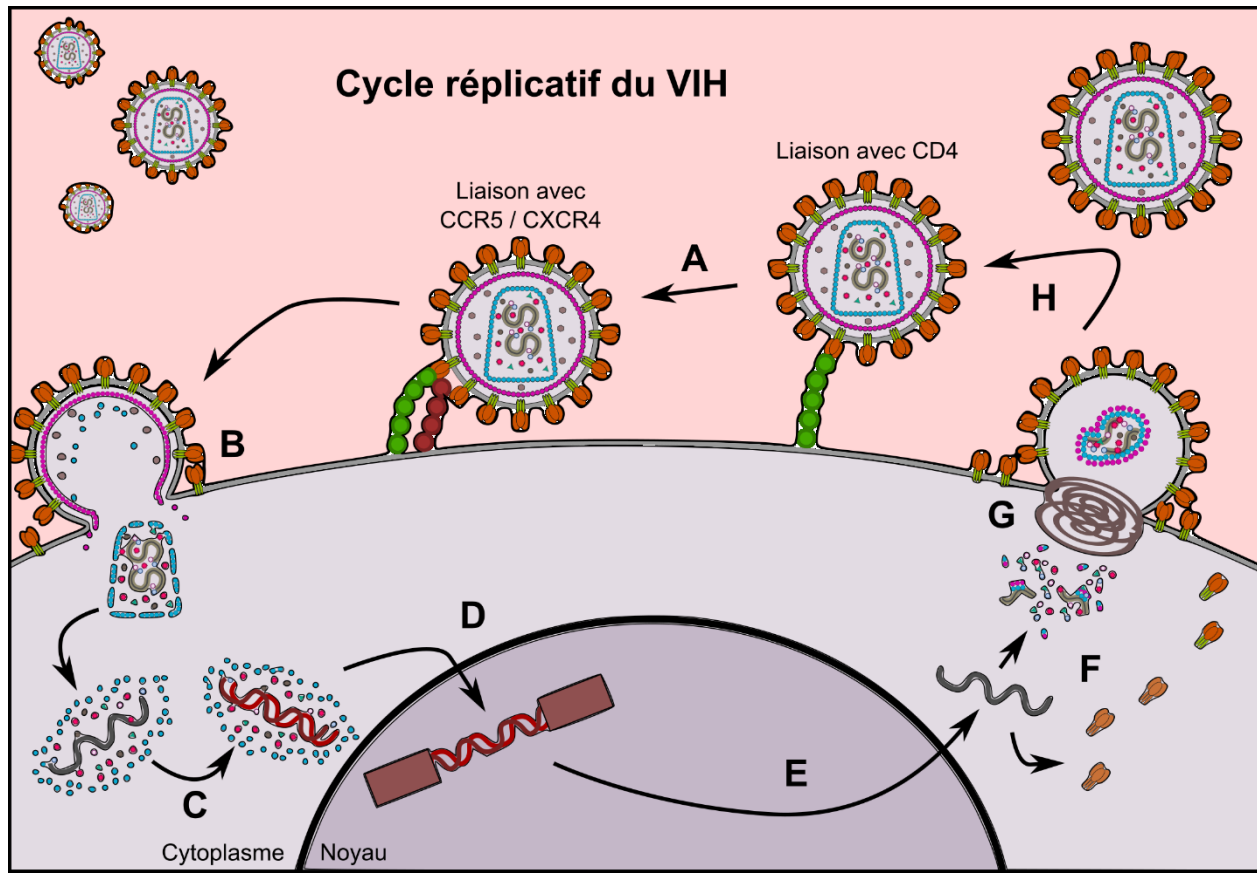
accidentellement contaminé, qu'un virus ayant une mutation au niveau du codon d'initiation de la protéine Vpr avait réverté de manière à encoder une protéine Vpr fonctionnelle (194). Enfin, mentionnons les travaux effectués sur les singes rhésus, qui démontraient que Vpr, Vpx et Nef facilitaient grandement l'infection par le SIV et que certains virus déficients pour Vpr ou Nef avaient également révertés rapidement durant les expériences (195, 196). Cet accident et ces expériences illustrent la pression de sélection, en faveur des protéines accessoires, qui s'effectue durant l'infection par le VIH. Les rôles des différentes protéines virales introduites dans ce paragraphe seront abordés dans les sections et paragraphes suivants.

### **3.2. Cycle répliatif du VIH**

Le cycle répliatif du VIH est composé de trois étapes principales : 1) étapes pré-intégration (ou précoce) incluant l'adhésion du virus, l'entrée dans la cellule et la rétrotranscription; 2) étape d'intégration; 3) étapes post-intégration (ou tardives) incluant la transcription et l'épissage, l'assemblage et la relâche des particules virales (161, 197). Ces étapes seront succinctement présentées dans les prochains paragraphes (Figure 1.3).

L'entrée du virus dans la cellule cible (*e.g.* lymphocyte T CD4<sup>+</sup> ou macrophage) nécessite l'interaction entre la sous-unité gp120 de la glycoprotéine de l'enveloppe virale avec le récepteur cellulaire CD4 (59-63, 198). Cette interaction entrainera un changement conformationnel de la glycoprotéine de l'enveloppe virale qui se liera alors aux récepteurs des chimiokines CXCR4 ou CCR5 (199-207). À la suite de l'interaction du corécepteur à gp120, il y aura un nouveau changement conformationnel de la glycoprotéine de l'enveloppe virale menant au harponnage de la membrane cellulaire par gp41 puis à la fusion de l'enveloppe lipidique du virion avec la membrane cellulaire. La capsid virale sera ainsi relâchée dans le cytoplasme cellulaire (207-210).

À cette étape, la capsid virale contient notamment le génome viral sous forme d'ARN, les protéines structurales MA et CA, les enzymes virales RT et IN ainsi que les protéines accessoires Vpr et Vpx dans le cas du VIH-2 (211-215). Elle est alors appelée complexe de rétrotranscription (RTC), ce complexe se dirigera vers le noyau cellulaire, en utilisant le réseau de microtubules et les filaments d'actine (216-224). Les protéines MA, CA, Vpr et Vpx semblent être importantes



**Figure 1.3. Cycle répliatif du VIH**

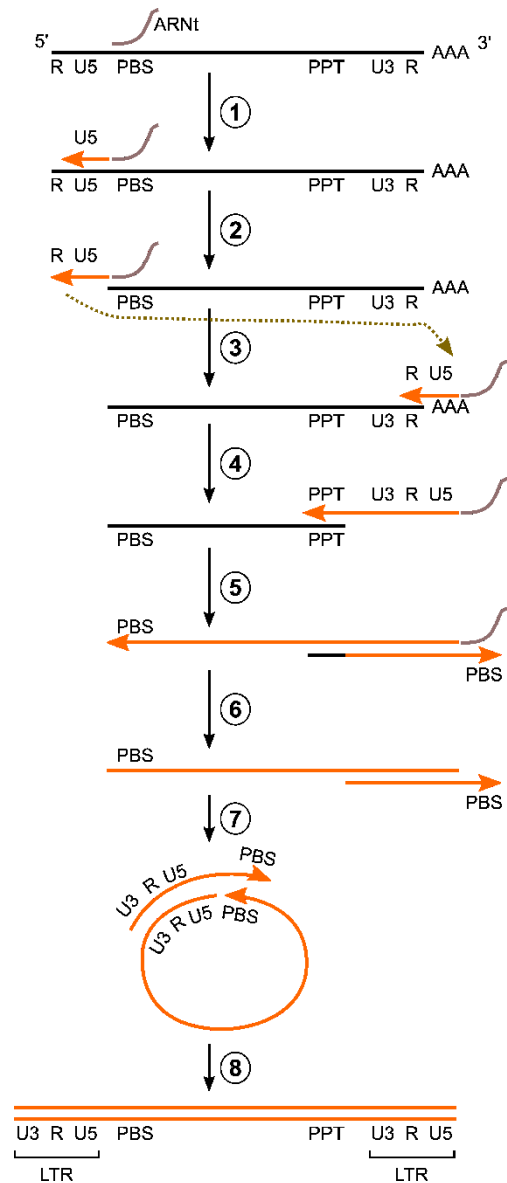
Représentation schématique du cycle répliatif du VIH. L'étape d'adhérence du virus à la surface cellulaire (A), la fusion de l'enveloppe lipidique du virion avec la membrane cellulaire (B) ainsi que la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN (C) font partie des étapes précoces du cycle répliatif. Ces étapes sont suivies par l'étape d'intégration (D). Enfin, les étapes tardives du cycle de répliation virale auront lieu; incluant la transcription des ARN messagers viraux (E), l'épissage (non présenté) et la traduction en protéines viraux (F), l'assemblage des particules viraux (G), et enfin la relâche et la maturation des virions (H). Figure reproduite, modifiée et basée sur une illustration provenant de (233).

pour le transport du RTC au noyau (213, 225-229). Il semblerait que l'interaction de la protéine CA avec l'adaptateur de la Kinésine 1 appelé FEZ1 et avec la protéine adaptatrice BICD2, impliquée dans le recrutement des complexes Dynéine-Dynactine, soit essentielle au transport du RTC (217, 220, 223, 230, 231). Le recrutement de la chaîne légère de la Dynéine avec les protéines virales IN et Vpr semble également important pour cette activité (224, 232).

La décapsidation virale, définie comme la dissociation des protéines CA du reste du RTC, prendra alors place; le mécanisme détaillé et la localisation de l'événement sont très controversés (234-236). Alors que le modèle classique de décapsidation la présentant comme un événement ayant lieu très rapidement, après la fusion de l'enveloppe lipidique du virion avec la membrane cellulaire, au niveau cytoplasmique soit soutenu par plusieurs études (215, 237-240); d'autres suggèrent plutôt que la décapsidation soit un événement ayant lieu progressivement lors du transport du RTC vers le noyau et qu'une partie des protéines CA soient nécessaires à l'ancrage du complexe aux pores nucléaires (217, 222, 241-245). Enfin, certaines études observent une localisation nucléaire de CA lors de l'infection et proposent que la décapsidation soit un événement débutant une fois le virus ancré aux pores nucléaires ou même seulement au niveau du noyau cellulaire (239, 246-253). Notons qu'une décapsidation trop rapide du virus pourrait exposer le génome viral à des senseurs cellulaires, entraînant sa reconnaissance comme « non-soi » et déclenchant une réponse immunitaire (254-256). Dans leur ensemble, ses études suggèrent que la décapsidation pourrait être initiée au niveau du cytoplasme, induisant une perte d'intégrité de la capsid virale et éventuellement se terminer dans le noyau cellulaire (236).

Durant son trajet vers le noyau cellulaire, le RTC sera le lieu où prendra place la transcription inverse, voir Figure 1.4 (239, 257-259). Pour ce faire, un ARN de transfert cellulaire (ARNt) se liera à une séquence spécifique, appelée site de liaison de l'amorce (PBS), présente à proximité du LTR en 5' du génome viral qui est alors sous forme d'ARN. Il y aura alors synthèse d'un brin complémentaire d'ADN viral à polarité négative par la transcriptase inverse (étape 1). L'ARN présent au niveau de la double structure ADN/ARN sera alors progressivement digéré par la RT ce qui formera une section d'ADN simple brin à polarité négative (étape 2). Ce brin ira ensuite s'hybrider par homologie au niveau du second LTR en 3' du génome viral, permettant à la RT de reprendre la synthèse de l'ADN à polarité négative (étapes 3 et 4). Notons, qu'une étude





**Figure 1.4. Rétrotranscription du VIH**

Représentation schématique de l'étape de rétrotranscription VIH. Le génome viral sous forme d'ARN à polarité positive est représenté par des traits noirs, alors que ceux-ci seront jaunes/orangés quand le génome viral sera sous forme d'ADN. Voir le paragraphe correspondant pour une explication détaillée de la figure. (1) Synthèse d'un brin d'ADN à polarité négative. (2) Digestion du brin d'ARN. (3) Transfert du brin premier d'ADN. (4) Reprise de la synthèse du brin d'ADN à polarité négative. (5) Digestion du brin d'ARN. (6) Synthèse du brin d'ADN à polarité positive. (7) Second transfert de brin d'ADN. (8) Fin de la synthèse de l'ADN génomique. PBS : site

de liaison de l'amorce; PPT : séquence polypurine. Figure reproduite, modifiée et basée sur une illustration provenant de (261).

récente propose que la décapsidation soit initiée une fois le transfert du brin effectué (260). Une fois la synthèse du premier brin terminée, l'ARN viral sera quasiment complètement digéré, ne laissant alors qu'une séquence résistante à l'activité RNaseH de la RT (étape 5). Cette séquence, appelée PPT, servira alors d'amorce à polarité positive (étape 6) et permettra à la RT d'ajouter un brin complémentaire afin d'obtenir un ADN double brin au moyen d'un second transfert de brin; voir l'étape 7 (197, 261). À cette étape et par convention, l'ADN génomique étant prêt à être intégré (étape 8), le RTC sera renommé sous le nom de complexe de pré-intégration ou PIC (262). Il semblerait que cette conversion du RTC en PIC s'effectue au niveau cytoplasmique et que les virus dont la RT se termine au noyau cellulaire soient défectifs pour l'intégration (239).

Le PIC traversera alors activement la membrane nucléaire (263). Ce mécanisme dépend de nombreuses interactions entre les protéines cellulaires et celles du PIC, particulièrement avec CA et IN qui contiennent des séquences classiques de localisation nucléaire (NLS), permettant le passage du complexe à travers les pores nucléaires; notamment au moyen de la voie Importine  $\alpha/\beta$  (227, 264-266). En effet, il semblerait que les protéines virales CA et IN recrutent tout d'abord, du côté cytoplasmique du nucléopore (NPC), un complexe formé de Transportin-3 (un membre de la famille des Importine  $\beta$  (267)) et de CPSF6 qui servent de transporteur au PIC (267-280). Ce complexe interagira par la suite avec les nucléoporines 358 (Nup358, également appelée RanBP2) et Nup88, toujours du côté cytoplasmique de façon à ancrer le PIC au nucléopore (281-284); puis traversera le nucléopore en interagissant notamment avec les nucléoporines Nup62 et Nup98 (284, 285). Enfin, le PIC sortira du nucléopore en interagissant notamment au niveau du panier du nucléopore avec la nucléoporine Nup153 (248, 284, 286, 287). La protéine virale Vpr, bien connue pour localiser au noyau cellulaire et être associée au PIC, pourrait également permettre le transport du PIC au noyau (217, 226, 228, 266, 288-291). Vpr possède en effet deux séquences non-conventionnelles de localisation nucléaire (291-298). Le transport nucléaire de Vpr semblerait être médié par une interaction directe entre Vpr et le NPC mais aussi éventuellement par un mécanisme impliquant Importine  $\alpha$  (266, 288, 290, 299-305). Vpr interagit avec la nucléoporine Nup42 (CG1) du côté cytoplasmique du nucléopore (300), puis les nucléoporines Nup54 et Nup58 présentent au milieu du nucléopore (288, 289). Ces interactions de Vpr avec le NPC suggèrent que Vpr pourrait médier l'importation du PIC durant l'infection par le VIH. Vpr serait également

capable de déstructurer l'enveloppe nucléaire par un mécanisme non identifié et il est possible que ceci aide également au transport du PIC à travers la membrane nucléaire (306).

Une fois le PIC au noyau cellulaire, le génome viral composé alors d'un ADN double brin sera intégré dans le génome cellulaire, une étape qui est catalysée par IN (307-311). La première étape de l'intégration consiste à enlever deux ou trois nucléotides des extrémités 3' de l'ADN viral (312, 313). Les extrémités 3' de l'ADN viral seront alors utilisées pour attaquer puis cliver l'ADN cellulaire, en y attachant simultanément les extrémités 3' de l'ADN viral aux extrémités 5' de l'ADN cellulaire (307, 308, 313). Cette étape laissera cependant quelques nucléotides sous forme de simple brin et l'ADN devra donc être réparé (314, 315). Les mécanismes de réparation de l'ADN employés afin de terminer l'intégration sont mal compris et sembleraient possiblement impliquer différentes voies de réparation qui ne coopèrent habituellement pas ensemble. Ce mécanisme pourrait notamment impliquer la voie de réparation par excision des bases (BER) notamment avec le recrutement de l'ADN polymérase  $\beta$  (316-318); ou encore la voie de réparation par recombinaison homologue (HR) notamment car la protéine RAD51, une protéine importante pour le transfert de brin ayant lieu durant la HR, semble interagir avec IN (319, 320). L'implication de BER et de HR dans ce mécanisme de réparation reste à confirmer. Plusieurs études semblent aussi indiquer que la protéine FEN1, une endonucléase, soit importante pour le retrait des nucléotides excédentaires et que la réparation soit effectuée à l'aide du complexe DNA-PK, Ku70 et Ku80 par le mécanisme de réparation non-homologue (NHEJ) (321-331). Le recrutement de Ku70 par IN semblerait être la clef de voute de ce mécanisme de réparation car la présence de Ku70 au niveau des dommages mènerait au recrutement des autres composantes du complexe (328). Notons que le complexe NHEJ est généralement impliqué dans la réparation de cassure double brin de l'ADN et non pas simple brin comme dans notre cas précis (332, 333). L'implication du NHEJ dans le mécanisme d'intégration est cependant remis en question par d'autres études (334, 335). L'intégration du VIH aura lieu dans des régions de l'ADN cellulaire qui seront relativement denses en gènes et transcriptionnellement actives (130, 336, 337), souvent à proximité des nucléopores (338, 339). Il semblerait cependant que les sites d'intégration soient légèrement différents d'un type cellulaire à l'autre et qu'en comparaison avec les sites d'intégration dans les cellules CD4<sup>+</sup>, l'intégration dans les macrophages ait plutôt lieu dans des régions intergéniques (340, 341).

À la suite de son intégration dans le génome cellulaire, l'ADN viral pourra être initialement transcrit par la RNA polymérase II, ce qui permettra d'exprimer les protéines précoces du VIH (342). Différents facteurs de transcription cellulaire comme NF- $\kappa$ B, NFAT ou Sp1 peuvent moduler cette transcription en liant les sites présents au niveau du LTR 5' du VIH (342). Notons que Vpr pourrait également moduler la transcription virale (343, 344). Une fois la protéine virale Tat exprimée, un complexe contenant entre-autres Tat et le complexe P-TEFb (lui-même composé des protéines cellulaires CDK9 et Cycline T1) se liera à l'élément de réponse à la transactivation (TAR) et soutiendra l'élongation de la transcription (345-351). Une fois la transcription effectuée, l'ARN messenger du VIH sera alors épissé de manière alternative en trois étapes (181). Dans un premier temps, l'ARN viral sera complètement épissé et codera pour les protéines précoces Tat, Rev et Nef (197, 342). Dans un second temps, Rev liera un élément de réponse (appelé RRE) présent sur certains ARNs viraux (352-355) afin de les exporter à travers les NPC à l'aide d'un mécanisme dépendant de CRM1/Exportine (356-358). Ces ARNs messagers partiellement épissés encoderont les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env (197, 342). Enfin, les ARNs viraux non épissés seront produits et exportés. Ces transcrits coderont pour la polyprotéine Gag, et un changement du cadre de lecture (-1) du ribosome permettra d'obtenir dans  $\approx$  5-7% des cas une polyprotéine Gag-Pol (359-361). Ces ARN viraux non épissés seront également utilisés comme génome viral lors de l'assemblage des particules virales (197, 342). Notons enfin que les protéines Nef et Vpu seront ancrées dans la membrane (362, 363); et que la protéine Env est synthétisée sous forme de précurseur (gp160) au niveau du réticulum endoplasmique et qu'elle sera par la suite clivée dans le Golgi par les protéases cellulaires Furin et PC7 en gp120 et gp41 (364-367).

Enfin, l'assemblage de la particule virale prendra place au niveau de la membrane cytoplasmique. Le domaine correspondant au précurseur de la protéine MA présent sur les polyprotéines Gag et Gag-Pol seront myristoylés à l'extrémité N-terminale (368, 369). Cette modification post-traductionnelle permettra l'ancrage de ces glyco-polyprotéines à la membrane plasmique et particulièrement au niveau des radeaux lipidiques (370-375). Pendant le trafic de la glyco-polyprotéine Gag vers la membrane, celle-ci liera deux copies d'ARN génomique viral (376-378). Cette activité est notamment dépendante du domaine correspondant au précurseur de la protéine NC présent sur cette glyco-polyprotéine et de la séquence d'encapsidation Psi ( $\Psi$ )

présente à l'extrémité 5' de l'ARN viral (379-384). Une étude récente suggère que le RRE soit également reconnu par Gag dans ce mécanisme (378). Les protéines virales Vpr et Vpx (dans le cas du VIH-2) interagiront également avec Gag, au niveau du domaine P6, pour être encapsidés (292, 385-392). Une fois au niveau des radeaux lipidiques, Gag et Gag-Pol se multimériseront au niveau des domaines correspondant aux CA (393-395). Ils sembleraient également capables de recruter les glycoprotéines de l'enveloppe virale notamment en grâce au domaine correspondant aux MA (396-398).

Le virus bourgeonnera alors en utilisant la machinerie des complexes de tri endosomaux nécessaires au transport, mieux connue sous l'acronyme anglophone ESCRT (399). Ce mécanisme implique notamment le domaine P6 présent sur le précurseur Gag qui recrutera TSG101 au niveau des sites de bourgeonnement (400-404). Il semblerait que la protéine ALIX soit également capable de lier Gag durant le bourgeonnement (405-408). Le recrutement de ces protéines permettra d'enclencher les mécanismes de bourgeonnement de la voie ESCRT (409, 410). Enfin, la particule virale passera par une étape de maturation coordonnée par la protéase virale (411-414). Cette étape de maturation est indispensable pour obtenir un virus infectieux (415-418).

#### **4. Les protéines accessoires du VIH et leurs rôles dans le soutien à la réplication virale**

Comme mentionné précédemment, le VIH-1 et ses précurseurs (VIS<sup>cpz</sup> et VIS<sup>gor</sup>) encodent quatre protéines accessoires (Nef, Vif, Vpu et Vpr). Vpu n'est pas encodée par le VIH-2 ni son précurseur VIS<sup>smm</sup>, qui codent plutôt pour Vpx (169, 419). De manière générale, la fonction de ces protéines est de modifier l'environnement cellulaire afin de favoriser la réplication virale. Elles permettent également au virus de contrecarrer les activités antivirales de certaines protéines cellulaires que l'on appellera facteurs de restriction (182, 420). Pour ce faire, la majorité de ces protéines accessoires utilisent la machinerie cellulaire de l'hôte et manipulent notamment des complexes d'E3 ubiquitine ligase afin de médier la dégradation de facteurs cellulaires. Dans les

prochains paragraphes, je décrirai ces protéines accessoires ainsi que les facteurs cellulaires qu'elles régulent et décrirai conséquemment leur rôle global sur la réplication virale.

#### **4.1. Vif**

Vif est une protéine virale d'environ 23 kDa qui est essentielle à la production de particules virales infectieuses (167, 188-190). Vif est capable de recruter le complexe protéique d'E3 ubiquitine ligase Cullin5-ElonginB-ElonginC-Rbx dans le but de médier la dégradation de protéines cellulaires (421-423). C'est notamment le cas de protéines appartenant à la famille des cytidine désaminase et appelées APOBEC, dont les plus importantes par rapport au VIH sont APOBEC3F et G (422-425). En absence de Vif, les protéines APOBEC3F/G sont encapsidées, notamment *via* une interaction avec Gag, dans le virion lors de l'étape de production des particules virales (426-431). Ce faisant, ils désamineront les cytosines (C) du brin antisens du génome viral en uraciles (U) lors de l'étape de rétrotranscription, remplaçant ainsi les guanines (G) par des adénines (A) sur le brin sens et induisant donc des mutations G → A dans l'ADN viral (432-438). Ces mutations sont abondamment présentes notamment en 3' du génome viral, au niveau de la séquence PPT et des gènes *Env* et *Nef*, mais aussi au niveau du gène *Pol* (439-441). APOBEC3G/F sont également capables de diminuer la synthèse d'ADN viral indépendamment de leur activité de désamination et il semblerait que APOBEC3G/F interfèrent notamment avec la reconnaissance du PBS par l'ARNt, mais aussi avec les transferts du premier et du second brin lors de la RT (442-447). C'est donc pour permettre une RT efficace et pour prévenir l'apparition de mutations abondantes que Vif induit la dégradation d'APOBEC3G/F.

Vif est une protéine aussi connue pour médier un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Cette activité a été reliée à sa capacité de recruter le complexe d'E3 ubiquitine ligase Cullin5-ElonginB-ElonginC-Rbx (448-451). Il a récemment été rapporté que l'activité d'arrêt du cycle cellulaire associée à Vif était due à la dégradation de la sous-unité régulatrice PPP2R5 (aussi appelée B56) de la phosphatase PP2A (451-454). L'implication de ces activités par rapport à la réplication et à la pathogénèse du VIH reste cependant incomprise.

## 4.2. Nef et Vpu

Nef est une protéine virale membranaire d'une taille approximative de 30 kDa (175, 179). Cette protéine perturbe la réponse immunitaire de l'hôte notamment en favorisant l'endocytose des complexes majeur d'histocompatibilité de type 1 et 2 (CMH-1 et CMH-2), les enlevant ainsi de la surface de la cellule infectée et les empêchant de présenter des antigènes viraux et de déclencher une réponse immunitaire (455-457). Nef est également connue pour contrecarrer les facteurs de restriction membranaires SERINC3 et SERINC5; qui en son absence sont incorporées dans l'enveloppe lipidique du virion lors de sa production et l'empêchent alors de fusionner correctement avec la membrane cellulaire lors de l'infection d'une nouvelle cellule cible (458-460). En les éliminant de la surface de la cellule infectée, Nef prévient donc leur incorporation dans le virion et permet ainsi à la fusion de l'enveloppe lipidique du virion et de la membrane cellulaire de s'effectuer convenablement (458, 459).

Le récepteur membranaire CD4 de la cellule hôte est lui aussi ciblé par Nef. Nef utilise l'adaptateur de clathrine AP2 afin de l'enlever par un mécanisme d'endocytose de la surface de la cellule infectée (461-464). Étant donné que Nef est une protéine qui est synthétisée à partir des ARNs viraux complètement épissés, la diminution de CD4 à la surface cellulaire sera un effet précoce durant l'infection (465-468). La protéine CD4 est également ciblée par Vpu, une autre protéine virale membranaire d'une taille d'environ 17 kDa (169, 170, 462, 463, 469-472). Dans ce cas, Vpu induit la dégradation du récepteur CD4 néosynthétisé et qui se trouvera au niveau du réticulum endoplasmique (470, 473). Cette activité dépend du recrutement du complexe d'E3 ubiquitine ligase Skp1-Cullin1-F-Box ( $SCF^{\beta-TrCP}$ ) par Vpu et aura lieu tardivement durant l'infection étant donné que Vpu est synthétisé à partir d'un ARN bicistronique codant également pour Env (474-478). Ce mécanisme de déplétion de CD4 par Nef et Vpu a plusieurs utilités et il permet d'inhiber la rétention des virus produits par l'interaction entre gp120 et CD4, et augmentent donc la relâche des particules virales (461, 476, 479-481), ainsi que de prévenir une surinfection de la cellule en retirant le récepteur de la surface cellulaire (462). Ce mécanisme de déplétion de CD4 par Vpu et Nef semble également prévenir la mort cellulaire par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). En effet, l'interaction du récepteur CD4 avec Env induit un changement conformationnel et expose certains épitopes pouvant être



reconnus et médiant l'ADCC (482-484). En diminuant les niveaux de CD4 à la surface de la cellule, Vpu et Nef empêchent l'exposition de ces épitopes et préviennent la mort de la cellule infectée par le mécanisme d'ADCC (485-487).

La protéine virale Vpu est également capable de médier la dégradation du facteur de restriction BST2 (488, 489). Lors de l'étape de relâche des particules virales, cette protéine cellulaire agit comme une ancre reliant la membrane cellulaire à l'enveloppe lipidique du virion et inhibe de ce fait la relâche virale (488-494). En séquestrant, en endocytant et en médiant la dégradation de BST2 *via* le recrutement du complexe SCF<sup>β-TrCP</sup>, Vpu permettra notamment d'augmenter la relâche et du même fait la production virale (491, 495-499).

### **4.3. Vpr et Vpx**

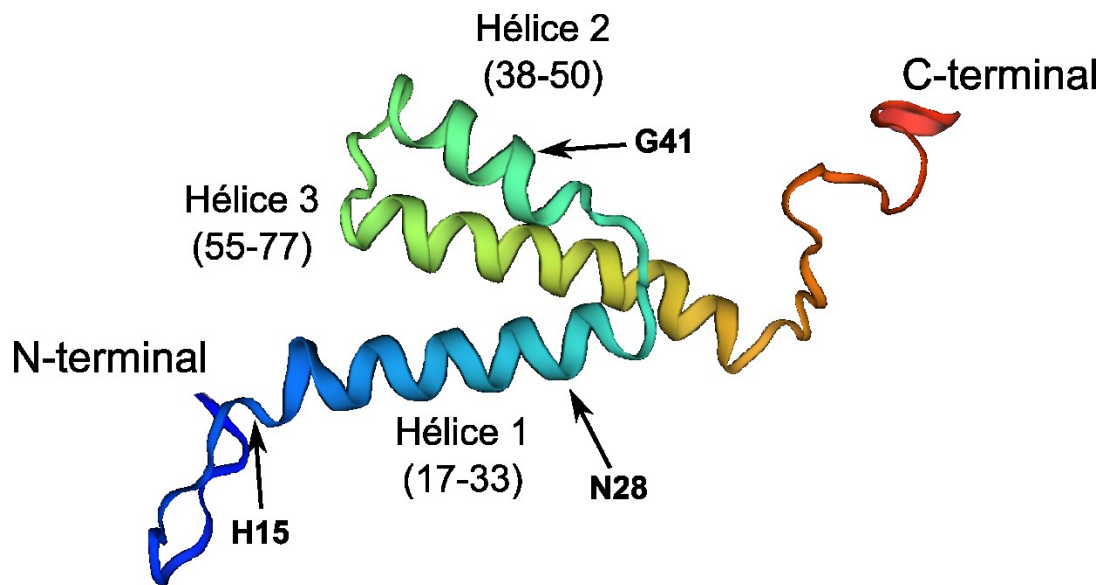
Vpr et Vpx sont deux protéines virales découvertes à la fin des années 1980 (171, 183, 419, 500-504). Comme pour les autres protéines accessoires, ces protéines ont été décrites comme non essentielles à la réplication virale dans certains modèles, notamment en culture cellulaire (172, 183, 184, 186, 187, 505); mais favorisent la réplication virale dans d'autres systèmes cellulaires et la pathogénicité du VIH (184, 186, 187, 191, 506). Reprenons l'exemple du travailleur de laboratoire de recherche qui s'était accidentellement contaminé avec un virus ayant une mutation au niveau du codon d'initiation de la protéine Vpr et qui a réverté (194).

#### **4.3.1. Généralités et structure des protéines virales**

Comme mentionné précédemment, autant le VIH-1 que le VIH-2 encodent pour Vpr, tandis que Vpx est uniquement encodé par le VIH-2 (169, 170, 173, 419, 503, 504). Les gènes codant pour ces protéines sont deux paralogues (507-510). Il était initialement pensé que *Vpx* provenait d'une duplication génique ayant eu lieu précocement durant l'évolution de la branche VIH-2/VIS<sup>smm</sup> mais il s'est finalement avéré que ce gène avait plutôt été acquis par transfert horizontal *via* recombinaison non homologue avec le gène *Vpr* du VIS infectant le singe vert africain ou VIS<sup>agm</sup> (507-510). Notons que la protéine Vpr encodée par le VIS<sup>agm</sup> est l'une des rares à posséder des fonctions communes à Vpr et à Vpx (511-515).

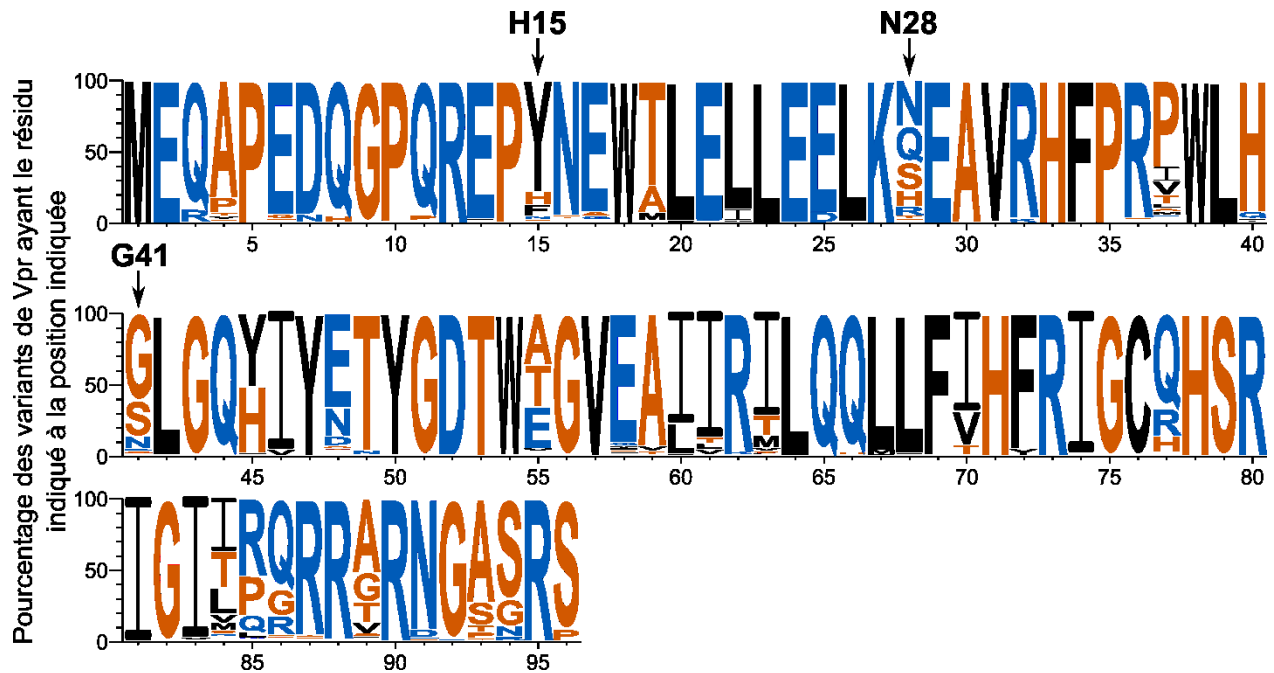
Vpr et Vpx ont des poids moléculaires d'environ 15 kDa, sont composées d'une centaine d'acides aminés très conservés et répartis en trois hélices  $\alpha$  qui sont flanquées de domaines C- et N-terminaux flexibles, voir Figure 1.5 et Figure 1.6 (516, 517). Comme mentionné précédemment, même si ces protéines n'ont pas de séquence de localisation nucléaire classique, elles sont capables de localiser au niveau du noyau cellulaire (518, 519). Des séquences importantes pour la localisation nucléaire de Vpr ont été retrouvées dans la première hélice  $\alpha$  et au niveau du domaine C-terminal (troisième hélice  $\alpha$ ) de la protéine (291, 292, 295, 296, 298, 520-522). L'import de Vpr pourrait être médié par une interaction directe entre Vpr et le NPC ou éventuellement par un mécanisme impliquant Importine  $\alpha$  (266, 288, 290, 299-305). Vpr contient une séquence d'export nucléaire (NES) au niveau de la troisième hélice  $\alpha$  et est capable d'être exportée par Exportine 1; elle navigue donc entre le noyau et le cytoplasme (293, 300, 525, 526). La protéine Vpx contient deux séquences de localisation nucléaire non classiques présentes au niveau C-terminal et semble être importée par différents mécanismes incluant Importine  $\alpha$  (213, 527, 528). Il n'est pas clair si Vpx possède une séquence d'export nucléaire et est capable de naviguer entre le noyau et le cytoplasme (528-530).

Vpr et Vpx sont deux protéines qui sont encapsidées lors de la production des particules virales (385, 518, 531-533). Dans le cas de Vpr, cette encapsidation s'effectue grâce à une interaction entre un motif présent au niveau de la première hélice  $\alpha$  de Vpr et au domaine C-terminal (riche en leucine) du précurseur de la protéine P6 de la protéine Gag (292, 385-387, 389, 390, 526, 534-540). Durant la maturation du virus, Vpr interagira avec la protéine NC afin de rester dans le cœur du virus et associé à l'ARN viral (390, 526, 539, 541-545). Il est estimé entre 250 et 700 molécules de Vpr par virion pour le VIH-1 (385, 546-548); et à 40 à 50 molécules de Vpr ainsi que 2000 à 3000 molécules de Vpx par virion dans le cas du VIH-2 (549). Le fait que ces protéines soient encapsidées laisse penser qu'elles pourraient jouer un rôle précoce durant l'infection, notamment au niveau des étapes pré-transcriptionnelles. En ce sens et comme mentionné précédemment, le rôle de Vpr au sein du PIC a été bien mis en évidence et il est notamment proposé que Vpr aide non seulement à l'ancrage du PIC au niveau des pores nucléaires mais aussi que cette protéine aide au transport du PIC à travers la membrane nucléaire (217, 226, 228, 266, 288-291, 300, 306).



**Figure 1.5. Structure de la protéine Vpr du VIH-1**

Représentation de la structure de Vpr, composée de trois hélices  $\alpha$  et de domaine N- et C-terminaux non-structurés. Le bleu représente le domaine N-terminal; l'orangé/rouge représente le domaine C-terminal. Les résidus H15, N28 et G41 sont pointés étant donné leur importance dans le Chapitre 3. Cette structure a été déterminée par résonance magnétique par (516) et la représentation a été adaptée à partir du modèle P05928 disponible dans la banque de donnée SWISS-MODEL ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)).



**Figure 1.6. Représentation de la conservation en acides aminés de la protéine Vpr du VIH-1**

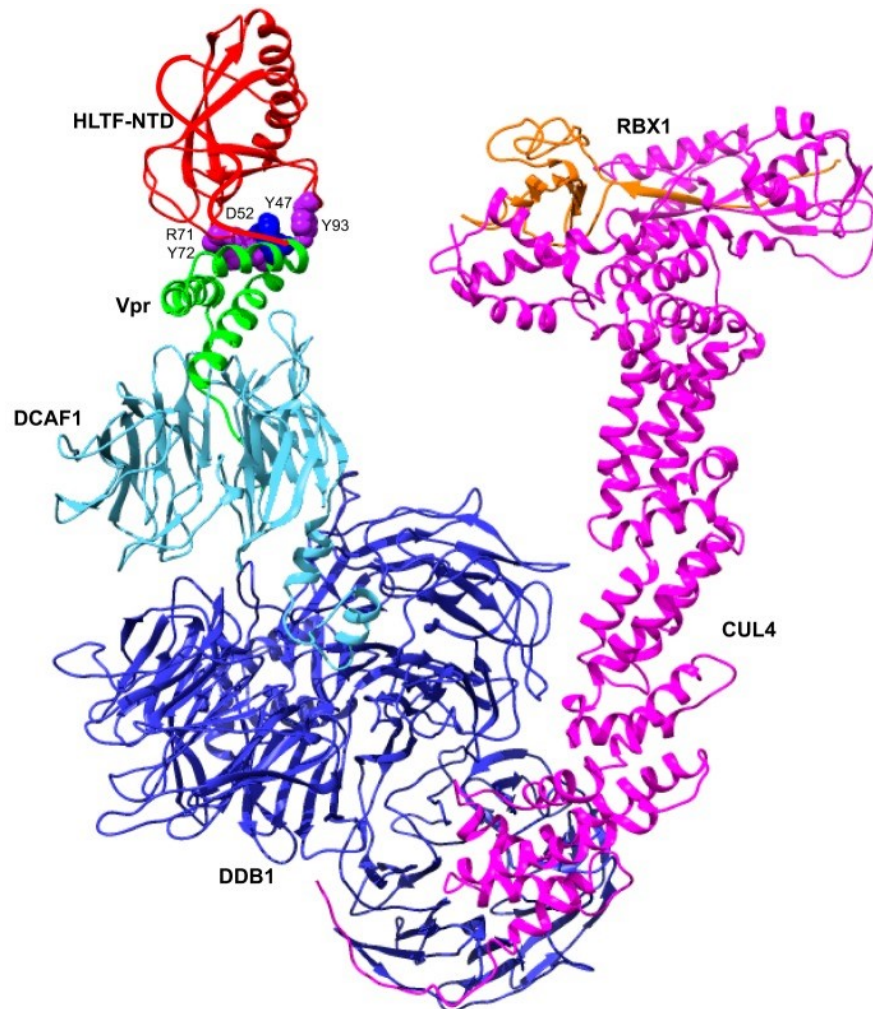
Les séquences nucléotidiques de 4 835 variants de Vpr du VIH-1, provenant de la banque de donnée des séquences du VIH (*HIV Sequence Database*; Los Alamos National Laboratory; hiv.lanl.gov), ont été traduites et alignées à l'aide de Jalview (v2.11.0 (523)). La représentation a été générée à l'aide de WebLogo (v3.7.4 (524)). Les acides aminés colorés en noir sont hydrophobes; ceux colorés en bleu sont hydrophiles et ceux colorés en orange sont neutres. Les résidus H15, N28 et G41 sont pointés étant donné leur importance dans le Chapitre 3.

Enfin, ces deux protéines recrutent toutes deux le même complexe d'E3 ubiquitine ligase (appelé Cul4a-DDB1-DCAF1; abrégé DCAF1com par la suite) afin de lui présenter des protéines pour induire leur polyubiquitinylation et subséquente dégradation par la voie protéasomale, voir Figure 1.7 (550-555). Le recrutement du complexe DCAF1 se fait par une interaction de Vpr/Vpx avec DCAF1, qui est un récepteur de substrat complexe d'E3 ligase de type Cul4-DDB1 (556, 557). L'interaction de Vpr avec DCAF1 se fait au niveau d'un domaine de l'extrémité C-terminale de DCAF1 contenant deux motifs WD40 et qui est suffisant à recruter à la fois Vpr et DDB1 (551, 558-560). Au niveau de Vpr, l'interaction se fait au niveau du motif L<sup>64</sup>QQLL et une mutation du résidu Q65 de Vpr entraînent l'incapacité de la protéine virale à recruter DCAF1com (550-552, 562). Notons que le recrutement de DCAF1 par Vpr peut aussi mener au recrutement d'une E3 ubiquitine ligase différente et appelée EDD-DDB1-DCAF1 (563, 564).

Comme nous le verrons dans les prochaines sections, malgré les grandes similarités entre Vpr et Vpx, et le fait qu'elles recrutent le même complexe DCAF1com, ces protéines virales ne médient pas la dégradation des mêmes cibles et conséquemment n'induisent pas les mêmes phénotypes.

#### 4.3.2. Vpr

Malgré la quantité abondante de travaux portant sur l'étude de Vpr, cette protéine reste la plus énigmatique du VIH-1. Deux phénotypes principaux ont été associés à Vpr 1) l'activation de la kinase ATR et des voies de dommage/réparation de l'ADN menant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules en division comme les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (565-568); et 2) l'avantage répliatif que Vpr confère au virus lors de l'infection notamment dans les cellules myéloïdes telles que les macrophages (186, 506). Ces deux activités de Vpr sont génétiquement reliées dans la mesure où des mutants de Vpr capables (S79A et R80A) ou non (Q65R) de recruter DCAF1com qui n'induisent pas d'arrêt du cycle cellulaire ne sont pas non plus capables de conférer un avantage répliatif au virus; enfin, bien que le recrutement de DCAF1com par Vpr soit essentiel, il n'est pas suffisant à l'induction de ces deux phénotypes et c'est la dégradation – *via* DCAF1com – d'une ou plusieurs protéines cellulaires de l'hôte qui *in fine* en est responsable (550-552, 569-573). Notons que la position S79 de Vpr est connue pour être phosphorylée par la protéine kinase A (PKA) et que cette activité de PKA est essentielle aux activités d'arrêt du cycle



**Figure 1.7. Structure du complexe Vpr-DCAF1com en complexe avec une cible de Vpr**

Vpr (en vert) fait le lien entre une cible (en rouge), ici le domaine N-terminal (NTD) de la protéine HLTF, et le complexe d'E3 ubiquitine ligase Cul4-DDB1-DCAF1 (en teinte de bleu, rose et orange). Cette structure peut être extrapolée à n'importe quelles autres cibles de Vpr. Figure provenant de (561) avec licence du journal autorisant la publication dans le cadre de cette thèse.

cellulaire et d'avantage répliatif associées à Vpr (571, 572). C'est sur la découverte de ces facteurs cellulaires que se concentre intensément la recherche sur Vpr. J'établirai dans les paragraphes qui suivent, une revue de la littérature sur le sujet incluant les activités et les cibles de Vpr.

#### 4.3.2.1. Voie de dommages, de réparation à l'ADN & activité d'arrêt du cycle cellulaire

Comme mentionné antérieurement, Vpr est une protéine modulant les voies de réponse et de réparation des dommages à l'ADN (574, 575). Vpr induit notamment la formation de punctuations nucléaires, contenant des marqueurs de dommages à l'ADN comme  $\gamma$ -H2AX, 53BP1, RPA32, FANCD2 ou encore RAD51, dont l'induction corrèle dans certains cas avec la capacité de Vpr à médier un arrêt de cycle en G2/M (567, 568, 576-580). Certaines composantes du complexe DCAF1com recrutées par Vpr sont-elles mêmes impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN; c'est notamment le cas de Cul4 et de DDB1 qui font partie d'un complexe protéique capable de lier les sites de dommages à l'ADN et ainsi d'activer la voie de réparation par excision des nucléotides, connue également sous l'acronyme NER (581-583).

De manière intéressante, la troisième hélice  $\alpha$  de Vpr ressemble à une glissière à leucine (*leucine-zipper*) (584, 585) et il semblerait que Vpr soit capable de lier directement l'ADN cellulaire et d'induire les dommages au niveau du site de liaison (567, 580). Notons qu'il est également spéculé que Vpr pourrait cibler d'autres facteurs cellulaires ayant des implications dans le remodelage de la chromatine, incluant notamment les protéines HP-1, SNF2H (SMARCA5), CTIP2 ou encore le complexe NuRD (586-589); pouvant éventuellement aider au relâchement de l'ADN et faciliter la liaison de Vpr à celui-ci (580). Les dommages induits seraient alors des cassures double brin de l'ADN et certaines études suggèrent en effet que Vpr activerait la kinase ATM (567, 590). L'activation d'ATM par Vpr est remise en question par plusieurs études qui suggèrent plutôt une activation de la kinase ATR, suggérant que Vpr activerait plutôt des voies de signalisation normalement impliquées dans la réparation de stress répliatif et non celles impliquées dans la réparation d'une cassure double brin de l'ADN (566, 568, 577, 578, 591). L'idée que Vpr active ATR est également supportée par le fait que la kinase CHK1 est phosphorylée et activée en présence de Vpr en phase S du cycle cellulaire (566, 577, 592, 593). Ces deux idées ne sont

cependant pas mutuellement exclusives car il est bien connu que les dommages à l'ADN induits dans le contexte d'un stress répliatif peuvent se transformer en cassure double brin de l'ADN en absence de réparation initiale (594-597). Toutefois, notons que Vpr semblerait induire l'activation de la kinase ATR en recrutant le complexe DCAF1 et dégradant des substrats, non-identifiés pour l'heure, plutôt qu'en liant directement l'ADN (554, 593).

En plus de médier l'activation de CHK1 qui peut induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M en inhibant CDC25C et en activant WEE1 (598-603), Vpr semblerait capable de moduler directement CDC25C et WEE1 (598, 604-607). En effet, Vpr semble former un complexe avec CDC25C et médier sa dégradation par le protéasome (593, 604), et aussi recruter la protéine 14-3-3 afin de séquestrer CDC25C au niveau du cytoplasme (605). De manière intéressante, le mutant R80A de Vpr n'est pas capable de former un complexe avec 14-3-3 (605). Aussi, Vpr semble augmenter les niveaux de WEE1 et former un complexe avec cette protéine afin d'augmenter son activité kinase (598, 606). Globalement, il semblerait donc qu'en plus de son activité sur l'axe ATR-CHK1 dont les mécanismes d'activation restent mal compris, Vpr pourrait moduler directement la transition G2/M en activant l'inhibiteur et en inhibant l'activateur de CDK1 dans les cellules humaines.

#### 4.3.2.2. Avantage répliatif associé à Vpr

Vpr confère un avantage répliatif au virus durant l'infection notamment de cellules myéloïdes comme les macrophages (186, 187, 502, 506, 608) ou encore les cellules dendritiques dérivées de monocytes (573). Moyennant un système de compétition entre un virus exprimant Vpr et un autre exprimant une version tronquée de la protéine, il a récemment été proposé que Vpr pourrait également conférer un avantage répliatif au virus durant l'infection de cellules en division et notamment de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (609, 610). Ces derniers résultats semblent en accord avec des études qui semblaient initialement démontrer un effet modeste mais positif de Vpr sur la répliation virale lors de l'infection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (171, 611).

Parmi les protéines pouvant potentiellement expliquer l'avantage répliatif de Vpr nous retrouvons les protéines du complexe SLX4, un complexe multiprotéique – composé de SLX4, de la sous-unité enzymatique EME1 et du régulateur MUS81 – impliqué dans la résolution des



jonctions de Holliday formées lors de la recombinaison homologue (579, 612, 613). Il a initialement été proposé que Vpr forme un complexe avec le complexe SLX4 et l'active prématurément en médiant la polyubiquitinylation puis la dégradation de MUS81 ainsi que l'hyperphosphorylation donc l'inhibition de EME1 (579). Il a été proposé que cette activation prémature du complexe SLX4 joue un rôle dans la dégradation des intermédiaires et dérivés non conventionnels provenant de la rétrotranscription et ainsi prévenir l'activation des senseurs cellulaires, le déclenchement d'une réponse de type interféron par la cellule infectée et donc du système immunitaire (574, 579). Cependant, bien que la dégradation de MUS81 médiée par Vpr ait été validée, il semblerait que EME1 soit également dégradée en présence de Vpr (614). Cette activation prémature du complexe SLX4 a également été proposée comme étant le mécanisme responsable de l'arrêt du cycle cellulaire médié par Vpr (579, 615), mais des études semblent indiquer que ces deux activités de Vpr sont indépendantes (515, 614, 616).

Contrairement aux autres cibles et partenaires de Vpr introduits jusqu'à présent, les protéines de la famille TET(1/2/3) ne sont pas reconnues comme des protéines impliquées dans les voies de dommages à l'ADN (617). Vpr induit la dégradation de ces protéines qui sont en fait des méthylcytosine dioxygénases impliquées dans les mécanismes de déméthylation de l'ADN (618-620). La dégradation de TET2 médiée par Vpr a été rapportée comme modulant transcriptionnellement au moins deux facteurs cellulaires. Le premier est l'interleukine 6 (IL-6), une cytokine bien connue pour augmenter la réplication virale lors de l'infection des macrophages et qui est augmentée en présence de Vpr (619, 621, 622). Le second est le facteur de restriction IFITM3, connu pour inhiber entre autres la maturation des glycoprotéines de l'enveloppe virale et l'entrée du virus en altérant la fusion de l'enveloppe lipidique du virion avec la membrane cellulaire (623-627). Conséquemment, la déplétion d'IFITM3 *via* TET2 médiée par Vpr conduit à une augmentation de la production des glycoprotéines de l'enveloppe virale, leur incorporation dans les virions et à une meilleure entrée du virus dans la cellule cible (623-625, 628). L'effet de Vpr sur TET2 corrèle, au moins partiellement, avec l'avantage réplcatif que Vpr confère lors de l'infection de cellules myéloïde (619). La dégradation de TET2 ne semblerait pas expliquer le phénotype d'arrêt de cycle cellulaire associé à Vpr (619).

En plus de son activité sur TET2 qui permet en soit d'augmenter la production des glycoprotéines de l'enveloppe virale; Vpr prévient la dégradation des glycoprotéines de l'enveloppe dans les cellules myéloïdes par un mécanisme nécessitant DCAF1 et aboutissant à l'augmentation de la production virale (569, 629, 630). En effet, en absence de Vpr, les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont dégradées par un mécanisme dépendant de la voie de dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique (ERAD), répondant à l'interféron et aboutissant à une diminution des glycoprotéines de l'enveloppe présentes dans les particules virales relâchées (569, 629, 630). Ce mécanisme de restriction des glycoprotéines de l'enveloppe virale semble être dépendant du récepteur au mannose, abrégé MR (631, 632). Il semblerait que le MR reconnaisse les résidus de mannose présents sur les glycoprotéines de l'enveloppe virale, les séquestre puis induise leur dégradation (631). Contrairement aux cibles de Vpr, le MR n'est pas dégradé mais semble plutôt être modulé transcriptionnellement par Vpr (631). Le mécanisme sous-jacent à la modulation transcriptionnelle du MR par Vpr reste non identifié. Cette activité de Vpr sur MR semble contribuer à l'avantage répliatif que confère Vpr au virus lors de l'infection des macrophages. De manière intéressante, notons que plusieurs autres protéines du VIH sont aussi capables de moduler le MR, incluant Tat au niveau transcriptionnel (633); Nef au niveau post-transcriptionnel (631, 634); suggérant que le MR est un facteur de restriction important du VIH.

Indépendamment des glycoprotéines de l'enveloppe virale; une récente étude a proposé que l'expression de Vpr modulerait les niveaux de REAF (également appelée Lv2), une protéine décrite comme capable d'inhiber les étapes d'entrée et/ou de rétrotranscription et donc la répliation virale du VIH-1, VIH-2 et des VIS, notamment lors de l'infection de macrophages (635-637). En présence de Vpr, les niveaux de REAF fluctueraient et permettraient de lever la restriction imposée au niveau des étapes précoces du cycle de répliation (638). Il semblerait également que la déplétion de REAF au moyen d'approche de type ARN interférent (siRNA) corrèle avec une très légère accumulation du pourcentage de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (638). Il se pourrait donc que la modulation de REAF par Vpr soit en partie responsable des activités d'avantage répliatif dans les macrophages et d'arrêt du cycle cellulaire en G2/M associées à Vpr.

Enfin, HLTF et EXO1 sont deux protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN et ciblées par Vpr (610, 639, 640). HLTF est impliquée dans la réparation des fourches de réplication bloquées; tandis qu'EXO1 joue des rôles dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et dans la réparation des mésappariements des bases de l'ADN (641). Le rôle de ces protéines de l'hôte sur le virus n'est pas connu et leur dégradation – individuelle – ne semble pas corrélérer avec l'avantage réplcatif dans les macrophages attribué à Vpr (610, 639, 640). Toutefois, il semblerait que des virus capables de médier la dégradation de ces cibles se répliquent davantage dans des systèmes de compétition lors de l'infection de cellules T CD4<sup>+</sup> en culture ou primaires (609, 610). Ces résultats suggèrent que HLTF et EXO1 pourraient contribuer à un éventuel avantage réplcatif de Vpr dans les cellules en division (609, 610).

#### 4.3.2.3. Rôle de Vpr dans la fidélité de la rétrotranscription

Comme mentionné précédemment, Vpr est une protéine encapsidée et qui semblerait jouer un rôle lors du transport du PIC au noyau. En plus de cette fonction précoce durant l'infection il semblerait que Vpr joue un rôle éventuel dans la fidélité de RT, notamment en limitant l'apparition de mutations durant cette étape (642-645). En effet, durant cette étape des dUTPs peuvent malencontreusement être incorporés à la place des dTTPs par la RT qui ne distingue pas les deux (646, 647). L'incorporation de dUTP dans le génome viral peut être néfaste pour le virus car elle peut éventuellement causer des mutations de l'ADN viral, induire une reconnaissance de l'ADN comme « non-soi », et prévenir l'intégration du virus (646, 648, 649). Les macrophages sont des cellules particulièrement riches en dUTP et faibles en dTTP, cela en fait donc des cellules peu propices à la synthèse d'ADN non muté lors de l'infection par le VIH-1 (646, 647, 650). De manière intéressante et pouvant être contre-intuitive, Vpr semblerait interagir et permettre l'encapsidation de la protéine UNG2, une protéine qui reconnaît puis excise les uraciles incorporés dans l'ADN pour permettre la réparation par la voie BER (641, 642, 644, 651-654). Notons qu'il a aussi été proposé que IN joue un rôle dans l'encapsidation de UNG et non Vpr (655). UNG2 serait donc présent dans le complexe de pré-intégration durant l'étape de rétrotranscription et pourrait alors exciser les uraciles intégrés à l'ADN viral (644, 655, 656). Notons que certains rapports semblent indiquer que UNG2 dégraderait les ADN viraux contenant beaucoup de dUTP plutôt que de les réparer (648, 657). UNG2 limiterait donc l'effet mutagène

des dUTPs sur le génome viral lors de l'infection de macrophages (644, 653, 658). Comme introduit précédemment, les protéines APOBEC3F/G sont encapsidées et désaminent les cytosines du brin antisens du génome viral en uraciles lors de l'étape de rétrotranscription (432-438). Il a été proposé que UNG2 soit encapsidé pour prévenir la réparation des cytosines désaminées par l'activité d'APOBEC3F/G et ainsi l'apparition de mutations G → A dans l'ADN viral; ou même pour dégrader les brins édités par APOBEC3 (657, 659). Notons enfin qu'il a aussi été rapporté que Vpr pourrait former un complexe avec APOBEC3G et médier sa dégradation par le protéasome avec pour objectif de prévenir son encapsidation et la désamination des cytosines (660). Pour en revenir à UNG2, il a également été rapporté que cette protéine pouvait réguler négativement la transcription virale, par un mécanisme restant indéterminé et ainsi diminuer la réplication virale (661). C'est probablement pour cette raison que Vpr induit sa déplétion (659, 662-665).

#### 4.3.2.4. Autres activités de Vpr

L'une des caractéristiques du VIH est qu'il peut passer par une phase de latence durant l'infection (42, 43, 666-669). De manière générale, la latence transcriptionnelle du VIH correspond à un état réversible du virus pour lequel il n'y a pas d'expression génique du virus et donc une absence de production de particules virales (670, 671). Cependant, il semblerait que Vpr soit une protéine capable de réactiver les virus latents (672, 673). En ce sens, il a été rapporté que Vpr induirait la dégradation du facteur cellulaire CTIP2, un facteur connu pour être associé à un complexe remodelant la chromatine et induire une latence virale dans des cellules myéloïdes appelées cellules microgliales (674-678). Ceci permettrait donc au virus d'éviter le mécanisme de latence ou de promouvoir sa transcription et donc sa réactivation éventuelle dans le cas de virus latent (589, 674-676). En plus de dégrader des facteurs cellulaires qui régulent négativement la transcription du VIH comme CTIP2, Vpr est également capable de former des complexes et d'activer des facteurs de transcription qui permettront alors l'expression virale à partir du LTR. Parmi ces facteurs cellulaires nous retrouvons par exemple : NF-κB, AP-1, C/EBP-δ, NFAT ou encore Sp1 (344, 585, 679-688). La résultante de l'activation de ces facteurs par Vpr pourrait donc être similaire à celle de la dégradation de CTIP2 médiée par Vpr : une augmentation de la transcription virale et une éventuelle sortie de la latence.

La dernière cible de Vpr que j'introduirai est le complexe SMN (689, 690). Ce complexe est impliqué dans la biogenèse des petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs) et intervient notamment dans le mécanisme d'épissage des ARN messagers (691). L'importance de ce complexe par rapport à la réplication et à la pathogénicité du VIH-1 reste mal comprise. Cependant, il semblerait que la déplétion de ce complexe par des approches d'interférence par des petits ARNs de type épingle à cheveux (shRNA) corrèle avec une accumulation de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (690). Bien qu'il faille étudier davantage les relations entre le complexe SMN et Vpr, étant donné son implication dans l'épissage des ARN messagers, il est possible que Vpr médie la déplétion de ce complexe pour moduler l'environnement cellulaire et ainsi promouvoir la réplication virale. Enfin, la sous unité Gemin2 du complexe SMN a été rapportée comme interagissant avec la protéine virale IN (692, 693). Il semblerait que grâce à cette interaction Gemin2 se retrouve au niveau du complexe de pré-intégration ou elle jouerait un rôle essentiel à l'étape de RT; sa déplétion ou l'inhibition par compétition de la liaison entre elle et IN semblerait mener à une diminution de la RT durant l'infection de macrophages (692, 693). Cependant, il n'est pas exclu que l'activité de Gemin2 soit indépendante du complexe SMN, mais ces résultats font de l'interaction entre SMN et Vpr une relation très complexe.

Dans les pages qui précèdent, j'ai essayé de donner un aperçu général des cibles de Vpr et des fonctions qui lui sont associées. Une liste plus exhaustive des partenaires et cibles de Vpr est présentée dans le Tableau 1. Vous l'aurez compris, Vpr cible une multitude de protéines cellulaires et pourrait globalement en moduler directement ou, plus vraisemblablement, indirectement plus de 2 000 (690). Conséquemment, Vpr est une protéine virale ayant un effet sur plusieurs étapes du cycle de réplication virale; que cela soit à l'étape de rétrotranscription, de transport du complexe de pré-intégration, de la transcription ou encore de la maturation des glycoprotéines de l'enveloppe virale. Aussi, les activités médiées par Vpr d'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans les cellules en division et d'avantage répliatif notamment dans les cellules myéloïdes ne sont probablement pas la conséquence de la modulation d'une seule et unique protéine ou d'un seul complexe. En fait, certaines études récentes supportent la notion que ces activités associées à Vpr soient plutôt une conséquence de la déplétion de plusieurs protéines cellulaires (609, 640, 690).

**Tableau 1. Liste non-exhaustive des partenaires et cibles rapportés de la protéine Vpr du VIH-1**

<b>Partenaire ou cible</b>	<b>Fonction associée à Vpr</b>	<b>Référence</b>
<b>Cul4a-DDB1-DCAF1</b>	Complexe d'E3 ubiquitine ligase recruté par Vpr pour dégrader des cibles cellulaires. Essentiel aux activités d'arrêt du cycle cellulaire et d'avantage réplcatif	(550-552)
<b>EDD-DDB1-DCAF1</b>	Complexe d'E3 ubiquitine ligase recrutée par Vpr pour dégrader certaines cibles cellulaires	(563, 564)
<b>ATR</b>	Kinase impliquée dans une voie de réponse aux dommages à l'ADN qui est activée par Vpr. Activation indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire	(566)
<b>CDC25C</b>	Forme un complexe avec Vpr qui induit sa dégradation et sa séquestration cytoplasmique	(593, 604, 605)
<b>CP110 (CEP110, CCP110)<sup>a</sup></b>	Cible de Vpr. Sa dégradation cause un allongement des centrioles et une amplification des centrosomes	(713)
<b>Complexe des pores nucléaires (NPC)</b>	Vpr a été rapportée pour interagir avec plusieurs protéines des pores nucléaires (notamment Nup42, Nup54, Nup58) et Importine $\alpha$ , afin d'être importée et exportée du noyau	(288, 290, 300, 302, 305)
<b>CTIP2</b>	Régulateur transcriptionnel du VIH-1, sa dégradation par Vpr corrèle avec une réactivation des virus latents	(589)
<b>DICER1</b>	Cible de Vpr. Sa dégradation corrèle avec une augmentation de la réplication virale dans les macrophages	(714)
<b>EXO1</b>	Cible de Vpr. Sa dégradation corrèle avec une augmentation de la réplication virale dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> (dans un contexte de compétition)	(610)

<b>HLTF</b>	Cible de Vpr. Sa dégradation corrèle avec une augmentation de la réplication virale dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> (dans un contexte de compétition)	(609, 639, 640)
<b>HP-1</b>	Vpr exclut HP-1 des centromères, causant une séparation prématurée des chromatides sœurs et des changements du degré de ploïdie	(586)
<b>NFAT</b>	Vpr augmente l'expression de NFAT pour induire l'activation des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et ainsi faciliter leur infection	(681, 687)
<b>NF-κB</b>	D'un côté, Vpr augmente l'expression de NF-κB et permet la transcription du VIH-1 à partir du LTR. Mais d'un autre, Vpr inhibe également NF-κB pour diminuer l'activation immunitaire et l'apoptose	(679, 680, 682)
<b>P21 (WAF1)</b>	Vpr augmente l'expression de P21. Lien avec l'arrêt du cycle cellulaire?	(715)
<b>P300 (CBP)</b>	P300 forme un complexe avec Vpr, permet l'activation transcriptionnel de protéines cellulaires (e.g. NF-κB) et la transcription du VIH-1	(688, 716)
<b>Protéine kinase A (PKA)</b>	Phosphoryle Vpr au niveau de l'acide aminé S79, activité indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire médié par Vpr	(571, 572)
<b>REAF (Lv2)</b>	Cible de Vpr qui inhibe l'étape de rétrotranscription du VIH-1. Sa dégradation augmente la réplication virale dans les macrophages	(635)
<b>Récepteur du mannose (MR)</b>	Vpr diminue transcriptionnellement l'expression du MR ce qui permet l'augmentation de la production des glycoprotéines de l'enveloppe virale (gp160) et de la relâche virale	(631)
<b>SLX4 (complexe)</b>	Vpr interagit avec le complexe et induit la dégradation de composantes pour potentiellement inhiber la détection des intermédiaires viraux et la réponse immunitaire	(579, 614, 616)

<b>SMN (complexe)</b>	Vpr interagit avec le complexe et médie la dégradation des sous-unités. Rôles à déterminer. Lien avec l'arrêt du cycle cellulaire?	(689, 690)
<b>SNF2h (SMARCA5)</b>	Partenaire de Vpr permettant son recrutement à la chromatine des cellules infectées. Facteur important pour l'induction des dommages à l'ADN par Vpr	(587)
<b>SP1</b>	Forme un complexe avec Vpr, augmente la transcription de P21 et du VIH-1 à partir du LTR	(344, 685)
<b>TET(1/2/3)</b>	Cibles de Vpr. La dégradation de TET2 médiée par Vpr module transcriptionnellement au moins deux gènes ( <i>IL-6</i> et <i>IFITM3</i> ) et est associée à une augmentation de la réplication virale dans les macrophages	(619, 623)
<b>UNG2</b>	Cible et partenaire de Vpr. Vpr médie l'encapsidation d'UNG2 afin de prévenir les mutations du génome viral lors de l'étape de rétrotranscription. Vpr dégrade UNG2 pour prévenir son effet négatif sur la transcription virale	(659, 662, 663)
<b>WEE1</b>	Vpr augmente l'expression et forme un complexe avec WEE1 pour augmenter son activité	(598, 606)
<b>ZIP (sZIP1)</b>	Cible de Vpr. Membre du complexe NuRD qui est impliqué dans le remodelage de la chromatine. Rôle dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1?	(588)

<sup>a</sup> Voir Chapitre 4



### 4.3.3. Vpx

Le rôle de Vpx a longtemps été associé à l'étape de rétrotranscription du VIH-2 et de certains VIS (694). En effet, il contrecarre un facteur de restriction appelé SAMHD1 qui est impliqué dans le contrôle des niveaux des déoxynucleotides triphosphates, dNTPs (695-702). Cette protéine est régulée notamment par une phosphorylation inhibitrice au niveau du résidu T592 (703, 704). Elle peut y être phosphorylée donc inactivée par CDK1 (704-706), déphosphorylée donc activé indirectement par P21 quand ce dernier inhibe CDK1 (707-711); ou encore être déphosphorylée directement par la phosphatase PP2A (712). SAMHD1 est une protéine capable de cliver les dNTPs en désoxynucléotides (dN) et ainsi de diminuer la quantité de dNTPs disponibles pour la rétrotranscription (650, 701). En liant et médiant la dégradation de SAMHD1, la protéine Vpx encapsidée permet l'augmentation des niveaux de dNTPs et promeut ainsi la rétrotranscription durant l'infection notamment dans les macrophages (717-719). L'effet de Vpx est particulièrement important dans les cellules myéloïdes et les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos ou les niveaux de dNTPs sont bas en raison de l'absence de synthèse d'ADN (695-698, 717, 720, 721).

De manière intéressante, il a récemment été rapporté que Vpx pouvait également promouvoir l'infection virale indépendamment de son interaction avec SAMHD1 et dans des conditions où les dNTPs ne sont pas limitant; suggérant qu'elle serait capable de médier la déplétion d'un autre facteur de restriction (722, 723). Le complexe HUSH, impliqué dans la régulation épigénétique, a été identifié comme ce second facteur contrecarré par Vpx (724, 725). Il a été démontré que HUSH localisait au niveau du promoteur du VIH-1 et que sa déplétion notamment par le Vpx encapsidé entraînait ultimement une réactivation virale dans des systèmes de latence du VIH. Ce faisant, Vpx permettrait d'éviter la mise en latence imposée par ce complexe. En médiant la dégradation de SAMHD1 et de HUSH, Vpx jouerait majoritairement au niveau de l'étape de rétrotranscription et de transcription du génome viral. Il n'y a actuellement pas d'autres fonctions connues de Vpx.

## 5. Problématique et objectifs de recherche

Comme vous l'aurez constaté dans ce *Chapitre 1 – Revue de la littérature* présentée ci-dessus et comme suggéré par des études de protéomique ayant pour but d'identifier les partenaires de Vpr ou d'évaluer son effet au niveau du protéome cellulaire (639, 640, 689, 690), Vpr semble interagir avec et moduler une multitude de protéines de l'hôte. Néanmoins et ce malgré l'identification de nombreuses cibles de Vpr, nous ne comprenons toujours pas complètement comment Vpr promeut la réplication virale, spécialement lors de l'infection de cellules myéloïdes comme les macrophages. Le but de ce projet est d'utiliser une technologie – alors nouvelle – d'identification de partenaires de proximité, appelée BioID, afin de définir un réseau de partenaires à proximité de Vpr et ainsi d'identifier de nouvelles cibles de Vpr. Le but ultime de ce projet est de mieux comprendre Vpr, ses cibles, ses fonctions et son importance relativement à la réplication et à la pathogénèse du VIH-1.

Dans le *Chapitre 2*, j'introduirai la technique de BioID, son développement et les adaptations effectuées afin de définir le réseau de partenaires à proximité de Vpr. Je discuterai dans ce chapitre des avantages et des désavantages du BioID comparativement à d'autres techniques de protéomique ayant déjà été employées avec Vpr. Le *Chapitre 3*, présentera le réseau de partenaire à proximité de Vpr. J'y présenterai également la caractérisation d'un nouveau complexe ciblé par Vpr : le complexe promoteur de l'anaphase/cyclosome (APC/C). Dans le *Chapitre 4*, j'expliquerai comment Vpr module l'homéostasie des centrosomes et présenterai des travaux issus d'une collaboration avec le laboratoire du Dr William Tsang de l'IRCM. Enfin, dans un dernier chapitre, je discuterai de tous les résultats à la lumière de la littérature et présenterai des perspectives de recherche pouvant être intéressantes à poursuivre.



## **Chapitre 2**

**Développement de la technique de BioID afin de définir  
un réseau de partenaires de proximité de la  
protéine Vpr du VIH-1**



## 1. Introduction spécifique

Il est possible d'utiliser diverses approches pour identifier de nouvelles interactions entre protéines. Ces approches sont essentiellement des techniques de protéomique utilisées en biologie cellulaire et pouvant être appliquées dans le contexte de la virologie moléculaire. J'en décrirai quelques-unes dans les prochains paragraphes, incluant : le double-hybride, l'AP-MS et les approches de marquages de proximité. Notons également qu'il existe une multitude de variantes aux techniques présentées ici et que chacune doit être adaptée au modèle expérimental utilisé. Je décrirai également quelques avantages et inconvénients de ces approches.

### 1.1. L'approche de double-hybride

Cette approche a été développée à la fin des années 1980 et est basée sur la complémentarité de deux domaines séparés d'un facteur de transcription (726, 727). La protéine d'intérêt et les protéines cibles seront respectivement fusionnées au domaine de fixation de l'ADN et à celui d'activation d'un même facteur de transcription. L'interaction entre la protéine cible et celle d'intérêt permettra alors la reconstitution du facteur de transcription et mènera à l'activation d'un gène rapporteur. Historiquement le facteur de transcription utilisé était GAL4 et le gène rapporteur *lacZ*. Comme ce système est utilisé chez la levure, le gène *lacZ* qui code pour la  $\beta$ -galactosidase permettra un criblage blanc/bleu des colonies et sera ainsi révélateur de l'interaction entre la protéine cible et celle d'intérêt (727). Cette approche peut évidemment être employée si les protéines d'intérêt et cible sont identifiées, mais elle peut également l'être pour cribler des banques d'ADN complémentaires en ne connaissant donc pas la protéine cible. La protéine cible sera par la suite identifiée par séquençage du gène présent dans le vecteur correspondant (728).

### 1.2. L'approche AP-MS

Le principe simple et efficace de l'approche de purification par affinité (AP-MS) en fait une approche très couramment utilisée pour l'identification de partenaires de protéine. Son principe repose sur l'immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt grâce à un anticorps spécifique et sur l'analyse des partenaires immunoprécipités par spectrométrie de masse. Afin d'améliorer la

performance de l'immunoprécipitation, la protéine d'intérêt est souvent fusionnée avec une étiquette (*e.g.* TAP, HA, Flag, Myc) et surexprimée dans les cellules cibles. Une fois la protéine de fusion exprimée, les cellules seront alors lysées – souvent délicatement, dans des conditions non-dénaturantes – et les lysats incubés avec les anticorps spécifiques (729). Les anticorps (et protéines liées) seront ensuite récupérés au moyen de billes et lavés. Les protéines ainsi récupérées seront par la suite digérées à l'aide de trypsine et identifiées par spectrométrie de masse (729).

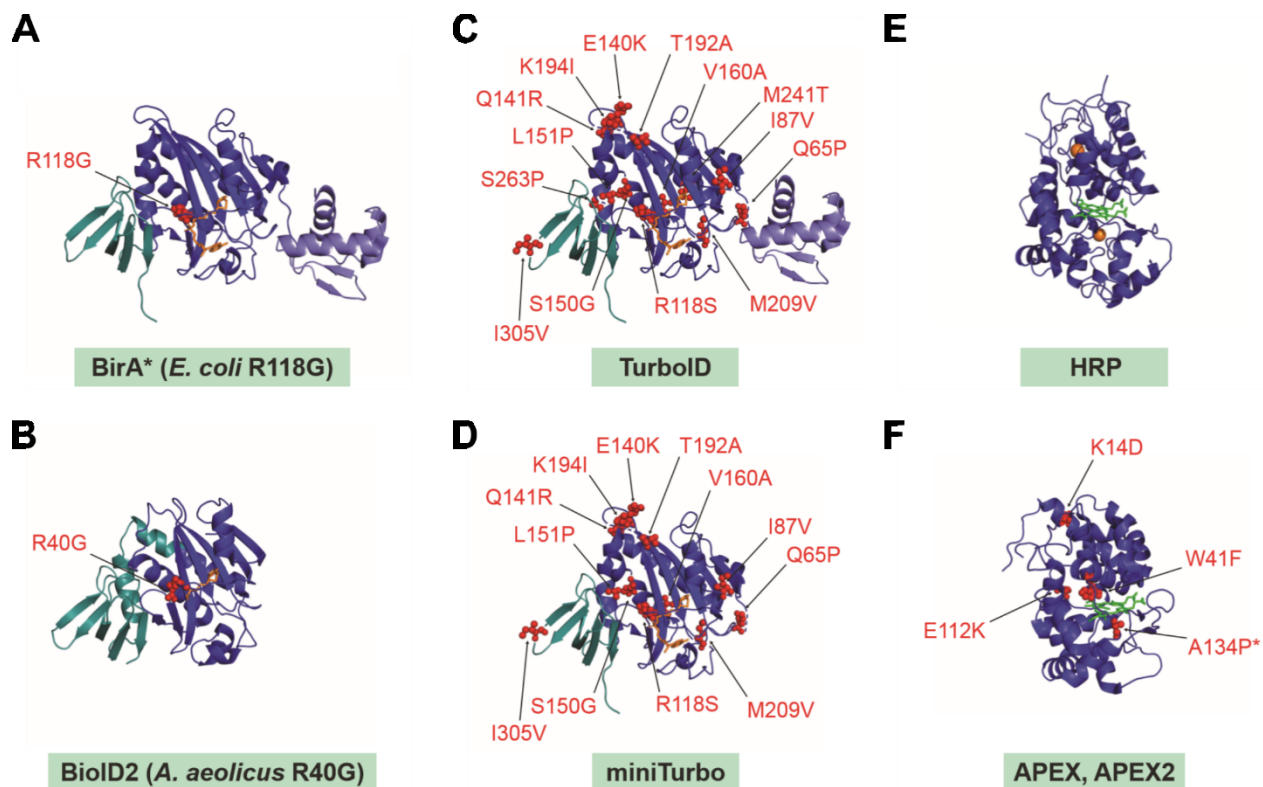
### **1.3. Les approches de marquage de proximité**

Deux approches de marquage de proximité ont très récemment été développées : le BioID et l'APEX (730, 731). Elles sont toutes deux basées sur un principe de biotinylation *in cellulo* des protéines à proximité de la protéine d'intérêt, permettant ainsi leur étiquetage et évitant la perte des candidats lors de la lyse (Figure 2.1).

#### **1.3.1. L'approche BioID**

Dans le cas du BioID, une biotine ligase (BirA) provenant d'*Escherichia coli* sera fusionnée à la protéine d'intérêt (Figure 2.1A). Cette biotine ligase a la particularité de porter la mutation R118G (annotée BirA\* ou BirA1) lui permettant de générer une espèce réactive (appelée biotinoyl-5'-AMP (bioAMP)) et de la relâcher rapidement. Ceci créera un nuage de bioAMP réactif, d'un diamètre approximatif de 10 nm, qui liera de manière covalente les lysines présentes à la surface des protéines présentes à proximité de l'enzyme (730, 732). Une fois les protéines biotinylées, habituellement entre 18 et 24 heures, les cellules seront lysées de manière extrêmement vigoureuse et les protéines biotinylées récupérées à l'aide de billes de streptavidine pour être identifiées par spectrométrie de masse.

La taille conséquente de BirA1 ( $\approx$  32 kDa) pouvant être un obstacle à l'identification de partenaires de la protéine d'intérêt, une version de seconde génération a été développée. Cette seconde version correspond à une biotine ligase ayant une taille relativement plus faible ( $\approx$  27 kDa) provenant d'*Aquifex aeolicus* (BioID2 ou BirA2; portant la mutation R40G), voir la Figure 2.1B. Nous parlons ici de 321 acides aminés pour la première génération contre 233 pour la seconde (733).



**Figure 2.1. Structure des enzymes utilisées dans le cadre des approches de marquage de proximité**

(A, B) Enzymes utilisées dans l'approche BioID, provenant (A) d'*Escherichia coli* (BirA\* ou BirA1) ou (B) d'*Aquifex aeolicus* (BioID2 ou BirA2). Les emplacements des mutations R118G (A) et R40G (B) permettant la relâche prématurée de la biotinoyl-5'-AMP sont indiqués en rouge. (C, D) Évolution des enzymes (A) et (B) avec l'introduction de mutations permettant leur hyperactivation. (E, F) Structure de la peroxydase et des enzymes utilisées dans l'approche APEX, provenant de la fève de soja. L'introduction de la mutation A134P dans APEX mène à APEX2. Figure provenant de (734) avec licence du journal autorisant la publication dans le cadre de cette thèse.



Plus récemment, deux versions additionnelles ont vu le jour et permettent cette fois de diminuer le temps d'expression et de biotinylation nécessaire à l'identification du réseau d'interactions de la protéine d'intérêt. Il s'agit du TurboID et du miniTurbo, des versions sélectionnées à partir des enzymes de première et seconde génération de BioID respectivement (Figure 2.1C et 2.1D). TurboID et miniTurbo sont capables de générer autant de protéines biotinylées en 10 minutes que les première et seconde version de BioID en 18 heures (735).

### **1.3.2. L'approche APEX**

Au lieu d'utiliser une biotine ligase comme dans la technique précédente, l'approche APEX utilise une peroxydase qui oxydera la biotine-phénol en biotine-phénoxy (Figure 2.1E et 2.1F). Ce radical réactif ira lier les tyrosines, tryptophanes, histidines et cystéines présentes à la surface des protéines dans un rayon d'environ 20 nm et permettra d'obtenir en quelques minutes des niveaux de biotinylation comparables à ceux obtenus en plusieurs heures avec le BioID de première génération (731). Notons que la biotinylation est initiée en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ce qui signifie qu'elle aura lieu après expression de la protéine de fusion et de manière terminale. Une différence majeure entre ces deux approches est que contrairement au BioID qui permet l'accumulation et l'analyse d'événements dynamiques prenant place sur plusieurs heures, l'APEX ne permet d'analyser les événements qu'à un moment fixe et déterminé par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. Une fois les protéines biotinylées, elles seront capturées et analysées comme précédemment décrit pour le BioID.

## **1.4. Avantages et inconvénients des approches de protéomiques**

Il n'existe pas d'approche parfaite pour identifier les interactions entre protéines. Certaines approches sont plus fiables alors que d'autres génèrent plus de résultats. L'une des étapes clés lors de l'emploi d'approches protéomiques est l'étape de validation de l'interaction entre la protéine d'intérêt et la protéine cible. Il est donc nécessaire de valider la proximité ou les interactions entre les protéines étudiées en utilisant des approches complémentaires et si possible, étudier en profondeur la nature de l'interaction entre ces protéines. Les avantages et inconvénients des approches introduites ci-dessus sont présentés de manière succincte dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Avantages et inconvénients des approches d'identification d'interactions entre protéines**

<i>Approche</i>	<b>Phage display</b>	<b>Double-hybride</b>	<b>AP-MS</b>	<b>BioID (1<sup>ère</sup> génération)</b>	<b>APEX</b>
<i>Mécanisme</i>	Immobilisation de la protéine d'intérêt et criblage d'une banque de bactériophages exprimant des partenaires potentiels	Complémentarité de deux domaines d'un facteur de transcription	Purification par affinité de complexes protéiques (immunoprécipitation) <sup>a</sup>	Marquage des protéines à proximité de la fusion par de la biotine réactive et isolation par précipitation avec des billes de streptavidine <sup>a</sup>	
<i>Temps nécessaire</i>	Temps limité par le nombre de cycles d'amplification désirés	Temps nécessaire à la croissance des levures	Temps limité par l'expression de la protéine d'intérêt (24-48 heures)	Classiquement 18-24 heures après induction et ajout de biotine	Quelques minutes (après expression de la fusion)
<i>Avantages</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Facilité d'utilisation</li> <li>2- Criblage de banques importantes de partenaires potentiels</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Facilité d'utilisation</li> <li>2- Criblage de banques d'ADN complémentaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Facilité d'utilisation et polyvalence de l'approche</li> <li>2- Utilisation possible d'étiquettes (TAG)</li> <li>3- Utilisation possible sur des protéines endogènes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Marquage <i>in cellulo</i> des partenaires</li> <li>2- Identification de partenaires interagissant stablement, faiblement et transitoirement avec la fusion</li> <li>3- Possibilité d'analyse de dynamique</li> </ul>	
<i>Inconvénients</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Difficulté d'obtenir une banque à cribler</li> <li>2- Problèmes reliés à l'expression des protéines à la surface du bactériophage</li> <li>3- Requièrre plusieurs cycles d'amplification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Haut taux de faux-positifs</li> <li>2- Non adapté aux protéines membranaires</li> <li>3- Contexte cellulaire (utilisation de levure)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Identification d'interactions stables</li> <li>2- Génération de lignées stables (au besoin)</li> <li>3- Couteuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Besoin de générer et valider les fusions; mise au point fastidieuse; génération de lignées stables</li> <li>2- Taille des enzymes et biotinylation pouvant être problématiques</li> <li>3- Non spécifique si localisée dans de petits organelles</li> <li>4- Couteuses</li> </ul>	

<sup>a</sup> Identification des partenaires par spectrométrie de masse

## 2. Mise en contexte du chapitre

### 2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre

Plusieurs approches ayant comme objectif d'étudier les interactions entre des protéines, comme le double-hybride et l'AP-MS, ont permis par le passé d'identifier de nouvelles cibles de Vpr. Néanmoins, nous ne comprenons toujours pas complètement les causes moléculaires sous-jacentes aux phénotypes de Vpr, notamment à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M et l'avantage répliatif que confère cette protéine surtout dans le contexte de l'infection des macrophages. J'ai précédemment introduit les deux approches que sont le double-hybride et l'AP-MS, puis les approches nouvellement développées de marquages de proximité. Contrairement aux approches classiques d'AP-MS, les approches de marquages de proximité permettent un étiquetage *in cellulo* des partenaires potentiels de la protéine d'intérêt. Ceci faisant en sorte que les cellules peuvent être lysées de manière très vigoureuse sans risque de perdre les partenaires potentiels. En plus de permettre l'identification d'interactions stables, ces approches de marquages de proximité permettent également la capture de protéines n'interagissant pas stablement avec la protéine d'intérêt, comme dans les cas d'interactions faibles ou transitoires.

L'objectif général de mon projet était donc d'utiliser l'approche BioID afin d'identifier de nouveaux partenaires ou de nouvelles cibles de la protéine Vpr du VIH-1 dans le but de mieux comprendre les mécanismes et dynamiques menant aux activités de Vpr. Dans la section résultat de ce chapitre, je présenterai succinctement la caractérisation et les optimisations mises en place par rapport à l'approche BioID. Le travail présenté ici est principalement basé sur la problématique que la fusion de BirA\* à Vpr altère grandement la capacité de cette dernière à induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. Les optimisations présentées dans ce chapitre ont donc pour but de restaurer la capacité de Vpr à induire un arrêt du cycle cellulaire dans le contexte de la fusion BirA\*-Vpr. Les objectifs de ce chapitre sont 1) de démontrer les différentes options envisagées afin de résoudre la problématique de perte d'activité de Vpr; et 2) de valider le système qui sera utilisé afin de réaliser l'analyse BioID à proprement dit et qui sera présentée dans le prochain chapitre.

## **2.2. Contribution au chapitre**

L'utilisation de l'approche BioID afin d'identifier de nouveaux partenaires ou de nouvelles cibles de Vpr est une idée originale du Dr Éric A. Cohen. Les résultats présentés dans ce chapitre (Figures 2.2.1 à 2.2.6) ont été réalisés dans leur entièreté par moi-même, sous la supervision du Dr Éric A. Cohen. Je souligne la contribution scientifique (idées, recommandations et conseils) du Dr Jean-François Côté ainsi que de son étudiant Dr Halil Bagci dans le développement de l'approche et je les remercie de leur aide.

## **3. Matériels et méthodes**

### **3.1. Culture cellulaire**

Les cellules humaines HEK293T, HEK293 Flp-In T-REx et HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent #319-005-CL) complétement avec 10% de sérum de veau foetal (Wisent #080-150). Dans le cas des cellules HEK293 Flp-In T-REx (736), le milieu était aussi complétement avec 15 µg/mL de blasticidine (InvivoGen #ANT-BL-1) afin de maintenir la pression de sélection et la stabilité de la construction Flp-In T-REx.

### **3.2. Plasmides et clonages**

Les plasmides codant pour HA-Vpr et la fusion TAP-Vpr ont été décrits précédemment (550). Le plasmide codant pour BirA1-Flag-Vpr a été généré par insertion de la séquence codante de Vpr en C-terminal de BirA1 dans le plasmide pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG N-term (fourni par Dr Anne-Claude Gingras (737)) et en utilisant la stratégie de clonage Gateway et le plasmide intermédiaire pDONR-221 (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific). Pour Myc-BirA2-Vpr : un fragment d'ADN contenant la séquence de Vpr a été produit à partir du plasmide codant pour HA-Vpr par une approche de polymérisation en chaîne (PCR) puis cloné au niveau du site de clonage multiple (MCS) du plasmide pMyc-BioID2-MCS (fourni par Kyle Roux ((733); Addgene #74223)) pour produire la fusion de Myc-BioID2 en N-terminal de Vpr. Les plasmides codant pour HA-NLS-BirA1, HA-NLS-BirA1-Vpr, HA-NLS-BirA2 et HA-NLS-BirA2-Vpr ont été générés par des approches de PCR par chevauchement en utilisant les plasmides précédents

comme point de départ. Le plasmide pOG44 codant une Flp recombinase a été obtenu d'Invitrogen (Thermo Fisher Scientific #V600520) et utilisé pour générer les lignées cellulaires exprimant les protéines de fusion Flag-NLS-BirA1 et BirA1-Flag-Vpr de manière inductible.

### **3.3. Génération des lignées stables et induction**

Les cellules HEK293 Flp-In T-REx exprimant de manière inductible les constructions codantes pour Flag-NLS-BirA1 et BirA1-Flag-Vpr ont été générées comme décrit précédemment (736, 737). Le traitement des lignées stables inductibles avec 0.5 µg/mL de doxycycline (Wisent #450-185) permet l'expression des gènes d'intérêts. L'ajout de 50 µM de biotine (BioBasic #BB0078) permet la biotinylation des protéines à proximité de la protéine de fusion. Dans certains cas, un inhibiteur du protéasome (MG-132; Calbiochem - MilliporeSigma #474787) a été utilisé pour 7h (10 µM) ou 24 h (1 µM) dans le but de prévenir la dégradation des cibles potentielles de Vpr.

### **3.4. Analyse du cycle cellulaire**

Les cellules HEK293T ont été transfectées en utilisant la méthode au calcium-phosphate avec les plasmides indiqués dans les figures et le plasmide pQBI-25 qui code pour la protéine fluorescente verte (GFP). Deux jours après la transfection, les cellules ont été récupérées et manipulées comme décrit précédemment (713). Les analyses de cycle cellulaire ont été faites sur les populations GFP<sup>+</sup>.

Dans le cas des lignées stables, les cycles cellulaires ont été déterminés aux temps post-induction indiqués et en suivant le protocole décrit précédemment (713). Dans ce cas, les analyses ont été faites sur la population totale.

Le modèle mathématique ModFit a été utilisé afin de déterminer les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle et les ratio G2/M : G1 calculés et indiqués au-dessus de chaque histogramme.

### **3.5. Immunobuvardage de type Western**

Deux jours après avoir été transfectées ou aux temps après induction indiqués dans les figures, les cellules ont été récupérées et lysées avec du tampon RIPA-DOC (140 mM NaCl,

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% NP-40, 0.05% SDS, 5 g/L désoxycholate de sodium, 1x inhibiteur de protéases cOmplete mini (Roche - MilliporeSigma #11836145001), pH 7.2) pour 30 min à 4°C. Les lysats ont alors été clarifiés (5 min, 10 000 g, 4°C) et les concentrations protéiques déterminées par dosage de Bradford (Bio-Rad #5000006). Les quantités des protéines d'intérêt ont alors été déterminées par immunobuvardage de type Western (WB) comme décrit précédemment (738).

Les anticorps suivants ont été utilisés : α-Vpr (anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un peptide N-terminal de Vpr (171)); α-Flag (MilliporeSigma #F3165); α-Actine (MP Biomedicals #0869100); α-GAPDH (BioLegend #649202). Les anticorps secondaires conjugués à une peroxydase provenaient de Bio-Rad (#170-6515 & #170-6516). Pour détecter les protéines biotinylées, une streptavidine couplée à une peroxydase (Streptavidine-HRP; GE Healthcare #RPN1231) a été utilisée.

### **3.6. Immunofluorescence**

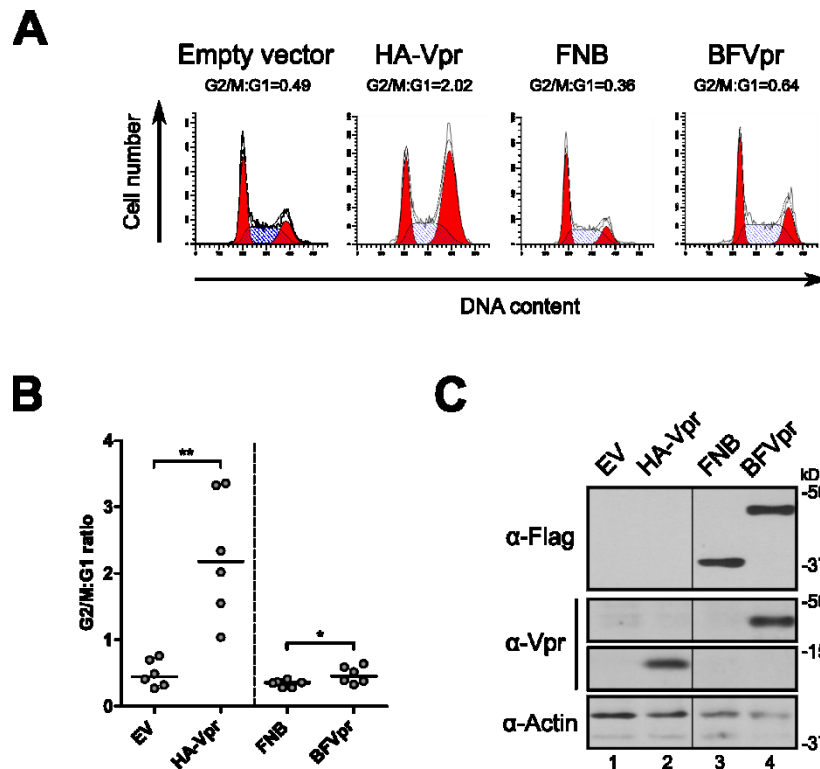
La localisation des protéines de fusion a été évaluée par microscopie confocale comme décrit précédemment (739). Brièvement, les cellules HeLa ont été déposées sur des lamelles de verre pour une nuit puis transfectées à l'aide de lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific #11668019) en suivant les instructions du manufacturier et, ce avec les plasmides indiqués dans les figures respectives. Deux jours après la transfection, les cellules ont été traitées comme décrit précédemment (739). Les anticorps primaires α-Flag (1/200; MilliporeSigma #F3165), α-HA (1/200; BioLegend #901513), α-Myc (1/200; MilliporeSigma #C3956) et secondaires conjugués Alexa Fluor 488 (1/500; Invitrogen - Thermo Fisher Scientific #A11001 et #A32731) ont été utilisés. Les images ont été capturées à l'aide d'un objectif à immersion 63× sur un microscope confocal inversé LSM710 (Zeiss) puis manipulées à l'aide d'ImageJ (v1.52).

## 4. Résultats

### 4.1. La fusion de BirA1 à Vpr perturbe la capacité de Vpr à médier un arrêt du cycle cellulaire

Pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux activités d'arrêt du cycle cellulaire et d'avantage répliatif associées à Vpr, nous avons décidé d'utiliser l'approche de marquages de proximité appelée BioID (730). Nous avons postulé que cette approche nous permettra d'identifier de nouveaux partenaires ou de nouvelles cibles de Vpr interagissant de manière faible et/ou transitoire avec ce dernier. Pour ce faire, la biotine ligase (BirA) d'*Escherichia coli* portant une mutation R118G lui permettant d'être hautement active (BirA\* ou BirA1), a été fusionnée en N-terminal de la protéine Vpr pour générer la protéine de fusion BirA1-Flag-Vpr (BFVpr). Vpr étant une protéine connue pour être localisée au noyau cellulaire (576), une protéine BirA1 fusionnée à un signal de localisation nucléaire (NLS; Flag-NLS-BirA1 (FNB)) a été utilisée comme contrôle.

Afin de valider la fonctionnalité de la protéine de fusion, nous avons évalué sa capacité à médier l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de Vpr. Pour ce faire, des cellules HEK293T ont été transfectées avec l'un des plasmides codant pour HA-Vpr, Flag-NLS-BirA1, BirA1-Flag-Vpr ou avec un vecteur vide ainsi qu'un plasmide codant pour GFP. Quarante-huit heures après la transfection, la population GFP<sup>+</sup> a alors été analysée par cytométrie en flux. Comme présenté dans les Figures 2.2.1A et 2.2.1B, en comparaison avec les cellules exprimant Flag-NLS-BirA1, les cellules exprimant la protéine de fusion BirA1-Flag-Vpr étaient très modestement ( $\approx 40\%$ ), bien que significativement, accumulées en phase G2/M du cycle cellulaire. Les niveaux d'expression de Flag-NLS-BirA1 et de BirA1-Flag-Vpr étaient comparables (Figure 2.2.1C). Cette accumulation de cellules en phases G2/M était cependant réduite d'environ 10 fois en comparaison à l'accumulation de cellules induites par l'expression de HA-Vpr; une condition où l'accumulation est augmentée d'environ 460% par rapport à la condition contrôle vecteur vide (Figures 2.2.1A et 2.2.1B). Ces résultats indiquent que la fusion de BirA1 à Vpr affecte grandement la capacité de cette dernière à médier un arrêt du cycle cellulaire.



**Figure 2.2.1. La fusion de BirA1 à Vpr altère sa capacité à médier un arrêt du cycle cellulaire**

(A, B) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec 3  $\mu\text{g}$  de plasmides codant pour HA-Vpr, Flag-NLS-BirA1 (FNB), BirA1-Flag-Vpr (BFVpr) ou un plasmide vide (EV) et 1  $\mu\text{g}$  de plasmide codant pour GFP. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été récupérées et les cycles cellulaires analysés. Des analyses de cycle cellulaire représentatives sont présentées en (A) et les résultats de six expériences sont présentés en (B). La barre centrale de chaque colonne représente la médiane. \* et \*\* indiquent des différences statistiquement significatives avec des valeurs de  $P$  respectivement  $\leq 0.05$ ;  $\leq 0.01$ ; déterminées par un test de Student. (C) Les cellules HEK293T en (A, B) ont été analysées par immunobuvardage de type Western pour déterminer les niveaux d'expression des protéines d'intérêt au moyen d'anticorps reconnaissant Vpr ou Flag. La séparation centrale indique que des puits ont été enlevés pour des raisons esthétiques, l'exposition est la même pour les deux côtés.

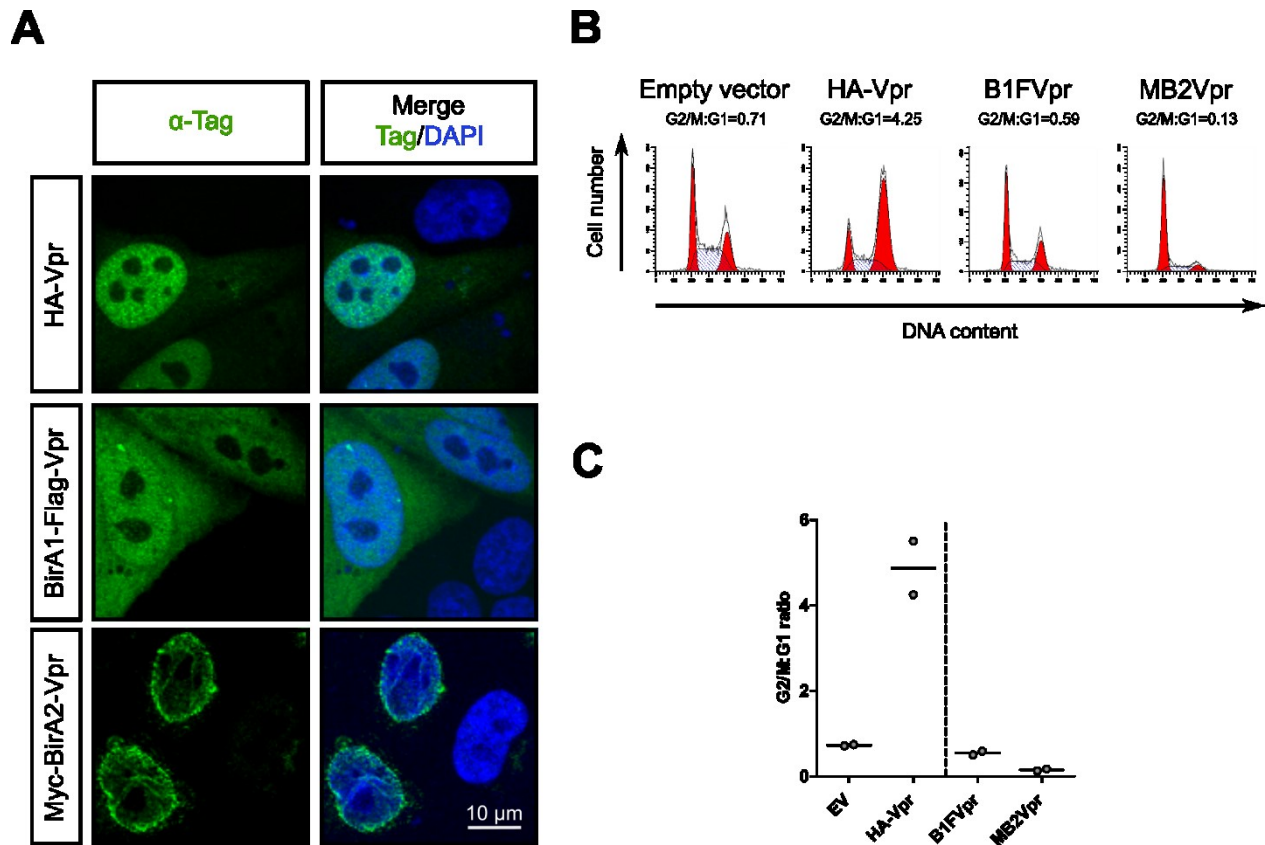


## 4.2. La fusion de BirA à Vpr perturbe sa localisation

Sachant que Vpr se rend au noyau cellulaire et y cause des dommages à l'ADN qui sont associés à son phénotype d'arrêt de cycle cellulaire (576), nous avons évalué la capacité de la fusion BirA1-Flag-Vpr à se rendre au noyau. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant pour HA-Vpr ou BirA1-Flag-Vpr. Vingt-quatre heures plus tard, la localisation des protéines de fusion a été déterminée en utilisant des anticorps reconnaissant HA ou Flag. Contrairement à HA-Vpr dont l'immunomarquage était exclusivement au niveau du noyau cellulaire, l'immunomarquage de la protéine de fusion BirA1-Flag-Vpr était à la fois au niveau du noyau et du cytoplasme (Figure 2.2.2A). Ces résultats suggèrent que la fusion de BirA1 à Vpr entraîne une relocalisation, au moins partielle, de la protéine.

Étant donné que la taille de la protéine BirA1 ( $\approx 32$  kDa) est relativement importante comparativement à celle de Vpr ( $\approx 14$  kDa), nous avons décidé d'évaluer la localisation de Vpr dans un contexte où la fusion était effectuée avec une biotine ligase plus petite nommée BirA2 ( $\approx 27$  kDa). Comme présenté dans la Figure 2.2.2A, le signal correspondant à l'anticorps anti-Myc indiquait un immunomarquage de la fusion Myc-BirA2-Vpr (MB2Vpr) au pourtour du noyau cellulaire. Ceci suggère que, malgré sa taille relativement plus petite, BirA2 entraîne également une relocalisation de Vpr dans le contexte de la fusion Myc-BirA2-Vpr.

Pour valider si la fusion Myc-BirA2-Vpr était capable ou non d'induire un arrêt du cycle cellulaire, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec les plasmides encodant pour les protéines HA-Vpr, BirA1-Flag-Vpr, Myc-BirA2-Vpr ou un vecteur vide et un plasmide encodant pour GFP. À quarante-huit heures après la transfection, les cycles cellulaires des populations GFP+ ont été analysés. Comme présenté dans les Figures 2.2.2B et 2.2.2C, les cellules transfectées avec les plasmides codant pour l'une des deux protéines de fusion BirA1-Flag-Vpr ou Myc-BirA2-Vpr n'accumulaient pas en phase G2/M du cycle cellulaire comme le faisait celles transfectées avec le plasmide codant pour HA-Vpr. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la relocalisation des protéines de fusion pourrait être une des raisons sous-jacentes à la perte de cette fonction de Vpr dans le contexte des fusions.



**Figure 2.2.2. Localisation différentielle des fusions BirA-Vpr par rapport à HA-Vpr**

(A) Les cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codant pour HA-Vpr, BirA1-Flag-Vpr (B1FVpr) ou Myc-BirA2-Vpr (MB2Vpr). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis l'immunomarquage a été effectué à l'aide d'anticorps reconnaissant les étiquettes HA, Flag ou Myc. Les noyaux cellulaires ont été marqués à l'aide de DAPI. Les cellules ont été observées sous microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 × à immersion. (B, C) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec 3  $\mu$ g des plasmides indiqués ou un vecteur vide et 1  $\mu$ g de plasmide codant pour GFP. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été manipulées comme décrit pour la Figure 2.2.1. Des analyses de cycle cellulaire sont présentées en (B) et les résultats de deux expériences sont présentés en (C). La barre centrale de chaque colonne représente la médiane.

### **4.3. Forcer la localisation nucléaire des protéines de fusions ne restaure pas l'activité de Vpr**

Étant donné que les protéines de fusion BirA1-Flag-Vpr et Myc-BirA2-Vpr ne localise pas au noyau cellulaire comme le fait HA-Vpr, nous avons décidé de forcer leur localisation nucléaire en introduisant un signal de localisation NLS dans la fusion. Comme présenté dans la Figure 2.2.3A et indiqué par un immunomarquage fait à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'étiquette HA, nous avons observé que HA-NLS-BirA1-Vpr localisait au niveau du noyau cellulaire. Cependant, sa localisation ne semblait pas aussi uniforme que celles observées pour HA-Vpr ou HA-NLS-BirA1 et la protéine semblait exclue de certaines régions du noyau. Dans le cas de HA-NLS-BirA2-Vpr et contrairement à HA-NLS-BirA2, la protéine semblait toujours partiellement localisée au pourtour du noyau, et ce malgré l'ajout du signal de localisation NLS (Figure 2.2.3A). Toutefois, ces résultats suggèrent que l'ajout du signal de localisation nucléaire permet de restaurer partiellement la localisation des protéines de fusion au noyau cellulaire.

Nous avons donc par la suite évalué l'effet de l'ajout du signal de localisation NLS sur la capacité de Vpr à médier un arrêt du cycle cellulaire dans le contexte des fusions. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides codants pour les protéines de fusion et contrôles précédemment décrits. Les analyses des cycles cellulaires révèlent que les protéines de fusion HA-NLS-BirA1 et HA-NLS-BirA2 n'étaient pas capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M comme le fait HA-Vpr (Figures 2.2.3B et 2.2.3C). Ceci suggère que malgré leur localisation au niveau du noyau cellulaire, les fusions ne sont pas, ou que très faiblement, actives.

### **4.4. La taille de BirA1 est responsable de la perte d'activité de Vpr dans le contexte de la fusion**

Sachant que les protéines de fusion BirA-Vpr sont peu capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, du moins en comparaison à HA-Vpr, et que forcer leur localisation nucléaire ne restaure pas leurs capacités à induire un arrêt de cycle; nous nous sommes demandé si la taille de BirA ne pouvait pas être un des facteurs expliquant la perte importante de fonction de Vpr dans le contexte de la fusion. Pour réponse à cette question, nous avons comparé la capacité de Vpr à médier un arrêt du cycle cellulaire dans le contexte de sa fusion avec BirA1 ou avec une

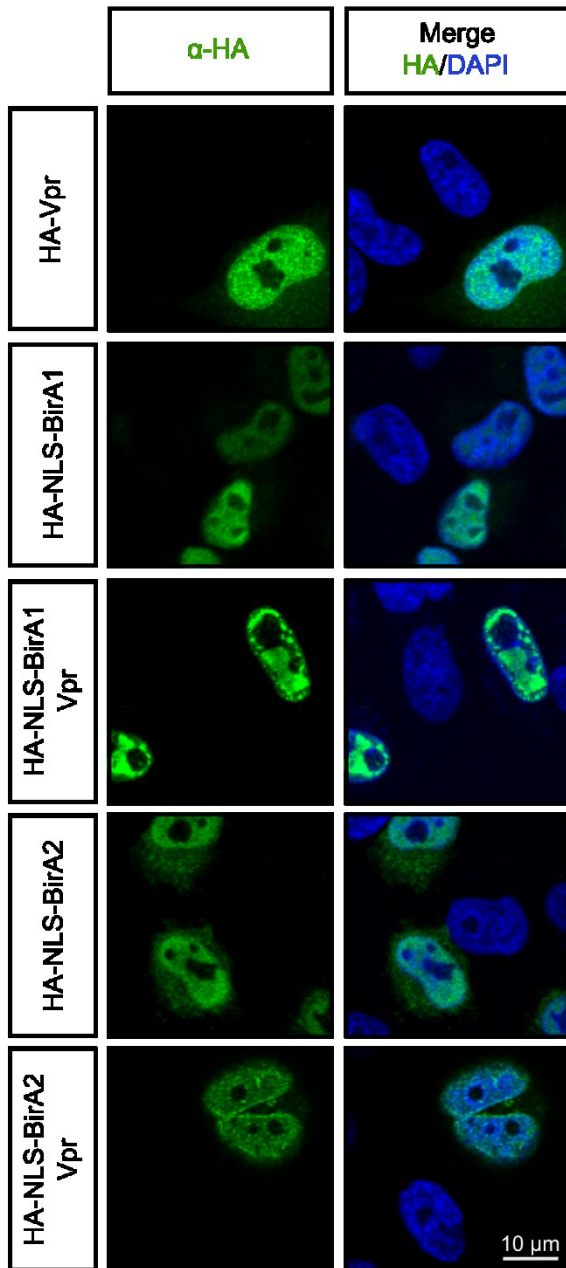
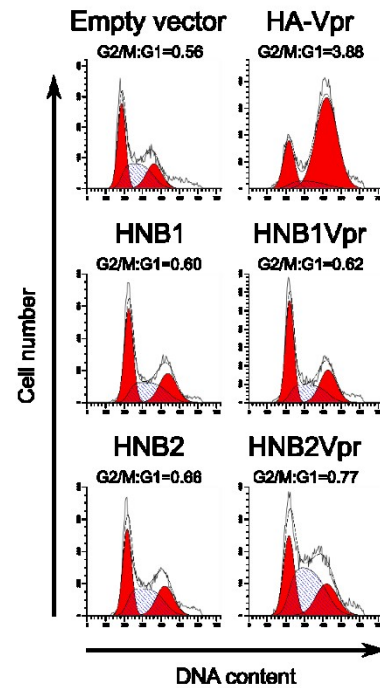
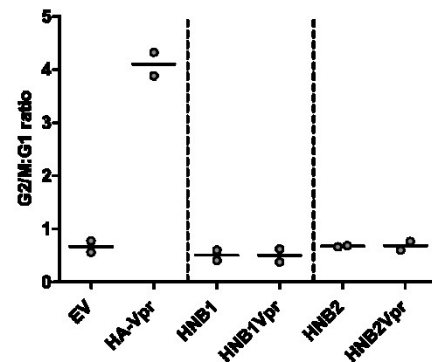
**A****B****C**

Figure 2.2.3. L'introduction d'un signal NLS permet de relocaliser les protéines de fusion au noyau mais ne restaure pas la capacité de celles-ci à médier un arrêt du cycle cellulaire

(A) Les cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codant pour les protéines indiquées et traitées comme décrit à la Figure 2.2.2. Les cellules ont été observées sous microscope confocal à l'aide d'un objectif 63 × à immersion. (B, C) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec 3 μg des plasmides indiqués ou un vecteur vide et 1 μg de plasmide codant

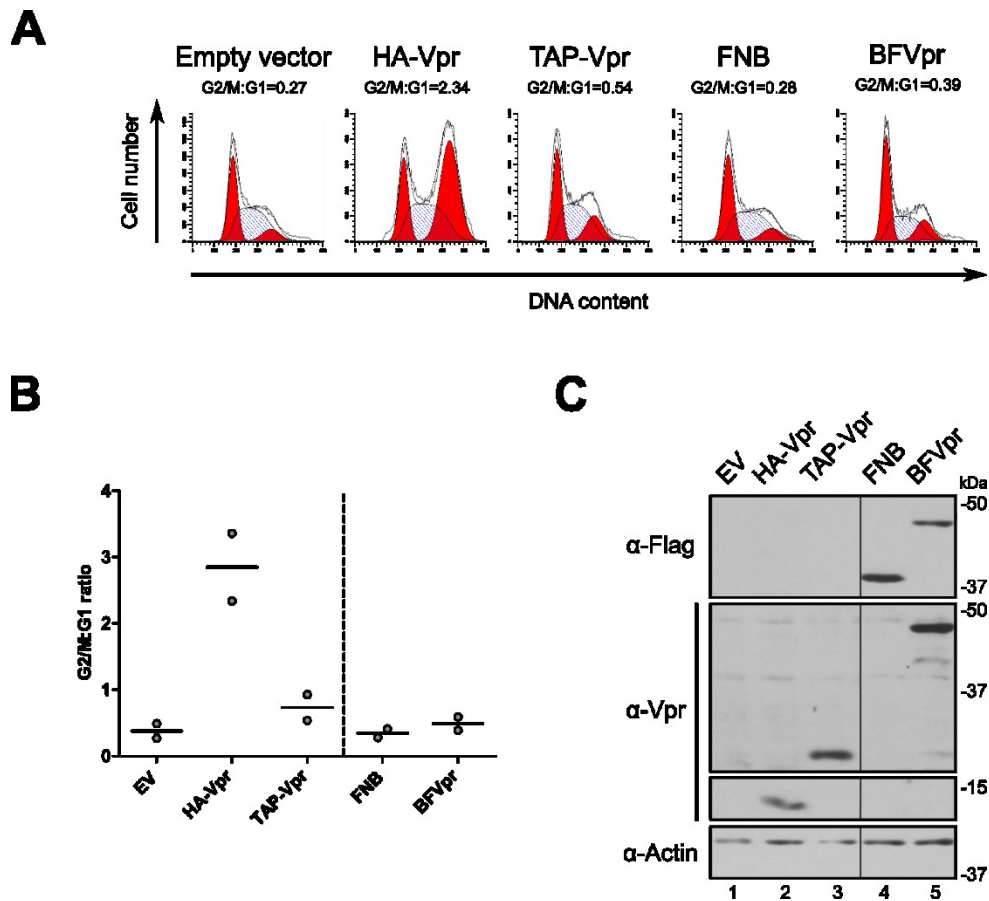
pour GFP. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été traitées comme décrit à la Figure 2.2.1. Des analyses de cycle cellulaire sont présentées en (B) et les résultats de deux expériences sont présentés en (C). La barre centrale de chaque colonne représente la médiane.

étiquette d'environ 21 ka utilisée dans les approches d'AP-MS, appelée TAP (550, 740). En comparaison à HA-Vpr, la fusion de l'étiquette TAP à Vpr réduisait d'environ 75% la proportion de cellules transfectées se retrouvant en phase G2/M du cycle cellulaire (Figures 2.2.4A et 2.2.4B). Cependant, la fusion TAP-Vpr était toujours capable de médier l'accumulation des cellules transfectées en phase G2/M,  $\approx$  190% comparativement au contrôle vecteur vide. Ces derniers résultats sont en accord avec un article précédemment publié par le laboratoire (550). À niveau d'expression semblable et par rapport à leur contrôle respectif, la fusion BirA1-Flag-Vpr induisait moins d'accumulation des cellules transfectées en G2/M que la fusion TAP-Vpr;  $\approx$  140% pour BirA1-Flag-Vpr contre  $\approx$  190% pour TAP-Vpr (Figure 2.2.4). Pris ensemble, ces résultats démontrent que la fusion d'une protéine d'une taille supérieure à 20 kDa en N-terminal de Vpr, perturbe grandement sa capacité à médier un arrêt du cycle cellulaire. Ils suggèrent également que la taille de BirA1 est un facteur contribuant à la perte d'activité de Vpr dans le contexte de la protéine de fusion.

#### **4.5. Analyse de l'activité de la fusion BirA1-Flag-Vpr dans un contexte de lignées stables inductibles**

Étant donné les capacités résiduelles de la protéine de fusion BirA1-Flag-Vpr à induire un arrêt du cycle cellulaire, nous avons voulu mettre en place un système nous permettant d'identifier les partenaires et cibles de Vpr dans le contexte de l'approche BioID. Pour ce faire, des cellules HEK293 Flp-In T-REx ont été transfectées avec les plasmides codant pour Flag-NLS-BirA1 ou BirA1-Flag-Vpr et le plasmide pOG44 codant pour une Flp recombinase.

La Flp recombinase permet d'induire la recombinaison du site FRT présent sur le plasmide d'intérêt avec celui présent dans les cellules HEK293 Flp-In T-REx. Ces sites FRT sont composés de deux séquences répétées et inversées de 13 paires de bases, séparées par une séquence de 8 paires de bases. Les séquences de 13 paires de bases serviront de motifs de liaison à la Flp recombinase, qui viendra alors cliver les sites FRT aux extrémités de la séquence de 8 paires de bases (741, 742). Ces clivages auront lieu à la fois sur le plasmide d'intérêt et sur le plasmide intégré de manière stable dans les HEK293 Flp-In T-REx. Il y aura alors recombinaison entre les



**Figure 2.2.4. Comparaison de la fusion de deux protéines de taille différente sur l'activité de Vpr**

(A, B) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec 3  $\mu$ g de plasmide codant pour HA-Vpr, TAP-Vpr, Flag-NLS-BirA1 (FNB), BirA1-Flag-Vpr (BFVpr) ou un vecteur vide (EV) et 1  $\mu$ g de plasmide codant pour GFP puis traitées comme décrit à la Figure 2.2.1. Des analyses de cycle cellulaire sont présentées en (A) et les résultats de deux expériences sont présentés en (B). La barre centrale de chaque colonne représente la médiane. (C) Les niveaux d'expression de Vpr et de Flag ont été validés par immunobuvardage de type Western sur les cellules HEK293T transfectées en (A, B). La séparation centrale indique que des puits ont été enlevés pour des raisons esthétiques, l'exposition est la même pour les deux côtés.

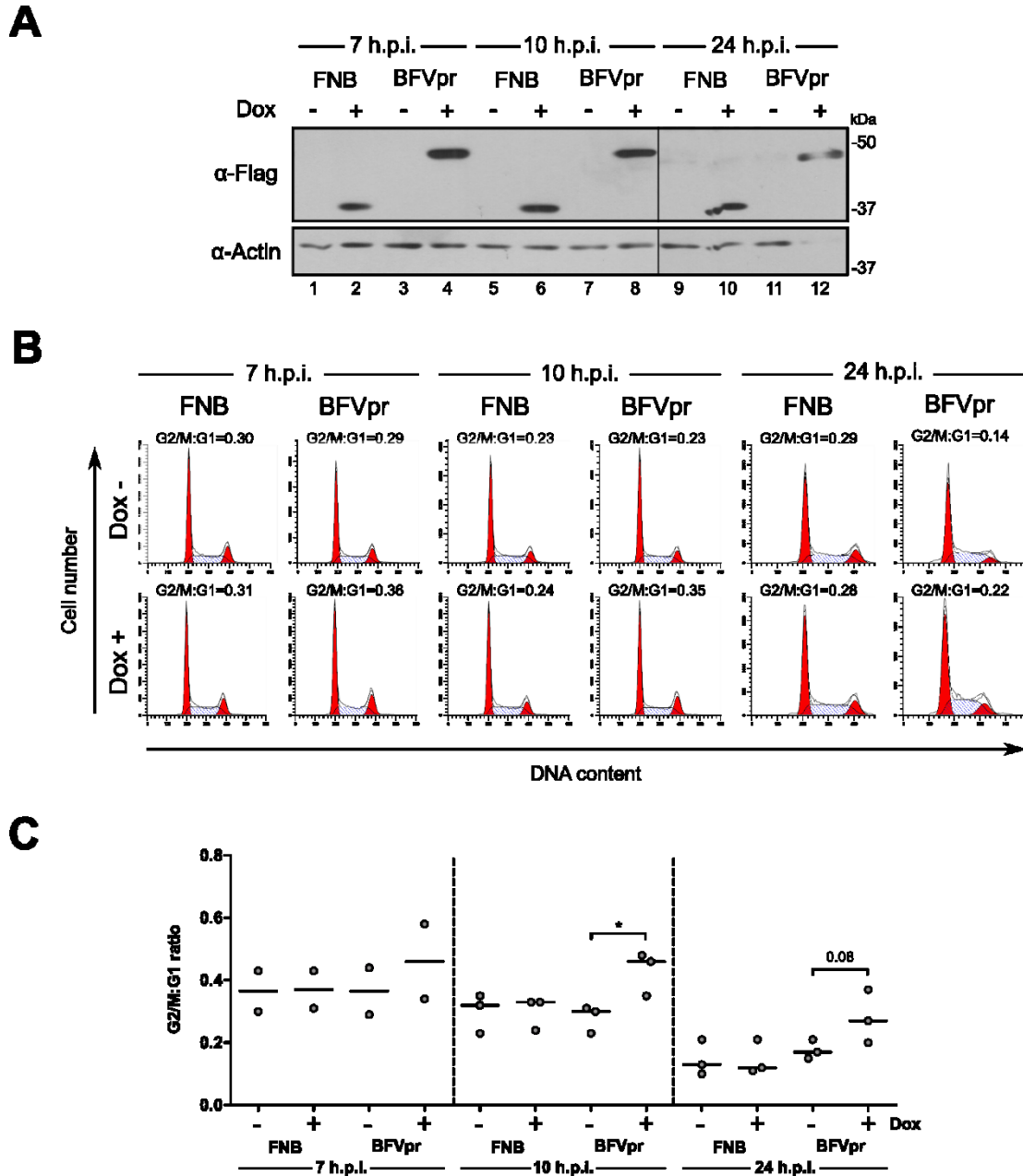


Figure 2.2.5. Production et caractérisation de lignées stables inducibles exprimant les protéines de fusion

(A) Les lignées stables exprimant de manière inducible Flag-NLS-BirA1 (FNB) ou BirA1-Flag-Vpr (BFVpr) ont été traitées avec 0.5  $\mu$ g/mL de doxycycline pour les temps indiqués afin de permettre l'expression des protéines d'intérêt. Les cellules ont alors été récoltées afin



d'analyser les niveaux d'expression des protéines d'intérêt par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps reconnaissant l'étiquette Flag. La séparation centrale indique que les puits proviennent de deux gels différents. (B, C) Une analyse du cycle cellulaire des cellules utilisées en (A) a été effectuée tel que décrit à la Figure 2.2.1. Des analyses de cycle cellulaire sont présentées en (B) et les résultats de deux ou trois expériences sont présentés en (C). La barre centrale de chaque colonne représente la médiane \* indique une différence statistiquement significative ( $P \leq 0.05$ ) déterminée par un test de Student.

séquences de 13 paires de bases de l'ADN intégré clivé et celui du plasmide également clivé; permettant l'intégration du plasmide d'intérêt dans la cellule Flp-In T-REx (743).

Comme les plasmides d'intérêts contiennent des sites de répression transcriptionnel de type TetO2 et que les cellules expriment le répresseur TetR, il faut traiter les lignées cellulaires stables avec de la doxycycline afin de permettre l'expression des protéines d'intérêt. Une fois les lignées stables établies, les cellules ont été traitées avec 0.5 µg/mL de doxycycline pour 7, 10 et 24 heures afin de valider l'expression des protéines d'intérêts par immunobuvardage de type Western. Comme indiqué dans la Figure 2.2.5A, nous avons été capables de détecter un signal correspondant à Flag-NLS-BirA1 et à BirA1-Flag-Vpr à 7, 10 et 24 heures après le début du traitement. Nous avons par la suite validé la capacité de la fusion à médier un arrêt de cycle résiduel, et observé que BirA1-Flag-Vpr n'induisait pas d'accumulation significative ( $\approx 125\%$  par rapport à la condition non traitée) de cellules en G2/M 7 heures après le début de l'induction (Figures 2.2.5B et 2.2.5C). Au contraire, à 10 et 24 heures après le début de l'induction, l'expression de BirA1-Flag-Vpr semble induire une modeste accumulation,  $\approx 150\%$  et  $\approx 160\%$  respectivement, de cellules en phase G2/M (Figures 2.2.5B et 2.2.5C), en accord avec les résultats obtenus en expression transitoire (Figures 2.2.1A et 2.2.1B). Ces résultats valident que les lignées stables générées sont capables d'exprimer les protéines d'intérêt lors d'un traitement avec de la doxycycline et valident une fois de plus que la fusion BirA1-Flag-Vpr, bien que grandement atténuée, est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire résiduel.

#### **4.6. Les protéines de fusion sont capables de médier une biotinylation des protéines cellulaires**

Comme BirA1-Flag-Vpr n'induit pas de changement dans la proportion de cellules en phase G2/M à 7 heures mais qu'une légère augmentation des cellules en G2/M a été observée à 24 heures après induction, nous avons postulé que la protéine Vpr de fusion pourrait être à proximité de partenaires/cibles de Vpr pouvant avoir une implication dans cette activité de Vpr et qu'utiliser ces deux temps nous permettrait de comprendre les événements menant à activité et possiblement à d'autres fonctions de Vpr. Nous avons donc analysé les patrons de biotinylation des protéines de fusion à 7 et 24 heures après induction et en présence ou non de MG-132, un

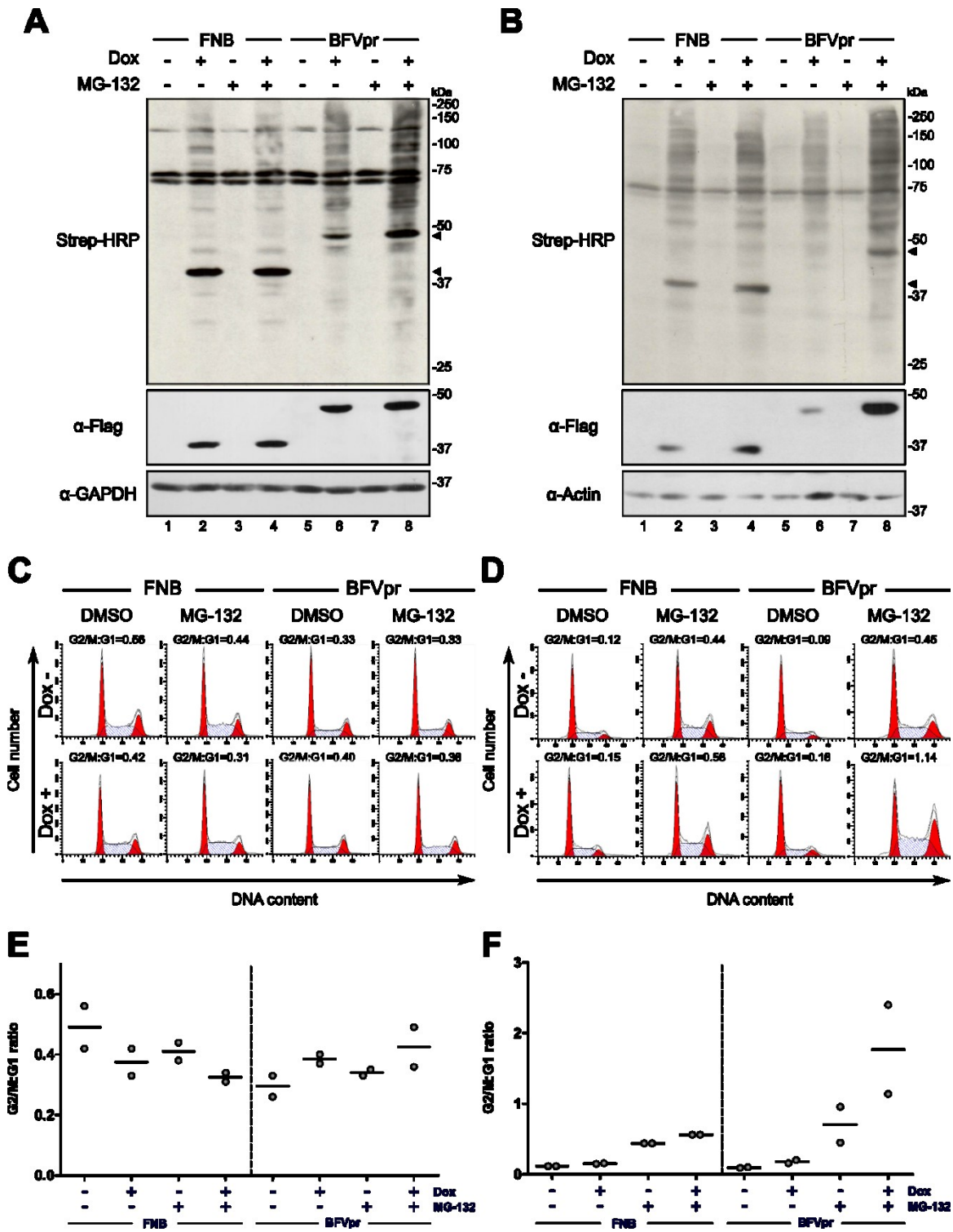


Figure 2.2.6. Les protéines de fusion sont capables d'induire la biotinylation de protéines cellulaires

(A, B) Les lignées HEK293 Flp-In T-REx exprimant de manière inductible Flag-NLS-BirA1 (FNB) ou BirA1-Flag-Vpr (BFVpr) ont été traitées avec 0.5 µg/mL de doxycycline et 50 µM de biotine pendant 7 heures (A) ou 24 heures (B) afin de permettre l'expression des protéines d'intérêt et la visualisation de la biotinylation des protéines à proximité des fusions. Lorsque indiqué, les cellules ont été traitées avec 10 µM (A) ou 1 µM (B) de MG-132 pour la durée de l'induction. Après induction et traitement, les cellules ont été récoltées afin d'analyser les niveaux d'expression des protéines d'intérêt et les niveaux de biotinylation des protéines cellulaires par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps reconnaissant l'étiquette Flag ou de la streptavidine-HRP reconnaissant les protéines biotinylées. Les têtes de flèche indiquent les formes autoubiotinylées des protéines de fusion.

inhibiteur du protéasome, un agent qui pourrait permettre la dégradation des cibles de Vpr. Dans les conditions d'induction avec la doxycycline, il est possible de détecter à l'aide de la streptavidine-HRP de nombreuses bandes correspondant à des protéines biotinylées (Figure 2.2.6). Il est également possible de détecter des bandes intensément biotinylées (indiquées par les têtes de flèches) qui correspondent aux bandes détectées avec un anticorps reconnaissant l'étiquette Flag, indiquant qu'il s'agit fort probablement de formes autobiotinylées des protéines de fusion. De manière intéressante, l'intensité de ces formes autobiotinylées ainsi que celle des profils de biotinylation sont augmentées lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur du protéasome, suggérant la dégradation d'une partie des protéines biotinylées et leur stabilisation lors du traitement avec l'inhibiteur. Ces résultats valident que la protéine de fusion est capable d'induire la biotinylation de protéines cellulaires, présumément à proximité de la fusion.

## 5. Discussion du chapitre

Les approches de double-hybride et d'AP-MS ont été abondamment utilisées afin de trouver de nouveaux partenaires ou de nouvelles cibles de Vpr pouvant expliquer moléculairement ses activités. L'utilisation du double-hybride a par exemple permis l'identification d'UNG2 comme une nouvelle cible de Vpr (662), alors que les approches d'AP-MS ont été utilisées largement afin d'établir l'interactome de Vpr ou pour identifier des cibles et partenaires de Vpr, notamment les complexes DCAF1 et SLX4 (550, 552, 579, 640, 689). Ces approches sont très efficaces pour l'identification de partenaires interagissant stablement avec la protéine d'intérêt mais présentent cependant des limites dans l'identification de partenaires interagissant avec la protéine d'intérêt de manière stable ou transitoire. Ces partenaires restent donc actuellement majoritairement inconnus. Afin d'identifier ces partenaires ou cibles de Vpr, nous avons décidé d'utiliser une approche de biotinylation de partenaires de proximité, l'approche BioID. En comparaison avec les techniques précédemment citées, cette approche permet le marquage *in cellulo* des protéines à proximité de la protéine

d'intérêt et donc l'identification efficace des partenaires/cibles interagissant faiblement ou de manière transitoire avec la protéine d'intérêt.

Pour ces raisons et étant donné que les clonages en C-terminal de Vpr induisent la perte de ses activités (744), nous avons fusionné la biotine ligase BirA1 en N-terminal de Vpr. Nous avons montré que la fusion de BirA1 à Vpr diminuait de l'ordre de 90% la capacité de Vpr d'induire un arrêt du cycle cellulaire. En plus de la diminution de l'activité de Vpr, nous avons également noté un changement de localisation de la protéine de fusion. Au lieu d'être essentiellement nucléaire, la protéine de fusion semble localiser à la fois au niveau du cytoplasme et au niveau du noyau. L'utilisation d'une biotine ligase de seconde génération (BirA2), légèrement plus petite que BirA1, n'a pas permis de restaurer ni l'activité d'arrêt de cycle associée à Vpr, ni la localisation nucléaire de la protéine. Notons toutefois que les expériences de localisation des protéines de fusion et d'analyse de l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire ont été conduites dans des lignées cellulaires différentes, respectivement HeLa et HEK293T. Il n'est donc pas possible d'établir un lien de causalité entre les deux phénotypes. Cependant, il reste qu'une corrélation est observée entre la mauvaise localisation des protéines de fusion dans le modèle cellulaire HeLa et la perte d'activité d'arrêt du cycle cellulaire dans le modèle cellulaire HEK293T.

De manière intéressante, il ne semble pas que la relocalisation de la protéine de fusion soit entièrement responsable de la perte de fonction de la protéine car 1) une partie de la fusion localise bel et bien au niveau du noyau; 2) l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire NLS augmente la localisation de la fusion au noyau mais ne restaure pas l'activité de la protéine. Étant donné que la fusion avec l'étiquette TAP ( $\approx 21$  kDa) réduit la capacité de Vpr d'induire un arrêt du cycle cellulaire, il semblerait que la taille de BirA1 ( $\approx 32$  kDa) soit au moins partiellement responsable de la perte d'activité d'une petite protéine comme Vpr (96 acides aminés) dans le contexte de la protéine de fusion.

Bien que fortement atténuée, il reste qu'une partie de la protéine de fusion localise convenablement au niveau du noyau et est capable de causer une légère accumulation de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Ces résultats suggèrent que la fusion n'inactive pas complètement Vpr et laisse donc penser qu'il serait possible d'établir un réseau de partenaires

de proximité avec cette protéine. Pour cette raison, nous avons généré des lignées cellulaires stables HEK293 exprimant de manière inducible les protéines de fusion et avons validé la capacité de ces protéines à induire la biotinylation de protéines cellulaires dans ce système. Ce système de fusion BirA1-Flag-Vpr a été utilisé par la suite pour générer un réseau d'interaction de partenaires de proximité de Vpr; celui-ci sera présenté dans le prochain chapitre.

Depuis la génération du réseau d'interaction de partenaires de proximité de Vpr, une nouvelle version de BioID a vu le jour : le BioID divisé ou *split-BioID* (745). Dans cette approche, BirA1 a été séparée en deux domaines inactifs qui ont la capacité de reformer une enzyme active quand ils sont à proximité l'un de l'autre. En perspective, il serait donc intéressant de fusionner le premier domaine à la protéine d'intérêt (Vpr dans notre cas) et le second domaine à un partenaire connu de la protéine d'intérêt (ici DCAF1). Ainsi, il y aurait formation d'une biotine ligase active uniquement quand Vpr et DCAF1 formerait un complexe. Comme les protéines ne seraient biotinylées que lors de la formation du complexe Vpr-DCAF1, cette approche permettrait de gagner en spécificité. Elle permettrait également, potentiellement, d'améliorer l'activité biologique de la protéine de fusion car il ne serait pas nécessaire de fusionner BirA1 dans son entièreté mais uniquement un domaine de celle-ci, limitant ainsi la taille de la protéine fusionnée.

## **Chapitre 3**

**Analyse des réseaux d'interactions de la protéine Vpr du VIH-1 & identification de la protéine APC1 comme une nouvelle cible de la protéine Vpr du VIH-1**





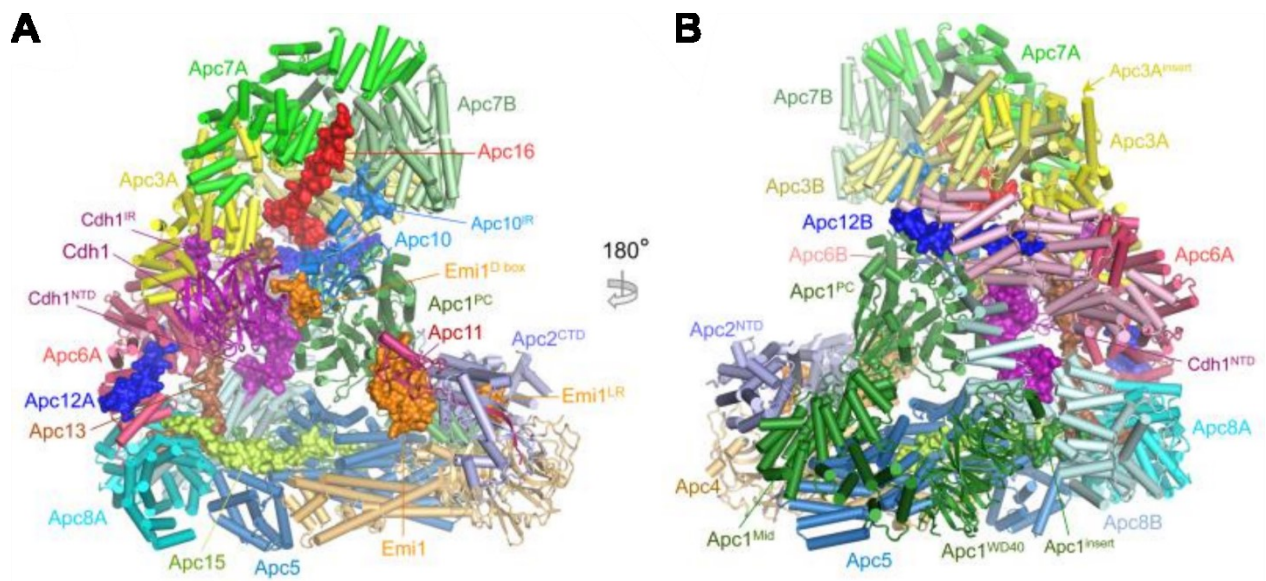
## 1. Introduction spécifique

Une importante machinerie cellulaire est utilisée pour permettre à la cellule de suivre les différentes étapes du cycle cellulaire afin de se diviser. Un des métronomes coordonnant la transition d'une étape du cycle à l'autre est le complexe d'E3 ubiquitine ligase APC/C (746). L'importance de ce complexe pour la régulation du cycle cellulaire sera abordée dans un paragraphe suivant.

### 1.1. Structure et activation du complexe APC/C

Chez l'homme, le complexe APC/C a une taille approximative de 1.5 MDa et est composé de 14 protéines différentes et présentes en un seul ou plusieurs exemplaires au sein du complexe (747, 748). Ces protéines sont réparties en trois sous-unités : la plateforme, la sous-unité catalytique et la sous-unité de recrutement des substrats et des coactivateurs, voir la figure 3.1 (747-749). La plateforme est composée des protéines APC1, APC4 et APC5; la sous-unité catalytique des protéines APC2 et APC11; et la sous-unité de recrutement des substrats et coactivateurs regroupe les protéines CDC27, CDC16, APC7, CDC23, APC10, CDC26, APC13, APC15 et APC16 (Tableau 3). Comme indiqué par leur nom, la sous-unité catalytique a pour rôle de catalyser la réaction de transfert de l'ubiquitine de la E2 ubiquitine ligase au substrat; alors que la sous-unité de recrutement des substrats et des coactivateurs permet le recrutement spécifique des coactivateurs et de leurs substrats. La plateforme quant à elle confère une stabilité au complexe et permet le maintien des deux autres sous-unités ensemble; enlever une des composantes de la plateforme déstructure le complexe et revient à l'inactiver (747, 749, 750).

Les protéines CDC27, CDC16 et CDC23 définissent une surface du complexe permettant le recrutement des coactivateurs : CDH1 ou CDC20 (749, 751, 752). Ces deux coactivateurs permettent la reconnaissance et l'interaction avec différents motifs conservés qui sont présents à la surface de leurs substrats respectifs. Également appelés dégrons (753-755), ces motifs reconnus à la fois par CDH1 et CDC20 sont : 1) les boîtes de destruction ou boîtes D (*D-Box*) ayant pour séquence consensus RxxLxx[ILV] (756, 757); 2) le domaine KEN composé des résidues lysine-acide glutamique-asparagine (758); et 3) le motif ABBA ayant pour séquence consensus



**Figure 3.1. Structure du complexe APC/C en complexe avec CDH1 et EMI1**

Représentation de la structure atomique du complexe APC/C<sup>CDH1-EMI1</sup> vu de face (A) ou de dos (B). Cette structure a été déterminée par cryo-microscopie électronique et provient de (749), avec licence du journal autorisant la publication dans le cadre de cette thèse.

**Tableau 3. Liste des sous-unités et des coactivateurs du complexe APC/C chez l'humain**

<b>Protéine</b>	<b>Autre nom</b>	<b>Fonction et propriété</b>
<b>APC1</b>	TSG24; ANAPC1	Rôle structurel avec APC4 et APC5; fait le lien entre la sous-unité enzymatique et celle de recrutement des substrats et des coactivateurs
<b>APC2</b>	KIAA1406; ANAPC2	Fonction catalytique (transfert de l'ubiquitine)
<b>CDC27</b>	APC3; ANAPC3; DOS1430E; D17S978E	Recrute les coactivateurs CDH1 et CDC20
<b>APC4</b>	ANAPC4	Rôle structurel avec APC1 et APC5
<b>APC5</b>	ANAPC5	Rôle structurel avec APC1 et APC4
<b>CDC16</b>	APC6; ANAPC6	Aide au recrutement des coactivateurs
<b>APC7</b>	ANAPC7	Inconnue
<b>CDC23</b>	APC8	Recrute le coactivateur CDC20
<b>APC10</b>	ANAPC10	Reconnaissance des substrats grâce aux dégrons
<b>APC11</b>	HSPC214; ANAPC11	Recrute la E2 ligase
<b>CDC26</b>	ANAPC12, C9ORF17	Stabilise APC6
<b>APC13</b>	SWM1; ANAPC13	Stabilise APC8
<b>APC15</b>	C11ORF51; HSPC020; ANAPC15	Inconnue
<b>APC16</b>	C10orf104; CENP-27; ANAPC16	Inconnue
<b>CDC20</b>	P55 <sup>CDC</sup>	Régulateur mitotique
<b>CDH1</b>	FZR1; HCT1; FYR; KIAA1242	Régulateur en fin de mitose et en phase G0/G1

\* Tableau reproduit et modifié basé sur une table provenant de (748).

[FILV]x[ILMVP][FHY]x[DE] (759-761). Une liste non-exhaustive des substrats et partenaires d'APC/C est présentée dans le Tableau 4.

Afin de cibler spécifiquement ces différents substrats, l'activité d'APC/C doit être méticuleusement contrôlée, notamment par l'état de phosphorylation du complexe et des coactivateurs. Par exemple, durant la mitose les deux coactivateurs d'APC/C seront phosphorylés, étant donné que la phosphorylation de CDH1 prévient son interaction avec APC/C et qu'à l'inverse la phosphorylation de CDC20 promeut son interaction avec le complexe; celui-ci sera alors sous la forme APC/C<sup>CDC20</sup> (762, 763). En sortie de mitose, CDH1 sera déphosphorylé et formera alors un complexe actif avec APC/C (763). Les états d'activation des complexes APC/C<sup>CDC20</sup> et APC/C<sup>CDH1</sup> sont donc maximaux respectivement en mitose et en phase G0/G1. Le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> permettra à la cellule d'orchestrer la mise en place des outils permettant la séparation des chromatides alors que le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> permettra la séparation des chromatides et régulera l'environnement cellulaire afin d'éviter à la cellule d'entrer prématurément en phase de synthèse d'ADN. Notons que l'activité d'APC/C est également régulée par le complexe du point de contrôle mitotique (MCC) et la protéine EMI1 qui inhibent le recrutement des substrats par APC/C (764, 765).

## 1.2. Régulation du cycle cellulaire par le complexe APC/C

Le complexe APC/C ainsi que le complexe SCF (composé de SKP1-Cul1-[protéine contenant une boîte F]) sont les deux complexes d'E3 ubiquitine ligase qui orchestrent et coordonnent les cascades d'évènements nécessaires à la réplication cellulaire (Figure 3.2). Notons que ces complexes sont capables de se réguler l'un et l'autre; contrôlant ainsi les niveaux de substrats du complexe ciblé.

C'est le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> qui contrôlera la cellule durant la phase G0/G1, il évitera alors que la cellule n'entre dans la phase de synthèse de l'ADN alors qu'elle n'y est pas prête (748, 752). Afin de prévenir l'entrée de la cellule en phase S, le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> dégradera notamment les protéines CDC6 et CDT1 qui forme un complexe au niveau des origines de réplication et qui sont essentielles au démarrage de la réplication de l'ADN (766, 767). APC/C<sup>CDH1</sup> induira également

**Tableau 4. Liste non-exhaustive des cibles et partenaires connus du complexe APC/C**

<b>Protéine</b>	<b>Coactivateur</b>	<b>Fonction</b>	<b>Référence</b>
<b>Aniline</b>	CDH1	Coordonne la cytotélière	(768)
<b>Aurora A</b>	CDH1	Coordonne la maturation et séparation des centrosomes	(769)
<b>Aurora B</b>	CDH1	Coordonne l'assemblage des fuseaux mitotiques, l'alignement et la séparation des chromosomes	(770)
<b>BARD1</b>	CDC20; CDH1	Régulateur de l'assemblage des fuseaux mitotiques. Fonction dans les réponses aux dommages à l'ADN (?)	(771)
<b>BIM</b>	CDC20	Prévient l'apoptose	(772)
<b>BUB1</b>	CDH1	Promeut la formation du complexe MCC régulant le point de contrôle mitotique (SAC)	(759, 773)
<b>BUBR1</b>	CDC20	Composante du MCC; inhibe le complexe APC/C <sup>CDC20</sup>	(764, 774)
<b>CBP/P300</b>	<i>n/a</i>	Forme un complexe avec APC/C afin de trans-activer certains gènes (incluant <i>P21</i> , <i>E2F</i> ) et de réguler transcriptionnellement la transition entre les différentes phases	(775)
<b>CDC6</b>	CDH1	Coopère avec CDT1 pour initier le démarrage de la réplication de l'ADN	(767)
<b>CDC7</b>	CDH1	Dégradé à la suite de dommage à l'ADN pour arrêter la réplication de l'ADN	(776)
<b>CDC20</b>	CDH1	Inactive le complexe APC/C <sup>CDC20</sup>	(754, 758, 774)
<b>CDC25 (A/B/C)</b>	CDH1	Régule la progression du cycle cellulaire	(777-779)

<b>CDT1</b>	CDH1	Coopère avec CDC6 pour initier le démarrage de la réplication de l'ADN	(766)
<b>CENPF</b>	CDC20	Contrôle la formation des kinétochores	(780)
<b>CKAP2</b>	CDH1	Maintien de l'intégrité des microtubules	(781)
<b>CKS1</b>	CDH1	Inactive le complexe SCF <sup>SKP2-CKS1</sup> (voir SKP2); prévient l'entrée en phase S	(782)
<b>Claspine</b>	CDH1	Active CHK1 et arrête les cellules en G2 lors de dommages à l'ADN	(783, 784)
<b>CUEDC2</b>	CDC20; CDH1	Inhibiteur des complexes APC/C	(785, 786)
<b>Cycline A</b>	CDC20; CDH1	Contrôle la transition S – G2	(787, 788)
<b>Cycline B</b>	CDC20; CDH1	Contrôle la transition G2 – M	(789)
<b>E2F1</b>	CDC20; CDH1	Facteur de transcription, contrôle la transition G1 – S	(790-792)
<b>E2F3</b>	CDH1	Facteur de transcription, contrôle la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale	(793)
<b>EHMT1/2</b>	CDH1	Régulation épigénétique; incluant les gènes codant pour IL-6 et IL-8	(794)
<b>EMI1</b>	CDC20; CDH1	Inhibiteur des complexes APC/C (pseudo-substrat)	(765, 792, 795, 796)
<b>FAN1</b>	CDH1	Impliqué dans la sortie de la mitose. Fonction dans les réponses aux dommages à l'ADN (?)	(797)
<b>FBXW5</b>	CDH1 (?)	Inactive le complexe SCF <sup>FBXW5</sup> ; régule la duplication des centrosomes	(798)
<b>FoxM1</b>	CDH1	Dégradé en sortie de mitose pour réguler transcriptionnellement les régulateurs de la mitose (?)	(799)

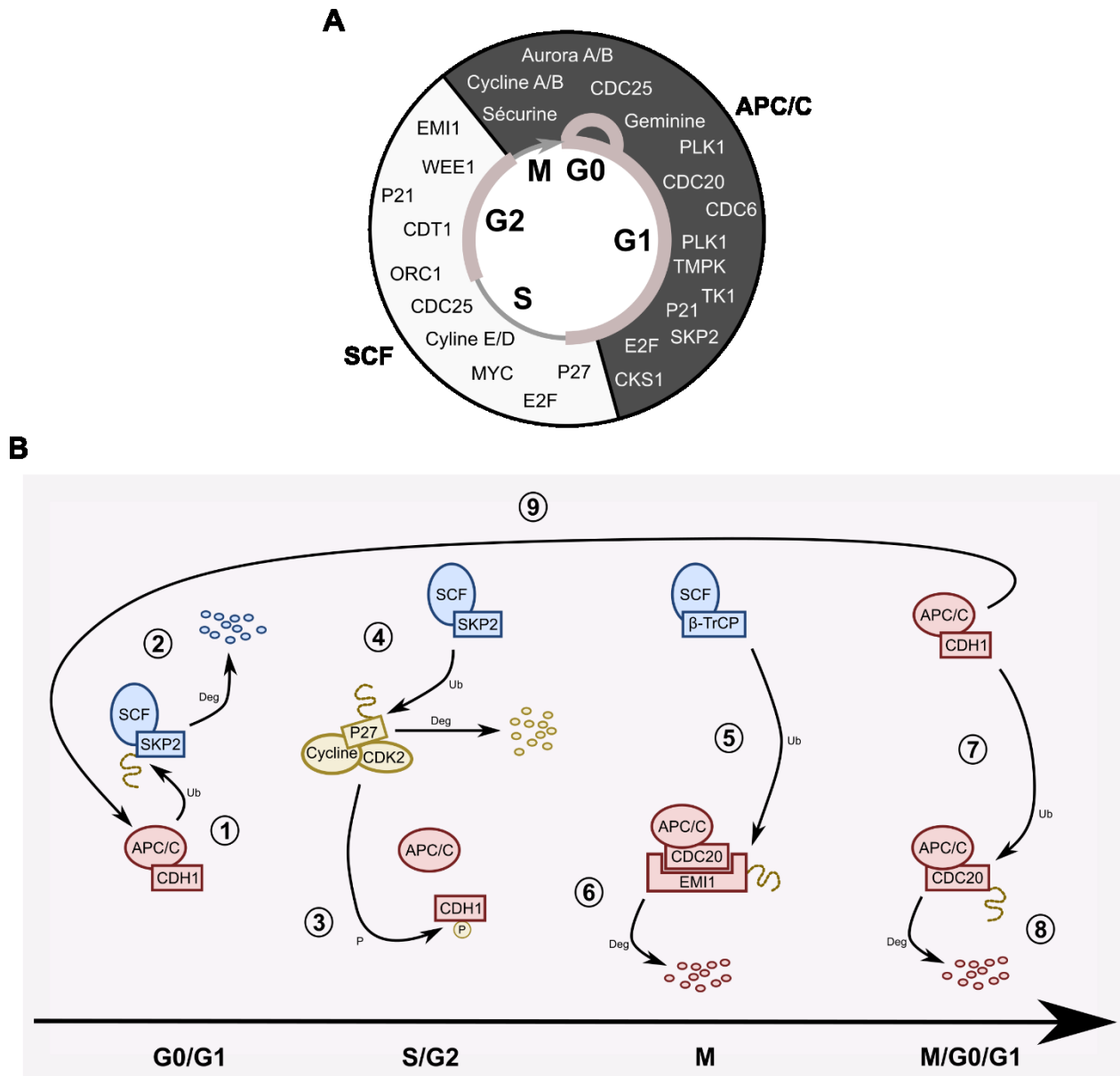
<b>Geminine</b>	CDH1	Prévient la réplication de l'ADN	(800)
<b>HEC1</b>	CDH1	Régule la séparation des chromatides et la sortie de mitose	(801)
<b>Id1</b>	CDC20	Régulateur transcriptionnel important pour la croissance des dendrites	(802)
<b>Id2</b>	CDH1	Régulateur transcriptionnel important pour la croissance des axones	(803)
<b>KIF11</b>	CDH1	Permet le regroupement des centrosomes surnuméraires	(804)
<b>KIF18A</b>	CDC20	Régule l'alignement des chromosomes	(805)
<b>KIF22</b>	CDH1	Régule l'alignement des chromosomes et la longueur des fuseaux mitotiques	(806)
<b>KIFC1</b>	CDH1	Régule l'assemblage des fuseaux mitotiques	(807)
<b>MCL-1</b>	CDC20	Sa dégradation initie l'apoptose lors d'un problème lors de la mitose	(808)
<b>NEK2A</b>	CDC20	Régule la condensation des chromosomes et la formation de fuseaux mitotiques	(809, 810)
<b>NINP</b>	CDC20; CDH1	Régule la maturation des centrosomes	(811)
<b>NIPA</b>	CDH1	Inactive le complexe SCF <sup>NIPA</sup> ; implication à déterminer	(812)
<b>NUSAP</b>	CDC20; CDH1	Régule la dynamique des microtubules et la formation des fuseaux mitotiques	(771, 813)
<b>P21</b>	CDC20	Inhibe l'activité des CDKs	(814, 815)
<b>PFKFB3</b>	CDH1	Régulation négative de la glycolyse	(816)



<b>PLK1</b>	CDH1	Prévient l'entrée en mitose lors de dommages à l'ADN. Régule aussi la sortie de mitose	(783, 817)
<b>Rad17</b>	CDH1	Mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN; voir Claspine	(818)
<b>RRM2</b>	CDH1	Régule les niveaux de dNTPs	(819, 820)
<b>Sécurine</b>	CDC20; CDH1	Régulateur de la séparation des chromatides	(755, 821-823)
<b>Sgo1</b>	CDH1	Régulateur de la séparation des chromatides (?)	(824)
<b>SKP2</b>	CDH1	Inactive le complexe SCF <sup>SKP2</sup> (voir CKS1); permet le maintien de la cellule en G1	(782, 825)
<b>TK1</b>	CDH1	Régule les niveaux de dTTP	(826, 827)
<b>TMPK</b>	CDC20; CDH1	Régule les niveaux de dTTP	(828)
<b>TRRAP</b>	CDC20; CDH1	Composante du complexe d'histone acétylase NuA4. Régule la condensation des chromosomes et la cohésion des chromatides	(829)
<b>UbcH10</b>	CDC20; CDH1	E2 ubiquitine ligase recrutée par APC/C; essentielle à l'activation des complexes	(830, 831)

*n/a* : non applicable

\* Tableau reproduit et modifié. Basé sur une table provenant de (832) et généré avec l'aide de [slim.icr.ac.uk/apc/](http://slim.icr.ac.uk/apc/)



**Figure 3.2. Régulation du cycle cellulaire par les complexes APC/C et SCF**

(A) APC/C et SCF régulent les différentes phases du cycle cellulaire et leur transition. APC/C induit la dégradation de ses substrats pendant les phases G0/G1 et M, alors que SCF sera fonctionnel à partir de la fin de la phase G1 jusqu'au début de la phase M. Les cibles ne sont pas nécessairement placées en fonction de l'ordre de dégradation. (B) Représentation simplifiée des mécanismes de régulation ayant lieu entre les complexes APC/C et SCF. Voir le texte pour plus de détails. P : phosphorylation ; Ub : ubiquitinylation ; Deg : dégradation. Figure reproduite, modifiée et basée sur une illustration provenant de (833).

la dégradation de SKP2, une composante du complexe SCF<sup>SKP2</sup>, inactivant ainsi ce complexe essentiel dès la fin de la mitose (782, 825).

En fin de phase G1, le complexe CDK2/Cycline E induira progressivement la phosphorylation de CDH1, menant à l'inactivation progressive du complexe APC/C<sup>CDH1</sup> et à l'augmentation des niveaux de SKP2 (763, 834-836). Le complexe SCF<sup>SKP2</sup> induira la dégradation des régulateurs du cycle cellulaire, notamment P27 et P21, pour activer pleinement les complexes CDK/Cycline ainsi que pour augmenter les niveaux de dNTPs qui sont nécessaires à la synthèse d'ADN (837-841). En plus de la phosphorylation de CDH1, le facteur de transcription E2F1 augmentera l'expression du pseudo-substrat EMI1 qui inhibera davantage l'activité d'APC/C (765, 792, 795). Le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> étant alors inactif, les niveaux de CDC6/CDT1 ainsi que ceux des dNTPs augmenteront et permettront l'initiation de la réplication de l'ADN. C'est l'entrée en phase de synthèse.

En fin de phase G2, il y aura une augmentation des niveaux de CDK1/Cycline B; un complexe important dans la transition de la phase G2 à la mitose. Ce complexe phosphorylera EMI1, permettant ainsi au complexe SCF<sup>B-TrCP</sup> d'induire sa dégradation. Conséquemment, le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> ne sera plus inhibé par EMI1 (796, 842, 843). Cependant, APC/C<sup>CDC20</sup> ne sera pas complètement activé tant que les microtubules ne seront pas convenablement ancrés aux kinétochores; cette inhibition d'APC/C<sup>CDC20</sup> est effectuée par le complexe MCC composé de BUBR1, BUB3 et MAD2 (764, 774). Ce complexe MCC recrute CDC20 et inhibe APC/C<sup>CDC20</sup> fonctionnellement, notamment en agissant en tant que pseudo-substrat (844-846). Une fois les microtubules convenablement ancrés aux kinétochores, le complexe MCC se désassemblera et lèvera l'inhibition du complexe APC/C<sup>CDC20</sup>. Ce dernier étant alors actif, il induira la dégradation de la Cycline B mais aussi de la Sécurine; une protéine ayant pour but de maintenir les kinétochores ensembles et ainsi de prévenir la séparation des chromosomes (755, 821, 822, 847). La dégradation de Cycline B causant une perte de fonction de CDK1, CDH1 sera de nouveau progressivement actif et reformera un complexe APC/C<sup>CDH1</sup> fonctionnel (835). Ce complexe prendra le relais de APC/C<sup>CDC20</sup>, notamment en dégradant CDC20, et permettra de terminer la mitose puis de garder la cellule en phase G0/G1.

### 1.3. Autres fonctions du complexe APC/C

La recherche s'est longtemps focalisée sur le rôle d'APC/C dans la régulation du cycle cellulaire, mais étant donné les protéines que ce complexe cible, de nouvelles activités d'APC/C émergent depuis quelques années. Ce complexe a notamment été associé aux voies de réponses aux dommages à l'ADN et pourrait orienter le choix de la réponse qui sera enclenchée (783, 785, 794, 848). Lors d'une cassure double brin de l'ADN deux mécanismes de réparation principaux peuvent être mis en place : la réparation non-homologue (NHEJ) en G0/G1 et la recombinaison homologue (HR) en S/G2 (641, 849). Le choix de la voie utilisée sera notamment déterminé par les axes 53BP1-RIF1 et BRCA1-CtIP menant respectivement à la NHEJ et à la HR (850). Il a été démontré que l'activation de la kinase CHK1 permettait le recrutement du complexe APC/C<sup>CDH1</sup> aux sites de dommages afin de médier la dégradation d'USP1 et de favoriser la réparation par HR durant les phases S/G2 (851, 852). Aussi, APC/C<sup>CDH1</sup> est également connu pour médier la dégradation de CtIP, une composante essentielle à la résection nécessaire à la réparation par HR, suggérant qu'APC/C<sup>CDH1</sup> pourrait favoriser la NHEJ en G0/G1 (850, 853, 854). Notons enfin que le complexe APC/C semble réguler et être régulé par 53BP1, un déterminant de la NHEJ (855). Les mécanismes d'action d'APC/C sur les voies de réparation restent néanmoins mal compris pour l'heure.

APC/C est également capable de moduler la qualité et les niveaux des dNTPs, notamment en médiant la dégradation de TMPK, TK1 et RRM2 (819, 820, 826-828, 856). RRM2 est une sous-unité de la ribonucléotide réductase (RNR), une enzyme essentielle à la synthèse des dNTPs et dont le niveau d'expression corrèle à la quantité de dNTPs produits dans la cellule (857). Notons que, bien que les expériences réalisées sur RRM2 aient été conduites dans des modèles murins, le domaine KEN reconnu par CDH1 pour induire la dégradation de RRM2 est conservé chez l'humain (819, 820). TK1 et TMPK quant à elles sont deux enzymes subséquentement impliquées dans la synthèse de dTTP (856). La dégradation de ces trois protéines par le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> permet l'abaissement puis le maintien des niveaux faibles de dNTPs et particulièrement de dTTP pendant les phases de mitose et G0/G1 (828, 856). Également, le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> est connu pour médier la dégradation de la protéine P21 (814), une protéine bien connue pour inhiber la réplication du VIH-1 dans les cellules en arrêt de division, comme les macrophages, en diminuant

les niveaux de dNTPs (707, 858). En effet, P21 agit au niveau transcriptionnel *via* E2F1 pour diminuer l'expression de TMPK, TK1 et RRM2 (858-860) et active un facteur de restriction SAMHD1 (707). Notons finalement que les niveaux de TMPK sont également sous le contrôle direct du complexe APC/C<sup>CDC20</sup> (828).

En plus des activités d'APC/C par rapport à la régulation des niveaux de dNTPs et des dommages à l'ADN; ce complexe a été impliqué dans la modulation de facteurs transcriptionnels et épigénétiques (791, 794, 829, 861, 862), mais aussi dans la différenciation cellulaire ainsi que la croissance des axones et des dendrites des cellules neuronales (802, 803, 863).

Enfin, notons que ces différentes fonctions d'APC/C ne sont pas isolées les unes des autres, mais le plus souvent reliées. On peut penser, par exemple, que le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> induit la dégradation de TK1, TMPK1, RRM2 pour diminuer les niveaux de dNTPs et en même temps induit la dégradation de CDC6 et CDT1 pour prévenir une entrée prémature de la cellule en phase S. Également et comme mentionné précédemment, le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> peut être activé dans des phases du cycle cellulaire où il est normalement inactif, notamment dans des conditions de dommage à l'ADN en phase S afin d'orienter les voies de réparation mais aussi présumément pour bloquer la synthèse en diminuant les niveaux de dNTPs (864). Le but d'APC/C semble ultimement de réguler le cycle cellulaire et de maintenir l'intégrité du génome cellulaire.

#### **1.4. Manipulation du complexe APC/C par les virus**

Afin de se répliquer davantage, certains virus ont adaptés des protéines virales dans l'optique de manipuler le(s) complexe(s) APC/C et ainsi contrôler l'avancement des phases du cycle cellulaire, ou même de l'arrêter, lors de l'infection (Tableau 5). Ces virus seront conséquemment capables de manipuler l'environnement cellulaire afin de présumément soutenir la réplication et/ou la pathogénèse virale (865, 866). Dans les prochains paragraphes, je présenterais certains mécanismes mis en place par les virus afin de manipuler le complexe APC/C et leurs conséquences.

**Tableau 5. Manipulation du complexe APC/C par des protéines virales**

<b>Virus</b>	<b>Protéine</b>	<b>Mécanisme d'action et conséquence</b>	<b>Référence</b>
<b>Adénovirus</b>	E1A	Interagit avec CBP/P300 et inhibe son recrutement par APC/C; promeut l'entrée en phase S	(775)
	E4orf4	Inhibe l'activité de PP2A induisant l'activation prématurée d'APC/C <sup>CDC20</sup> ; cause un arrêt en G2/M	(867-869)
<b>CAV</b>	Apoptine (VP3)	Interagit avec APC1 et relocalise APC/C dans les corps PML où le complexe est déstructuré; bloque les cellules en G2/M	(870, 871)
<b>HBV</b>	X (HBx)	Lie BubR1 et active prématurément APC/C <sup>CDC20</sup> ; induit de l'instabilité génomique et des anomalies chromosomiques. Diminue l'expression de CDH1 et facilite l'entrée en phase S	(872-874)
<b>HCMV</b>	UL21a	Induit la dégradation d'APC4, APC5 et APC1; déstructure les complexes APC/C et affecte leurs activités	(875-877)
	UL97	Possède une activité kinase et phosphoryle CDH1; inhibe l'activité du complexe APC/C <sup>CDH1</sup>	(875, 878)
<b>HPV</b>	E2	Interagit avec CDH1 et CDC20, prévenant l'activation des complexes APC/C et arrête les cellules en G2/M	(879, 880)
	E6/E7	Augmentent les niveaux de CDC20 et de UbcH10 menant à une activation prématurée d'APC/C et à une sortie de mitose précoce	(881)
	E7	Stabilise EMI1; inhibe les complexes APC/C	(882)

<b>HTLV-1</b>	Tax	Lie CDC20 et CDH1. Mécanismes et conséquences incertains	(883-886)
<b>ORFV</b>	PACR	Compétitionne avec APC11 en liant APC2 et forme un complexe PACR-APC/C, induisant une perte d'activité d'APC/C	(887, 888)

\* Tableau reproduit et modifié. Basé sur une table provenant de (832)

### 1.4.1. Adénovirus

Les adénovirus sont des virus ayant une organisation génomique sous la forme d'un double brin d'ADN linéaire, d'une longueur classiquement comprise entre 30 et 36 kb, codant pour une trentaine de protéines (889). Les deux protéines précoces E1A et E4orf4 sont capables de manipuler APC/C de diverses façons.

E1A est une protéine qui transactive les promoteurs viraux et cellulaires (890-892) et qui est également capable de transformer les cellules (893-895). Pour se faire, E1A interagit avec CBP/P300, un complexe de lysine acétyltransférase qui agit comme coactivateur transcriptionnel (896-898). Mais physiologiquement CBP/P300 est notamment retrouvé sous forme d'un complexe CBP/P300-APC/C permettant la transactivation de certains gènes cellulaires comme *P21* et *E2F* (775). E1A compétitionne donc avec APC/C pour lier CBP/P300 et inhibe par conséquent la capacité d'APC/C à transactiver certains gènes cellulaires, à maintenir la cellule en G1 et force l'entrée de la cellule en phase S (775, 899, 900). Cette activité de compétition avec APC/C est essentielle à l'activité de transformation cellulaire de la protéine E1A (775).

E4orf4 est une protéine bien connue des adénovirus qui a la capacité de médier un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (869, 901). Cette activité médiée par E4orf4 a été reliée à la formation d'un complexe avec la sous-unité régulatrice B55 de PP2A. Ce faisant, E4orf4 induit la phosphorylation de CDC20 et de CDH1, menant respectivement à l'activation prématurée d'APC/C<sup>CDC20</sup> et à l'inhibition d'APC/C<sup>CDH1</sup> (867-869, 902-904).

### 1.4.2. Virus de l'anémie du poulet

Le virus de l'anémie du poulet (CAV) est un petit virus de la famille des *Circoviridae*. Il possède un simple brin d'ADN circulaire à polarité négative comme génome. Celui-ci est d'une taille de 2,3 kb et encode pour uniquement trois protéines virales (905, 906). Son nom vient du fait qu'il cause une anémie accompagnée d'une immunosuppression chez le poulet en causant l'apoptose des hématies et des cellules épithéliales thymiques corticales (907, 908). La protéine VP3 de CAV, également connue sous le nom d'Apoptine, peut induire l'apoptose des cellules T lymphoblastoïdes et des cellules myéloïdes (906). Cette protéine est également capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M puis l'apoptose, indépendamment de P53, quand elle est



exprimée dans des cellules transformées humaines (870, 909, 910). La capacité de la protéine Apoptine d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M puis l'apoptose, a été reliée à sa capacité de lier APC1 et de relocaliser le complexe APC/C dans les corps PML. Ces événements mènent à la dissociation du complexe APC/C et donc à son inactivation (870, 871). Notons qu'une protéine homologue à la protéine Apoptine encodée par le CAV a été retrouvée chez le Gyrovirus humain (HGYV). Cette protéine, Apoptine du HGYV, est également capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et l'apoptose quand elle est exprimée dans des cellules transformées (911, 912). Bien qu'il n'y ait pas de preuve d'interaction entre Apoptine du HGYV et APC/C; nous pouvons penser que le mécanisme d'action de cette protéine virale est proche, sinon identique, à Apoptine du CAV (911, 912).

#### **1.4.3. Virus de l'hépatite B**

Le virus de l'hépatite B (HBV) est un virus de la famille des *Hepadnaviridae*. Son génome est constitué d'un ADN partiellement double brin circulaire d'une taille approximative de 3.2 kb (913). HBV encode la protéine X, également appelée HBx, afin de manipuler APC/C. HBx compétitionne avec CDC20 pour le site de liaison présent sur BUBR1. Se faisant, HBx diminue l'activité inhibitrice du complexe MCC ce qui mène à l'activation prématurée du complexe APC/C<sup>CDC20</sup>, à une entrée prématurée en mitose et à des anomalies chromosomiques (872, 874). Enfin, HBx diminue les niveaux de CDH1 par un mécanisme encore non élucidé et stabilise ses substrats, notamment CDC6, induisant une entrée en phase de S de la cellule (873). Notons que de manière intéressante, le recrutement du complexe Cul4-DDB1 par HBx a été associée à sa capacité de médier la dégradation de protéines cellulaires (914-918). Cul4-DDB1 sont deux composantes du complexe DCAF1 recruté par Vpr.

#### **1.4.4. Cytomégalovirus humain**

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un herpèsvirus (famille des *Herpesviridae*) à ADN double brin linéaire ayant une taille d'environ 230 kb (919). Ce virus utilise une grande variété de mécanismes (*e.g.* transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel) afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire dans une pseudo-phase G1 afin de se répliquer convenablement (920-925). HCMV utilise également deux protéines virales, UL21a et UL97, afin

de manipuler le complexe APC/C. UL21a est capable d'induire la dégradation protéasomale des composantes de la plateforme d'APC/C (incluant APC1, APC4 et APC5) et ainsi de déstructurer le complexe (875-877). La kinase virale UL97 quant à elle, induit l'hyperphosphorylation de CDH1 et inhibe du même fait l'activation du complexe APC/C<sup>CDH1</sup> (875, 878, 926, 927). L'importance de ces deux protéines virales dans l'arrêt de cycle en pseudo-G1 par HCMV reste à être clarifiée (925). Cependant, il semblerait qu'ensemble les activités de UL21a et de UL97 sur le complexe APC/C contribue à augmenter la réplication virale et que des virus déficients pour UL21a et UL97 se répliquent davantage dans un contexte de déplétion de certaines sous-unités du complexe par des approches de siRNA (866, 876).

Il semblerait que deux autres herpèsvirus pourraient manipuler APC/C. En effet, il a été proposé que la protéine kinase virale BGLF4 du virus d'Epstein-Barr (EBV) induise une augmentation des substrats d'APC/C, le mécanisme d'action éventuel n'a pas été identifié et l'observation est principalement basée sur des résultats de SILAC (928). Il semblerait également que la protéine K10 du KSHV interagisse avec plusieurs protéines du complexe APC/C mais ces résultats obtenus par AP-MS n'ont pas été validés et le mécanisme d'action reste donc incertain (929). Toutefois, un article très récemment publié semble indiquer que KSHV pourrait se répliquer indépendamment de l'activité d'APC/C (930), par conséquent, il reste à déterminer si KSHV manipule APC/C et les conséquences de cette manipulation éventuelle.

#### **1.4.5. Papillomavirus humain**

Le papillomavirus humain (HPV) est un virus appartenant à la famille des *Papillomaviridae*. Son génome est composé d'un ADN circulaire à double brin ayant une taille comprise entre 6 et 8 kb (931). Ce virus a la particularité de répliquer son ADN lorsque les cellules infectées se trouvent en phase G2 du cycle cellulaire (932). HPV n'utilise pas moins de trois protéines virales afin de manipuler APC/C : E2, E6 et E7. E2 lie CDH1 et le relocalise dans des structures insolubles, inhibant par conséquent la formation du complexe APC/C<sup>CDH1</sup> (879). E2 inhibe également l'activation du complexe APC/C<sup>CDC20</sup> en formant un complexe MCC-CDC20-E2 qui ne pourra pas être activé, prévenant donc l'activation du complexe APC/C<sup>CDC20</sup> (880). En surexpression, cette protéine est rapportée pour induire un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (879, 880, 933). À l'inverse de E2, les protéines virales E6 et E7 permettent la sortie de mitose (881). Ces protéines induisent une

augmentation des niveaux de CDC20 et de UbcH10 qui mène à l'activation d'APC/C<sup>CDC20</sup> indépendamment de l'activité du MCC, d'où la sortie de mitose (881). De manière contre-intuitive, E7 semble également stabiliser les niveaux de EMI1 et ainsi inhiber l'activité d'APC/C (882). L'importance d'E7 dans les mécanismes d'activations et d'inhibition d'APC/C doit cependant être analysée davantage; il se pourrait que E7 inhibe APC/C dans des conditions particulières notamment pour induire une rereplication de l'ADN (934).

#### **1.4.6. Virus T-lymphotropique humain 1**

Tous comme le VIH, le virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV-1) fait partie de la famille des *Retroviridae*. Son génome est composé d'un ARN simple brin linéaire ( $\approx 9$  kb) qui doit être rétrotranscrit en ADN double brin avant d'être intégré (935). Sa protéine virale Tax, qui est la protéine transactivatrice du virus, induirait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, une activité qui a été reliée par l'analyse de mutants de Tax à l'activation des complexes APC/C (884, 886). En fait, il semblerait que Tax interagisse directement avec CDH1 et CDC20 pour activer prématurément les complexes APC/C (883). Le mécanisme d'action reste mal compris. Notons enfin que la capacité de Tax à induire un arrêt en G1 est discutable car, pour certains groupes, Tax induirait plutôt une accélération afin de sortir de la phase G1 (936, 937).

#### **1.4.7. Virus ORF**

Le virus ORF (ORFV) est un virus de la famille des *Poxviridae*. Son génome est composé d'un ADN double brin linéaire d'environ 140 kb et contenant  $\approx 130$  gènes (938). Ce virus encode la protéine PACR, une protéine homologue à APC11 et avec laquelle PACR compétitionne pour lier APC2 au sein du complexe APC/C (887, 888). La formation du complexe PACR-APC/C a été associée à la perte d'activité d'APC/C car PACR ne possède pas d'activité E3 ubiquitine ligase à l'inverse d'APC11. Dans un contexte de surexpression de PACR, un arrêt du cycle cellulaire en G2/M a été observé (887). Également, durant l'infection PACR favorise la réplication virale (887).

#### **1.4.8. Pourquoi les virus ciblent-ils APC/C ?**

Comme abordé dans les précédents paragraphes, différents virus sont capables de cibler le complexe APC/C durant l'infection. Des virus comme l'adénovirus, HCMV ou encore HPV ont évolués afin d'utiliser plusieurs de leurs protéines virales respectives afin de cibler ce complexe

par diverses approches. Pourquoi consacrer autant de moyens à moduler ce complexe et quelles en sont les conséquences? Les raisons sont très variables d'un virus à l'autre.

Certains virus (*i.e.* adénovirus, HBV, HCMV, HPV) semblent cibler le complexe APC/C par exemple dans le but de prévenir la reformation de l'enveloppe nucléaire durant la mitose et ainsi accéder au noyau cellulaire où ils se répliquent; ou plus généralement pour maintenir la cellule dans une phase du cycle qui leur convient afin de pouvoir se répliquer (866, 924, 925, 932, 939, 940). Dans le cas de l'adénovirus et de HPV, il se pourrait que ces virus manipulent APC/C dans le but d'induire une transformation des cellules infectées (775, 880, 883).

Dans le cas de HCMV, il se pourrait que le virus inhibe le complexe APC/C afin d'augmenter les niveaux de dNTPs et de faciliter ainsi sa réplication. En effet, trois enzymes des voies de synthèse des dNTPs sont retrouvées parmi les substrats d'APC/C, soit : TK1, TMPK et RRM2. De manière intéressante, HCMV n'encode pas de thymidine kinase mais induit une hausse des niveaux et de l'activité de la thymidine kinase lors de l'infection (941-943). Également, il a été démontré que ce virus utilisait UL97 afin de médier la phosphorylation donc inactiver SAMHD1, par un mécanisme dépendant des CDKs, et ainsi de prévenir le clivage des dNTPs (944). Il se pourrait donc que HCMV utilise deux mécanismes distincts pour moduler les niveaux de dNTPs.

Dans le cas du CAV qui n'encode que trois protéines virales, la protéine Apoptine a été sélectionnée pour cibler le complexe APC/C (870, 905). Il a été proposé que la production de l'ADN virale induisait une réponse aux dommages à l'ADN par la cellule, une condition propice à la relocalisation d'Apoptine au noyau cellulaire puis à l'induction d'un arrêt en G2/M menant à l'apoptose. Ce mécanisme semble dépendre d'APC/C et pourrait favoriser la réplication virale (945).

Notons que tous les virus ciblant le complexe APC/C sont des virus à ADN ou ont une étape de leur cycle de réplication durant laquelle leur génome est sous forme d'ADN (dans le cas de HLTV-1). Il se pourrait donc aussi que ces virus ciblent le complexe APC/C dans le but de limiter ou d'orienter la réponse aux dommages à l'ADN et ainsi de forcer la cellule à poursuivre son cycle de division ou promouvoir certaines voies de réparation au détriment d'autres (854, 855, 946, 947).

Notons enfin qu'il a été rapporté dans la littérature des cas de protéines virales dégradées ou potentiellement dégradées par APC/C. C'est notamment le cas de la protéine E1 du papillomavirus bovin qui possède un domaine KEN ainsi qu'une boîte D et qui est dégradée par APC/C. Notons que ces expériences ont été conduites dans des cellules d'origine humaine ou de xénope (948). Dans le cas du HCMV, la protéine UL97 possède deux boîtes D mais il n'a pas été démontré pour l'instant qu'UL97 était une cible d'APC/C (875). Dans ce contexte, il est probable que les virus ciblent APC/C afin de prévenir la dégradation de leurs propres protéines dans le but de favoriser la réplication virale *via* d'autres activités.

## 2. Mise en contexte du chapitre

### 2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre

Le choix d'étudier l'interaction de la protéine Vpr du VIH-1 avec le complexe APC/C a été motivé par différentes raisons. La première est que Vpr est une protéine virale induisant un arrêt du cycle cellulaire en G2/M au moyen d'un mécanisme encore peu compris et que, comme introduit précédemment dans ce chapitre, le complexe APC/C est ciblé par de nombreuses protéines virales induisant des perturbations du cycle cellulaire. La seconde est que plusieurs protéines du complexe APC/C ont été identifiées dans l'analyse BioID et que j'ai retrouvé plusieurs protéines du complexe (APC1, APC2, APC5, APC7 et CDC20) dans l'analyse des résultats obtenus par une approche AP-MS de Vpr et publiés par le laboratoire du Dr Jacek Skowronski (640). La troisième est qu'il a été rapporté que DDB1, une composante du complexe DCAF1 recruté par Vpr, pouvait former un complexe avec CDH1 afin d'activer le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> (949); notons également que la protéine virale HBx qui recrute Cul4-DDB1 est aussi capable de moduler les complexes APC/C (872-874). Enfin, les seules connaissances reliant APC/C et le VIH-1 ont été obtenues par des approches d'analyses de banques d'ARN interférence (siRNA) et suggéraient que le complexe APC/C était essentiel à la réplication du VIH-1 (950-952).

C'est pour ces raisons que je me suis donné l'objectif d'analyser la relation entre Vpr et le complexe APC/C. L'emphase du projet a été mis sur la protéine APC1 car il s'agit d'une

composante essentielle de la plateforme et que son absence induit une déstructuration du complexe APC/C (750).

Les objectifs de ce chapitre sont donc : 1) d'analyser les partenaires à proximité de Vpr en utilisant l'approche BioID (introduite et présentée dans le précédent chapitre); 2) de valider l'analyse BioID en détaillant la nature des interactions entre Vpr et le complexe APC/C; 3) de définir APC1 comme une cible de la protéine virale Vpr du VIH-1; et 4) d'établir les implications de cette interaction au niveau de la réplication du VIH.

## 2.2. Contribution au chapitre

L'idée d'utiliser l'approche BioID afin d'identifier de nouveaux partenaires ou de nouvelles cibles de Vpr est une idée originale du Dr Éric A. Cohen. L'idée d'analyser la relation entre APC/C et Vpr est une idée originale de moi-même.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été générés par :

- Figure 3.3.1 : génération des lignées stables et BioID (moi-même; avec les conseils du Dr Jean-François Côté ainsi que de son étudiant Dr Halil Bagci), injection et analyse par spectrométrie de masse (effectuée par la plateforme de protéomique de l'IRCM), analyse bioinformatique (Dr Jonathan Boulais).
- Figure 3.3.2 : analyses bioinformatiques (moi-même; avec les conseils du Dr Jonathan Boulais).
- Figure 3.3.3 : moi-même (avec la formation technique de la plateforme de microscopie de l'IRCM).
- Figure 3.3.4 : moi-même (Figure 3.3.4.C : avec la formation technique de la plateforme de cytométrie en flux de l'IRCM).
- Figure 3.3.5 à Figure 3.3.8 : moi-même.
- Figure 3.3.9 : (A) moi-même; (B) moi-même (avec les conseils du Dr Mariana Bego); (C-D) donneurs #1, #2 et #3 : moi-même (avec les conseils du Dr Robert Lodge), donneurs #4 et #5 : Dr Robert Lodge; (E) protocole de marquage établi par moi-même et expérience faite par Dr Robert Lodge.

Les expériences ont été conduites et les résultats générés sous la supervision du Dr Éric A. Cohen.

### **3. Article #1**

Statut de l'article : en révision pour *Journal of Virology*

# Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Mediates Degradation of APC1, a Scaffolding Component of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome

Jérémy A. Ferreira Barbosa<sup>1</sup>, Jonathan Boulais<sup>1</sup>, Robert Lodge<sup>1</sup> and Éric A. Cohen<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup> Montreal Clinical Research Institute (IRCM), Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

# Correspondence to Éric A. Cohen: [Eric.Cohen@ircm.qc.ca](mailto:Eric.Cohen@ircm.qc.ca)

Phone: +1 (514) 987-5804

## Contact information:

Jérémy A. Ferreira Barbosa: [Jeremy.FerreiraBarbosa@ircm.qc.ca](mailto:Jeremy.FerreiraBarbosa@ircm.qc.ca)

Jonathan Boulais: [Jonathan.Boulais@ircm.qc.ca](mailto:Jonathan.Boulais@ircm.qc.ca)

Robert Lodge: [Robert.Lodge@ircm.qc.ca](mailto:Robert.Lodge@ircm.qc.ca)

**Running title:** HIV-1 Vpr mediates APC1 degradation

**Keywords:** human immunodeficiency virus (HIV-1); Vpr; anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C); APC1; proximity labelling; BioID; proteomic



## **Abstract**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) encodes several accessory proteins – Nef, Vif, Vpr and Vpu – whose functions are to modulate the cellular environment to favor viral replication. In this study we focus on Vpr, a viral protein capable of mediating a G2/M cell cycle arrest in dividing cells and providing a replicative advantage to the virus during infection of myeloid cells. We further define its proximity interaction network by using the proximity labelling approach known as BioID and identified 352 potential Vpr partners/targets, including several organized in complexes such as the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). We demonstrated that both wild type and cell cycle defective mutants of Vpr mediated the degradation of an essential APC/C scaffolding protein, namely APC1. Vpr-mediated APC1 degradation relied on the recruitment by Vpr of functional DCAF1 E3 ubiquitin ligase complex and was mediated by the proteasomal pathway. We next demonstrated that Vpr formed a complex with APC/C, including APC1 and the APC/C coactivators CDH1 and CDC20. Interestingly, a well characterized and studied Vpr variant called NL4.3 did not mediate APC1 degradation. Indeed, a N28S-G41N double-mutation in NL4.3 Vpr abrogated its abilities to mediate APC1 degradation. In contrast to NL4.3 Vpr, we showed that APC1 degradation is a conserved feature of some transmitted/founder primary isolate variants of Vpr. This degradation of APC1 mediated by Vpr did not correlate with previously mentioned Vpr functions and therefore more experiments need to be conducted to fully understand the Vpr impact on APC/C activities with regard to HIV-1 pathogenesis.

## **Importance**

HIV-1 uses Vpr to enhance viral replication, especially in myeloid cells. Several Vpr targets were previously identified but their individual degradation does not fully explain Vpr activity. Here, we used the unbiased proximity labelling approach called BioID to further define the Vpr proximity interaction network and identified several potentially new Vpr partners/targets. We validated our approach by focusing on a cell cycle master-regulator, the APC/C complex, and demonstrated that Vpr mediated the degradation of a critical scaffolding component of APC/C

called APC1. The Vpr-mediated APC1 degradation was not correlating with the viral replication increase attributed to Vpr in myeloid cells. However, given that it is a conserved feature of some transmitted/founder primary isolate variants of Vpr we believe that this Vpr and APC/C interplay might govern other aspects of HIV-1 pathogenesis.

## Introduction

All primate lentiviruses, including human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1/2), encode a set of accessory proteins primarily involved in promoting viral immune evasion (182). Of all the lentivirus-encoded accessory proteins, Viral Protein R (Vpr) remains the most enigmatic at the functional level. HIV-1 Vpr is a 14 kDa protein that is packaged into virions, pointing to an early role in the virus life cycle. The protein is required for HIV pathogenesis *in vivo* and for efficient virus replication in macrophages but the mechanisms underlying these phenotypes remain elusive (953). One well established but poorly understood Vpr-associated phenotype is its ability to activate DNA replication/damage pathways, a condition that leads to a G2/M cell cycle arrest in dividing cells (566, 954). This biological activity requires the recruitment of an E3 ubiquitin ligase complex, namely DDB1-CUL4A-DCAF1 (DCAF1com). However, while recruitment of DCAF1com is necessary to induce a G2/M cell cycle arrest, it is not sufficient as demonstrated by well characterized G2/M arrest-defective Vpr mutants that are impaired (Q65R) or still competent (S79A or R80A) for complex formation with DCAF1com (550-552). Indeed, Vpr recruits DCAF1com to mediate polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation of several cellular targets (554), including the DNA repair proteins UNG2, HLTF, EXO1 and MUS81, a component of the SLX4 complex (579, 610, 616, 639, 640, 659). However, degradation of these cellular targets by Vpr – at least individually – could not explain the Vpr-mediated activation of the DNA replication/damage checkpoint in G2/M (579, 610, 616, 639, 640, 659).

As for the G2/M cell cycle arrest induction in cycling cells, recruitment of DCAF1com by Vpr and proteasomal degradation of host cellular proteins appear to contribute to the enhancement of HIV replication in myeloid cells such as macrophages (506). Hence, proteins belonging to the TET family of methylcytosine dioxygenase (TET1/2/3) involved in transcriptional

regulation are reported to be degraded by Vpr in a DCAF1com-dependent manner (619). By mediating TET2 degradation, Vpr affects the transcription of at least two cellular genes, namely the cytokine IL-6 and the antiviral restriction factor IFTM3. While sustained IL-6 production by Vpr-mediated TET2 degradation is reported to promote HIV-1 replication in macrophages, decreased expression of IFTM3 enhances HIV-1 infectivity by increasing Env processing and incorporation into virions (619, 623). More recently, Vpr was also found to induce the degradation of REAF, a protein that inhibits HIV-1 reverse transcription during macrophages infection (638).

In order to develop a better understanding of Vpr functions, several studies have used unbiased global proteomic approaches to identify host partners/targets of Vpr. For instance, both Jäger *et al.* and Hrecka *et al.* used an affinity purification approach (AP-MS) and respectively reported a Vpr interaction network consisting of 47 highly confident proteins or identified HLTF as a new Vpr target (640, 689). More recently, using a quantitative proteomics approach Lahouassa *et al.* also demonstrated that Vpr mediates HLTF degradation (639), and Greenwood *et al.* identified almost 2,000 cellular proteins modulated directly or indirectly by Vpr (690). Indeed, the demonstration of a promiscuous targeting of cellular proteins by Vpr supports the notion that this viral protein is unlikely to target one unique cellular protein or complex to mediate cell cycle arrest or promote viral replication in myeloid cells, but instead that remodeling of multiple host factors is likely to underpin the complex Vpr-associated phenotypes (609, 640).

To define the Vpr proximity interaction network and identify new specific Vpr partners/targets, we used a proximity-dependent labeling approach – called BioID – which allows identification of proximal proteins and protein networks that are stably, weakly and/or transiently interacting with a protein of interest (730). This approach relies on the biotinylation of proximal proteins, which can then be pull-down through high affinity streptavidin-biotin interactions for identification by mass spectrometry. Using BioID, we define 352 partners/targets of Vpr that are part of its proximity interaction network. In addition to previously reported targets of Vpr such as UNG (659), EXO1 (610) and Vpr-interacting complexes such as DCAF1com (550-552) and SMN (689, 690), our analysis also reveals novel potential partners/targets of Vpr, including the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C).

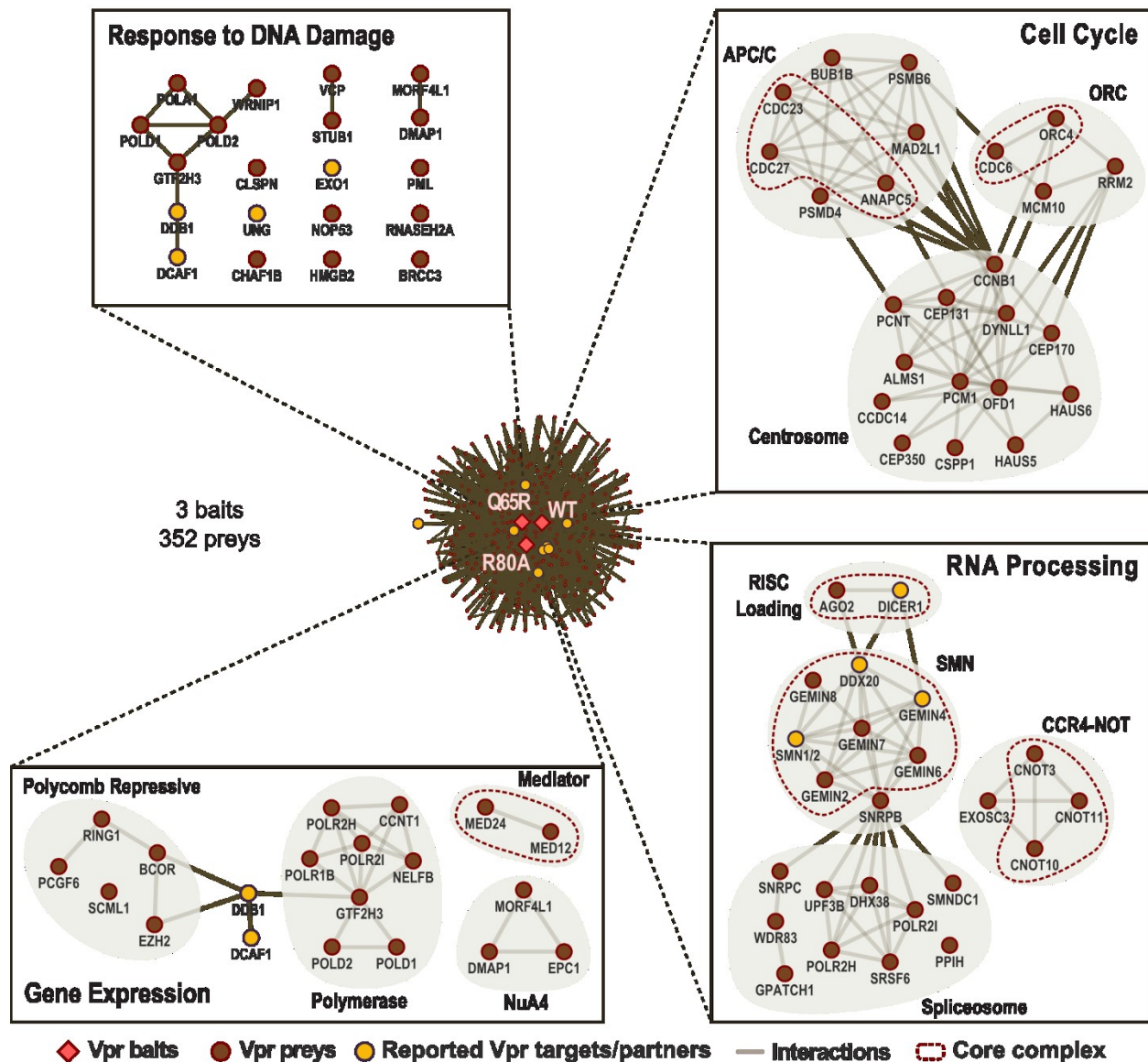
APC/C is a large 1.5 MDa E3 ubiquitin ligase complex composed of 14 subunits and two coactivators, namely CDH1 and CDC20, that marks target cell cycle proteins for degradation by the proteasome (see (748) for a review). While the APC/C<sup>CDH1</sup> complex activity peaks during the G1 phase of the cell cycle, APC/C<sup>CDC20</sup> activity peaks in the M phase (751, 752). Besides regulating the cell cycle, APC/C is implicated in additional processes, including DNA damage response/repair, dNTPs synthesis, autophagy and cellular metabolism (955). Interestingly, several proteins from both RNA and DNA viruses interact with APC/C to manipulate the host during infection, although in most cases the relevance of these interactions for viral replication remains poorly understood (865).

Given the importance of the APC1 scaffolding subunit in APC/C architecture and stability, we focused herein our analysis on the interplay of HIV-1 Vpr and APC1 (750). We show that HIV-1 Vpr forms a physical complex with APC1 and mediates its proteasomal degradation by a process that relies on DCAF1com recruitment. We further demonstrate that Vpr-mediated APC1 degradation is a conserved feature of selected primary and lab-adapted Vpr variants but not of the prototypic NL4.3 Vpr. By comparing Bru Vpr variant competent for APC1 degradation to NL4.3 Vpr, we delineate N28S and G41N amino acid mutations responsible for NL4.3 Vpr defect and further demonstrate that APC1 degradation and G2/M cell cycle arrest are two independent activities of Vpr. Lastly, we show that the replication kinetics of viruses encoding wild type (WT) Vpr or a Vpr containing the N28S-G41N double-mutation in activated primary CD4<sup>+</sup> T cells and monocyte-derived macrophages (MDMs) are undistinguishable, thus pointing to APC1 degradation and conceivably APC/C impairment as a new biological activity of Vpr with currently undefined functional implications in HIV-1 pathogenesis.

## Results

### Analysis of HIV-1 Vpr Proximity Interaction Network Uncovers Potential New Host Partners/Targets

To gain insight into Vpr interactions with host cell proteins and processes, we took advantage of the BioID proximity labelling approach (730). To this end, we fused the highly active *Escherichia coli* biotin ligase (BirA<sup>R118G</sup> annotated BirA\*) at the N-terminus of WT Vpr or of G2/M cell cycle arrest defective mutants (Q65R and R80A). We reasoned that introduction of Vpr mutant in these analyses would expand the coverage of Vpr partners/targets that would either be degraded in the context of the WT Vpr-DCAF1 complex or be absent from this complex in condition where a G2/M cell cycle arrest was induced. Since Vpr is a nuclear protein, a BirA\* fused to a nuclear localization signal (NLS) sequence was used as negative control to exclude BirA\* specific proximity interaction network. Doxycycline-inducible HEK293 and HeLa cell lines stably expressing these constructs were generated using the Flp-In T-REx system. BioID screens were then performed in biological duplicates at 6 hours and 24 hours post-doxycycline induction in HEK293 as well as at 24 hours post-doxycycline induction in HeLa cells as described in Materials and Methods. After performing significance analysis of interactome (SAINT analysis) for each bait and for every time of induction in both cell lines, preys passing the statistical threshold (iProphet protein probability  $\geq 0.9$ ; unique peptides  $\geq 2$ ; Bayesian false discovery rate (BFDR)  $\leq 0.02$ ) were kept and merged together, constituting the global Vpr proximity interaction network from both HEK293 and HeLa cell lines (Figure 3.3.1). Three hundred and fifty-two proximal proteins were identified in our Vpr proximity interaction network analysis. The analysis was validated by the presence of well-known Vpr partners/targets including: DCAF1 (550-552), DDB1 (550-552), UNG (659), EXO1 (610), DICER1 (714) and components of the SMN complex (689, 690). Complexes of statistically enriched processes with high number of preys, such as: cell cycle, RNA processing and gene expression were presented in Figure 3.3.1. Given the



**Figure 3.3.1. The Large-Scale HIV-1 Vpr Proximity Interaction Network**

HEK293 Flp-In T-REx and HeLa Flp-In T-REx stable cell lines were induced for 6 or 24 hours with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doxycycline to induce BirA\*-Flag-Vpr (WT, Q65R or R80A) or Flag-NLS-BirA\* fusion protein expression. Biotin (50  $\mu\text{M}$  for 6 or 24 hours) and MG-132 (10  $\mu\text{M}$  for 6 hours) were also added at the same time than doxycycline to allow respectively biotinylation of proximal partners/targets and to prevent Vpr-mediated proteasomal degradation; see Materials and Methods for detailed procedures. Three hundred and fifty-two SAINT-filtered Vpr proximal partners/targets were identified by bioinformatic analysis in our merged BioID dataset. Dataset

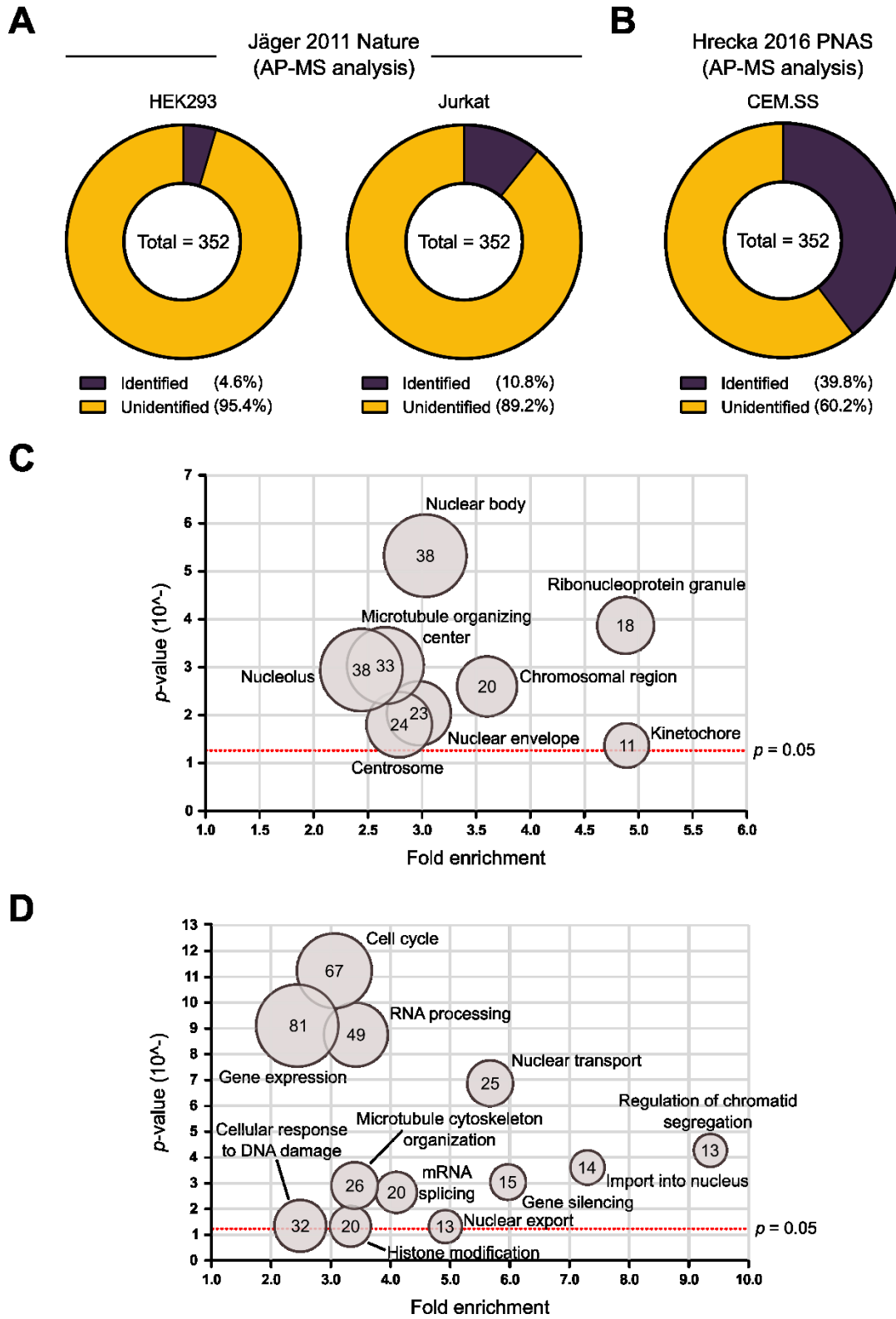
include two biological replicates for each of the following conditions: HEK293 (6 hours, with MG-132), HEK293 (24 hours) and HeLa (24 hours). Complexes of statistically enriched processes, such as: response to DNA damage, cell cycle, RNA processing and gene expression are represented in the framed boxes. For the “response to DNA damage” process, proteins which are not part of determined complexes are also represented individually. Interesting complexes surrounded in light grey, such as APC/C, are indicated with complex core components encircled with brown dashed lines. Baits (Vprs) and preys (proximal partners/targets) are color-coded in red and brown respectively. Previously reported Vpr partners/targets are colored in yellow. Reported protein-protein interactions are represented by a light grey line. Interactions statistics were determined using SAINTexpress and considered statistically significant based on the following criteria: iProphet protein probability  $\geq 0.9$ ; unique peptides  $\geq 2$ ; BFDR  $\leq 0.02$ .

Vpr ability to activate the DNA replication/damage process, proteins which are not part of determined complexes are also represented individually (Figure 3.3.1). Furthermore, we identified core elements from several complexes such as the APC/C (748); the ORC complex implicated in transcriptional silencing and DNA replication (956); the RISC-loading complex implicated in RNA silencing mediated by small RNAs (957); the CCR4-NOT complex involved in transcriptional regulation and RNA surveillance (958); and the SMN complex implicated in biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins (691). These results suggest that Vpr is in closed proximity with these complexes.

Of the 352 preys identified in the Vpr proximity interaction network, only a small fraction ( $\approx$  5-10%) overlapped with a AP-MS interactome analysis conducted by the Krogan group (689) in HEK293 and Jurkat cell lines (Figure 3.3.2A). However, we observed a greater ( $\approx$  40%) overlap when analyzing our results with a second AP-MS analysis conducted by the Skowronski group (640) in CEM.SScell line (Figure 3.3.2B). For instance, components of complexes such as the APC/C, the ORC complex, the RISC-loading complex, the SMN complex, as well as centrosomal proteins and polymerase components were found in both the Skowronski and our analysis. Our BioID analyses complement both AP-MS analyses with 200 additional Vpr preys. These cross-analyses indicates that proximity labelling allows the identification of new potential Vpr partners/targets that are not detected using conventional pull-down proteomic methods.

When analyzing our dataset with Gene Ontology (GO) and PANTHER (<http://geneontology.org/>; version released on: 2019-07-03 (GO), 2019-07-11 (PANTHER)), we observed that identified preys were distributed in the nucleus (nucleolus, nuclear body), at the nuclear envelope and within the cytosol (microtubule organizing center, centrosome, kinetochore), suggesting that Vpr was potentially in closed proximity with cellular proteins that localized or shuttled between the cytoplasm and the nucleus (Figure 3.3.2C). Furthermore, when analyzing our proximity interaction network for cellular processes, we found that both cell cycle processes and to some extent DNA repair were represented in our BioID analyses (Figure 3.3.2D). As previously shown in Figure 3.3.1, Vpr also seemed to be in closed proximity with proteins involved





**Figure 3.3.2. Comparative and Gene Ontology Analysis of the HIV-1 Vpr Proximity Interaction Network**

(A, B) Data from the Vpr proximity interaction network were cross-analyzed against results obtained by affinity purification coupled with mass-spectrometry (AP-MS) analyses of HIV-1 Vpr (640, 689). (A) Of the 352 proteins identified by BioID, 16 ( $\approx 4.5\%$ ) and 38 ( $\approx 10.8\%$ ) were respectively found (purple; #1) in Vpr AP-MS experiment conducted by the Krogan group (689) in HEK293 cells (left pie chart) and in Jurkat cells (right pie chart). (B) 140 ( $\approx 39.8\%$ ) of the proteins identified by BioID were found (purple; #1) in Vpr AP-MS experiment conducted by the Skowronski group (640) in Jurkat cells (right pie chart). The proportion of proteins unidentified by AP-MS are represented in yellow (#2). (C, D) The list of proteins identified in the BioID analysis was clustered using Gene Ontology (GO) enrichment analysis and PANTHER Classification System (<http://geneontology.org/>). GO cellular component (C) and GO biological process (D) were manually curated to highlight general cellular components and biological processes. The X-axis indicates the fold enrichment of the category in comparison to the human proteome, while the Y-axis indicates the  $P$  values results from a Fisher's exact test with the Bonferroni correction done during the GO enrichment analysis. Red dashed line indicates a significant  $P$  value threshold ( $P = 0.05$ ). Circles size correlate with the number of proteins identified, indicated in the center of each circle, and associated with each category.

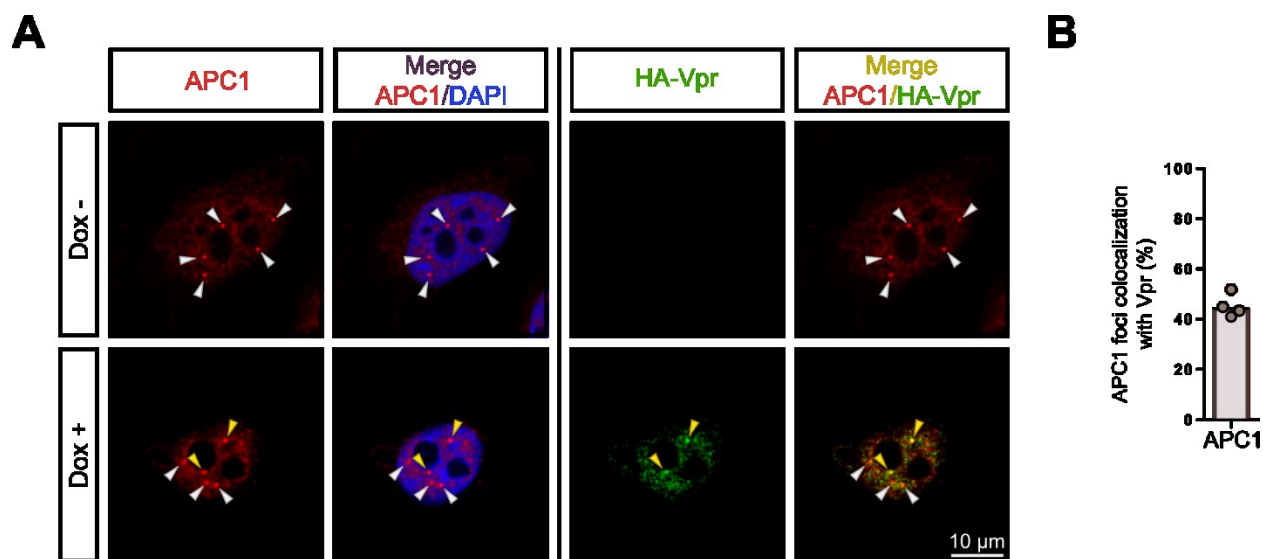
in other cellular processes such as gene expression or RNA processing. In addition, we found that complexes related to previously ascribed Vpr activities such as microtubule/cytoskeleton organization, nuclear transport and gene silencing were also represented in our analyses (Figure 3.3.2D). Taken together, these results suggest that Vpr may influence multiple cellular processes beside DNA repair and cell cycle regulation, as suggested by several recent reports (589, 619, 638, 690, 713, 714).

### **HIV-1 Vpr Colocalizes with APC1, a Critical Scaffolding Component of APC/C**

To validate a putative proximity interaction of Vpr and APC/C, we assessed the co-localization of APC1, a critical scaffolding component of APC/C, and HIV-1 Vpr using a HeLa cell line inducibly expressing HA-Vpr. We first observed that in the absence of Vpr, APC1 localized in puncta that are distributed throughout the nucleus (Dox - ; Figure 3.3.3A). When Vpr expression was induced, immunostaining revealed an overlap between the Vpr staining and the APC1 foci (Dox + ; Figure 3.3.3A). Quantitative co-localization analysis showed that  $\approx 44\%$  of the APC1 foci overlapped with the Vpr immunostaining (Figure 3.3.3B). These results indicate that APC1 and Vpr co-localize in discrete nuclear structures, thus validating the bait/prey proximity detected in our BioID analysis and further suggesting a putative interplay between HIV-1 Vpr and APC/C.

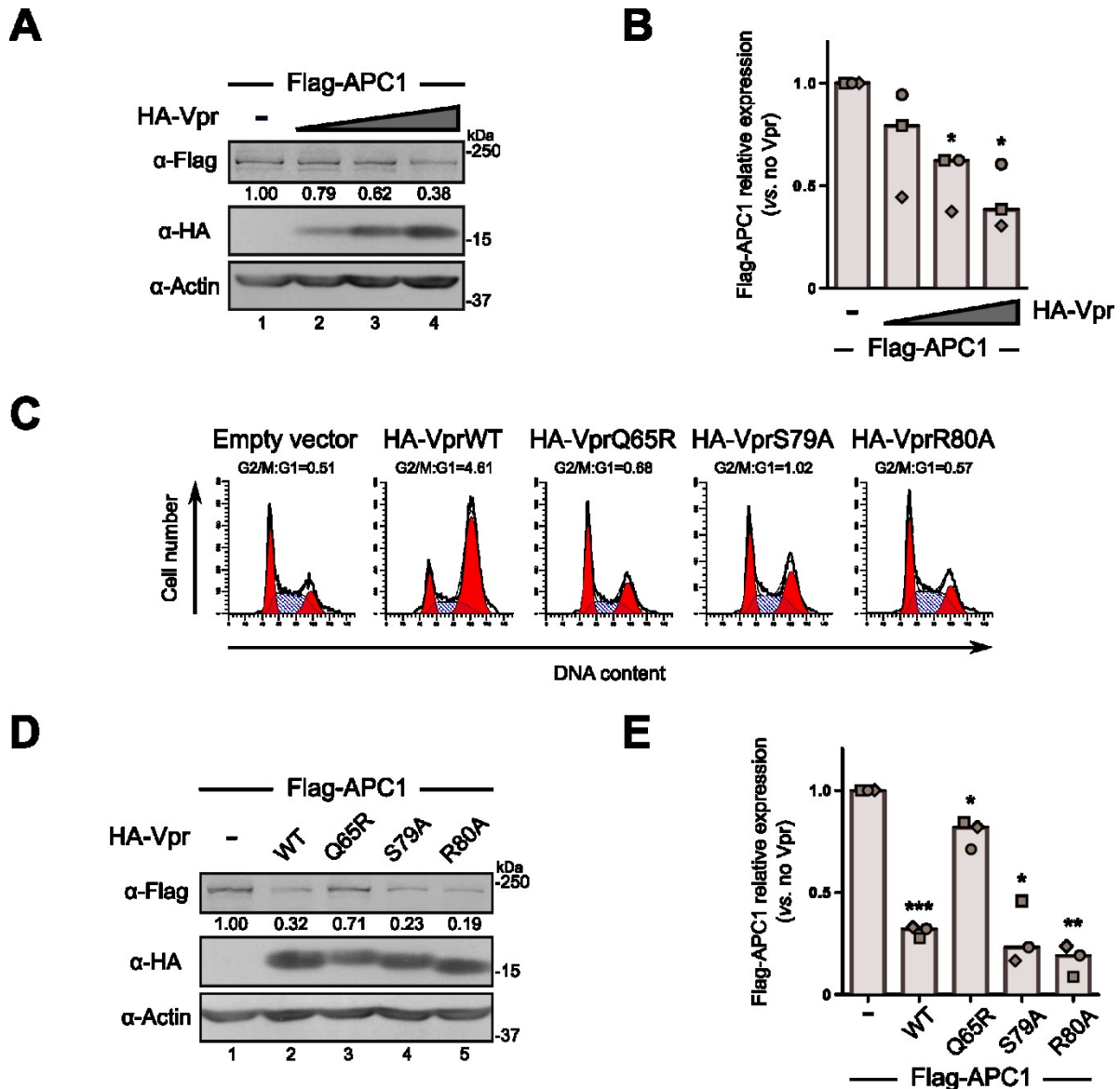
### **HIV-1 Vpr Mediates APC1 Depletion Independently of its Ability to Induce a G2/M Cell Cycle Arrest**

Vpr mediates the degradation of several cellular proteins such as UNG2, HLTF, EXO1 or TET2 (610, 619, 639, 640, 659). We assessed whether Vpr could mediate the depletion of APC1 by transfecting HEK293T cells with a set quantity of plasmid encoding for Flag-APC1 and increasing amounts of a plasmid encoding for HA-Vpr. After two days, transfected cells were treated with cycloheximide for 6 hours to prevent *de novo* protein synthesis and evaluate the effect of Vpr on a set amount of APC1. As shown in Figure 3.3.4A and B, Flag-APC1 levels were increasingly reduced at increasing HA-Vpr expression levels, suggesting that Vpr mediates APC1 depletion.



**Figure 3.3.3. APC1 Forms Nuclear Foci and Colocalizes with HIV-1 Vpr**

Inducible HeLa stable cell line expressing HA-Vpr were induced for 16-18 hours with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doxycycline (Dox +) or left untreated (Dox -). APC1 and HA-Vpr were then immunostained using rabbit  $\alpha$ -APC1 and mouse  $\alpha$ -HA primary antibodies. After counterstaining with DAPI, images were acquired by confocal microscopy. (A) Representative images depicting APC1 nuclear staining. APC1 foci are indicated by arrowheads and the colocalization of APC1 with HA-Vpr within nuclear foci is indicated by yellow arrowheads (Dox + ; lower panels); white arrowheads indicate APC1 nuclear foci that do not colocalize with HA-Vpr. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (B) The percentage of APC1 foci colocalizing with HA-Vpr was determined on at least a hundred cells ( $\approx 400$  foci) per condition and per replicate. Each dot indicates the average of one biological replicate ( $n = 4$ ). Bar graph represents the median.



**Figure 3.3.4. APC1 Depletion and G2/M Cell Cycle Arrest are Two Independent Biological Activities of HIV-1 Vpr**

(A, B) HEK293T were transfected with 5  $\mu$ g of plasmid encoding for Flag-APC1 and an empty control vector (lane 1) and/or with increasing amounts of a plasmid encoding for HA-Vpr (1  $\mu$ g, 2.5  $\mu$ g or 5  $\mu$ g; lanes 2-4). Forty-two hours post-transfection, cells were treated with 20  $\mu$ g/mL cycloheximide for 6 hours and lysed prior to Flag-APC1 and HA-Vpr levels analysis by Western blotting. A representative Western blot is presented in (A) and quantification of three

biological replicates is depicted in (B). (C) HEK293T were transfected with 2.5  $\mu\text{g}$  of the indicated Vpr-expressing or control plasmids and 1  $\mu\text{g}$  of a construct encoding for GFP. Two days later, the cell cycle profiles of GFP<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry. G2/M:G1 ratios, were calculated and indicated above each histogram. (D, E) HEK293T were co-transfected with 5  $\mu\text{g}$  of a plasmid encoding for Flag-APC1 and 5  $\mu\text{g}$  of an empty vector (lane 1), 5  $\mu\text{g}$  of a plasmid encoding HA-Vpr WT or mutants Q65R, S79A, R80A (lanes 2-5) and processed as described for (A). A representative Western blot is presented in (D) and quantification of three biological replicates is depicted in (E). (A, D) Flag-APC1 quantification was performed using ImageJ and by calculating the intensity of the Flag-APC1 bands relative to the loading control. The value obtained with the Flag-APC1 control was set at 1.0 as indicated below the upper panels. (B, E) Each dot indicates Flag-APC1 relative expression of one biological replicate (n = 3). Bar graphs represent the median.

To ensure that APC1 depletion was not a consequence of Vpr-mediated G2/M cell cycle arrest, we assessed the effect of well characterized G2/M cell cycle arrest-defective Vpr mutants on APC1 levels. We first used the Q65R Vpr mutant, which is impaired in the recruitment of the DCAF1com and consequently does not arrest cycling cells in G2/M (Figure 3.3.4C). Whereas WT Vpr induced a strong depletion of APC1, the Q65R mutation in Vpr almost completely abrogate this effect (lanes 2, 3 vs 1; Figure 3.3.4D and E), suggesting that Vpr-mediated APC1 depletion requires the recruitment of DCAF1 by Vpr. Interestingly, co-expression of APC1 with the S79A or R80A mutants of Vpr, which are competent for DCAF1 binding but impaired for G2/M cell cycle arrest (Figure 3.3.4C), still led to an efficient depletion of APC1 (lanes 4, 5 vs 1; Figure 3.3.4D and E). These results support the notion that Vpr-mediated APC1 depletion is not a consequence of the G2/M cell cycle arrest induced by Vpr.

### **HIV-1 Vpr Relies on a Functional DCAF1 Complex to Degrade APC1 Through a Proteasomal Pathway**

Given that the Q65R Vpr mutant is unable to mediate APC1 depletion, we next sought to examine whether DCAF1 was required for Vpr-mediated APC1-depletion using siRNA-directed technology. First, we observed that depletion of DCAF1 appeared to slightly upregulate the levels of Flag-APC1 detected in the absence of Vpr, although the effect was variable and did not reach significance (lanes 3 vs 1; Figure 3.3.5A and B). Nevertheless, Vpr was no longer capable of mediating APC1 depletion in condition of DCAF1 knockdown (lanes 4 & 3 vs 2 & 1, Figure 3.3.5A and B). Furthermore, treatment of transfected cells with MLN4924, a neddylation inhibitor of Cullin-RING E3 ubiquitin ligases, alleviated the Vpr-mediated APC1 depletion (lanes 4 & 3 vs 2 & 1; Figure 3.3.5C and D), suggesting that the DCAF1com needs to be neddylated in order to deplete APC1 in presence of Vpr. To evaluate whether Vpr mediates APC1 depletion by a proteasome-dependent degradation process, similar experiments were conducted in the presence or the absence of proteasome inhibitor MG-132. As shown in Figure 3.3.5E and F, treatment of cells expressing HA-Vpr and Flag-APC1 with MG-132 limited the extent of APC1 depletion by Vpr (lanes 4 & 3 vs 2 & 1). Indeed, the extent of inhibition of Vpr-mediated APC1 degradation by MG-132 was comparable to the one observed with HLTF, a known Vpr

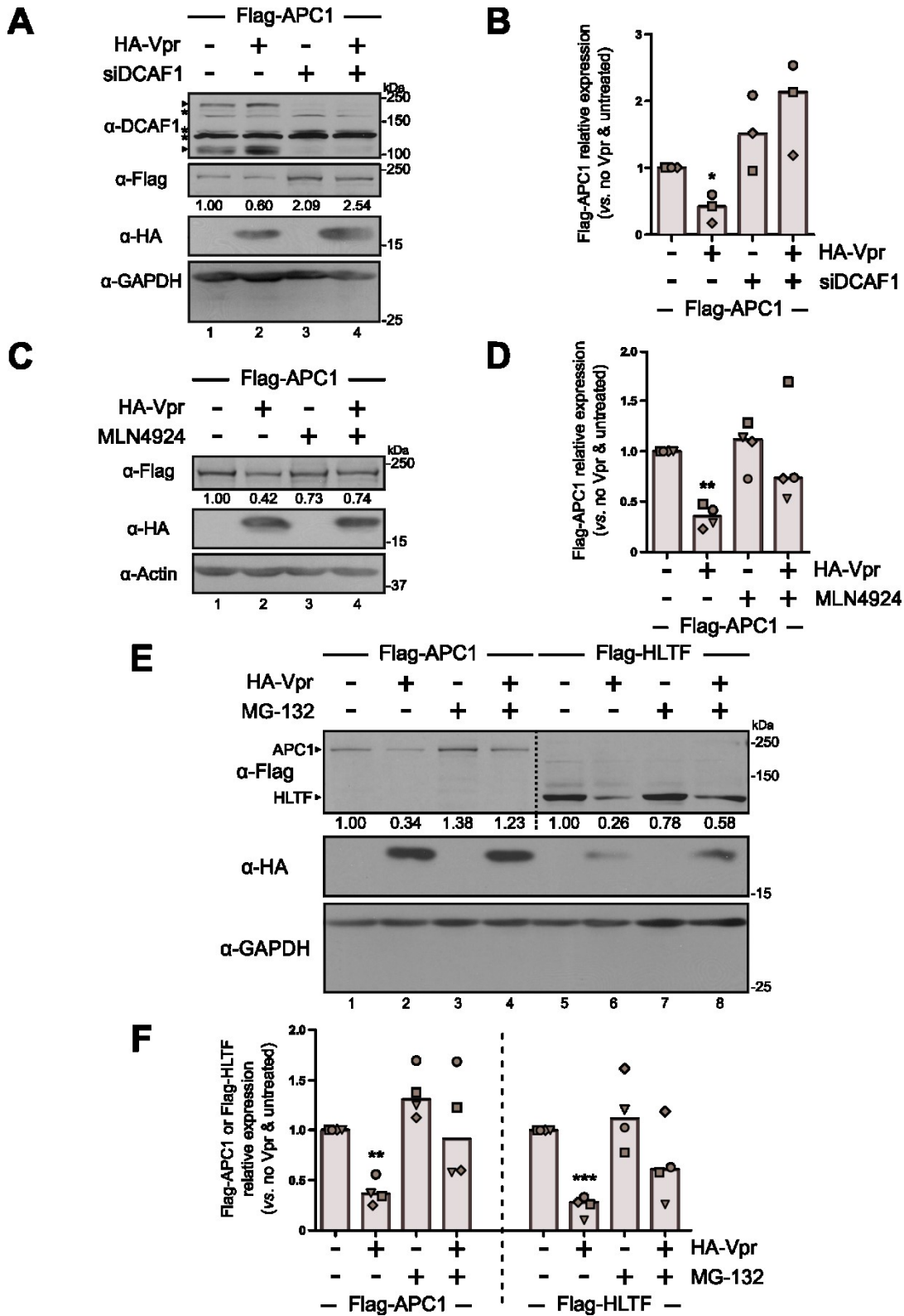


Figure 3.3.5. HIV-1 Vpr Induces APC1 Degradation Through a Process that Requires the DCAF1com and a Functional Proteasome



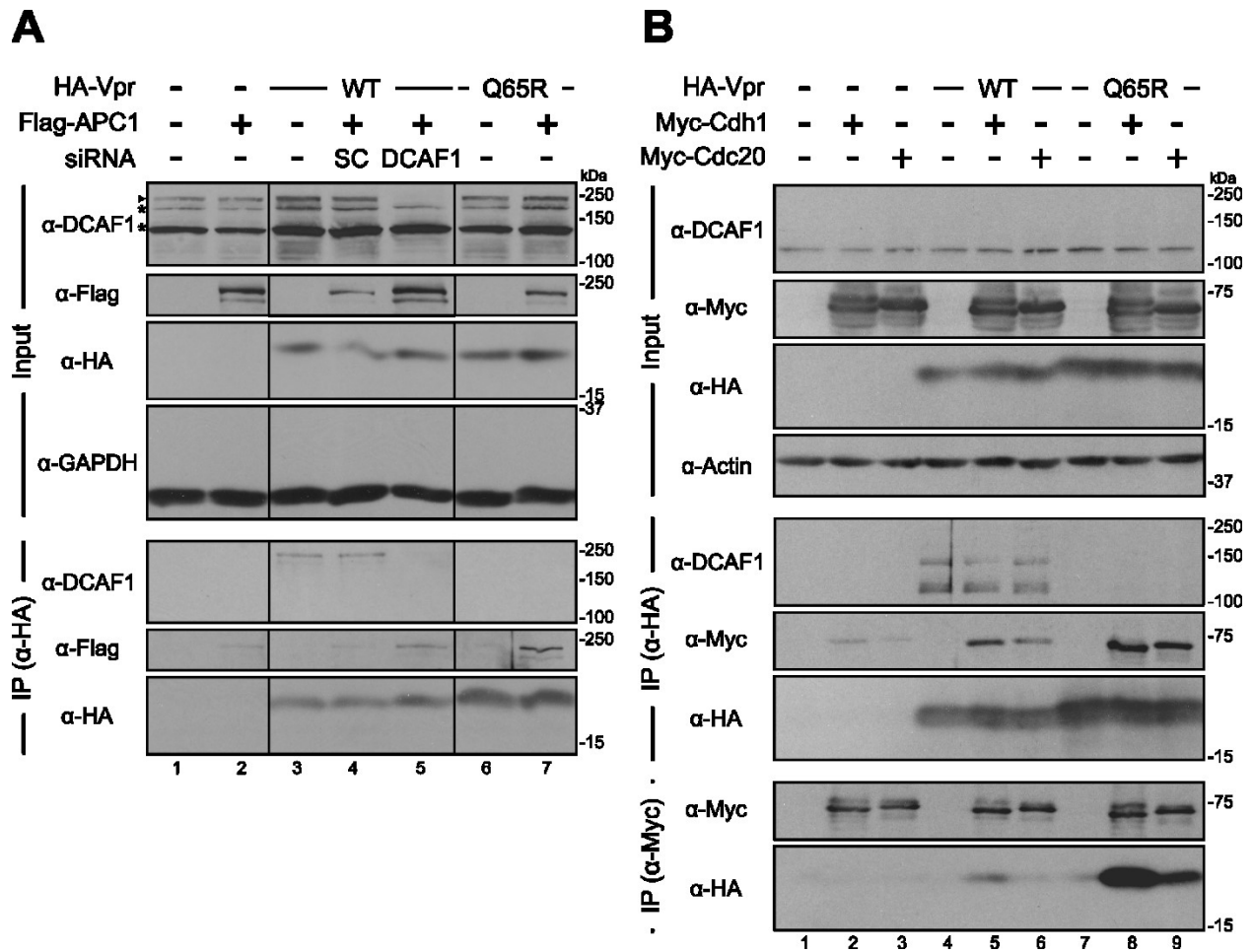
(A, B) HEK293T were transfected with siRNA-DCAF1 (siDCAF1; lanes 3, 4) or siRNA-scrambled (lanes 1, 2) and incubated overnight. Cells were then transfected with 5  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-APC1 and 5  $\mu$ g of either an empty vector (lanes 1, 3) or a plasmid encoding for HA-Vpr (lanes 2, 4). Forty-two hours after plasmids transfection, cells were processed as described in Figure 3.3.4 and analyzed for Flag-APC1, HA-Vpr and DCAF1 levels by Western blotting. A representative Western blot is presented in (A) and quantification of three biological replicates is depicted in (B). (A) Arrowheads indicate DCAF1-related bands that were depleted by the siRNA-DCAF1 while \* indicates non-depleted bands. (C, D) HEK293T were transfected with plasmids as in (A, B) and treated at 42 hours after transfection with 20  $\mu$ g/mL cycloheximide and 1  $\mu$ M MLN4924 (lanes 3, 4) or an equivalent volume of DMSO (lanes 1, 2) for 6 hours. Flag-APC1 and HA-Vpr levels were monitored by Western blotting. A representative Western blot is presented in (C) and quantification of four biological replicates is depicted in (D). (E, F) Cells were transfected and treated as described previously in (C, D), except that 10  $\mu$ M MG-132 was used instead of MLN4924. As controls, 5  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-HLTF was transfected with 5  $\mu$ g of either an empty vector or of a construct expressing HA-Vpr. After 42 hours, transfected cells were treated as indicated above. A representative Western blot is presented in (E) and quantification of four biological replicates is depicted in (F). (A, C, E) Quantification were determined as described in Figure 3.3.4. (B, D, F) Each dot indicates Flag-APC1 or Flag-HLTF relative expression of one biological replicate (n = 3 or 4). Bar graphs represent the median.

target degraded through the proteasomal pathway (lanes 8 & 7 vs 6 & 5; Figure 3.3.5E and F). Altogether, these results indicate that Vpr mediates APC1 degradation through a mechanism that requires the recruitment of an active DCAF1com by Vpr and the presence of a functional proteasome.

### **HIV-1 Vpr Forms a Physical Complex with APC/C Independently of DCAF1**

We next assessed whether Vpr and APC1 can be found in the same complex and if the association between the two proteins was influenced by the presence of DCAF1. To do so, cells were transfected with plasmids encoding for Flag-APC1 and HA-Vpr (WT or Q65R) and proteins co-immunoprecipitated with HA-Vpr were then analyzed for the presence of Flag-APC1 and/or DCAF1 by immunoblotting. As shown in Figure 3.3.6A, despite efficient DCAF1 co-immunoprecipitation with WT Vpr (lanes 3 & 4 vs 1), we were unable to detect a specific co-immunoprecipitation of APC1 in these conditions (lanes 4 vs 2). In clear contrast, we specifically detected the presence of APC1 in the Q65R Vpr mutant immunoprecipitates (lanes 7 vs 2; Figure 3.3.6A), suggesting that the degradation of APC1 mediated by WT Vpr limits the detection of Vpr-APC1 complexes. To further support these findings, we performed the WT Vpr pull-down in conditions where cells were knockdown for DCAF1 by siRNA to prevent Vpr-mediated APC1 degradation. In this context, APC1 was detected in complexes co-precipitated with WT Vpr (lanes 5 vs 4 & 2; Figure 3.3.6A). Overall, these results suggest that Vpr forms a physical complex with APC1 to mediate its degradation by the proteasome. Although the DCAF1com is required for Vpr-mediated degradation of APC1, association of Vpr to APC1 can occur independently of the DCAF1com recruitment by Vpr.

Given that APC1 forms a complex with either CDH1 or CDC20, two different APC/C coactivators that are allowing selective substrate recognition (748), we next asked if regulatory components of the APC/C complex could also be found in complex with Vpr. To this end, Myc-tagged APC/C coactivators were expressed either with WT Vpr or the Q65R Vpr mutant and processed for HA or Myc pull-down followed by analysis of the immunocomplexes for the presence of HA-Vpr, Myc-CDH1/Myc-CDC20 and DCAF1 by Western blotting. As shown in Figure 3.3.6B, both coactivators were found to be specifically co-immunoprecipitated with WT Vpr



**Figure 3.3.6. HIV-1 Vpr Forms a Physical Complex with APC/C Independently of DCAF1com**

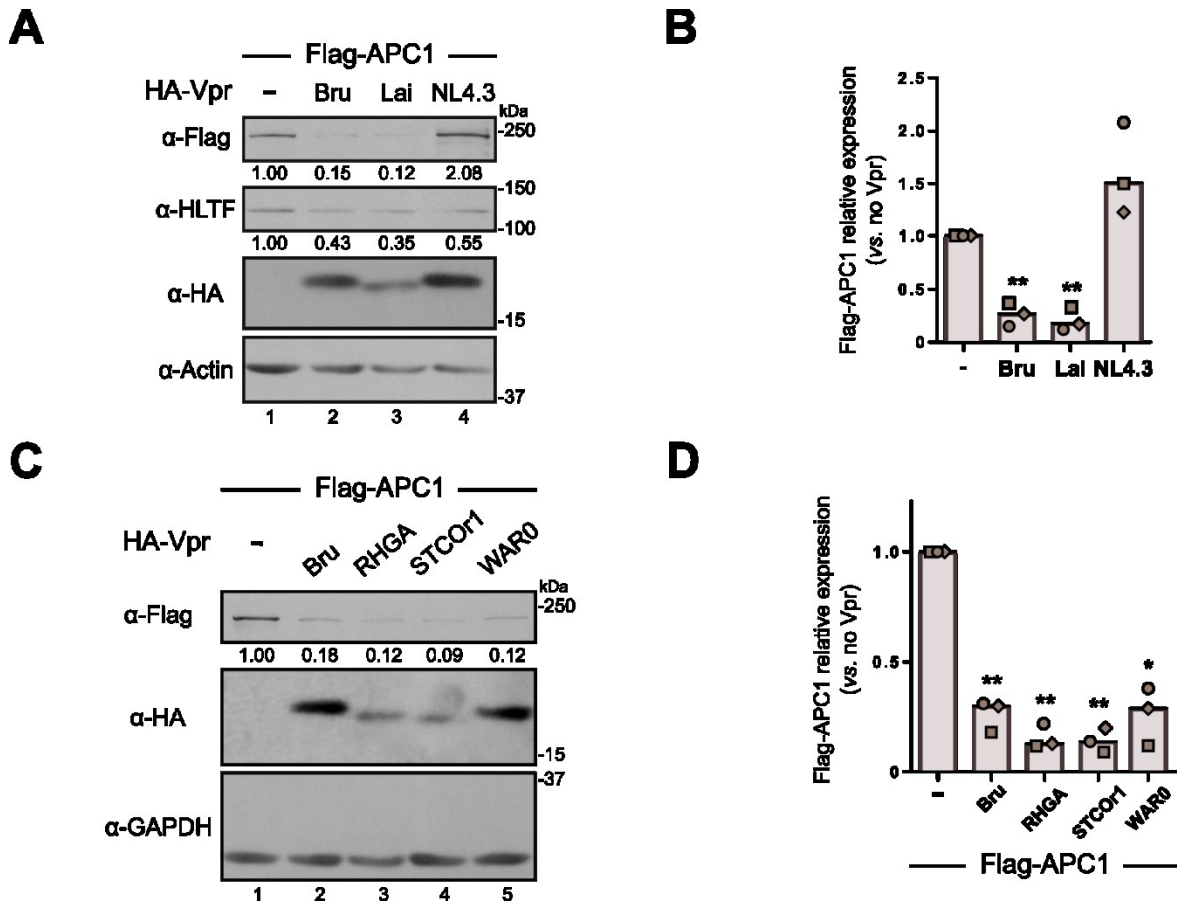
(A) HEK293T were transfected with siRNA-DCAF1 (DCAF1; lane 5), siRNA-scrambled (SC; lane 4) or left mock-transfected (lanes 1-3, 6, 7). Following an overnight incubation, cells were transfected with 10  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-APC1 (lanes 2, 4, 5, 7) and 10  $\mu$ g of a plasmid encoding either HA-VprWT (lanes 3-5) or HA-VprQ65R (lanes 6, 7). Two days later, cells were harvested and lysed in ice-cold Triton lysis buffer. Lysates were then incubated with HA-beads for 3 hours. Flag-APC1, HA-Vpr and DCAF1 levels were determined by Western blotting in both the input and immunoprecipitated fractions. Arrowheads indicate DCAF1 bands that were depleted by the siRNA-DCAF1 while \* indicates non-depleted bands. (B) HEK293T were transfected with 10  $\mu$ g of a plasmid encoding for either Myc-CDH1 (lanes 2, 5, 8) or for Myc-CDC20 (lanes 3, 6, 9) and either HA-VprWT (lanes 4-6) or HA-VprQ65R (lanes 7-9). Two days post-transfection, cells

were harvested and lysed in ice-cold Triton lysis buffer. Lysates were then incubated with  $\alpha$ -HA-beads for 3 hours or with a rabbit  $\alpha$ -Myc antibody for 2 hours followed by an additional hour with protein A-sepharose beads. Myc-CDH1, Myc-CDC20, HA-Vpr and DCAF1 levels were determined by Western blotting in both the input and immunoprecipitated fractions.

(lanes 5 vs 2, 6 vs 3) or the Q65R mutant of Vpr (lanes 8 vs 2, 9 vs 3) indicating that APC/C coactivators and Vpr could form a complex. Endogenous DCAF1 was also detected in the precipitates of WT Vpr but not in those of the Q65R mutant (lanes 4-6 vs 7-9). Moreover, upon immunoprecipitation of the co-activators, both WT and Q65R mutant Vprs were co-immunoprecipitated (lanes 5 & 6 vs 4; 8 & 9 vs 7; Figure 3.3.6B), suggesting that CDC20 and CDH1, which are part of distinct APC/C complexes, can associate with Vpr. Interestingly, we found that Vpr was more efficiently pull-down with CDH1 than with CDC20, as shown for both WT Vpr (lanes 5 & 6) and Q65R Vpr mutant (lanes 8 & 9), perhaps reflecting a specific targeting of APC/C<sup>CDH1</sup> by Vpr or an increased stability of the Vpr-APC/C<sup>CDH1</sup> complex as compared to Vpr-APC/C<sup>CDC20</sup>. Together, these results support the notion that Vpr forms a complex with components of the APC/C complex, including APC1 as well as the co-activators CDH1 and to a lesser extent CDC20, and is likely to affect the integrity of APC/C complexes by mediating the degradation of at least APC1.

### **HIV-1 Vpr Variants From the Laboratory-Adapted Strain Lai and Transmitted/Founder Primary Isolates Mediate APC1 Degradation**

In a recent SILAC analysis, the Lehner group reports that NL4.3 Vpr expression has a major modulatory effect on the cellular proteome (690). Surprisingly, no components of the APC/C complex were found modulated by Vpr in this analysis. To validate if the APC1 degradation mediated by Vpr was specific to the Bru strain used herein, we analyzed side-by-side the impact of Vpr variants encoded by two other laboratory-adapted strains, namely Lai and NL4.3, on APC1 levels using our transient expression system in HEK293T cells. Strikingly and in clear contrast to both Bru and Lai variants, NL4.3 Vpr was unable to mediate APC1 degradation, while all three Vpr variants were capable of mediating HLTF degradation (lanes 4 vs 2 & 3; Figure 3.3.7A and B). These results indicate that Vpr variants display differences in their ability to mediate APC1 degradation and importantly further demonstrate that Vpr-mediated APC1 degradation is not involved in the induction of G2/M cell cycle arrest since both Vpr variants Bru (Figure 3.3.4C) and NL4.3 (954) can trigger a cell cycle arrest in G2/M.



**Figure 3.3.7. HIV-1 Vpr Primary Variants Mediate APC1 Degradation**

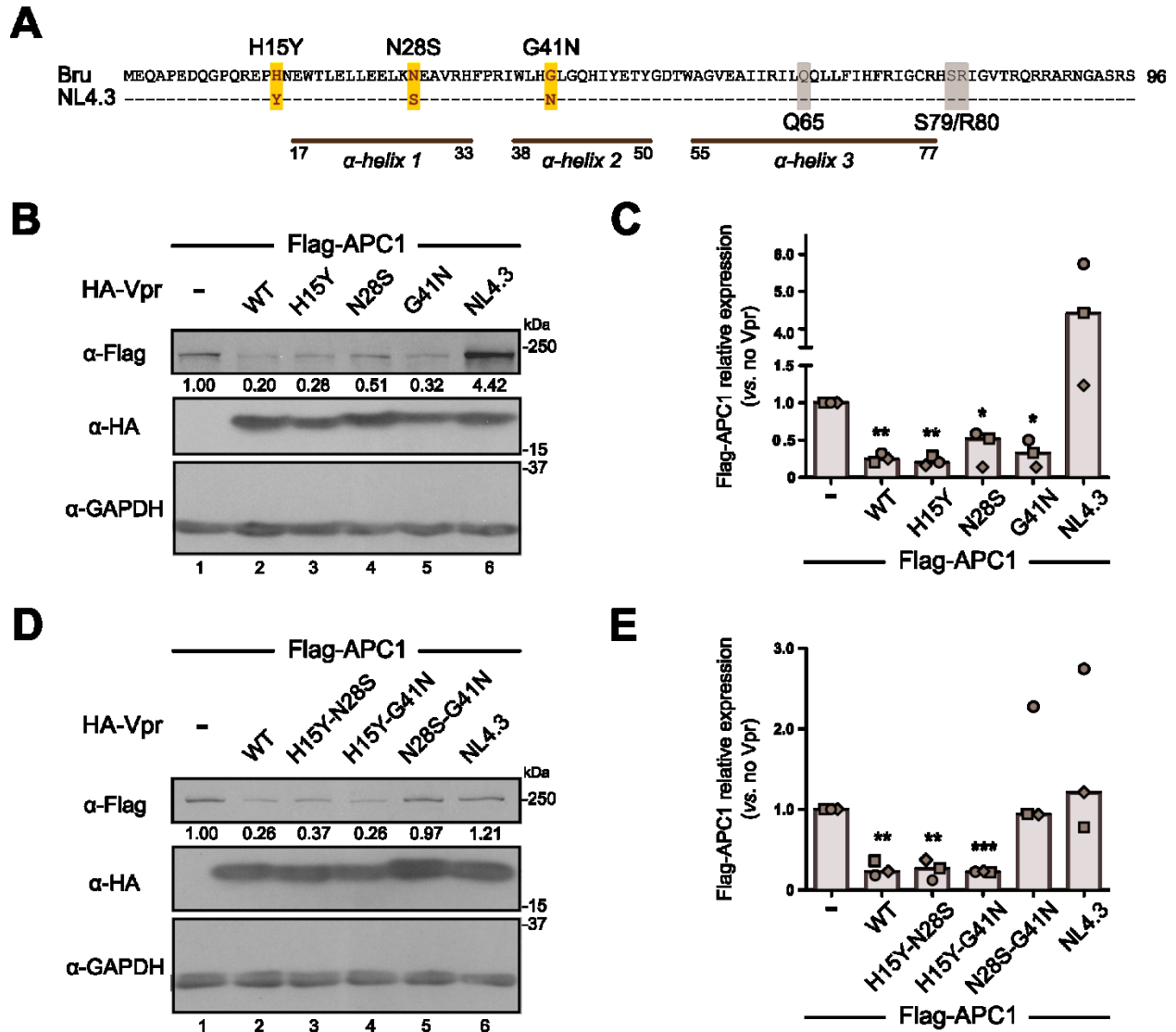
(A, B) HEK293T were transfected with 5  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-APC1 (lanes 1-4) and 5  $\mu$ g of either an empty vector (lane 1) or a plasmid encoding for the indicated HA-Vpr variants (lanes 2-4). After 42 hours, cells were treated as described in Figure 3.3.4 and processed for Western blotting. A representative Western blot is presented in (A) and quantification of three biological replicates is depicted in (B). (C, D) HEK293T were transfected with 5  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-APC1 (lanes 1-5) and 5  $\mu$ g of an empty vector (lane 1) or a plasmid encoding for the indicated HA-tagged Vprs (lanes 2-4) for 42 hours, treated as described in Figure 3.3.4 and processed for Western blotting. A representative Western blot is presented in (C) and quantification of three biological replicates is depicted in (D). (A, C) Quantifications were determined as described in Figure 3.3.4. (B, D) Each dot indicates Flag-APC1 relative expression of one biological replicate (n = 3). Bar graphs represent the median.

Given that the Vpr variants tested previously originated from laboratory-adapted strains, we next sought to validate if Vpr variants encoded by transmitted/founder primary isolates (RHGA, STCO<sub>r</sub>1 and WAR0) were able to mediate APC1 degradation (959). As shown in Figure 3.3.7C and D, Vpr variants encoded by the three primary isolates had the capacity to mediate APC1 degradation (lanes 3-5 vs 1). These results indicate that Vpr-mediated APC1 degradation activity is not restricted to laboratory-adapted Vpr variants but is conserved by selected primary variants of Vpr, highlighting the potential relevance of this interplay in HIV-1 pathogenesis.

### **N28S-G41N Double-Mutation Impedes HIV-1 Vpr Ability to Mediate APC1 Degradation**

Given that NL4.3 Vpr does not mediate APC1 degradation, we next aligned its amino-acid sequence with its counterpart from Bru Vpr. We found only three divergent amino acid residues between Vpr variants Bru and NL4.3, namely H15Y, N28S and G41N (Figure 3.3.8A). We generated individual mutations as well as combination of mutations at these amino acid positions in the Vpr Bru variant based on the NL4.3 sequence and analyzed their impact on Vpr ability to mediate APC1 degradation. As shown in Figure 3.3.8B and C, none of the individual substitution mutation had a significant impact on Vpr-mediated APC1 degradation (lanes 3-5 vs 6). In contrast, combining substitution mutation at amino acid 28 and 41, namely N28S-G41N, strongly impaired Vpr-mediated APC1 degradation; in fact, this mutant mimicked the NL4.3 Vpr variant phenotype (lanes 5 vs 1 and 6; Figure 3.3.8D and E). These results indicate that Vpr residues N28 and G41 are critical for Vpr ability to mediate APC1 degradation.

In order to evaluate the possibility that Vpr from other HIV-1 strains could mediate APC1 degradation, we took advantage of the HIV Sequence Database (Los Alamos National Laboratory; <http://www.hiv.lanl.gov/>) and analyzed 4 835 Vpr variants. We observed that amino acids N28 and G41 were respectively conserved in 32.08% and 60.87% of the Vpr variants, suggesting that a significant number of HIV-1 strains encode Vpr variants potentially capable of inducing APC1 degradation.



**Figure 3.3.8. Double-Mutation N28S-G41N in Vpr Impedes its Ability to Mediate APC1 Degradation**

(A) Sequences from Bru and NL4.3 Vpr variants were aligned using Clustal  $\Omega$ . Amino acid positions (15, 28 and 41) that are not conserved between both variants are highlighted in yellow. Residues known to be important for Vpr activities (Q65, S79 and R80) are highlighted in grey. (B, C) HEK293T were transfected with 5  $\mu$ g of a plasmid encoding for Flag-APC1 (lanes 1-6) and 5  $\mu$ g of either an empty vector (lane 1) or a plasmid encoding for the indicated HA-tagged Vpr (lanes 2-6) and processed 42 h later as described in Figure 3.3.4. A representative Western blot is presented in (B) and quantification of three biological replicates is depicted in (C). (D, E) HEK293T



were transfected with 5  $\mu$ g of plasmid encoding for Flag-APC1 (lanes 1-6) and 5  $\mu$ g of either an empty vector (lane 1) or a plasmid encoding for the indicated HA-tagged Vpr (lanes 2-6). Cells were processed as described in (B, C). A representative Western blot is presented in (D) and quantification of three biological replicates is depicted in (E). (B, D) Quantifications were determined as described in Figure 3.3.4. (C, E) Each dot indicates Flag-APC1 relative expression of one biological replicate ( $n = 3$ ). Bar graphs represent the median.

## **HIV-1 Harboring Vpr N28S-G41N Double-Mutation do not Impact HIV-1 Replication in Primary CD4<sup>+</sup> T Cells and Macrophages**

Having identified substitution mutations that abrogate APC1 degradation by Vpr, we next assessed the impact of these mutations on HIV-1 replication in activated primary CD4<sup>+</sup> T cells and primary monocyte-derived macrophages (MDMs). The N28S and G41N point mutations were introduced by site-directed mutagenesis in the CCR5 tropic HxBru-ADA-GFP infectious molecular clone (Richard et al. 2010) and viruses validated for Vpr's ability to mediate a G2/M cell cycle arrest during infection of the T cell line MT4. As shown in Figure 3.3.9A, vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) pseudotyped viruses expressing WT or N28S-G41N double-mutant Vpr, but not Vpr-deficient virus, induced a G2/M cell cycle arrest with similar efficiency during infection of MT4 cells, indicating that the proteins were likely expressed and further validating that Vpr mutations that impair APC1 degradation do not impact Vpr-mediated G2/M cell cycle arrest. We then infected activated primary CD4<sup>+</sup> T cells at different multiplicities of infection and followed the replication of the viruses over 6 days (Figure 3.3.9B). As indicated by the percentage of GFP<sup>+</sup> cells, expression of Vpr did not confer any detectable replicative advantage in primary CD4<sup>+</sup> T cells, as previously reported (186). In fact, the three isogenic viruses displayed very similar spreading of infection in these cells indicating that expression of neither WT nor Vpr mutant N28S-G41N had any impact on HIV-1 replication in this system.

Lastly, we tested the effect of the N28S-G41N double-mutation on viral replication in MDMs, a system where expression of Vpr was reported to provide a replication advantage (506). While the virus encoding WT Vpr did spread more efficiently than the Vpr-deficient virus in MDMs, no difference in replication kinetics was observed between the WT HxBru-ADA-GFP and the Vpr double-mutant virus (Figure 3.3.9C and D). Furthermore, at three days after infection, we assessed Vpr expression levels in infected MDMs by flow cytometry. In clear contrast to the Vpr-deficient virus, we detected a Vpr signal for both the WT and the Vpr double-mutant viruses, indicating that these viruses properly expressed a functional Vpr (Figure 3.3.9E). Altogether, these results indicate that mutations abrogating Vpr-mediated APC1 degradation do not impede HIV-1 replication in primary CD4<sup>+</sup> T cells nor macrophages, suggesting

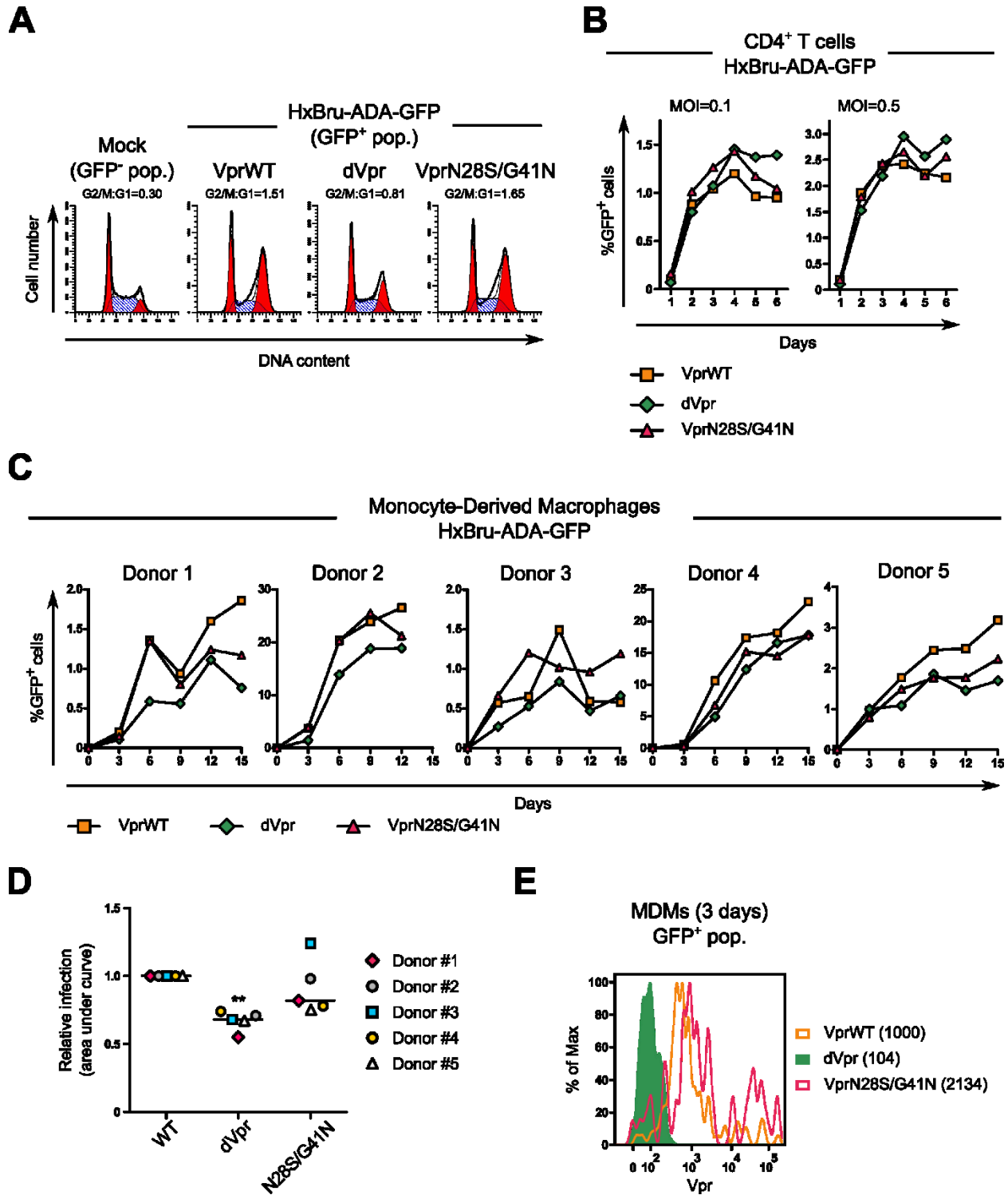


Figure 3.3.9. HIV-1 Vpr Double-Mutation N28S-G41N does not Affect HIV-1 Replication in Primary CD4<sup>+</sup> T Cells or Macrophages

(A) MT4 cells were infected with VSV-G pseudotyped HxBru-ADA-GFP viruses, expressing the indicated Vpr, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.75 or left mock infected. Twenty-four hours later, cells were harvested and the cell cycle profile of the indicated population (GFP<sup>-</sup> or GFP<sup>+</sup>) analyzed. G2/M:G1 ratios were calculated and indicated above each histogram. (B) Activated primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with VSV-G pseudotyped HxBru-ADA-GFP viruses expressing the indicated Vpr, at MOI of 0.1 and 0.5. The percentage of GFP<sup>+</sup> cells was monitored daily for up to 6 days post-infection by flow cytometry. (C) Primary MDMs were infected with VSV-G pseudotyped HxBru-ADA-GFP viruses, expressing the indicated Vpr, at a MOI of 1 for up to 15 days post-infection. Viral spread was monitored every three days by determining the percentage of GFP<sup>+</sup> cells by flow cytometry. (D) Area under the curves for each condition from donors in (C) was determined using GraphPad Prism and the relative infection spread for each condition calculated by setting the data obtained for individual donor infected with HxBru-ADA-GFP Vpr<sup>WT</sup> virus to 1. \*\* indicates statistically significant difference (*P* values ≤ 0.01) between HxBru-ADA-GFP dVpr and both the WT and the N28S-G41N Vpr viruses as determined by two-tailed Mann Whitney. (E) Primary MDMs were infected as indicated in (C). Three days later, Vpr levels were assessed in the GFP<sup>+</sup> population by flow cytometry. Geometric mean fluorescent intensity (MFI) are indicated in the parentheses.

that the interplay between HIV-1 Vpr and APC/C might influence other aspects of HIV-1 pathogenesis.

## Discussion

Many studies have employed proteomic approaches to define the HIV-1 Vpr interactome to ultimately identify Vpr partners/targets. Both the Krogan and the Skowronski groups analyzed the Vpr interactome by using AP-MS, respectively in both HEK293 & Jurkat cells or CEM.SS cells, leading to the identification of new Vpr partners/targets including HLTF (640, 689). More recently, the impact of HIV-1 infection and specifically Vpr on the cellular proteome has been analyzed, using a SILAC approach, by the Margottin group in HeLa cells and more extensively by the Lehner group in CEM T4 cells (639, 690). Indeed, the latter study identified almost two thousand proteins that are directly or most-likely indirectly modulated by Vpr during HIV-1 infection (690). Both approaches are complementary since, for instance, Jäger *et al.* identified the SMN complex as a potential Vpr partner/target while Greenwood *et al.* successfully demonstrated Vpr abilities to deplete components of the SMN complex by SILAC and more conventional biochemical approaches (689, 690); furthermore, Hrecka *et al.* and Lahouassa *et al.* used respectively an AP-MS and a SILAC approaches to identify HLTF as a Vpr target (639, 640).

However, given the pull-down approach used to identify partners/targets, transient or unstable interactions of proteins or protein complexes with Vpr are likely to have been missed, suggesting that the Vpr interaction network is most probably underestimated. To further define the Vpr interaction network and identify novel Vpr targets/partners, we used a proximity labelling approach called BioID (730). One major strength of BioID is to provide *in cellulo* tagging of not only stable, but also weak or transient proximal proteins and to allow their identification, following a harsh cell lysis conditions, using mass-spectrometry. Using this approach with WT Vpr as well as well characterized Vpr mutants (Q65R and R80A we report the identification of 352 preys (Figure 3.3.1), including well known Vpr partners such as DCAF1 and DDB1 (550-552), as well as individually characterized targets such as UNG (659), EXO1 (610) or complexes like the RISC loading complex (714) and the SMN complex (689, 690). Of the 352 preys, 152 preys were

found in AP-MS analyses conducted by the Krogan or the Skowronski groups (640, 689), leading to the identification of 200 new proteins that were previously not detected (Figure 3.3.2A and B). Analysis of Vpr proximity interaction network reveals that in addition to being in close proximity to components involved in DNA damage and cell cycle processes, Vpr was in close proximity with proteins implicated in centrosome regulation (713), RNA processing (689, 690), and gene expression (589, 619, 623), as reported by previous studies (Figure 3.3.2B and C).

In this study, we focused on APC/C as a HIV-1 Vpr target and provide evidence that Vpr forms a physical complex containing APC1 and the APC/C coactivators CDH1/CDC20, to mediate the degradation of APC1, a central scaffolding component of APC/C (Figure 3.3.4 and 3.3.6). As for previously reported Vpr targets (554, 579, 610, 619, 639, 640, 659, 713, 714), our results suggest that APC1 degradation relies on the recruitment of a functional DCAF1com by Vpr through DCAF1 binding as well as a functional proteasome (Figure 3.3.5). These results support a model in which Vpr would form a complex with APC1 and recruit DCAF1com to induce the polyubiquitination and proteasomal degradation of central scaffolding component of APC/C, a condition that is likely to impair APC/C activity (750). While AP-MS analyses suggested an interplay between Vpr and CDC20 (640), more studies are warranted to directly assess whether Vpr selectively targets APC/C<sup>CDH1</sup> or/and APC/C<sup>CDC20</sup> (Figure 3.3.6).

Interestingly, we show that Vpr-mediated APC1 degradation activity is conserved in the tested transmitted/founder variants, suggesting that the interplay between HIV-1 Vpr and APC/C might be a conserved feature of primary HIV-1 strains. We also found that the Vpr variant derived from the laboratory-adapted virus NL4.3 does not mediate APC1 degradation, further supporting the notion that APC1 depletion and G2/M cell cycle arrest are two distinct Vpr activities. Mutagenic analysis of Vpr identified residues N28 and G41 as critical for Vpr-mediated APC1 degradation (Figure 3.3.8). Whether these residues play an important role for the formation of a complex containing Vpr and APC/C remains to be determined. Importantly, the fact that some HIV-1 Vpr variants display a conservation of these residues at these positions underlines further the potential functional importance of Vpr-mediated APC1 degradation. This is not the first report demonstrating that the laboratory-adapted NL4.3 virus behaves differently than primary isolate.

For instance, Vpu variants from most HIV-1 primary strains downregulate HLA-C while the NL4.3 Vpu variant does not (960).

We found that mutations abrogating Vpr-mediated APC1 degradation, namely N28S-G41N, do not impede viral replication in primary CD4<sup>+</sup> T cells nor in macrophages, suggesting that the Vpr-APC1 interplay is not critical for HIV-1 replication at least in this cellular setting. However, the conservation of this activity suggests that it might be important for other aspects of HIV-1 pathogenesis. For instance, HIV-1 is heavily uracilated in macrophages given that HIV-1 reverse transcriptase (RT) fails to distinguish dTTP and UTP during reverse transcription (646, 647). Mis-incorporation of non-canonical dNTPs into the HIV-1 genome is reported to result in mutations or sensing of the viral genome as “non-self” (646, 649). The fact that key regulators of the dTTP pool, namely TK1 and TMPK, are modulated by APC/C<sup>CDH1</sup> and APC/C respectively (826, 828), raise the interesting possibility that by targeting APC/C, Vpr might increase TK1 and TMPK levels to increase dTTP levels relative to UTP in non-cycling macrophages and therefore allow a preferential incorporation of dTTP during reverse transcription. Whether Vpr-mediated APC1 degradation impacts the dTTP pool as well as HIV-1 genome uracilation and/or sensing during infection of macrophages warrants further investigations.

Several viral proteins are known to interact with APC/C and consequently to impair APC/C functions during viral infection. For instance, human T cell lymphotropic virus type 1 Tax prematurely activates APC/C<sup>CDC20</sup> (883), while ORF virus PACR acts as a competitor of the APC11 subunit (887) and chicken anemia virus Apoptin associates and displaces APC/C to promyelocytic leukaemia (PML) nuclear bodies (870). In most cases, the impact of targeting of APC/C on viral replication remains unclear (865). Interestingly, the interplay between APC/C and its coactivators is regulated by the PP2A phosphatase (961). The adenovirus protein E4orf4 binds the PP2A regulatory B55 $\alpha$  subunit and thereby mediates CDK-dependent CDC20 and CDH1 phosphorylation, leading to premature APC/C<sup>CDC20</sup> activation and inhibition of APC/C<sup>CDH1</sup> (868). Given that recent studies have reported that HIV-1 Vif mediates the degradation of the PP2A phosphatase subunit called PPP2R5<sup>A-E</sup> (452, 454), it will be interesting to determine whether the phosphorylation status of APC/C and its coactivators is affected upon Vif expression. Indeed, some HIV-1 strains might employ multiple accessory proteins and processes to modulate APC/C

functions. This redundant concept of modulating APC/C by several accessory proteins might be a strong *a priori* evidence of APC/C biological relevance with respect to HIV-1 pathogenesis.

## Materials and Methods

### Cells

HEK293T and HeLa cells were cultured in DMEM (Wisent #319-005-CL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Wisent #080-150 or GE Hyclone #SH30396.03). HEK293 Flp-In T-REx (736) and HeLa Flp-In T-REx (from Stephen Taylor (University of Manchester (962))) were cultured as HEK293T and HeLa except that media was supplemented with 15 µg/mL blasticidin (InvivoGen #ANT-BL-1). MT4 CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in RPMI (Wisent #350-000-CL) supplemented with 10% heat-inactivated FBS.

Peripheral blood samples were obtained from HIV- and HCV-seronegative adults (of either gender). Research protocols for the use of human blood cells were approved by the Research Ethics Review Board of the Montreal Clinical Research Institute (IRCM). All participants had given written informed consent and all studies were in compliance with the Declaration of Helsinki. MDMs and CD4<sup>+</sup> T cells were obtained as previously described (963, 964).

### Plasmids

HA-Vpr plasmids: HIV-1 Vpr were obtained by amplification from source plasmids (WT and mutants (Q65R, S79A, R80A) Bru (550); Lai ; NL4.3 ; RHGA (#12421), STCOr1 (#12417) and WAR0 (#12419) were obtained from Beatrice Hahn (University of Pennsylvania (959) through the NIH AIDS Reagent Program)), HA-tagged and ligated into a modified pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG N-term (737) using HindIII and XhoI restriction sites. Single Bru mutants (H15Y, N28S and G41N) were obtained by Gene Art Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific) and cloned as indicated above. Vpr double-mutants (H15Y-N28S, H15Y-G41N and N28S-G41N) were generated in the single mutant plasmids using site-directed mutagenesis (SDM; New England Biolabs (NEB) # E0552S) with the following primer pairs: N28S (F: GGAGCTTAAGAGTGAAGCTGTTAG; R:



TCTAAAAGCTCTAGTGTC; T<sub>m</sub> = 59°C); G41N (F: TTGGCTCCATAACTTAGGGCAAC; R: ATCCTAGGAAAATGTCTAAC; T<sub>m</sub> = 57°C).

BioID plasmids: WT Vpr (Bru variant) and Vpr mutants (Q65R and R80A) were fused at the N-terminal with BirA\*-Flag- by Gateway cloning strategy in pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG N-term using pDONR-221 (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific) as an intermediate. pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG N-term and pDEST-pcDNA5-FLAG-NLS-BirA constructs were provided by Anne-Claude Gingras (The Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute (737)).

pOG44 plasmid, encoding the Flp-Recombinase used to generate the stable cell lines, was obtained from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific #V600520); Flag-APC1 encoding plasmid was provided by Jose Teodoro (McGill University); Flag-HLTF encoding plasmid was provided by Jacek Skowronski (Case Western Reserve University (640)); Myc-CDH1 (Addgene #11595) and Myc-CDC20 (Addgene #11593) encoding plasmids were provided by Marc Kirschner (Harvard Medical School (965)).

### **Stable cell line generation, BioID and LC-MS/MS**

HEK293 Flp-In T-REx and HeLa Flp-In T-REx stably expressing inducible HA-Vpr or BioID constructs (see above) were generated using the Flp-In T-REx system (Thermo Fisher Scientific (743)) and BioID screens were performed as previously described (736, 737). Briefly, two 150-mm plates (around 13×10<sup>6</sup> cells) HEK293 Flp-In T-REx or HeLa Flp-In T-REx cells inducibly expressing Flag-NLS-BirA\*, BirA\*-Flag-VprWT, BirA\*-Flag-VprQ65R or BirA\*-Flag-VprR80A were induced with 0.5 µg/mL doxycycline and treated with 50 µM D-biotin (BioBasic #BB0078) for 6 or 24 hours. HEK293 based cell lines treated for 6 hours were also treated with 10 µM proteasome inhibitor MG-132 (Calbiochem - MilliporeSigma #474787) to prevent proteasomal degradation of potential Vpr targets. After induction, cells were washed once in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed for 1 hour at 4°C on wheel in RIPA-DOC buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% NP-40, 0.05% SDS, 5 g/L sodium deoxycholate, 1x cOmplete mini protease inhibitor cocktail (Roche - MilliporeSigma #11836145001), pH 7.2) supplemented with 200 U Benzamide hydrolyase (EMD Millipore #70664) per sample. Samples were then sonicated (450 Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation) on ice for 30 seconds (3 × (10 sec ON, 5 sec OFF cycle)) at 20 W. Following sample

clarification (5 min, 10 000 g, 4°C), 4 mg of proteins were mixed with 200 µL of prewashed streptavidin sepharose high performance beads (GE Healthcare #17-5113-01) and incubated on wheel for 3 to 4 hours. Beads were washed once in RIPA-DOC buffer and four additional times in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5).

The on-bead proteins were digested and harvested as previously described (736). Peptides were then reduced, alkylated and detergent residue removed by MCX (96-well Oasis MCX µElution plate; Waters #186001830BA) following manufacturer's instructions. After elution in 10% ammonium hydroxide / 90% methanol (v/v), samples were dried, reconstituted in 5% formic acid and injected on a LTQ Orbitrap Velos equipped with a Proxeon nanoelectrospray Flex ion (Thermo Fisher Scientific) source as previously described (736).

## **Mass Spectrometry Data Analyses**

Raw mass spectrometry files were analyzed with the search engines Mascot, XTandem!, and Comet through the iProphet pipeline integrated in ProHits (966), using UniProt database (v20160623) supplemented with "common contaminants" from the Max Planck Institute (<http://maxquant.org/downloads.htm>), the Global Proteome Machine (GPM; <http://www.thegpm.org/crap/index.html>) and decoy sequences. The parameters were set with trypsin specificity (two missed cleavage sites allowed), variable modifications involved Oxidation (M), Deamidation (NQ), Biotin (K), Biotin (N-Term) and Ubiquitin (K), and fixed modification was set with Carbamidomethyl (C). The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 15 ppm and 0.6 Da, respectively, and peptide charges of +2, +3, +4 were considered. The resulting searches results were individually processed by PeptideProphet and peptides were assembled into proteins using parsimony rules first described in ProteinProphet using the Trans-Proteomic Pipeline (TPP) with the following settings: -p 0.05 -x20 -PPM –"DECOY"; iProphet options: pPRIME and PeptideProphet: pP.

## **Interaction Scoring**

To estimate interaction statistics, we used SAINTexpress (v3.6.1) on proteins with iProphet protein probability  $\geq 0.9$  and unique peptides  $\geq 2$  (967). Each of the proteomics datasets (HEK293 (6 or 24 hours) and HeLa (24 hours)) was compared separately against their respective negative

control (Flag-NLS-BirA\*). SAINT analyses were performed with the following settings: nControl:2, nCompressBaits:2 (no baits compression). Interactions displaying a BFDR  $\leq 0.02$  were considered statistically significant and kept. Unfiltered contaminants, such as Keratin, BirA\* and beta-galactosidase were considered as contaminants and removed.

## **Bioinformatics Analyses**

Proteomic data and annotation databases, such as BioGRID (human v3.4.164), Uniprot (human, released on October 2017) and Gene Ontology (GO) Annotation Database were imported into a local MySQL database (968). Graphical representations of protein-protein networks were generated with Cytoscape (v3.7.0). Network augmentations of our BioID screens was performed by extracting prey-prey interactions from the human BioGRID network and from Cytoscape's PSICQUIC Web Service client (released on October 2018) searching the IntAct, iRefIndex, Reactome and Uniprot databases. Individual network from the HEK293 (6 and 24 hours) and HeLa (24 hours) were merged together into one Vpr proximity interaction network and clustered using GO enrichment analysis and PANTHER Classification System (<http://geneontology.org/>). Interactions were clustered and the following functions were extracted: response to DNA damage, cell cycle, RNA processing and gene expression; based on the GO associated to each node within the network.

## **Transfection and Cycloheximide Treatment**

HEK293T were transfected with the indicated plasmids using the calcium phosphate precipitation method. Forty-two hours post-transfection, cells were treated with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cycloheximide (Calbiochem - MilliporeSigma #239764) to inhibit translation, allowing the analysis of a preset pool of proteins. Six hours post-treatment, cells were harvested and processed for immunoblotting by Western blot.

## **SDS-PAGE and Western Blot Analysis**

Cells were lysed in RIPA-DOC buffer for  $\geq 30$  min at 4°C. Lysates were then clarified by centrifugation (5 min, 10 000 g, 4°C), protein amounts quantified by Bradford assay (Bio-Rad #5000006) and analyzed by Western blotting as previously described (550). The

following primary antibodies were used:  $\alpha$ -HA (BioLegend #901513);  $\alpha$ -Flag (MilliporeSigma #F3165);  $\alpha$ -Myc (MilliporeSigma #C3956);  $\alpha$ -HLTF (Bethyl #A300-230A);  $\alpha$ -DCAF1 (Bethyl #A301-887A);  $\alpha$ -Actin (MP Biomedicals #0869100);  $\alpha$ -GAPDH (BioLegend #649202). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad (#170-6515 & #170-6516). Quantification of bands was performed using Image J (v1.52).

### **SiRNA-Mediated Protein Knockdown**

DCAF1 knockdown in HEK293T was performed with lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific #13778150) according to the manufacturer instructions and as previously described (550). The following siRNAs were used: DCAF1 (Dharmacon #M-021119-01); scrambled (Dharmacon #D-001210-02). After siRNA transfection, cells were subjected to transfection of plasmids of interest using the above-mentioned protocol.

### **Co-Immunoprecipitation**

Forty-eight hours post-transfection, HEK293T cells were washed once in DMEM, harvested and lysed in ice-cold Triton lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5% Triton X-100, 1x cOmplete mini protease inhibitors without EDTA (Roche - MilliporeSigma #11873580001), pH 7.25) for 30 min and clarified (5 min, 10 000 g, 4°C). For HA co-IP, 1.5 mg of proteins were mixed with 50  $\mu$ L  $\alpha$ -HA agarose beads (MilliporeSigma #A-2095) and incubated at 4°C for 3 hours on wheel. For Flag and Myc co-IP, 1.5 mg of proteins were mixed with 2.5  $\mu$ g  $\alpha$ -Myc antibody (MilliporeSigma #C3956) or 5  $\mu$ g  $\alpha$ -Flag antibody (MilliporeSigma # F3165), incubated at 4°C, and after 2 hours, 100  $\mu$ L protein A - sepharose beads (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific #101041) were added to the mixture. Following an incubation of 1 hour at 4°C, beads were washed three times in lysis buffer, resuspended in Laemmli buffer, boiled for 5 min and loaded on SDS-PAGE for Western blotting analysis.

### **Cell Cycle Analysis**

Cell cycle analyses of transfected HEK293T or of infected MT4 were performed by flow cytometry (BD FACS Calibur, Becton Dickinson) as previously described (713). The ModFit

mathematical model (v4.1.7, Verity Software House) was used to determine the proportion of cells in G1 and G2/M phases and ratio G2/M over G1 calculated.

## **Confocal Microscopy**

APC1 and HA-Vpr localization was determined by confocal microscopy as previously described (576). HA-Vpr inducible HeLa cells were treated with 0.5 µg/mL doxycycline for 16-18 hours. Cells were fixed, permeabilized and incubated with α-HA (1/500; BioLegend #901513) and α-APC1 (1/250; Abcam #ab133397) for 1h at 37°C. The following secondary antibodies were used for 30 min at 37°C: α-mouse Alexa Fluor 488 (1/500; Invitrogen - Thermo Fisher Scientific #A-11001) and α-rabbit Alexa Fluor 647 (1/500; Invitrogen - Thermo Fisher Scientific #A-21244). Pictures were acquired using 43× or 63× oil immersion objectives on an inverted confocal microscope LSM710 (Zeiss). APC1 and HA-Vpr colocalization was determined using ImageJ (v1.52).

## **Vpr Sequence Alignments**

Primary amino-acid sequences from Bru and NL4.3 Vpr variants were aligned using Clustal Ω from European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; v1.2.4). The percentage of conservation of Vpr residues at position 28 and 41 was determined using nucleotide sequences from 4 835 HIV-1 strains obtained from the HIV Sequence Database (Los Alamos National Laboratory; <http://www.hiv.lanl.gov/>), translated and aligned with Jalview (v2.11.0).

## **Proviral Constructs, Viral Production and Infection**

Isogenic proviruses HxBru-ADA-GFP encoding WT Vpr or defective for Vpr (dVpr) were previously described (141). HxBru-ADA-GFP harboring N28S-G41N Vpr double-mutation was generated by SDM and validated by sequencing. Infectious VSV-G-pseudotyped HIV-1 viruses were produced by transfection of proviral construct with plasmid encoding VSV-G in HEK293T by using calcium phosphate transfection method (141). After 48 hours, culture supernatant was harvested and ultracentrifuged onto a 20% sucrose cushion to concentrate viruses. Viral titers

were determined by analyzing the percentage of GFP<sup>+</sup> cells in infected HeLa cells by flow cytometry at 24 hours post-infection.

MT4 cells were infected at MOI of 0.75 and processed for cell cycle analysis 24 hours later. MDMs were infected at MOI of 1 and the percentage of infection was determined by measurement of GFP by flow cytometry (SA3800 Spectral Analyzer; Sony Biotechnology) every three days (963). Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected at a MOI of 0.1 and 0.5 and the percentage of GFP positive cells monitored daily by flow cytometry (964).

### **Immunostaining and Flow Cytometry**

MDMs were infected as described above. After three days, cells were harvested, fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and blocked as previously described (963). Vpr was detected by immunostaining using an  $\alpha$ -Vpr monoclonal primary antibody (1/200; clone 8D1; obtained from Yukihiro Ishizaka (National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan (969), commercially available: Cosmo Bio #CAC-NCG-M01-1)) and a secondary  $\alpha$ -mouse Alexa Fluor 647 antibody (1/100; Invitrogen - Thermo Fisher Scientific #A-21236). Vpr levels were determined on the GFP<sup>+</sup> population by flow cytometry (BD LSRFortessa, Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo (v9.3.2).

### **Statistics**

Statistical analyses were done using GraphPad Prism 5.03 or 8.2.1. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. \*, \*\* and \*\*\* indicate statistically significant differences (*P* values  $\leq 0.05$ ;  $\leq 0.01$ ;  $\leq 0.001$  respectively) relatively to the no Vpr control as determined by two-tailed paired Student's *t*-tests or as indicated.

### **Acknowledgements**

We thank the Mass Spectrometry and Proteomics, the Flow Cytometry, the Microscopy, and the Molecular Biology core facilities of the Montreal Clinical Research Institute (IRCM) for their support and assistance. We are also grateful to Dr Jean-François Côté, Dr Halil Bagci and

Christian Poitras for their assistance and helpful discussions regarding the BioID experiments. We thank Martine Gauthier from the IRCM Clinic for coordinating access to blood donors, as well as the blood donor participants. The following reagents obtained from the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: RHGA (#12421), STCOR1 (#12417) and WAR0 (#12419) were from Dr Beatrice Hahn. We also thank Drs Jean-François Côté, Anne-Claude Gingras, Yukihito Ishizaka, Marc Kirschner, Jacek Skowronski, Stephen Taylor and Jose Teodoro for providing reagents.

This study was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Foundation grant (HB2-164064) to EAC. EAC is recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV research. JAFB was awarded doctoral scholarships from the IRCM Foundation and Université de Montréal.

## **Chapitre 4**

**La protéine Vpr du VIH-1 module l'homéostasie  
des centrosomes**





# 1. Introduction spécifique

Les centrosomes sont des organelles non-membranaires localisés à proximité du noyau cellulaire. Ils sont essentiels à la division cellulaire et composent le centre cellulaire organisateur des microtubules, aussi appelé MTOC (970). Ils sont composés d'une paire de centrioles (une mère et une fille) entourées d'une matrice appelée matrice péri-centriolaire (PCM). C'est de cette structure que proviendront les microtubules et, durant la quiescence, les cils ou flagelles (971).

## 1.1. Les centrosomes

### 1.1.1. Duplication des centrosomes

Les cellules en phase G1 du cycle cellulaire possèdent un centrosome, composé de deux centrioles, qui devra se dupliquer afin d'obtenir deux paires de centrioles. Ces deux paires de centrioles sont essentielles pour permettre la bonne séparation des chromosomes durant la mitose (972-974). Le cycle de duplication des centrosomes est régulé parallèlement au cycle cellulaire et commence à la transition G1/S. Ce mécanisme dépend notamment de l'expression de la protéine SAS6 (975). En G1, SAS6 est dégradé par APC/C<sup>CDH1</sup> afin de prévenir la duplication prémature des centrosomes (976). La protéine FBXW5, également dégradée par APC/C<sup>CDH1</sup>, fait partie d'un autre complexe d'E3 ubiquitine ligase (SCF<sup>FBXW5</sup>) capable de médier la dégradation de SAS6 (798). Comme le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> est progressivement inactivé en fin de G1, les niveaux de FBXW5 augmenteront et le complexe SCF<sup>FBXW5</sup> se formera; ce mécanisme permettra alors de garder SAS6 à un faible niveau (798). En début de phase S, FBXW5 sera phosphorylée par la kinase PLK4, menant à l'inactivation du complexe d'E3 ubiquitine ligase SCF<sup>FBXW5</sup> et ultimement à une hausse des niveaux de SAS6 (798). L'augmentation des niveaux de SAS6 initiera alors la duplication des centrioles (976-978).

Une fois la duplication des centrosomes initiée et les pro-centrioles formées, celles-ci seront alors allongées. Ce mécanisme est régulé négativement par plusieurs protéines incluant notamment OFD1 et CP110 (979-981). Ces protéines sont localisées à l'extrémité distale des centrioles et empêcheront leur élongation (980-982). Afin de permettre l'élongation des centrioles, CP110 sera dégradée par les complexes d'E3 ubiquitine ligase SCF<sup>CyclinF</sup> et/ou

EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (983, 984). De manière intéressante et bien que le mécanisme soit peu défini, la dégradation de CP110 par le complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> pourrait être contrecarrée par une interaction de la E3 ligase avec la protéine centrosomale CEP78 (984). La dégradation de CP110 et OFD1 permettra l'allongement des centrioles et l'obtention de deux paires de centrioles matures.

### **1.1.2. Matrice péricentriolaire et microtubules**

Comme mentionné précédemment, une matrice péricentriolaire se trouve à la base des centrosomes. La PCM est composée de protéines dont le but est d'initier et d'ancrer les microtubules aux centrosomes (985-987). L'ancrage des microtubules aux centrosomes est effectué par un mécanisme peu compris mais qui impliquerait, entre autres, les protéines Péricentrine (PCNT), Ninéine, AKAP450, NLP, ASP et la protéine centrosomale CEP83 (988, 989). Toutefois, il semblerait que la phosphorylation de la protéine PCM1, également associée à la PCM, soit un élément critique permettant la maturation des centrosomes. En effet, la phosphorylation de PCM1 par la kinase PLK1, induit la relocalisation de PLK1 aux centrosomes en début de mitose (990). Ce recrutement de PLK1 par PCM1 au niveau des centrosomes permet notamment le recrutement de la Tubuline  $\gamma$ , qui est l'élément de base des microtubules et qui permettra l'assemblage des dimères de Tubulines  $\alpha\beta$  et conséquemment l'allongement des microtubules. C'est le mécanisme de nucléation des microtubules (991-996).

Une fois que les microtubules seront convenablement ancrés aux kinétochores, le complexe MCC sera activé, se désassemblera et permettra l'activation d'APC/C<sup>CDC20</sup>. Comme introduit précédemment, ce complexe médiera notamment la dégradation de la protéine Sécurine, permettant ainsi la séparation des chromatides (774, 821, 844).

## **1.2. Centrosomes et VIH-1**

### **1.2.1. Importance des centrosomes pour les étapes précoces de l'infection du VIH-1**

Le VIH-1, comme les autres rétrovirus, doit naviguer à travers le cytoplasme pour accéder au noyau cellulaire. Pour ce faire, il utilisera le réseau de microtubules et les filaments

d'actine (218, 221, 230, 231). Dans le cas des microtubules, la protéine de capsid du virus liera l'adaptateur de la Kinésine 1 appelé FEZ1. Cette liaison entre la capsid et FEZ1 permet au complexe de préintégration d'utiliser le système de transport kinésine/microtubules, comme un cargo, afin de rejoindre le MTOC puis le noyau cellulaire (220, 223). Notons que la capsid peut aussi interagir avec la protéine adaptatrice BICD2 afin de recruter le complexe Dynéine-Dynactine et ainsi exploiter les filaments d'actine pour se rendre au noyau cellulaire (217, 230, 231).

En plus d'exploiter les microtubules, le virus semble capable d'induire leur stabilisation. En effet, il a été démontré que la protéine de matrice recrute la kinésine KIF4. Ce recrutement de KIF4 par la matrice permet le recrutement subséquent de la protéine cellulaire EB1; une protéine qui est essentielle à l'acétylation des microtubules, une modification post-traductionnelle permettant leur stabilisation (997-1001). Cette stabilisation des microtubules durant les étapes précoces du cycle de réplication virale a été associée à une plus grande capacité du virus à rejoindre le noyau cellulaire et donc à une augmentation de l'infection (1000). À l'inverse, la déstabilisation du réseau de microtubules, notamment par la protéine Moésine, corrèle avec une inhibition de l'infection par le VIH-1 (219, 1002). La stabilité des microtubules est donc essentielle à l'infection du VIH-1 dans la mesure où la stabilisation et la déstabilisation des microtubules stimule et inhibe respectivement l'infection (219, 222, 1000, 1002).

### **1.2.2. Relation entre Vpr et centrosomes**

Vpr est une autre protéine virale capable de promouvoir le trafic du PIC au noyau cellulaire, une activité qui semblerait être reliée au recrutement de la Dynéine par Vpr (224). À *contrario*, il a été rapporté qu'une fois l'infection établie dans les macrophages, Vpr délocaliserait EB1 des microtubules afin de prévenir le recrutement de la Dynéine et possiblement l'assemblage des microtubules (1003). Cette activité de Vpr permettrait notamment d'inhiber la maturation des phagosomes en phagolysosomes (1003). Enfin et bien que le mécanisme d'action soit peu clair, il semblerait que Vpr induise des duplications des centrosomes. Ceci mènerait à une surabondance de fuseaux mitotiques et à des défauts mitotiques ainsi qu'à des défauts de cytodierèse (1004-1006).

## 2. Mise en contexte du chapitre

### 2.1. Rationnelle et objectifs du chapitre

Les centrosomes et le réseau de microtubules sont des éléments critiques à l'infection par le VIH-1. Étant donné que la protéine virale Vpr est encapsidée et est retrouvée au niveau du PIC, et qu'elle semble avoir une activité sur les centrosomes, il n'est donc pas surprenant de constater que de nombreuses composantes des centrosomes ont été retrouvées dans l'analyse BioID des partenaires à proximité de Vpr (Chapitre 3).

L'analyse BioID révèle que Vpr est à proximité de protéines présentes dans la matrice péricentriolaire, incluant PCM1, PCNT, CEP170 ou encore ALMS1. Ces protéines sont notamment impliquées dans la duplication des centrosomes et l'ancrage des microtubules (996, 1007-1011). Nous y retrouvons également OFD1 qui régule l'allongement des centrioles (979, 1012); une sous-unité de la Dynéine (DYNLL1) qui joue un rôle dans le transport vésiculaire *via* les microtubules (1013, 1014); ainsi que HAUS5 et HAUS6 qui sont deux composantes d'un complexe de huit protéines dont la fonction est de réguler l'intégrité des centrosomes, des microtubules et des fuseaux mitotiques (1015, 1016).

Le groupe du Dr William Tsang (Institut de recherches cliniques de Montréal) a récemment démontré que le complexe d'E3 ubiquitine ligase EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> est impliqué dans la dégradation de la protéine centrosomale CP110; un mécanisme menant à une élongation des centrioles (984). Étant donné que deux des sous-unités du complexe d'E3 ligase dégradant CP110 font partie du complexe DCAF1 recruté par Vpr, Dr William Tsang a initié des études, en collaboration avec notre laboratoire, visant à définir si le complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> pouvait être un nouveau partenaire de Vpr et si la protéine CP110 pouvait être une nouvelle cible de Vpr. Cette étude a mené à l'identification de Vpr comme un modulateur de l'homéostasie des centrosomes et de CP110 comme une nouvelle cible de Vpr (713).

### 2.2. Contribution au chapitre

L'idée d'étudier la relation entre Vpr, le complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> et CP110 est une idée originale du Dr William Tsang et de son étudiant Dr Delowar Hossain.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été générés par :

- Figure 4.1.1 à Figure 4.1.5 : Dr Delowar Hossain
- Figure 4.1.6 : (A) moi-même; (B-F) Dr Delowar Hossain
- Figure 4.1.7 et Figure 4.1.8 : Dr Delowar Hossain
- Figure 4.1.9 : Infection et fixation des cellules : moi-même; marquage et analyses par microscopie : Dr Delowar Hossain
- Figure 4.1.10 : Dr Delowar Hossain

Les expériences ont été conduites et les résultats générés principalement par Dr Delowar Hossain sous la supervision du Dr William Tsang et en partie par moi-même sous la supervision du Dr Éric A. Cohen.

### **3. Article #2**

Statut de l'article : Publié dans *The Journal of Biological Chemistry* (713); article introduit avec licence du journal autorisant sa publication dans le cadre de cette thèse.

# HIV-1 Vpr Hijacks EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> to Disrupt Centrosome Homeostasis

Delowar Hossain<sup>1,2</sup>, Jérémy A. Ferreira Barbosa<sup>1</sup>, Éric A. Cohen<sup>1,2,3</sup> and William Y. Tsang<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

\* Address correspondence to William Y. Tsang: [William.Tsang@ircm.qc.ca](mailto:William.Tsang@ircm.qc.ca)

Phone: +1 (514) 987-5719

## Contact information:

Delowar Hossain: [MohammadDelowar.Hossain@ircm.qc.ca](mailto:MohammadDelowar.Hossain@ircm.qc.ca)

Jérémy A. Ferreira Barbosa: [Jeremy.FerreiraBarbosa@ircm.qc.ca](mailto:Jeremy.FerreiraBarbosa@ircm.qc.ca)

Éric Cohen: [Eric.Cohen@ircm.qc.ca](mailto:Eric.Cohen@ircm.qc.ca)

**Running title:** Vpr usurps EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> at the centrosome

**Keywords:** centrosome; centriole; microtubule; HIV-1; Vpr; ubiquitin ligase; CEP78; CP110

## Abstract

Viruses exploit the host cell machinery for their own profit. To evade innate immune sensing and promote viral replication, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subverts DNA repair regulatory proteins and induces G2/M arrest. The pre-integration complex of HIV-1 is known to traffic along microtubules and accumulate near the microtubule-organizing center. The centrosome is the major microtubule-organizing center in most eukaryotic cells, but precisely how HIV-1 impinges on centrosome biology remains poorly understood. We report that HIV-1 accessory protein viral protein R (Vpr) localizes to the centrosome through binding to DCAF1 and forms a complex with the ubiquitin ligase EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and CEP78, a resident centrosomal protein previously shown to inhibit EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup>. Vpr does not affect ubiquitination of CEP78. Rather, it enhances ubiquitination of an EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> substrate CP110, leading to its degradation, and this effect can be overcome by CEP78 expression. Down-regulation of CP110 and elongation of centrioles provoked by Vpr are independent of G2/M arrest. Infection of T lymphocytes with HIV-1, but not with HIV-1 lacking Vpr, promotes CP110 degradation and centriole elongation. Elongated centrioles recruit more  $\gamma$ -tubulin to the centrosome and results in increased microtubule nucleation. Our results suggest that Vpr is targeted to the centrosome where it hijacks an ubiquitin ligase, disrupting organelle homeostasis which might contribute to HIV-1 pathogenesis.

## Introduction

Viruses are pathogens that infect all life forms and reproduce inside living cells. To do so, they must be able to counteract and evade immune defenses and utilize cellular machinery from the host for their own replication. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) belongs to the lentivirus subgroup of retroviruses and is the causal agent of acquired immunodeficiency syndrome (5, 1017). The HIV-1 genome encodes five proteins essential for viral replication and four accessory proteins, namely, viral infectivity factor (Vif), viral protein U (Vpu), negative regulatory factor (Nef), and viral protein R (Vpr) (161, 1018). These accessory proteins are not absolutely essential for viral replication *in vitro*, but nevertheless play critical roles in viral



infection, survival, and propagation *in vivo* (343, 499, 552, 579, 1019-1026). Vpr is among the least characterized in terms of function and mechanism of action. As a predominantly nuclear protein, Vpr is able to exert multiple effects on host cells by interacting with a cohort of cellular proteins (343, 552, 554, 558, 560, 563, 579, 659, 663, 1025-1027). Among these, viral protein R binding protein (VprBP/DCAF1) is the first protein identified to bind Vpr (519, 558). Current evidence suggests that DCAF1 can function as a protein kinase (1028), a transcriptional repressor (1029), and a substrate recognition subunit of two distinct multi-subunit ubiquitin ligases, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and CRL4<sup>DCAF1</sup> (1030). EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> is composed of DYRK2, EDD, DDB1, and DCAF1 subunits (1031), whereas CRL4<sup>DCAF1</sup> consists of Roc1, Cullin4, DDB1, and DCAF1 (556, 1032, 1033). Upon binding to an ubiquitin ligase, Vpr directs ubiquitination of novel substrates and accelerates ubiquitination of native substrates, leading to their premature degradation (561, 579, 639, 640, 659, 1027).

In contrast to CRL4<sup>DCAF1</sup> which is present in the nucleus, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> exists in two distinct subcellular compartments, the nucleus and centrosome, which comprises a pair of centrioles surrounded by pericentriolar material from which microtubules emanate and elongate (564, 984). In the nucleus, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> functions to suppress telomerase activity by targeting telomerase reverse transcriptase TERT for ubiquitination and degradation (564). The downregulation of TERT is further enhanced by Vpr binding to EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (563). On the other hand, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> at the centrosome is known to ubiquitinate and induce the degradation of CP110, a protein which controls centriole length (980, 981, 984, 1034, 1035). The ability of EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> to ubiquitinate CP110 is subjected to regulation by CEP78, a resident centrosomal protein which directly associates with, and inhibits, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> in a cell cycle-dependent manner (984). It is currently unknown if Vpr has the capacity to hijack EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> at the centrosome.

The centrosome is the major microtubule-organizing centers in most eukaryotic cells and acts as a central hub for coordinating a multitude of cellular events. Various molecules and cargos are known to transit through this organelle (1036). The viral core of HIV-1 disassembles upon entry into the host cells and the resulting pre-integration complex traffics along microtubules and accumulates near the microtubule-organizing center (217, 221, 222, 1000). Another study

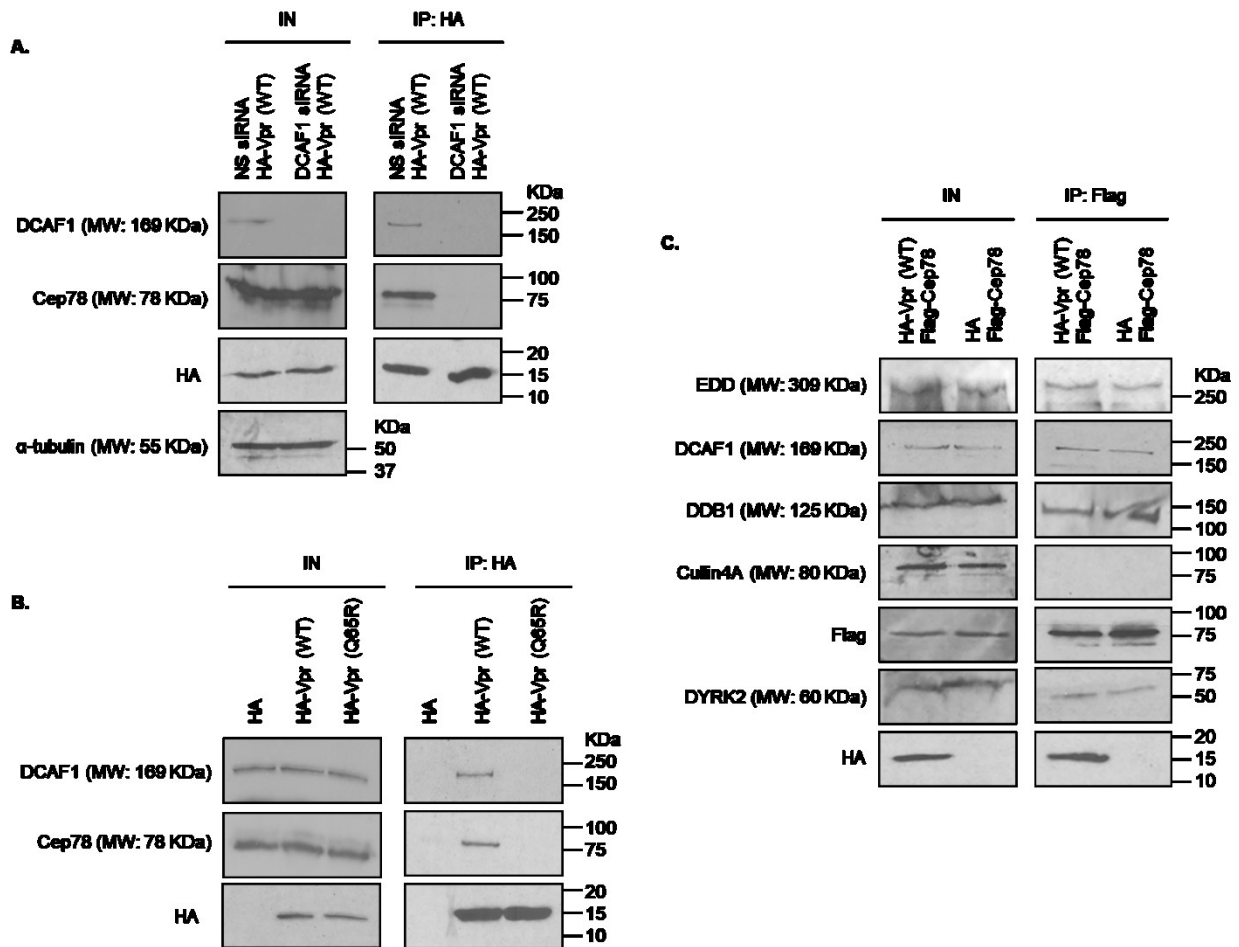
reported that HIV-1 sub-viral particles accumulate at the centrosome under resting T cells through an unknown mechanism and resumes infection upon stimulation (1037). Interestingly, Vpr has been observed to disrupt certain protein interactions at the centrosome (1038) and induce centrosome amplification and multipolar spindle formation (1005, 1039), suggesting that this viral protein is capable of exerting an effect on the centrosome, either directly or indirectly. In spite of these observations, the extent to which Vpr modulates different aspects of centrosome biology and the underlying mechanisms have not been studied in detail.

## Results

### **Vpr Binds to CEP78 and EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and Localizes to the Centrosome**

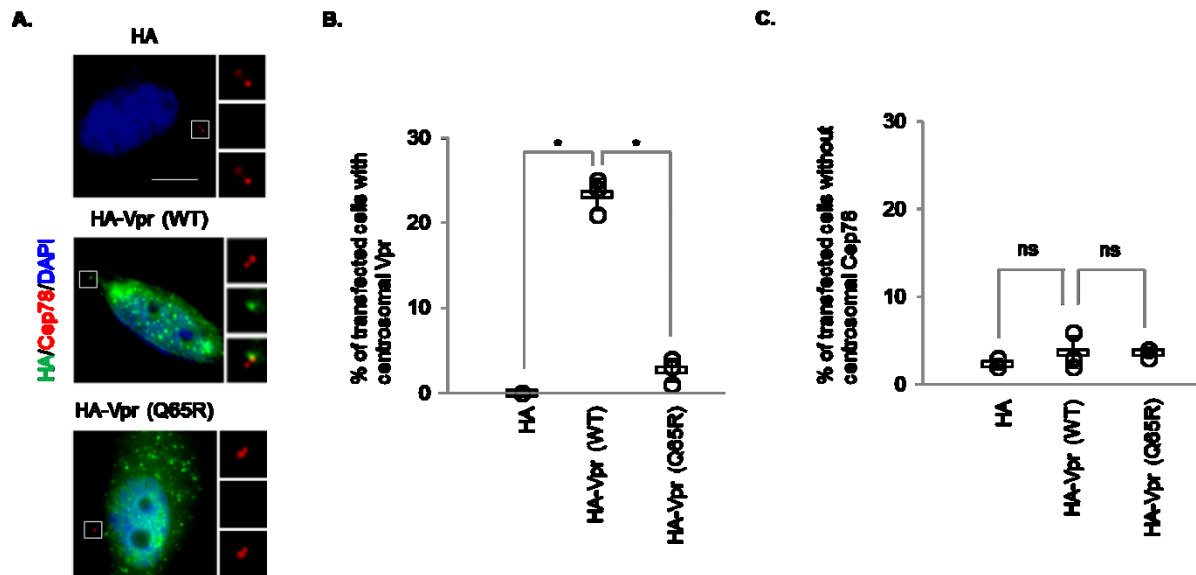
We have recently demonstrated that CEP78 forms a complex with EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> through DCAF1 (984). Given that Vpr is known to associate with DCAF1 (519, 558), we first asked if Vpr and CEP78 interact. Endogenous CEP78 and DCAF1 coimmunoprecipitated with HA-Vpr in HEK293 cells (Figure 4.1.1A and B). When DCAF1 was depleted with siRNA, very little CEP78 was detected in Vpr immunoprecipitates (Figure 4.1.1A). Moreover, endogenous DCAF1 and CEP78 bound to wild type Vpr, but neither protein interacted with a Vpr mutant refractory to DCAF1 binding (VprQ65R) (Figure 4.1.1B). Thus, Vpr is likely to associate with CEP78 through DCAF1, and these results are consistent with the findings that the Vpr- and CEP78-binding sites of DCAF1 are non-overlapping. Vpr binds to the WD40 domain of DCAF1 (551, 558), whereas CEP78 binds to the acidic domain of DCAF1 (984).

Next, we explored whether Vpr might specifically bind to the CEP78/EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> complex, which normally forms at the centrosome. We expressed Flag-CEP78 and HA-Vpr in HEK293 cells, performed anti-Flag immunoprecipitations, and demonstrated that CEP78 binds to EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> but not to CRL4<sup>DCAF1</sup>, as expected (984), and Vpr (Figure 4.1.1C). Wild type Vpr co-localized with endogenous CEP78 in  $\approx$  20-25% of transfected HeLa cells, indicating that this viral protein is targeted to the centrosome in some contexts (Figure 4.1.2A and B). In contrast, VprQ65R did not exhibit centrosomal localization (Figure 4.1.2A and B). Taken



**Figure 4.1.1. Vpr Interacts with CEP78 and EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> Through DCAF1**

A) HEK293 cells were transfected with NS (non-specific) or DCAF1 siRNA, followed by plasmid expressing HA-Vpr wild type (WT). Lysates were immunoprecipitated with an anti-HA antibody and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. B) HEK293 cells were transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT, or HA-Vpr mutant refractory to DCAF1 binding (Q65R). Lysates were immunoprecipitated with an anti-HA antibody and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input. C) HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing Flag-CEP78 and HA or HA-VprWT. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input.



**Figure 4.1.2. Vpr but not VprQ65R Localizes to the Centrosome**

A) HeLa cells transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT, or HA-VprQ65R were processed for immunofluorescence and stained with antibodies against HA (green) and CEP78 (red). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 2 μm. B-C) The percentage of HA-expressing cells showing centrosomal localization of Vpr (B) or no centrosomal CEP78 staining (C) was determined. For (B-C), at least 100 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ ; ns, nonsignificant.

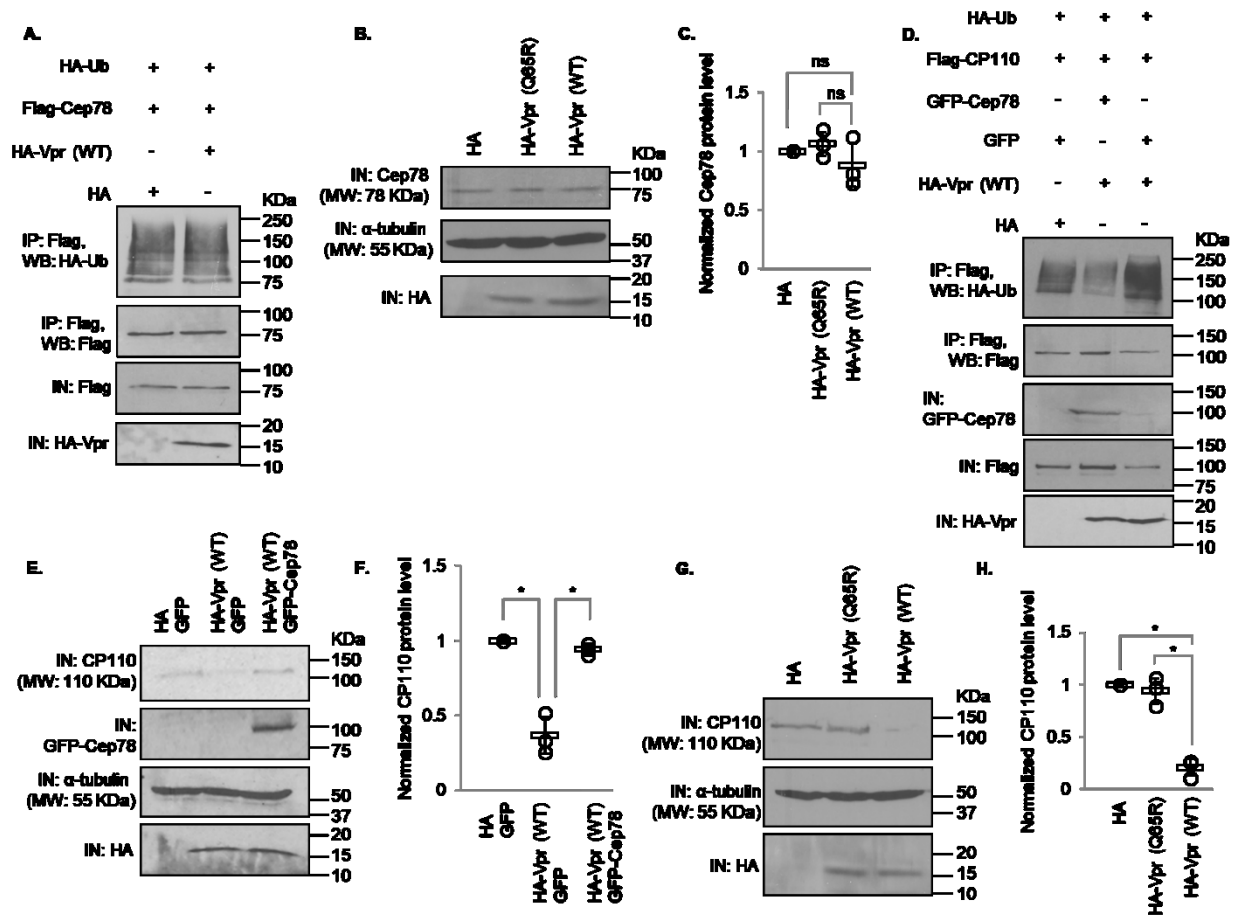
together, these data suggest that Vpr engages in a complex with EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and CEP78 at the centrosome through binding to DCAF1.

### **Vpr Hijacks EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> to Enhance Ubiquitination and Degradation of CP110**

To explore the relevance of Vpr-binding to EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and CEP78, we tested if Vpr might promote ubiquitination of proteins at the centrosome. The ubiquitination levels of CEP78, an inhibitor and non-substrate of EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (984), remained the same upon Vpr expression (Figure 4.1.3A). Likewise, centrosomal localization and steady-state levels of CEP78 were not altered by wild type Vpr or VprQ65R (Figure 4.1.2A and C, Figure 4.1.3A and C). On the contrary, ubiquitination of CP110, a known centrosomal EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> substrate (984), became greatly enhanced by Vpr (Figure 4.1.3D). This was accompanied by a decrease in CP110 protein levels (Figure 4.1.3D-H), and a loss of centrosomal CP110 staining by immunofluorescence (Figure 4.1.4A and B). Notably, diminished levels of CP110 were specifically induced by wild type Vpr but not VprQ65R mutant (Figure 4.1.3G and H, Figure 4.1.4A and B), and could be rescued by addition of a proteasome inhibitor MG132 (Figure 4.1.5A and B) or depletion of DCAF1 (Figure 4.1.5C and D). Furthermore, co-expression of CEP78 drastically reduced ubiquitination of CP110 (Figure 4.1.3D) and restored endogenous CP110 to wild type levels (Figure 4.1.3E and F). These data indicate that Vpr subverts centrosomal EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> to accelerate ubiquitination and proteasomal degradation of a native substrate CP110, and these effects can be counteracted by overexpression of CEP78.

### **Vpr Induces Centriole Elongation Through CP110 Degradation**

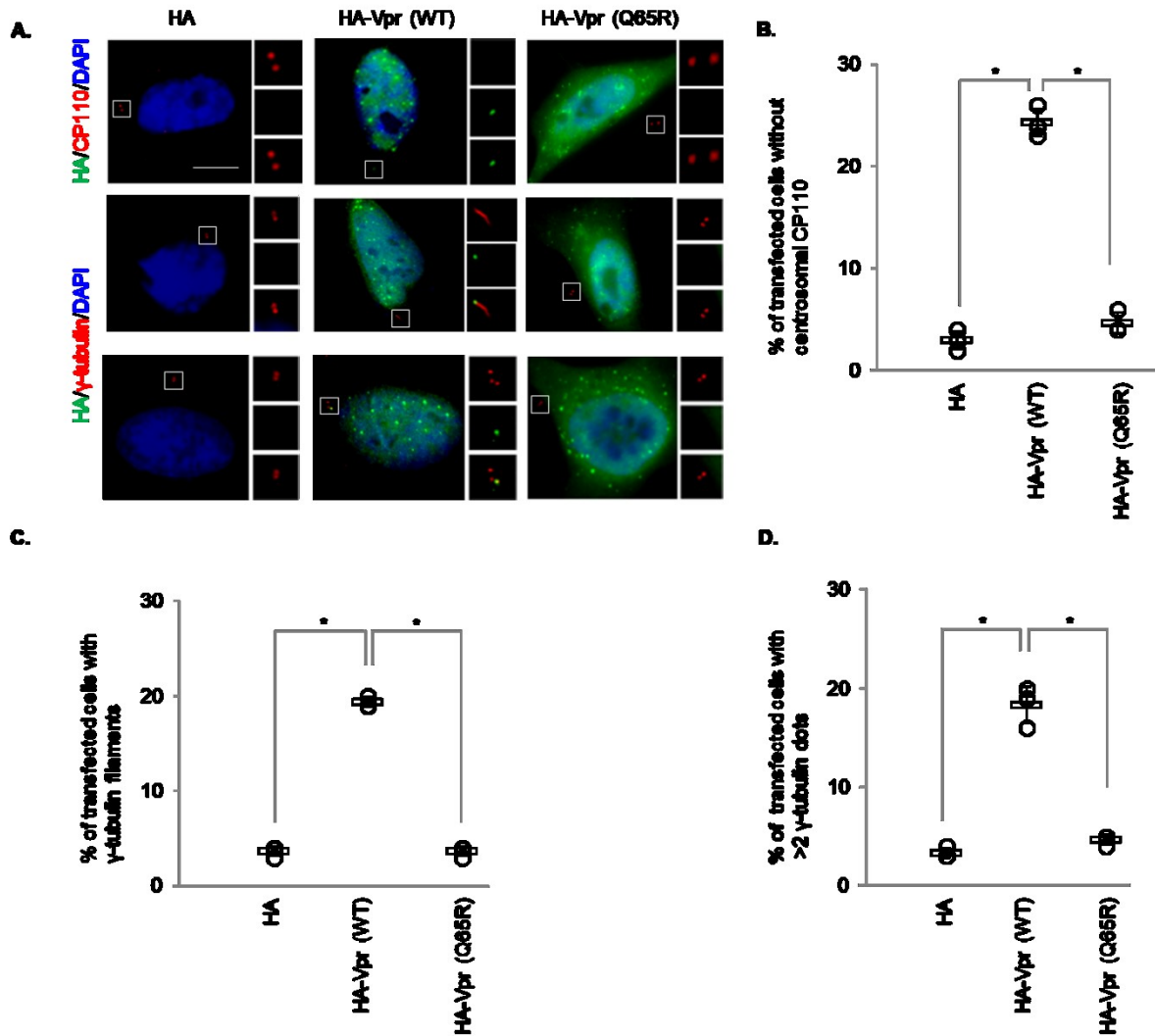
Previously, it has been shown that depletion of CP110 induces the formation of overly long or longated centrioles, represented by  $\gamma$ -tubulin filaments, in non-ciliated or poorly ciliated cells including HeLa (980, 981, 1034, 1035). This phenotype can also be recapitulated by CP110 loss resulting from ablation of CEP78 or overexpression of EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (984). To further substantiate our observations that Vpr enhances degradation of CP110, we found that wild type Vpr provokes centriole elongation, whereas VprQ65R mutant could not (Figure 4.1.4A and C). Of note, wild type Vpr also induced centrosome amplification (>2  $\gamma$ -tubulin foci; Figure 4.1.4A and



**Figure 4.1.3. Vpr Enhances Ubiquitination and Degradation of CP110 but not CEP78**

A) HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing HA-Ub, Flag-CEP78, and HA or HA-VprWT. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody in 1% SDS and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input. B) HEK293 cells were transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT or HA-VprQ65R. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. C) Normalized CEP78 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. ns, non-significant. D) HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing HA-Ub, Flag-CP110, GFP or GFP-CEP78, and HA or HA-VprWT. Lysates were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody in 1% SDS and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input. E) HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing HA and GFP, HA-VprWT and GFP,

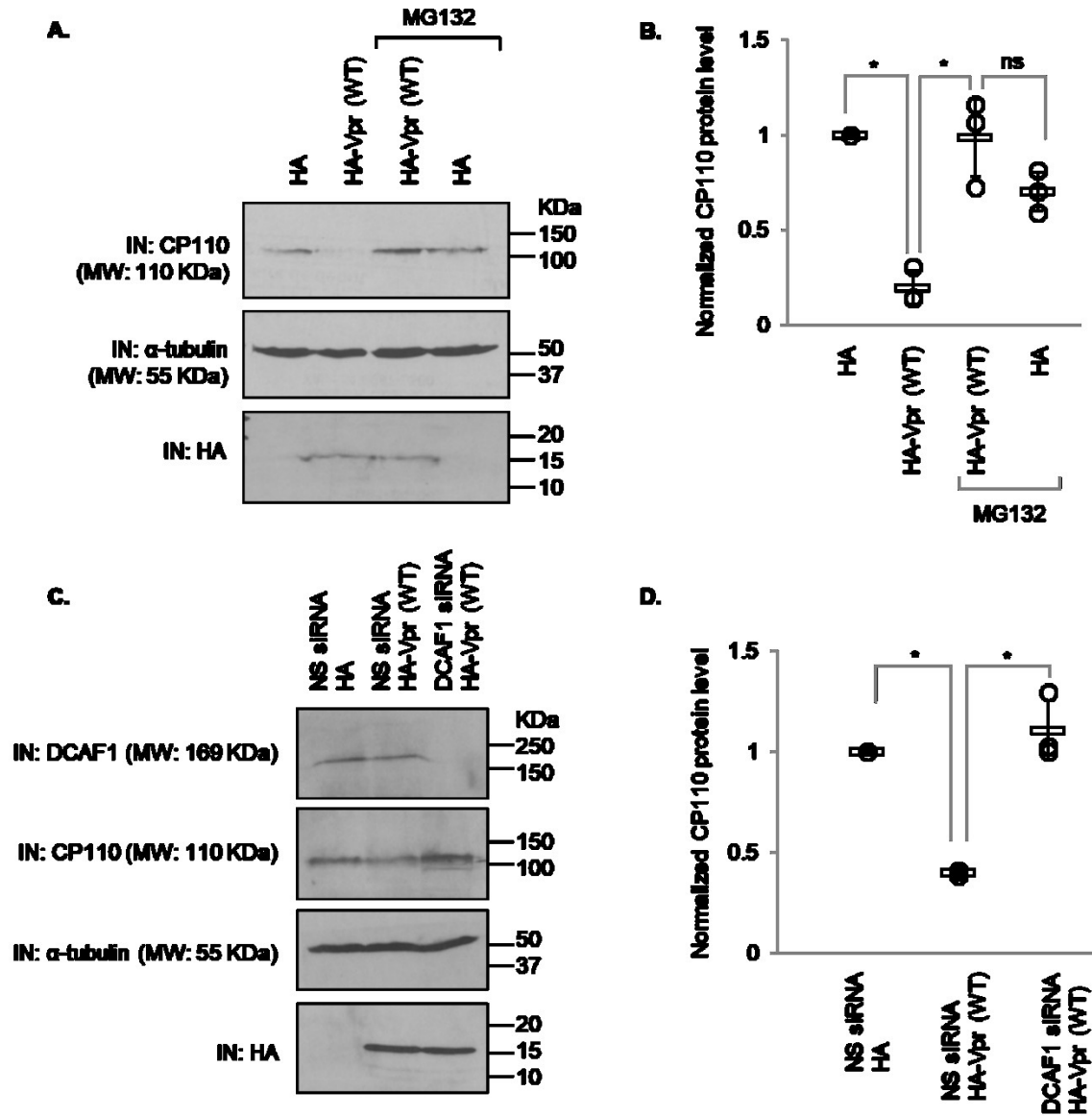
or HA-VprWT and GFP-CEP78. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. F) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ . G) HEK293 cells were transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT, or HA-VprQ65R. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. H) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ .



**Figure 4.1.4. Vpr Induces CP110 Loss, Centriole Elongation and Centrosome Amplification**

A) HeLa cells transfected with plasmid expressing expressing HA, HA-VprWT, or HA-VprQ65R were processed for immunofluorescence and stained with antibodies against HA (green) and CP110 or  $\gamma$ - tubulin (red). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 2  $\mu$ m. B) The percentage of HA-expressing cells with no centrosomal CP110 staining was determined. C-D) The percentage of HA-expressing cells with elongated centrioles ( $\gamma$ -tubulin filaments; (C)) or centrosome amplification (>2  $\gamma$ -tubulin dots; (D)) was determined. For B-D), at least 100 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ .





**Figure 4.1.5. Vpr-Induced Proteasomal Degradation of CP110 Occurs in a DCAF1-Dependent Manner**

A) HEK293 cells transfected with plasmid expressing HA or HA-VprWT were treated with or without 10  $\mu$ M MG132 for 6 hours. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. B) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ ; ns, non-significant. C) HEK293 cells were transfected with NS (non-specific) or DCAF1 siRNA, followed by plasmid expressing HA or HA-VprWT. Lysates were Western blotted

with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. D) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ .

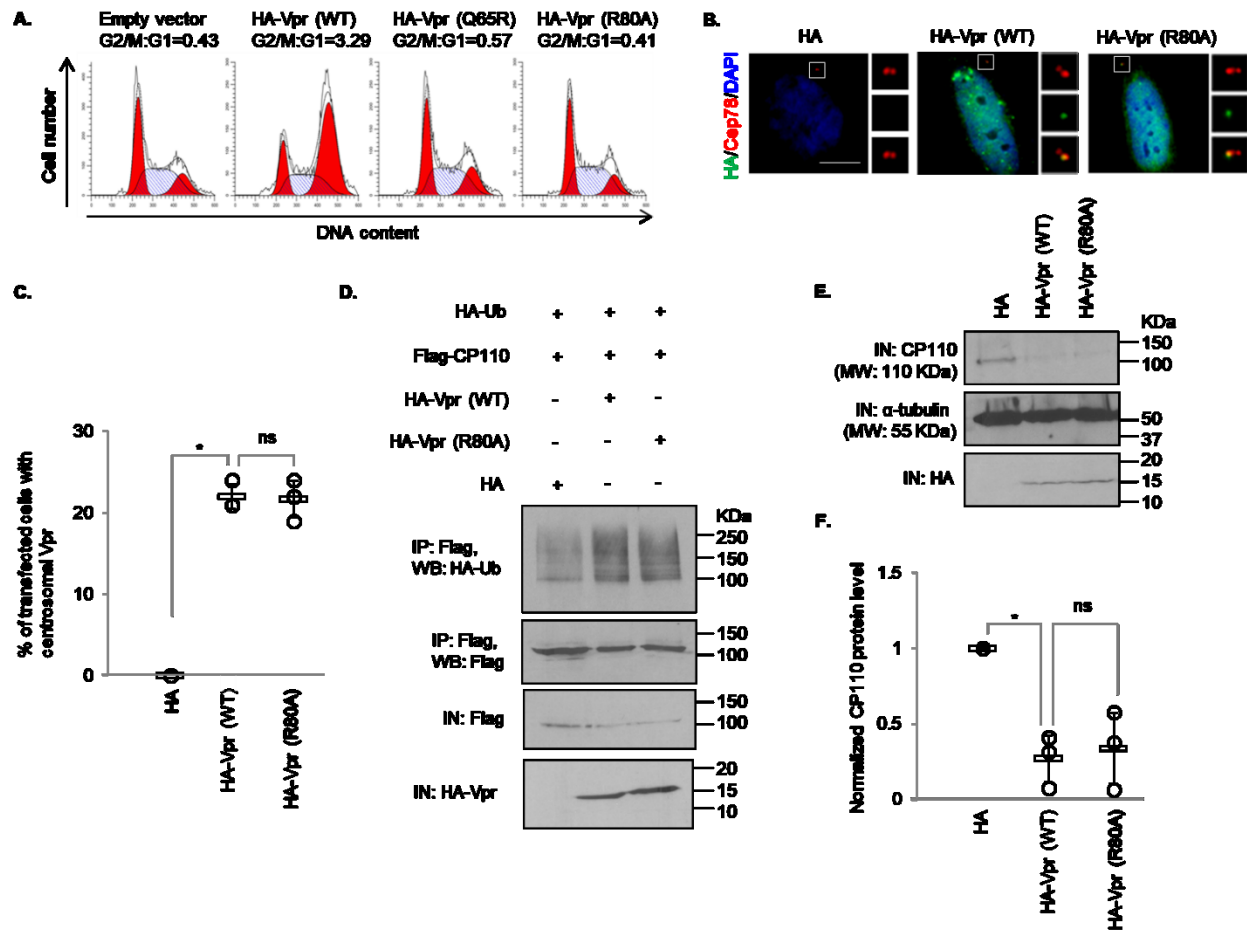
D), consistent with a previous report (1039), but this phenotype is unlikely to be a consequence of CP110 loss since excessive CP110, rather than loss of CP110, drives centrosome amplification (983).

## **Vpr-Induced CP110 Degradation and Centriole Elongation are Independent of G2/M Arrest**

A recent study showed that Vpr associates with the SLX4 complex to induce chromosomal instability, triggering activation of DNA damage response (DDR) pathways and cell cycle arrest at the G2/M phase (579), although this is debated (616). Coincidentally, CP110 has been documented to undergo ubiquitination by SCF<sup>cyclinF</sup> and EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (983, 984), and subsequently proteasomal degradation, in G2/M. Thus, we sought to address whether, or not, down-regulation of CP110 induced by Vpr is due to prolonged G2/M arrest. For this purpose, we utilized a well-characterized Vpr mutant VprR80A, which, in contrast to VprQ65R, can bind to DCAF1 but is unable to provoke G2/M arrest ((550, 1040) and Figure 4.1.6A). Similar to wild type Vpr, VprR80A was detected at the centrosome in  $\approx$  20-25% of transfected cells (Figure 4.1.6B and C). Next, we investigated the consequences of expressing VprR80A on CP110 and centriole length. Wild type Vpr and VprR80A were equally able to enhance CP110 ubiquitination (Figure 4.1.6D), causing a diminution of CP110 levels (Figure 4.1.6E and F) and immunostaining at the centrosome (Figure 4.1.7A and B). Furthermore, wild type Vpr and VprR80A induced  $\gamma$ -tubulin filament formation to similar extent (Figure 4.1.7A and C). Downregulation of CP110 provoked by wild type Vpr or VprR80A could be rescued by ectopic expression of CEP78 (Figure 4.1.8A-D). Remarkably, unlike wild type Vpr, VprR80A did not induce centrosome amplification (Figure 4.1.7A and D). These data suggest that CP110 downregulation and centriole elongation could be attributed to subversion of EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> rather than G2/M arrest. On the contrary, the other phenotype caused by Vpr, namely centrosome amplification, is dependent on cell cycle arrest at the G2/M phase.

## **Vpr Induces CP110 Degradation and Centriole Elongation in Infected T Cells**

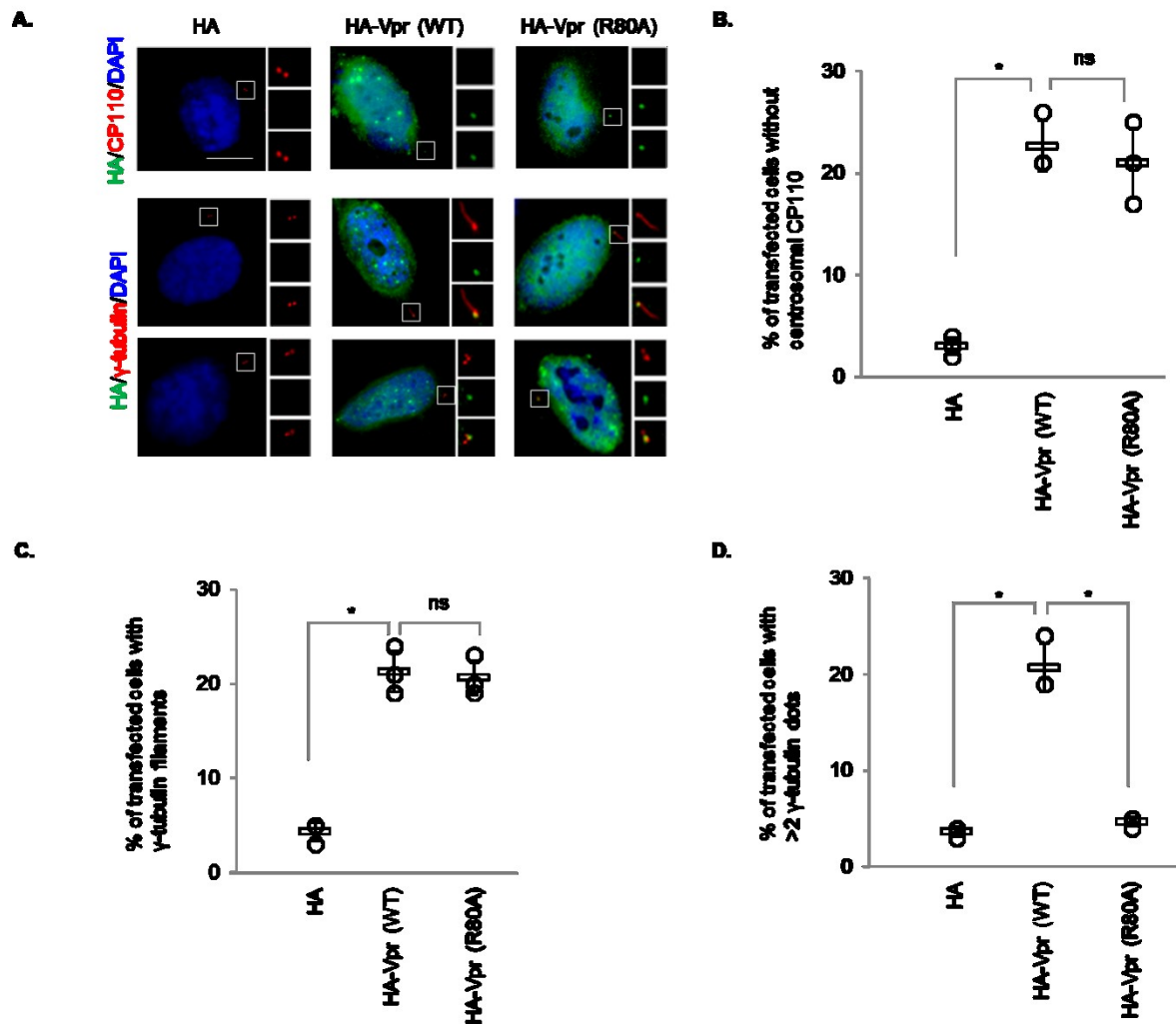
We have thus far shown that Vpr induces the loss of CP110 in two model cell lines, HEK293 and HeLa. However, it remains unknown if this accessory protein could trigger the same response



**Figure 4.1.6. Vpr Centrosomal Localization and Vpr-Induced Ubiquitination and Degradation of CP110 are Independent of G2/M Arrest**

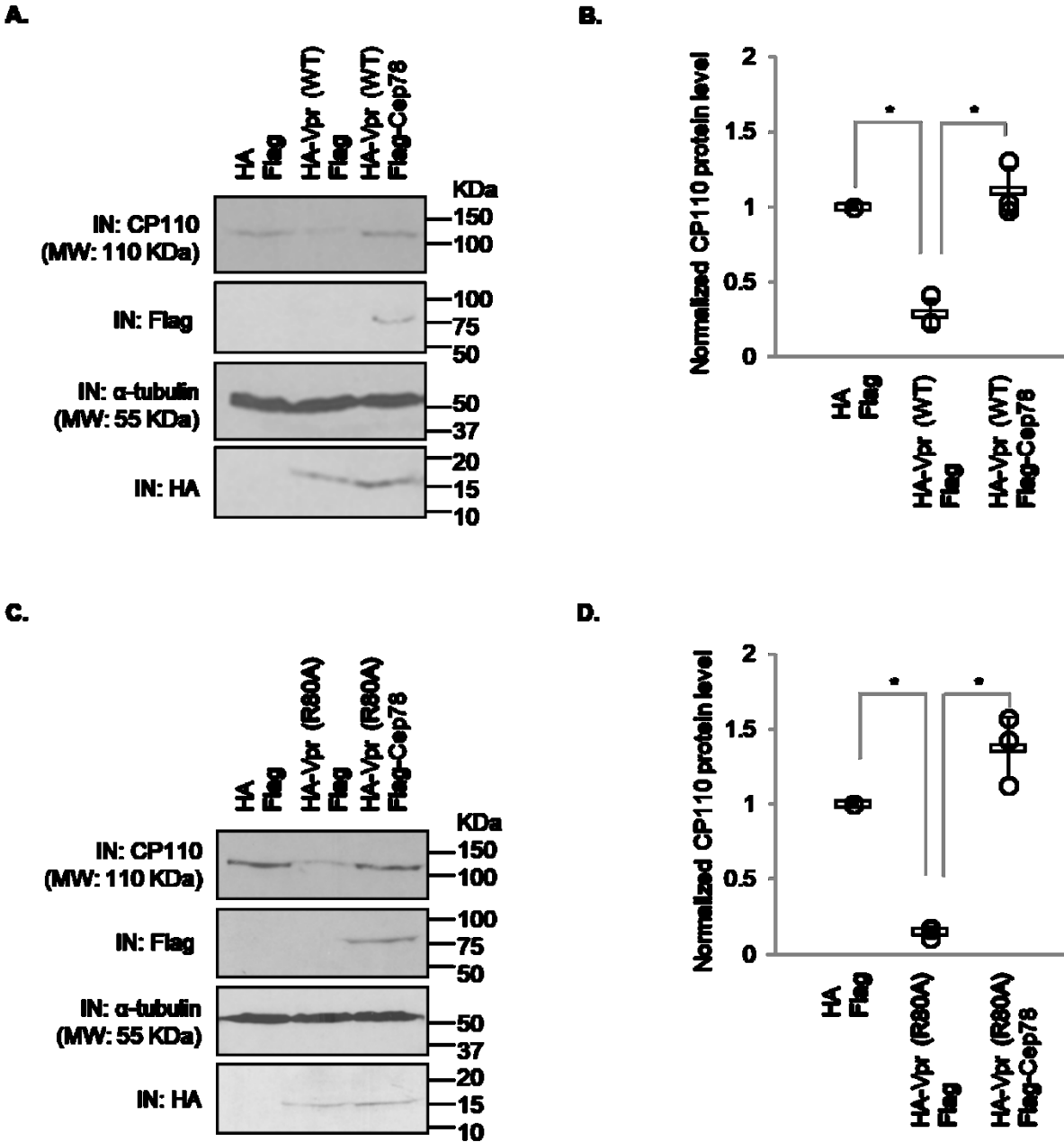
A) HEK293T cells co-transfected with plasmids expressing GFP and HA (empty vector), HA-VprWT, HA-VprQ65R or HA-VprR80A. Cell cycle profiles were determined by flow cytometry gating on the GFP<sup>+</sup> population. G2/M:G1 ratio is presented for each condition. B) HeLa cells transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT or HA-VprR80A were processed for immunofluorescence and stained with antibodies against HA (green) and CEP78 (red). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 2  $\mu$ m. C) The percentage of HA-expressing cells showing centrosomal localization of Vpr was determined. At least 100 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ ; ns, nonsignificant. D) HEK293 cells were co-transfected with plasmids expressing HA-Ub, Flag-C110, and HA, HA-VprWT or HA-VprR80A.

Lysates were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody in 1% SDS and Western blotted with the indicated antibodies. IN, input. E) HEK293 cells were transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT or HA-VprR80A. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. F) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ ; ns, non-significant.



**Figure 4.1.7. Vpr-Induced Centrosome Amplification, but not CP110 Loss or Centriole Elongation, is Dependent of G2/M arrest**

A) HeLa cells transfected with plasmid expressing HA, HA-VprWT or HA-VprR80A were processed for immunofluorescence and stained with antibodies against HA (green) and CP110 or  $\gamma$ -tubulin (red). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 2  $\mu$ m. B) The percentage of HA-expressing cells with no centrosomal CP110 staining was determined. C-D) The percentage of HA-expressing cells with elongated centrioles ( $\gamma$ -tubulin filament; (C)) or centrosome amplification (>2  $\gamma$ -tubulin dots; (D)) was determined. For B-D), at least 100 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ ; ns, nonsignificant.



**Figure 4.1.8. Degradation of CP110 Induced by Vpr or VprR80A can be Overcome by CEP78 Expression**

A) HEK293 cells were transfected with plasmids expressing HA and Flag, HA-VprWT and Flag, or HA-VprWT and Flag-CEP78. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. B) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph.

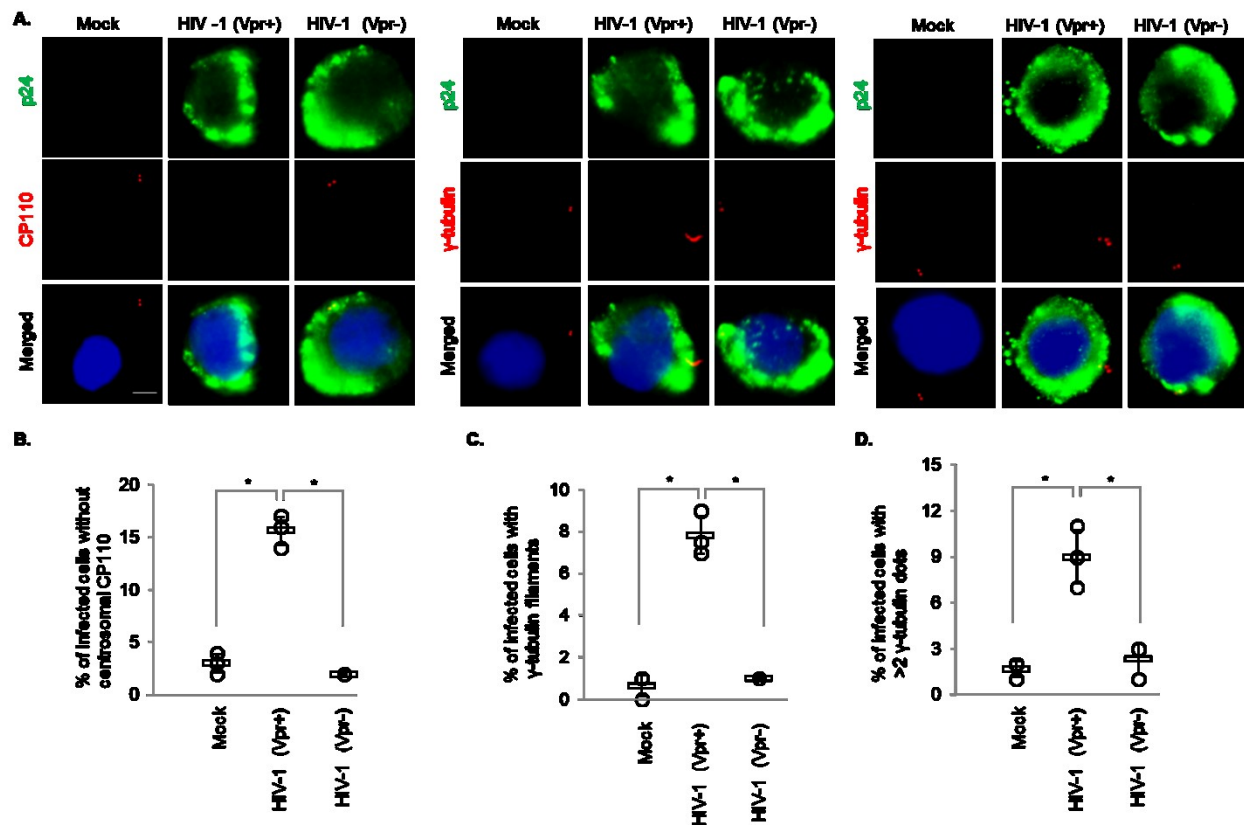
*\**,  $P < 0.01$ . C) HEK293 cells were transfected with plasmids expressing HA and Flag, HA-VprR80A and Flag, or HA-VprR80A and Flag-CEP78. Lysates were Western blotted with the indicated antibodies.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. D) Normalized CP110 protein level. Mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. *\**,  $P < 0.01$ .



in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes that HIV-1 normally infects. To interrogate the relationship between Vpr and CP110 in a more physiologically relevant cell line, we infected CD4<sup>+</sup> MT4 T cells, which are highly susceptible to, and permissive for, infection with HIV-1. We found that a significant percentage of cells infected with wild type HIV-1 (HIV-1 Vpr<sup>+</sup>) exhibit CP110 loss and centriole elongation (Figure 4.1.9A-C), in addition to centrosome amplification (Figure 4.1.9A and D). In contrast, very few mock infected cells or cells infected with HIV-1 lacking Vpr (HIV-1 Vpr<sup>-</sup>) possessed these phenotypes (Figure 4.1.9A-D). These results indicate that HIV-1 can also induce CP110 degradation and centriole elongation in T cells in a Vpr-dependent manner.

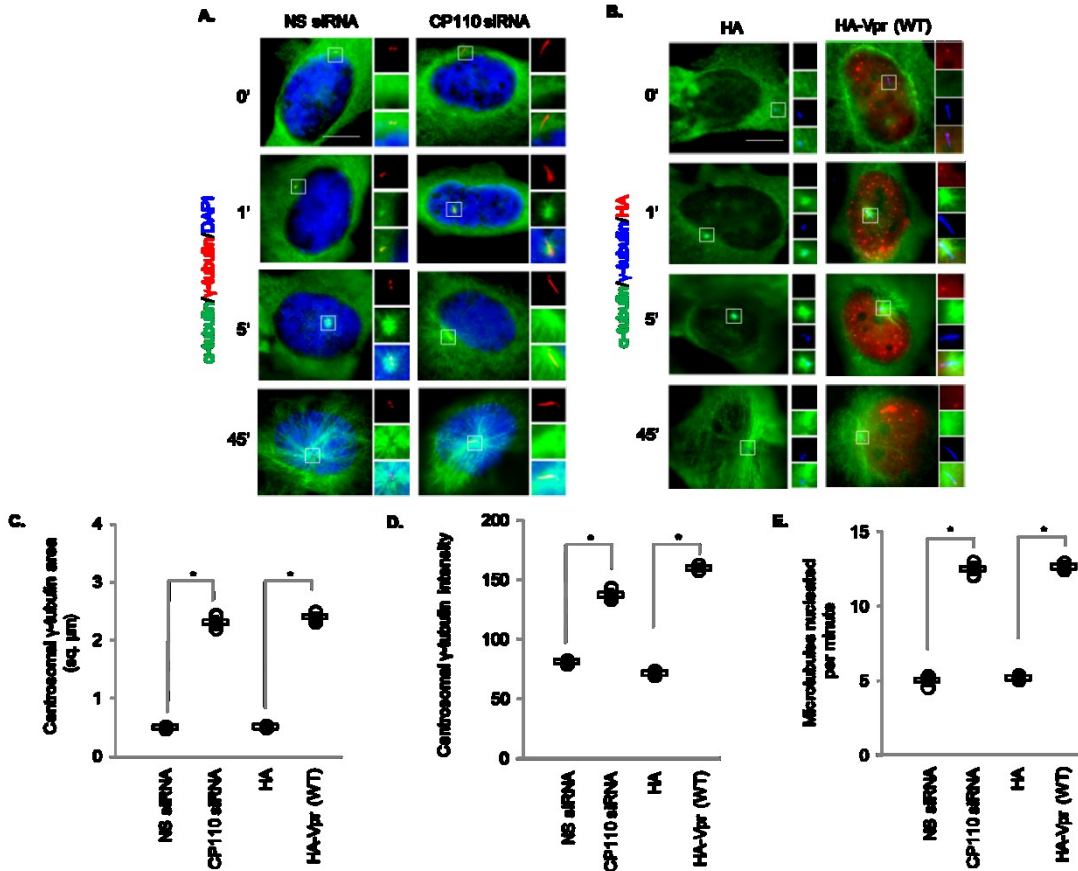
### **Elongated Centrioles Enhance Microtubule Nucleation**

In order to shed light on the net effects of down-regulating CP110 for Vpr, we studied how elongated centrioles might influence centrosome function. When a centriole becomes abnormally long, the surrounding pericentriolar material becomes distorted into the shape of a filament (980, 981, 1034, 1035). Given that  $\gamma$ -tubulin present in the pericentriolar material plays a crucial role in microtubule nucleation, we addressed whether, or not, elongated centrioles might alter nucleation. We quantified the staining area occupied by  $\gamma$ -tubulin and found that it is substantially bigger in CP110-depleted or Vpr expressing cells than in control cells (Figure 4.1.10A-C).  $\gamma$ -tubulin staining intensity was likewise higher upon depletion of CP110 or expression of Vpr (Figure 4.1.10A, B and D). Next, we performed microtubule re-growth assays following microtubule depolymerization with nocodazole. Shortly after removal of nocodazole, control cells nucleated an aster of microtubules emanating from the centrosome (1'; Figure 4.1.10A and B). With time, the aster enlarged, signifying an increase in the length and number of microtubules (5'; Figure 4.1.10A and B). Strikingly, cells depleted of CP110 or expressing Vpr formed a bigger aster and nucleated more microtubules at comparable time points (1', 5'; Figure 4.1.10A, B and E). In contrast, no gross microtubule anchoring defects were observed (45'; Figure 4.1.10A and B). Together, these data strongly suggest that elongated centrioles have the capacity to recruit more  $\gamma$ -tubulin, resulting in enhanced microtubule nucleation.



**Figure 4.1.9. HIV-1 Vpr Induces CP110 Loss, Centriole Elongation and Centrosome Amplification in Infected T Cells**

A) MT4 cells mock infected or infected with either wild type HIV-1 (Vpr+) or HIV-1 missing Vpr (Vpr-) were processed for immunofluorescence and stained with antibodies against P24 (green) and CP110 or  $\gamma$ -tubulin (red). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 2  $\mu$ m. B) The percentage of P24-positive cells with no centrosomal CP110 staining was determined. C-D) The percentage of P24-positive cells with elongated centrioles ( $\gamma$ -tubulin filaments; (C)) or centrosome amplification (>2  $\gamma$ -tubulin dots; (D)) was determined. For B-D), at least 100 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ .



**Figure 4.1.10. Depletion of CP110 or Expression of Vpr Enhances Microtubule Nucleation**

A) HeLa cells transfected with NS (non-specific) or CP110 siRNA were subjected to a microtubule regrowth assay. Cells were processed for immunofluorescence at the indicated time points after release and stained with antibodies against  $\alpha$ -tubulin (green) and  $\gamma$ -tubulin (red). DNA was stained with DAPI (blue). B) HeLa cells transfected with plasmid expressing HA or HA-VprWT were subjected to a microtubule regrowth assay. Cells were processed for immunofluorescence at the indicated time points after release and stained with antibodies against HA (red),  $\alpha$ -tubulin (green) and  $\gamma$ -tubulin (blue). C) The staining area of  $\gamma$ -tubulin at the centrosome was quantitated. D) The staining intensity of  $\gamma$ -tubulin at the centrosome was quantitated. E) The number of cytoplasmic microtubules emanated from the centrosome was determined at the 1' time point. For C-E), at least 20 cells were scored for each condition in each experiment and mean (thick open line) and standard error (bar) of three independent experiments (o) are shown in the graph. \*,  $P < 0.01$ .

## Discussion

In this work, we sought to obtain molecular insights into how HIV-1 Vpr exploits host machinery at the centrosome. While an intimate connection exists between HIV-1, Vpr, and centrosomes (1005, 1006, 1036-1039), the extent to which Vpr orchestrates its effects on this organelle remains poorly understood. Our data show that Vpr associates with a resident centrosomal protein CEP78 through DCAF1 and that it localizes to the centrosome by engaging in a complex with the ubiquitin ligase EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> and CEP78. Because Vpr and VprR80A localize to the centrosome with similar efficiency and EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> components are known to be present at this organelle throughout the cell cycle (984), it seems likely that centrosomal localization of Vpr is independent of G2/M arrest. Vpr is able to hijack EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup>, accelerating ubiquitination and degradation of a native centrosomal substrate CP110. Down-regulation of CP110 triggers the formation of abnormally long centrioles which recruit excess  $\gamma$ -tubulin, and as a consequence, nucleation of cytoplasmic microtubules becomes greatly enhanced. In addition, Vpr can provoke other centrosome anomalies such as amplification ((1039) and this study), indicating that proteins involved in the regulation of organelle copy number might also be affected. It would therefore be interestingly to identify novel Vpr-interacting partners and/or EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> substrates, and test if any of these might be responsible for the centrosome amplification phenotype.

Although Vpr triggers centriole elongation and centrosome amplification, it is clear that these phenotypes occur through two distinct mechanisms. We show that centriole elongation as a result of Vpr-mediated CP110 loss is independent of G2/M arrest, whereas centrosome amplification necessitates G2/M arrest. How then does Vpr-induced G2/M arrest result in centrosome amplification? It is reported that Vpr targets DNA repair factors such as HLF and UNG (639, 640) for degradation and inappropriately activates the SLX4 complex in the nucleus (579), conditions that could contribute to replication stress and induction of DDR (953). The DDR protein Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) and Rad3-related protein (ATR), once activated, initiates downstream signaling cascades that involve activation of Checkpoint Kinase 1 (CHK1) and inhibition of Cell Division Cycle 25C (CDC25C) and Cyclin B/Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1), ultimately leading to G2/M arrest (574). Curiously, other studies have shown that DNA damage

alone is sufficient to induce centrosome amplification (1041), and several DDR proteins, such as ATM, ATR and CHK1, are found in the nucleus and at the centrosome (1042). While the precise functions of DDR proteins at the centrosome await future investigation, it is plausible that a DDR signal originating from the nucleus impinges on the centrosome through DDR proteins, causing amplification to occur.

What are the benefits HIV-1 might receive by hijacking EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> at the centrosome? Regulation of microtubule dynamics and microtubule-associated proteins such as end-binding proteins and motor proteins is an important facet during the HIV-1 replication cycle. For example, HIV-1 promotes the formation of stable microtubules, an event crucial for early infection and translocation of the viral core in the cytoplasm *en route* to the nucleus (1000). Intact microtubules are needed to facilitate HIV-1 uncoating and disruption of microtubules by nocodazole impairs this process (222). In macrophages, HIV-1 Vpr perturbs the localization of End-Binding 1 (EB-1) to impair the maturation of phagosomes, leading to defects in innate immunity (1003). Moreover, HIV-1 Tat can promote or hinder microtubule stability in a context-dependent fashion (1043-1045). Thus, it is clear that HIV-1 employs different strategies to remodel the host microtubule network during infection. Further studies will be needed to decipher how CP110 loss, elongated centrioles, and enhanced microtubule nucleation provoked by Vpr might affect various stages of HIV-1 infection.

One interesting finding from our studies is that CEP78 counteracts the effects of Vpr on CP110, raising the possibility that it might have anti-viral properties. It would therefore be interesting to test if this protein might safeguard the centrosome to inhibit viral infection.

## **Experimental procedures**

### **Cell Culture and Plasmids**

HeLa, HEK293, and HEK293T cells were grown in DMEM (Wisent Inc, 319-005-CL) supplemented with 5% FBS (Wisent Inc, 080150) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. MT4 T cells were grown in RPMI1640 (Wisent Inc, 350-000-CL) supplemented with 10% FBS at

37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The following proteins were expressed from plasmids in mammalian cells: HA-Ub (1046), pCBF-Flag-CEP78 (984), pEGFP-C1-CEP78 (984), pCBF-Flag-CP110 (982), pQBI25, SVCMV-HA-Vpr, SVCMV-HA-VprQ65R and SVCMV-HA-VprR80A (550).

## **Viral Production and Infection**

Infectious GFP-marked HIV-1 NL4.3 or NL4.3ΔVpr viruses were generated by calcium phosphate transfection of HEK293T cells. Virus containing supernatants were recovered 2 days post transfection, clarified, pelleted by ultracentrifugation and titrated by analyzing the percentage of GFP positive MT4 T cells using flow cytometry. MT4 T cells were infected with the different GFP-expressing NL4.3 viruses at a multiplicity of infection of 0.75. Three days post infection, cells were plated on coated coverslips and processed for immunofluorescence.

## **Antibodies**

Antibodies used in this study included anti-CP110 (Bethyl Laboratories, A301-344A), anti-CEP78 (Bethyl Laboratories, A301-799A and IRCM6 (984)), anti-DCAF1 (Proteintech, 11612-1-AP), anti-EDD (Bethyl Laboratories, A300-573A), anti-DDB1 (Bethyl Laboratories, A300-462A), anti-Cullin4A (Bethyl Laboratories, A300-739A), anti-GFP (Roche, 11814460001), anti-HA (Santa Cruz, sc-7392 and Novus Biologicals, NB600-362), anti-Flag (Sigma-Aldrich, F7425 and F3165), anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, T5168), anti- $\gamma$ -tubulin (Sigma-Aldrich, T3559 and T6557)) and anti-DYRK2 (Abcam, ab37912). The anti-P24 monoclonal antibodies were produced from hybridomas 31-90-25 (HB9725) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

## **RNA Interference and Transient Expression of Recombinant Proteins**

For RNA interference, synthetic siRNAs for non-specific (NS) control, DCAF1 and CP110 were described previously (1031, 1047, 1048) and purchased from GE Dharmacon. Transfection of siRNA into HEK293 or HeLa cells was performed using siIMPORTER (Millipore, 64-101) per manufacturer's instructions, and cells were processed for immunoprecipitation, immunoblotting, or immunofluorescence 72 hours post transfection. For expression of recombinant proteins, expression vector(s) was/were transfected into HEK293 cells using calcium phosphate or HeLa cells using polyethylenimine, and cells were processed 72 hours post transfection. For

experiments involving both RNA interference and recombinant protein expression, HEK293 cells were transfected with siRNA, followed by transfection of expression vector 24 hours later. Cells were processed 72 hours after siRNA transfection. Optimal knockdown and recombinant protein expression were achieved 72 hours and 48-72 hours, respectively, post transfection.

### **Immunoprecipitation, Immunoblotting and Immunofluorescence**

Immunoprecipitation, immunoblotting and immunofluorescence were performed as described (1047, 1048). Cells were lysed in a lysis buffer (50 mM HEPES/pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA/pH 8, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg aprotinin, 10 mM NaF, 50 mM β-glycerophosphate and 10% glycerol) at 4°C for 30 minutes. Extracted proteins were recovered in the supernatant after centrifugation at 16,000g. For immunoblotting, 100 µg of extract was used as input. For immunoprecipitation, 2 mg of extract was incubated with anti-Flag (Sigma-Aldrich, A2220) or anti-HA agarose (Sigma-Aldrich, A2095) beads at 4°C for 2 hours. The beads were washed three times with a lysis buffer, and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with primary antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Rockland Inc, 610-703-002 and 611-7302). For indirect immunofluorescence, cells were fixed with cold methanol and permeabilized with 1% Triton X-100/PBS. Slides were blocked with 3% BSA in 0.1% Triton X-100/PBS prior to incubation with primary antibodies. Secondary antibodies used were Cy3- (Jackson Immunolabs, 711-165-151 and 715-165-152), Alexa647- (Jackson Immunolabs, 711-605-152), DyLight649- (Jackson Immunolabs, 715-495-151), or Alexa488- (Thermo Fisher Scientific, A11008, A11055, A11001) conjugated donkey anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG. Cells might also be stained with DAPI (Molecular Probes, D3571), and slides were mounted, observed, and photographed using a Leitz DMRB (Leica) microscope (100 ×, NA 1.3) equipped with a Retiga EXi cooled camera.

### ***In Vivo* Ubiquitination Assay**

*In vivo* ubiquitination assays were performed as described (984, 1049). Briefly, HEK293 cells were transfected with various plasmids including HA-Ub. Cells were lysed 72 hours post transfection and the desired protein was immunoprecipitated with 1% SDS (Bio Basic Inc, SB0485) to prevent non-covalently linked binding partners from co-immunoprecipitating with the desired

protein. After extensive washing, bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with an anti-HA antibody.

### **Microtubule Regrowth Assay**

Cells were treated with 10  $\mu$ M nocodazole (Sigma-Aldrich, M1404) for 1 hour at 4°C. After washing the cells several times with cold medium, they were placed in a pre-warmed medium at 37°C. Cells were fixed at various time points (0', 1', 5', 45') after 37°C and processed for immunofluorescence.

### **Cell Cycle Analysis**

HEK293T cells were co-transfected plasmids expressing GFP (pQBI25) and wild type or mutant HA-Vpr. 48 hours post transfection, cells were fixed, permeabilized and stained with propidium iodide as described (550). Cell cycle analysis was performed on the GFP<sup>+</sup> population by flow cytometry (BD FACSCalibur, Becton Dickinson). The ModFit mathematical model (ModFit LT v4.1.7, Verity Software House) was used to enumerate proportions of cells in G1 and G2/M phases.

### **Quantitation of $\gamma$ -Tubulin Staining Area and Intensity**

A region of interest (ROI) was drawn around  $\gamma$ - tubulin which marks the centrosome and the area of the ROI was calculated by using Volocity6 (PerkinElmer). The area of the ROI was used to measure the fluorescence intensity of  $\gamma$ -tubulin by using Volocity6. Image conditions were identical in all cases and none were saturated as confirmed by the pixel intensity range.

### **Quantitation of Cytoplasmic Microtubules**

The number of microtubules emanated from the centrosome at 0' after microtubule regrowth was subtracted from that at 1' after regrowth and presented as microtubules nucleated per minute.



## **Quantitation of Western Blots**

Protein bands from Western blot films were quantitated with ImageJ. Different film exposure lengths were used to prevent saturation. Quantitation was normalized with respect to the loading control.

## **Data and Statistical Analysis**

Each experiment was conducted three times. The statistical significance of the difference between two means was calculated using a two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant when  $P < 0.01$ .

## **Acknowledgements**

We thank all members of the Tsang laboratory for constructive advice, M. Bego and R. Lodge for helpful discussions, and J. Archambault for providing plasmids.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## **Footnotes**

WYT was a Canadian Institutes of Health Research New Investigator and a Fonds de recherche Santé Junior 2 Research Scholar. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to WYT and Canadian Institutes of Health Research (HOP143169) to EAC. The abbreviations used are: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; Vpr, viral protein R; VprBP/DCAF1, viral protein R binding protein; DDR, DNA damage response.

## **Author Contributions**

DH, JAFB, EAC, and WYT designed the experiments. DH and JAFB performed the experiments and analyzed the corresponding results. WYT wrote the paper, and DH, JAFB, EAC, and WYT reviewed the paper.



## **Chapitre 5**

### **Discussion & Conclusion**



# 1. Discussion des résultats

## 1.1. Comprendre la protéine Vpr du VIH-1 en explorant ses partenaires cellulaires

Depuis la découverte de la protéine Vpr, le domaine a abondamment utilisé les approches de protéomique afin d'étudier ses partenaires cellulaires et ses fonctions. L'utilisation des approches de type AP-MS a notamment permis de démontrer que Vpr manipulait le complexe d'E3 ubiquitine ligase Cul4a-DDB1-DCAF1 afin d'induire la dégradation de protéines cellulaires, des événements essentiels à l'activité d'arrêt du cycle cellulaire en G2/M médiée par Vpr (519, 550-552, 558, 659). Ce fût une découverte majeure dans le domaine de Vpr et le point de départ d'une course à la recherche de nouvelles cibles pouvant expliquer les phénotypes attribués à cette protéine virale. Dans les dix dernières années, cette course a permis l'identification de nombreuses cibles de Vpr, incluant : DICER1 (714), le complexe SLX4 (579, 614, 616), HLTF (639, 640), EXO1 (610), TET2 (619), le complexe SMN (689, 690), CTIP2 (589) ou encore REAF (638).

Certaines études ont également utilisé les approches protéomiques afin de définir un interactome de Vpr le plus ample possible. C'est notamment le cas de Jäger *et al.* (689) qui ont défini un interactome composé de 47 protéines cellulaires, incluant en plus du complexe DCAF1 : le complexe SMN impliqué dans la biogénèse des snRNPs (691); le signalosome COP9 impliqué dans l'inactivation des complexes d'E3 ubiquitine ligase de type Cullin-RING (1050); et trois sous-unités de la Dynéine qui permet le transport de cargo grâce aux microtubules (1014). Plus récemment, les travaux de Greenwood *et al.* ont démontré que Vpr modulerait environ 2 000 protéines cellulaires durant l'infection par le VIH-1 (690). Ces deux études, parmi d'autres, montrent à quel point l'effet de Vpr sur le protéome cellulaire est un effet global.

Nous avons également décidé d'explorer le réseau de protéines à proximité de Vpr en utilisant une approche de protéomique alors nouvelle, le BioID (Chapitre 2). L'idée était que d'utiliser le BioID nous permettrait d'identifier les protéines interagissant de manière stable mais aussi celles interagissant faiblement et/ou transitoirement avec Vpr et qui sont majoritairement non-identifiées dans les approches d'AP-MS (730). La force de cette approche est de marquer *in*

*cellulo* les protéines à proximité de la protéine d'intérêt et de les identifier par spectrométrie de masse. L'utilisation de l'approche BioID, nous a permis d'identifier 352 cibles ou partenaires potentiels de Vpr. L'analyse a été validée par la présence de nombreux partenaires (DCAF1 et DDB1 (550-552)), et cibles (UNG (652, 659, 662), EXO1 (610), DICER1 (714) ou encore des composantes du complexe SMN (689, 690)) connus de Vpr. L'une des forces de l'approche BioID est de pouvoir identifier des réseaux de partenaires à proximité de la protéine de fusion et notre analyse en présente en effet. Nous retrouvons notamment les complexes APC/C (Chapitre 3), SMN, ORC, CCR4-NOT ainsi que des réseaux correspondant aux centrosomes (Chapitre 4), au spliceosome, aux polymérases ou encore aux complexes Polycomb. De manière intéressante, parmi les 352 cibles ou partenaires potentiels identifiés dans nos analyses de BioID, conduites dans des modèles de cellules HEK293 et HeLa, 152 avaient déjà été identifiées par des approches d'AP-MS (640, 689), conduites dans des modèles de HEK293 et de Jurkat (des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en culture cellulaire). L'utilisation de l'approche BioID a donc permis d'obtenir 200 protéines qui n'avaient alors pas été identifiées précédemment par les approches classiques d'AP-MS. Ces résultats suggèrent que parmi ces protéines, certaines interagissent probablement faiblement ou transitoirement avec Vpr. C'est là une autre force de l'approche BioID.

Alors que l'attention scientifique des 15-20 dernières années dans le domaine semblait principalement centrée sur les voies de réponse et de réparation des dommages à l'ADN ainsi que sur le cycle cellulaire, nos résultats suggèrent que Vpr pourrait exploiter de nombreuses autres voies cellulaires. En effet, en plus des deux voies précédemment mentionnées, nous avons retrouvé de nombreuses protéines impliquées notamment dans les mécanismes de régulation épigénétique, des ARNs, des microtubules et du cytosquelette ou encore du transport nucléaire. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études rapportant des activités de Vpr dans ces mécanismes de régulation (224, 249, 293, 300-302, 304, 563, 586-589, 619, 638, 679-681, 683, 684, 690, 714, 716, 1051). Comme mentionné précédemment, des résultats récemment publiés par le groupe du Dr Paul J. Lehner valident que l'effet de Vpr est un effet global sur le protéome cellulaire et que Vpr modulerait environ 2 000 protéines lors de l'infection par le VIH-1 (690). Les conclusions de cette analyse ainsi que de la nôtre est qu'il y a encore beaucoup à comprendre sur cette protéine virale et qu'il serait probablement judicieux d'utiliser des approches globales pour

déterminer les mécanismes d'action de Vpr. En ce sens, choisir judicieusement les candidats à détailler en croisant les différentes analyses de SILAC (639, 690), d'AP-MS (640, 689), de BioID (Chapitre 3) et éventuellement même de transcriptomique (1052-1055) ou d'approche de déplétion par siRNA (950-952, 1056), pourrait permettre d'identifier des facteurs contribuant aux diverses activités de Vpr. Avec le recul, il serait cependant surprenant que les activités de Vpr, notamment celles d'arrêt du cycle cellulaire et d'avantage réplcatif, soient le fruit de la dégradation par Vpr d'une seule protéine ou d'un seul complexe.

## **1.2. Identification de la sous-unité APC1 du complexe APC/C comme une cible de la protéine Vpr du VIH-1**

### **1.2.1. Résumé des résultats**

Étant nous même dans la course à la recherche de nouvelles cibles pouvant expliquer les phénotypes attribués à cette protéine virale, il semblait alors logique d'étudier la relation entre la protéine virale Vpr et le complexe APC/C, particulièrement étant donné l'importance de ce complexe pour la régulation du cycle cellulaire. J'ai donc fait la démonstration que Vpr formait un complexe avec le complexe APC/C, incluant notamment : APC1 et les coactivateurs CDH1 et CDC20, et que la formation de ce complexe induisait la dégradation protéasomale de la sous-unité APC1 (Chapitre 3). J'ai également démontré que le recrutement d'un complexe composé de DCAF1, très fort probablement Cul4a-DDB1-DCAF1, par Vpr était essentiel à l'activité de dégradation d'APC1 médiée par Vpr, mais facultative pour la formation du complexe Vpr-APC1. De manière intéressante, le variant de Vpr provenant du clone moléculaire NL4.3 n'est pas capable de médier la dégradation d'APC1 et cette perte d'activité a été reliée à une double-mutation N28S-G41N présente chez le Vpr NL4.3 en comparaison au variant Vpr provenant du clone moléculaire Bru. Le fait que la combinaison des acides aminés N28 et G41 est prédite pour être conservée chez  $\approx 20\%$  des variants de Vpr, laisse penser que ces résidus pourraient contribuer à un certain point à la pathogénèse virale. Cependant, l'introduction des mutations N28S-G41N dans le virus ne semble pas avoir un effet flagrant sur la réplcation virale lors de l'infection de macrophages.



### **1.2.2. Voies de réponses aux dommages à l'ADN et activité d'arrêt du cycle cellulaire de la protéine Vpr du VIH-1**

Le complexe APC/C a notamment été associé aux voies de réponses aux dommages à l'ADN et pourrait orienter le choix de la réponse enclenchée lors de dommages (783, 785, 794, 848). Il a notamment été démontré que l'activation de la kinase CHK1 permettait le recrutement du complexe APC/C<sup>CDH1</sup> aux sites de dommages afin de favoriser la réparation par HR durant les phases S/G2 (851, 852). Au contraire, il a également été proposé que le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> cible des protéines clef de la HR pour favoriser la NHEJ en G0/G1 (850, 853, 854). Enfin, le complexe APC/C semble réguler et être régulé par 53BP1, un déterminant de la NHEJ (855). Ces exemples démontrent l'importance d'APC/C dans les mécanismes de réponse une fois les dommages détectés. Il semblerait que le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> puisse aussi activer l'axe ATR-CHK1. En effet la déplétion du coactivateur CDH1 par des approches d'interférence à ARN augmente la phosphorylation et promeut la formation de foci de H2AX (1057, 1058), puis la phosphorylation de CHK1 (783, 1059). Étant donné que l'activité d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr est dépendante de l'activation de la kinase ATR (565-568), que la déplétion de CDH1 activerait ce mécanisme et que le complexe APC/C est un régulateur essentiel du cycle cellulaire on aurait pu s'attendre à ce que la dégradation d'APC1 par Vpr et son activité sur le cycle cellulaire soient deux activités de Vpr reliées l'une à l'autre. Ceci ne semblerait cependant pas être le cas. Cette conclusion est soutenue par le fait que les variants NL4.3 et Bru induisent tous deux un arrêt du cycle cellulaire et que le transfert des mutations N28S-G41N, responsable de la perte d'activité de dégradation d'APC1, dans le variant Bru n'induit pas de variation dans la capacité de Vpr à médier un arrêt du cycle cellulaire; mais aussi par le fait que les mutants S79A et R80A de Vpr sont capables de médier la dégradation d'APC1 mais n'induisent pas d'arrêt du cycle cellulaire comme le fait Vpr dans les cellules humaines.

Une étude récemment publiée, sans révision par les pairs, laisse penser que Vpr (LAI) pourrait inhiber la réparation des dommages à l'ADN par les voies HR et NHEJ (1060). Cette même étude a été publiée, avec révision par les pairs, durant la révision de cette thèse (1061). Comme introduit précédemment, étant donné l'implication du complexe APC/C dans les voies de réparation des dommages à l'ADN, il serait intéressant de valider si la double mutation

N28S-G41N pourrait affecter cette activité de Vpr. En effet, le variant LAI de Vpr est également capable de médier la dégradation d'APC1 (Chapitre 3) et possède la combinaison de résidus N28-G41 identique au variant Bru. Si la dégradation d'APC1 médiée par Vpr est importante pour cette activité de diminution des voies de réparation de l'ADN, l'introduction des mutations N28S-G41N dans LAI devrait alors induire une perte de cette fonction de Vpr. De manière intéressante, cette activité de Vpr sur la HR n'a pas été observée, par un autre groupe (1062), dans un contexte d'infection avec le virus provenant du clone moléculaire NL4.3 et encodant donc pour le variant NL4.3 de Vpr, incapable de médier la dégradation d'APC1 dans notre système. Bien qu'il soit impossible d'exclure les variations liées aux systèmes utilisés dans les deux études précédemment citées, ces observations suggèrent une corrélation, du moins génétique, avec l'activité de Vpr sur APC/C.

Concernant le mutant N28S-G41N de Vpr, il n'est pas clair si ce mutant qui n'induit pas la dégradation d'APC1 a seulement perdu sa capacité de former un complexe avec APC1 ou si ce mutant forme un complexe mais n'induit pas la dégradation de la protéine APC1. Le fait de retrouver des composantes du complexe APC/C dans les analyses d'une approche AP-MS effectuée avec le variant de Vpr NL4.3 (640), semblerait indiquer que ce variant est capable de former un complexe avec APC/C mais en n'induisant pas la dégradation d'APC1. Ce manque d'information limite également l'interprétation de certains résultats précédemment introduits, car il se pourrait que Vpr forme un complexe avec APC/C sans dégrader APC1 mais en inactivant tout de même le complexe APC/C. C'est ce que fait par exemple la protéine PACR du virus ORF qui compétitionne avec APC1 pour inactiver le complexe sans induire la dégradation des sous-unités (887, 888), ou encore les pseudo-substrats EMI1 (765, 796) et MCC (845, 846). En ce sens, j'ai noté la présence d'une boîte de destruction (RxxLxxL) très conservée sur la séquence de Vpr (Annexe 1), il s'agit-là d'un motif typique des substrats des complexes APC/C (758, 1063). Notons que ce motif (fpR<sup>36</sup>PWL<sup>39</sup>HGL<sup>42</sup>gq) contient de nombreux acides aminés aromatiques, des conditions pas nécessairement optimales mais dont certaines combinaisons ont été retrouvées chez d'autres substrats d'APC/C, incluant Cycline B1 (756, 757), le récepteur au glutamate 1 (1064), la protéine DVL1L1 (1065), la protéine TEX14 (1066). Également, ce domaine contient l'acide aminé Glu41 qui est l'un des deux acides aminés définis comme essentiels à la dégradation

d'APC1 médiée par Vpr. Notons enfin que ce motif est localisé à la fin de la région flexible et au début de la seconde hélice  $\alpha$  (acides aminés 38 à 50) de Vpr, ce qui en fait une région relativement exposée. L'idée est donc que différents variants de Vpr utilisent des mécanismes différents afin de moduler le complexe APC/C; notamment 1) en formant un complexe avec APC/C et induisant la dégradation d'APC1 en recrutant le complexe DCAF1 comme le fait le variant Bru; et éventuellement 2) en formant un complexe avec APC/C et le verrouillant comme un pseudo-substrat en induisant un changement conformationnel du complexe par exemple, sans recruter le complexe DCAF1, comme pourrait éventuellement le faire le variant NL4.3. Notons encore une fois que des composantes du complexe APC/C ont été retrouvées dans des analyses AP-MS effectuées avec le variant de Vpr NL4.3 (640). Pour ces raisons, je pense qu'il serait important de vérifier si le mutant N28S-G41N et/ou NL4.3 sont capables de former un complexe avec APC/C. Le cas échéant, il serait important d'effectuer des mutations au niveau du motif RxxLxxL afin de valider l'importance de ce dernier pour la formation du complexe éventuel. Si ce motif RxxLxxL permet à certains variants de Vpr d'agir comme des pseudo-substrats, alors il faudrait valider quel complexe APC/C est ciblé. Comme le complexe ne serait pas déstructuré dans ce cas éventuel, une approche biochimique de chromatographie d'exclusion stérique pourrait être utilisée et permettrait d'identifier le ou les coactivateur(s) présent(s) au sein du complexe APC/C-Vpr. Toutefois, cette expérience serait limitée par l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M induit par Vpr et il faudrait alors procéder soit avant l'obtention de l'arrêt du cycle, soit dans un contexte de cellules synchronisées en G1 puis en G2 afin de regarder spécifiquement à la liaison de Vpr avec APC/C<sup>CDH1</sup> ou APC/C<sup>CDC20</sup> respectivement.

J'ai précédemment démontré que les mutations S79A et R80A de Vpr n'affectaient pas la capacité de Vpr à induire la dégradation d'APC1. De manière intéressante, ces mutations qui sont responsables d'une perte de l'activité d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr dans les cellules humaines, ne semblent pas induire cette perte d'activité dans des modèles de levures (1067, 1068). De plus, étant donné que DCAF1 n'est pas exprimé chez la levure et que Vpr n'est pas capable de lier DDB1 dans ce modèle, les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire dans les levures et dans les cellules humaines semblent différents (550, 558). Il pourrait donc être intéressant de valider l'importance d'APC/C dans l'activité d'arrêt du cycle cellulaire médiée par Vpr dans des modèles de levures car

nous n'avons pas exclu la possibilité que Vpr puisse inactiver le complexe APC/C sans le dégrader, notamment chez la levure. La relation entre APC/C et Vpr pourrait donc éventuellement expliquer l'activité d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr dans ce modèle particulier.

### **1.2.3. La relation entre le complexe APC/C et la protéine Vpr du VIH-1 dans le contexte de la rétrotranscription**

Le complexe APC/C étant un complexe d'E3 ubiquitine ligase, on pourrait s'attendre à ce qu'en le ciblant, Vpr augmente les niveaux des substrats d'APC/C. Comme discuté dans le Chapitre 3, nous retrouvons deux enzymes clés de la voie de synthèse des dTTPs, soit TK1 et TMPK, parmi les substrats d'APC/C (826-828). Ceci est particulièrement intéressant car le VIH-1 est abondamment uracilé lors de l'infection des macrophages, notamment car ceux-ci ont de faibles niveaux de dTTP et que la transcriptase inverse peut intégrer accidentellement les dUTPs à défaut des dTTPs durant la synthèse de l'ADN viral (646, 647, 650). En ciblant APC/C, Vpr pourrait ainsi augmenter les niveaux de TK1 et de TMPK, prévenant alors l'uracilation du génome viral durant la rétrotranscription. Ce mécanisme serait alors complémentaire aux effets d'UNG2, qui excise les uraciles intégrés à l'ADN viral lors de la RT (644, 653, 655, 656, 658); et de dégradation d'APOBEC3F/G par Vif et Vpr, prévenant la désamination des cytosines (422-425, 660). Afin de valider cette hypothèse, il faudrait tout d'abord valider que les niveaux de TK1 et de TMPK sont augmentés durant l'infection de macrophages par des virus encodant un variant de Vpr capable ou non de médier la dégradation d'APC1. Si l'hypothèse est vraie alors on s'attendrait à voir une augmentation des niveaux protéiques de TK1 et de TMPK par le virus encodant un Vpr capable de médier la dégradation d'APC1 mais pas dans le cas de l'autre virus. Gardons cependant en tête un éventuel effet confondant de Vif qui pourrait également jouer sur le complexe APC/C *via* PP2A (voir la discussion du chapitre 3 ou la section 1.2.5 de la présente discussion). De manière intéressante, deux analyses de SILAC semblent indiquer que les niveaux de TK1 sont augmentés en présence de Vpr (variant NL4.3) dans des contextes d'infection ou de transduction de cellules T CD4<sup>+</sup> (639, 690).

#### **1.2.4. Est-ce que Vpr dégrade APC1 pour permettre l'exploitation du complexe SCF par le VIH-1 ?**

Le complexe APC/C et le complexe SCF sont les deux régulateurs principaux du cycle cellulaire. Ces complexes se régulent l'un et l'autre (833). APC/C médi la dégradation de plusieurs protéines contenant des boîtes F, incluant notamment SKP2, FBXW5, NIPA ou encore la protéine CKS1 (782, 798, 812, 825). De l'autre côté, SCF<sup>β-TrCP</sup> dégrade EMI1 et active ainsi APC/C (796, 842, 843). Bien qu'il n'ait pas été rapporté qu'APC/C pourrait dégrader β-TrCP, deux boîtes D putatives sont présentes dans la séquence de cette protéine : caR<sup>85</sup>LCL<sup>88</sup>nq et cgR<sup>290</sup>HSL<sup>293</sup>QRI<sup>296</sup>hc. Étant donné que la protéine virale Vpu recrute le complexe SCF<sup>β-TrCP</sup> notamment pour dégrader le facteur de restriction BST-2 (491, 493), si β-TrCP est un substrat d'APC/C alors on pourrait penser que Vpr pourrait cibler APC/C pour maintenir des niveaux stables de β-TrCP et ainsi permettre à Vpu d'exploiter le complexe d'E3 ubiquitine ligase SCF<sup>β-TrCP</sup>.

#### **1.2.5. Le complexe APC/C est-il un complexe ciblé par deux protéines du VIH-1?**

Dans cette thèse, j'ai démontré que Vpr ciblait le complexe APC/C et induisait la dégradation d'au moins APC1. De manière extrêmement intéressante, il a récemment été rapporté que la protéine accessoire Vif induisait la dégradation de la sous-unité régulatrice B56 de la phosphatase PP2A; une condition responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M médié par Vif (452, 453). Bien que le lien avec APC/C n'a pas été établi dans ces publications, il est bien connu que PP2A est un régulateur d'APC/C. En fait, en liant APC1, PP2A-B56 permet le recrutement du coactivateur CDC20 et l'activation du complexe APC/C<sup>CDC20</sup>, permettant ainsi le début de la phase de mitose (961, 1069). Notons que l'activité de Vif sur PP2A semble également corrélée avec une augmentation des niveaux de Cycline B1 (453); une cible bien connue d'APC/C (789). L'importance d'APC/C dans le cadre de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M médiée par Vif pourrait donc être un élément critique de ce phénotype. Il se pourrait donc qu'en plus de Vpr qui dégrade APC1, une sous-unité de la plateforme du complexe APC/C, Vif soit capable d'inhiber le recrutement de CDC20 et donc l'activation du complexe APC/C<sup>CDC20</sup>. Cette possibilité complexifierait davantage l'analyse des résultats de réplication durant l'infection des macrophages car il se pourrait que la contribution de Vif balance pour la perte d'activité de Vpr dans le contexte du double-mutant. Gardons toutefois en tête les mutants de Vpr S79A et R80A

dont la réplication est altérée durant l'infection de macrophages (570) et qu'il est possible que certains variants de Vpr n'induisent pas la dégradation d'APC1. La possibilité que le VIH-1 utilise deux protéines accessoires pour moduler les activités du complexe APC/C est néanmoins indicative d'une importance de ce complexe pour la réplication du VIH-1.

La redondance des fonctions semble être une chose relativement fréquente parmi les protéines accessoires du VIH. C'est par exemple le cas pour Vpu et Nef qui ciblent toutes deux CD4 (461-464, 469, 470), Vpr et Vpx qui recrutent toutes deux le complexe Cul4-DDB1-DCAF1 (550-553, 555), ou encore de Vif et Vpr qui ont été rapportées pour médier la dégradation d'APOBEC3G (422, 423, 425, 660). L'idée que Vpr et Vif soient toutes les deux capables de moduler les activités d'APC/C est donc séduisante. Sachant que PP2A promeut la formation du complexe APC/C<sup>CDC20</sup> en stimulant la formation de ce complexe, il serait intéressant de voir si Vif module la quantité de CDC20 présent sous forme de complexe avec APC/C au moyen, par exemple, d'approche d'immunoprécipitation (1069). Si l'effet de Vif sur PP2A et son activité sur le cycle cellulaire sont reliés au complexe APC/C<sup>CDC20</sup>, alors on pourrait s'attendre à retrouver une moindre quantité de CDC20 en complexe avec APC/C en présence de Vif. Une fois ce point validé, je pense qu'il serait important d'étudier la conservation des activités de Vpr (sur APC1) et de Vif (sur PP2A) parmi les différentes souches primaires de VIH-1 ainsi que du VIH-2 et des VISs. Je pense que cette analyse phylogénétique pourrait être critique afin de mieux comprendre l'importance pour le virus de cibler les complexes APC/C. Si la présence de ce complexe dans la cellule est d'une façon ou d'une autre nuisible à la réplication virale, alors on pourrait prédire un haut niveau de conservation des activités anti-APC/C du virus. Dans l'éventualité où Vpr et Vif auraient toutes les deux un rôle à jouer contre APC/C, alors il serait intéressant de procéder à l'infection de MDMs avec des virus ayant des substitutions dans Vpr (N28S-G41N) et/ou Vif (I31V-R33G (452)) qui les rendent incapables de médier les dégradations respectives d'APC1 ou de PP2A. Si APC/C joue rôle négatif dans la réplication virale alors on pourrait s'attendre à avoir une diminution de l'infection avec les virus possédant les substitutions précédemment nommées.

### 1.3. Recrutement des complexes d'E3 ubiquitine ligase par Vpr

Le recrutement du complexe Cul4-DDB1-DCAF1 par Vpr est bien caractérisé (550-552, 555, 559, 560, 562). De manière intéressante, il semblerait que Vpr soit capable de recruter au moins un autre complexe d'E3 ubiquitine ligase, EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> (563, 564, 713, 1031), pour dégrader les protéines TERT et CP110 (563, 564, 713). Étant donné que la protéine DCAF1 est présente à la fois dans EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> mais aussi dans le complexe Cul4a-DDB1-DCAF1, on pourrait se demander si les autres cibles connues de Vpr sont vraiment ciblées par ce dernier complexe. En effet, certaines études présentant Cul4a-DDB1-DCAF1 comme l'E3 ubiquitine ligase recrutée par Vpr pour induire la dégradation d'une cible démontrent principalement que la déplétion de DCAF1 ou de DDB1, par des approches de siRNAs, corrèle avec une augmentation des niveaux de la cible en présence de Vpr; et/ou que DCAF1 et DDB1 sont retrouvés dans un complexe avec Vpr et la cible. Cependant étant donné que DCAF1 et DDB1 sont retrouvés dans les deux complexes d'E3 ubiquitine ligase, il se pourrait que certaines conclusions soient erronées et que le complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> soit davantage impliqué. La différence majeure entre ces deux complexes d'E3 ligase est la présence/absence de Cul4 ainsi que la neddylation du complexe Cul4a-DDB1-DCAF1, nécessaire à son activation (1030, 1031, 1070-1073). Dans notre cas, l'utilisation du MLN4924, un inhibiteur de la neddylation (1074), nous a permis d'observer que ce mécanisme était important dans l'activité de dégradation d'APC1 par Vpr. Ceci laisse penser que le complexe Cul4a-DDB1-DCAF1 est fort probablement impliqué dans ce mécanisme. Nous ne pouvons cependant pas exclure complètement une implication éventuelle du complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup>, particulièrement au niveau des centrosomes. De manière générale, il serait mécanistiquement intéressant de valider si le paralogue de Vpr, Vpx, a également la capacité de manipuler le complexe EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> en plus du complexe Cul4a-DDB1-DCAF1, afin de vérifier s'il s'agit-là d'une activité acquise ou conservée durant l'évolution. Notons que cette activité de Vpr sur EDD-DYRK2-DDB1<sup>DCAF1</sup> ne semble pas liée à l'activité d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr et que son importance dans la pathogénèse du VIH-1 reste à être déterminée.

## 2. Limites et perspectives des approches protéomiques

### 2.1. Les limites principales du BioID

Comme mentionné précédemment, la force de l'approche BioID est de marquer *in cellulo* les protéines à proximité de la protéine d'intérêt et de les identifier par spectrométrie de masse. L'une des faiblesses du BioID est que les protéines identifiées peuvent ne pas être à proximité de la protéine de fusion de manière spécifique mais plutôt se trouver malencontreusement dans le diamètre approximatif de 10 nm de biotine réactive présent autour de la protéine de fusion. Comme pour toutes les autres approches protéomiques utilisant la spectrométrie de masse, la validation de l'interaction entre la protéine d'intérêt et la protéine cible est donc une étape critique à l'identification du partenaire. Une autre limite du BioID est que des défauts de localisation et d'activité peuvent être observés dans le contexte des protéines de fusion, cet obstacle est bien connu de l'approche BioID (733, 1075). Dans notre cas, la fusion de la biotine ligase BirA1\* en N-terminal de Vpr est problématique pour au moins deux raisons : 1) la fusion altère grandement, de l'ordre de 90%, l'activité d'arrêt du cycle cellulaire en G2/M associée à Vpr; et 2) la fusion induit un changement de localisation de Vpr. Cependant, l'arrêt de cycle résiduel et la localisation partielle de la protéine de fusion BirA1\*-Flag-Vpr au noyau, nous a permis de générer une analyse des réseaux à proximité de Vpr intéressante et pertinente dans le contexte de Vpr. Nous avons de plus validé l'approche en rapportant la présence de partenaires et cibles de Vpr dans l'analyse, en plus de valider biochimiquement l'interaction entre APC/C et Vpr.

L'altération des activités de Vpr dans la protéine de fusion peut probablement être expliquée par la petite taille de Vpr ( $\approx 14$  kDa) comparativement à la taille de BirA1\* ( $\approx 35$  kDa). Des altérations des activités de Vpr dans le contexte de protéines de fusion ont également été rapportées dans le passé. Par exemple, la fusion de la luciférase ( $\approx 60$  kDa) à l'extrémité N-terminale de Vpr relocalise la protéine dans le cytoplasme et induit une perte de son activité d'arrêt de cycle (296). Il a également été démontré que la fusion de GFP ( $\approx 28$  kDa) en N-terminal de Vpr localisait correctement au noyau, tandis que la fusion en C-terminal de Vpr relocalisait la protéine au niveau du cytoplasme et de la membrane nucléaire. Dans les deux cas, la fusion de GFP à Vpr rendait la protéine incapable de médier un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (744). Il a



enfin été noté que la fusion de la chloramphénicol acétyltransférase ( $\approx 27$  kDa) aux extrémités N- ou C-terminales de Vpr induisait également une perte de l'activité d'arrêt de cycle de la protéine (1076, 1077).

## 2.2. Perspectives concernant les analyses protéomiques

Plusieurs nouvelles générations de BioID ont récemment été développées et pourraient être utilisées en alternative à l'approche classique. Branon et al. ont développé deux nouvelles enzymes dont les capacités de biotinylation ont été améliorées (735). L'utilisation de ces approches pourraient être une bonne alternative à la condition six heures que nous avons utilisé. Elles permettraient notamment d'identifier plus facilement le réseau d'interaction de partenaires de proximité de Vpr à des temps réduits. Cependant, étant donné que ces versions ont été développées en utilisant les versions de premières générations (BirA1 et BirA2) et que ces dernières inhibent grandement l'activité d'arrêt de cycle de Vpr (Chapitre 2), il serait donc surprenant qu'elles permettent à Vpr de médier cette activité dans un contexte de fusion. Une autre alternative, plus prometteuse, serait d'utiliser l'approche de *split-BioID* (745). Cette approche est basée sur la séparation de BirA1\*, entre les acides aminés E256 et G251, en deux fragments capables de reformer une enzyme fonctionnelle en interagissant ensemble (745). Étant donné les tailles de Vpr et de DCAF1, respectivement d'environ 14 et 170 kDa, nous pourrions penser à fusionner le fragment C-terminal de BirA1\* ( $\approx 10$  kDa) à l'extrémité N-terminale de Vpr et le fragment N-terminal de BirA1\* ( $\approx 25$  kDa) à DCAF1. Sachant que la fusion de l'étiquette TAP ( $\approx 21$  kDa) à l'extrémité N-terminale de Vpr, permet de conserver une activité d'arrêt du cycle cellulaire (550), la fusion du fragment C-terminal de BirA1\* à Vpr devrait permettre l'obtention d'une protéine de fusion au moins partiellement fonctionnelle. L'interaction entre Vpr et de DCAF1 permettrait de reconstruire l'enzyme BirA1\* et ainsi d'obtenir un réseau de partenaire à proximité de Vpr plus raffiné.

Comme mentionné précédemment, en utilisant une approche de SILAC, le groupe du Dr Paul J. Lehner a démontré que Vpr induisait la modulation d'environ 2 000 protéines lors de l'infection par le VIH-1 de cellule lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en culture (690). Cette approche de SILAC ne permet cependant pas d'identifier les complexes protéiques qui sont déstructurés, et donc

inactivés, en présence de Vpr. À *contrario*, l'approche BioID permet bien d'identifier les complexes étant à proximité de Vpr mais ne permet pas, sans expériences complémentaires, de valider que ces complexes sont en effet déplétés en présence de la protéine. Une approche de protéomique qui permettrait d'identifier les complexes protéiques dégradés et déstructurés en présence de Vpr est l'approche de profilage de corrélation des protéines (*protein correlation profiling*; PCP). Cette approche développée au début des années 2000 est essentiellement basée sur l'approche SILAC (1011, 1078). La différence majeure réside dans le fait qu'une fois les protéines cellulaires marquées, les lysats cellulaires seront fractionnés au moyen d'une chromatographie à exclusion de taille (1079). Se faisant, il sera possible de déterminer quels seront les complexes protéiques présents/absents dans chaque fraction et ainsi de déterminer quels complexes protéiques sont déstabilisés ou déplétés en présence de Vpr.

Parmi les limites de notre approche, nous retrouvons également le fait que nous avons analysé le réseau de partenaires à proximité de Vpr dans des conditions non physiologiques, en surexpression et dans des modèles cellulaires de HEK293 et HeLa; et à des temps relativement longs (après 6 et 24 heures d'induction). Malgré la complexité technique, il serait vraiment intéressant d'analyser l'effet de Vpr notamment par l'approches AP-MS directement dans les macrophages ou dans des lignées cellulaires équivalentes. On pourrait par exemple encapsider HA-Vpr durant la production virale de virus déficients pour Vpr et encodant GFP, puis analyser les partenaires de Vpr dans des cellules triées pour exprimer ou non GFP à deux jours après l'infection. Ceci nécessiterait une quantité importante de cellules et l'utilisation de tri cellulaire mais permettrait de gagner en spécificité par rapport aux candidats qui seront alors identifiés. Sachant que Vpr est une protéine virale encapsidée, qu'elle est retrouvée dans le complexe de pré-intégration et que certaines activités peuvent être induites par elle lorsqu'elle est encapsidée, il serait également intéressant d'analyser ses partenaires et ses effets précoces sur le protéome cellulaire. Pour cela, on pourrait par exemple penser à des expériences de type AP-MS ou SILAC en présence de virus ayant une mutation dans l'intégrase (*e.g.* D64A) et qui sont capables d'entrer dans la cellule, de rétrotranscrire leur ARN mais qui ne peuvent pas s'intégrer dans le génome cellulaire. Ceci permettrait ainsi d'éliminer la confondante de Vpr néosynthétisé et de regarder uniquement à l'effet des protéines encapsidées.

## 2.2. Perspectives sur les candidats identifiés par l'approche BioID

L'analyse BioID nous a permis d'identifier de nombreux complexes ou réseaux à proximité de Vpr. Pour les raisons mentionnées précédemment nous avons décidé d'analyser la relation entre le complexe APC/C et Vpr, mais bien d'autres peuvent être intéressants à analyser en profondeur. Parmi ceux-ci : le complexe SMN, le complexe CCR4-NOT ainsi que le complexe d'histone acétyltransférase NuA4 et les complexes Polycomb (PRC).

Le complexe SMN est important pour l'assemblage des petites ribonucléoprotéines nucléaires spliceosomales et l'épissage des ARNs messagers (691). Ce complexe a été très récemment validé comme étant une cible de Vpr et sa déplétion par des approche de shRNA semblerait induire une accumulation de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (689, 690). Ce complexe est particulièrement intéressant car il semblerait que l'intégrase soit capable d'interagir avec Gemin2, une sous unité du complexe et que la déplétion de Gemin2 diminue la RT durant l'infection de macrophage (692, 693). Il semblerait donc que cette protéine, et par extension possiblement le complexe SMN, joue un rôle précoce durant l'infection de macrophage, menant à se poser la question de savoir si ce complexe est encapsidé durant la production virale. De manière contrintuitive, ce complexe est également dégradé par Vpr, laissant suggérer qu'il pourrait aussi affecter des étapes tardives du cycle de réplication virale (690). Comme mentionné précédemment, le complexe SMN joue notamment un rôle dans les mécanismes d'épissage des ARNs messagers (691); le VIH étant un virus dont la régulation post-intégration dépend notamment de l'épissage (180, 181), il serait intéressant de valider l'effet de ce complexe sur l'épissage du virus. Étant donné que Vpr induit la dégradation de ce complexe (690), on pourrait spéculer que SMN régule indirectement l'épissage du VIH et qu'en modulant ce complexe Vpr limite cette activité. De manière intéressante, il semblerait que Vpr module différents facteurs importants dans le mécanisme d'épissage comme par exemple SAP145, SAP49; et que Vpr soit capable de moduler l'épissage viral mais aussi cellulaire (1080). Notons également que le spliceosome qui joue un rôle dans l'épissage des ARNs (1081), est un réseau que nous avons détecté à proximité de Vpr en utilisant l'approche BioID.

Le complexe CCR4-NOT possède notamment des activités de déadénylase et de 3'-5' exonucléase qui lui permettent d'être impliqué au niveau du contrôle de la qualité des ARNs

messagers (958). Il semble aussi jouer des rôles au niveau de la chromatine et moduler l'expression génique; mais aussi moduler l'initiation et l'élongation de la transcription ou encore l'export des ARNs messagers (1082). Ce complexe a été rapporté pour interagir avec une protéine liant l'ARN, appelée Tristetraprolin (1083). Cette protéine semble inhiber la production virale en liant l'ARN génomique du VIH (1084). Il est spéculé que le complexe CCR4-NOT pourrait recruter Tristetraprolin pour inhiber au niveau transcriptionnel le VIH (1085). De manière intéressante, il semblerait que l'expression de Tristetraprolin soit elle-même modulée par un mécanisme dépendant de micro-ARN durant l'infection par le SIV (1086). Pour ces raisons, il semblerait donc pertinent d'analyser la relation entre Vpr et CCR4-NOT. Un modèle dans lequel Vpr dégraderait CCR4-NOT pour augmenter l'expression du VIH-1 pourrait alors être proposé.

Les complexes NuA4 et PRC sont impliqués dans des mécanismes de régulation épigénétique (1087). De manière intéressante, il a été démontré que les complexes PRC étaient importants dans l'établissement et la maintenance de la latence du VIH-1 et que dépléter certaines composantes par des approches d'ARN interférence ou inhiber les complexes réactivait les virus latents (1088). Dans le cas du complexe NuA4, il a été rapporté que NuA4 pouvait augmenter la transcription à partir du LTR du VIH mais ces observations proviennent d'un système *in vitro* (1089). Il serait intéressant de valider cette activité lors de l'infection. La protéine Vpr a été rapportée pour dégrader la protéine CTIP2, un régulateur épigénétique, un mécanisme proposé pour permettre au virus d'éviter le mécanisme de latence et pour promouvoir la transcription virale et donc sa réactivation éventuelle le cas échéant (589). Également, il a récemment été rapporté que le complexe HUSH, un autre régulateur épigénétique, pouvait être dégradé par Vpx, le paralogue de Vpr, entraînant la réactivation virale dans des systèmes de latence (724, 725). Il serait donc intéressant de valider l'effet de Vpr sur les complexes NuA4 et PRC ainsi que les mécanismes éventuellement conséquents de réactivation du VIH.

Les cibles éventuelles discutées ici sont toutes plus intéressantes les unes que les autres. Un point que je pense important de rappeler et que Vpr a un effet majeur et global au niveau du protéome cellulaire. Considérant que cet effet de Vpr sur le protéome est probablement majoritairement indirect, il se pourrait que chacune de ces cibles ait le potentiel théorique

d'expliquer une partie de ces effets de Vpr et de contribuer aux activités de cette protéine énigmatique du VIH.

### **3. Conclusion et contributions de la thèse**

#### **3.1. Conclusion**

Cette thèse présente une exploration moléculaire des partenaires cellulaires de la protéine virale Vpr du VIH-1. L'utilisation de l'approche BioID, nous a permis d'identifier 200 nouvelles cibles potentielles de Vpr incluant de nombreux complexes cellulaires et réseaux de protéines dont : APC/C, ORC, les centrosomes, le spliceosome, CCR4-NOT, NuA4 ou PRC. Nous avons validé l'approche en choisissant de détailler la relation entre le complexe APC/C et Vpr, et avons démontré que Vpr induisait la dégradation d'APC1, une sous-unité essentielle à la structure du complexe APC/C. Nous avons ainsi défini APC1 comme une nouvelle cible de Vpr dont nous ne comprenons actuellement pas l'importance dans la pathogénèse du VIH-1.

Au-delà des nouvelles cibles potentielles de Vpr identifiées, l'approche BioID semble nous indiquer que Vpr pourrait avoir des activités additionnelles aux activités de régulation du cycle cellulaire et de dommages à l'ADN. Vpr pourrait notamment jouer au niveau de la régulation épigénétique, mais aussi au niveau de l'épissage ou encore du contrôle de la qualité des ARNs, et ce pour les gènes/ARNs cellulaires et/ou viraux. Ces activités potentielles de Vpr pourraient être importantes pour la pathogénicité du VIH-1.

Dans cette thèse, des travaux relatifs à l'activité de Vpr au niveau des centrosomes sont également présentés. Ces travaux qui ont été réalisés en grande majorité par Dr Delowar Hossain, sous la supervision du Dr William Tsang, démontrent que Vpr module l'homéostasie des centrosomes, notamment en induisant la dégradation de la protéine centrosomale CP110. L'importance de cette activité de Vpr dans la pathogénèse du VIH-1 n'est pas comprise pour l'instant.

Les travaux présentés ici nous permettent de mieux comprendre les activités moléculaires de Vpr et ouvrent la voie à de nombreux axes de recherche possibles. L'activité globale de Vpr durant l'infection semble aller au-delà des activités d'arrêt du cycle cellulaire en G2/M dans les cellules cycliques et d'avantage répliatif dans les macrophages. Il reste beaucoup de travail à fournir afin de comprendre moléculairement parlant Vpr, ainsi que son rôle dans la pathogénèse du VIH-1.

### **3.2. Contributions de la thèse**

Les contributions scientifiques majeures des travaux présentés dans cette thèse sont :

- 1- Première utilisation de l'approche BioID afin d'identifier les partenaires cellulaires et réseaux de protéines à proximité de Vpr.
- 2- Identification de 200 nouvelles cibles potentielles de Vpr incluant de nombreux complexes protéiques et réseaux d'interaction. L'analyse inclut notamment les complexes et réseaux : APC/C, ORC, du centrosome, CCR4-NOT, du spliceosome, NuA4, du médiateur, de polymérase, Polycomb.
- 3- Identification d'APC1 comme une nouvelle cible de Vpr dont l'activité est conservée par des variants provenant d'isolats primaires mais non par celui provenant de l'isolat prototypique NL4.3.



## **Références bibliographiques**





1. Centers for Disease Control C. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30(25):305-8.
2. Kapadia SB, Krause JR. Kaposi's sarcoma after long-term alkylating agent therapy for multiple myeloma. *South Med J.* 1977;70(8):1011-3.
3. Vilaseca J, Arnau JM, Bacardi R, Mieras C, Serrano A, Navarro C. Kaposi's sarcoma and toxoplasma gondii brain abscess in a Spanish homosexual. *Lancet.* 1982;1(8271):572.
4. Rozenbaum W, Coulaud JP, Saimot AG, Klatzmann D, Mayaud C, Carette MF. Multiple opportunistic infection in a male homosexual in France. *Lancet.* 1982;1(8271):572-3.
5. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-71.
6. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224(4648):500-3.
7. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 1984;224(4648):497-500.
8. Vilmer E, Barre-Sinoussi F, Rouzioux C, Gazengel C, Brun FV, Dauguet C, et al. Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS. *Lancet.* 1984;1(8380):753-7.
9. Cohen J, Enserink M. Nobel Prize in Physiology or Medicine. HIV, HPV researchers honored, but one scientist is left out. *Science.* 2008;322(5899):174-5.
10. Pincock S. HIV discoverers awarded Nobel Prize for medicine. *Lancet.* 2008;372(9647):1373.
11. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* 1999;397(6718):436-41.

12. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006841.
13. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*. 2006;313(5786):523-6.
14. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009;15(8):871-2.
15. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol*. 2011;85(3):1403-7.
16. UNAIDS. UNAIDS data 2019; [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2019-UNAIDS-data\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2019-UNAIDS-data_en.pdf). 2019(dernier accès: 30-Janv-2020).
17. Centers for Disease Control C. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1982;31(48):652-4.
18. Curran JW, Lawrence DN, Jaffe H, Kaplan JE, Zyla LD, Chamberland M, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *N Engl J Med*. 1984;310(2):69-75.
19. Feorino PM, Jaffe HW, Palmer E, Peterman TA, Francis DP, Kalyanaraman VS, et al. Transfusion-associated acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for persistent infection in blood donors. *N Engl J Med*. 1985;312(20):1293-6.
20. Peterman TA, Stoneburner RL, Allen JR, Jaffe HW, Curran JW. Risk of human immunodeficiency virus transmission from heterosexual adults with transfusion-associated infections. *JAMA*. 1988;259(1):55-8.
21. Holmberg SD, Horsburgh CR, Jr., Ward JW, Jaffe HW. Biologic factors in the sexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 1989;160(1):116-25.
22. Alexander NJ. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. World Health Organization, Global Programme on Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Fertil Steril*. 1990;54(1):1-18.

23. Ryder RW, Nsa W, Hassig SE, Behets F, Rayfield M, Ekungola B, et al. Perinatal transmission of the human immunodeficiency virus type 1 to infants of seropositive women in Zaire. *N Engl J Med.* 1989;320(25):1637-42.
24. Conant M, Hardy D, Sernatinger J, Spicer D, Levy JA. Condoms prevent transmission of AIDS-associated retrovirus. *JAMA.* 1986;255(13):1706.
25. Kelly JA, St Lawrence JS. Cautions about condoms in prevention of AIDS. *Lancet.* 1987;1(8528):323.
26. Desai M, Field N, Grant R, McCormack S. Recent advances in pre-exposure prophylaxis for HIV. *BMJ.* 2017;359:j5011.
27. Youle M, Wainberg MA. Pre-exposure chemoprophylaxis (PREP) as an HIV prevention strategy. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic).* 2003;2(3):102-5.
28. Martin JN, Roland ME, Neilands TB, Krone MR, Bamberger JD, Kohn RP, et al. Use of postexposure prophylaxis against HIV infection following sexual exposure does not lead to increases in high-risk behavior. *AIDS.* 2004;18(5):787-92.
29. Kashuba AD, Patterson KB, Dumond JB, Cohen MS. Pre-exposure prophylaxis for HIV prevention: how to predict success. *Lancet.* 2012;379(9835):2409-11.
30. Veronese F, Anton P, Fletcher CV, DeGruttola V, McGowan I, Becker S, et al. Implications of HIV PrEP trials results. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(1):81-90.
31. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(4):a007161.
32. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N Engl J Med.* 2016;375(9):830-9.
33. Samji H, Cescon A, Hogg RS, Modur SP, Althoff KN, Buchacz K, et al. Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada. *PLoS One.* 2013;8(12):e81355.

34. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(13):853-60.
35. Hogg RS, Eyawo O, Collins AB, Zhang W, Jabbari S, Hull MW, et al. Health-adjusted life expectancy in HIV-positive and HIV-negative men and women in British Columbia, Canada: a population-based observational cohort study. *Lancet HIV*. 2017;4(6):e270-e6.
36. Gueler A, Moser A, Calmy A, Gunthard HF, Bernasconi E, Furrer H, et al. Life expectancy in HIV-positive persons in Switzerland: matched comparison with general population. *AIDS*. 2017;31(3):427-36.
37. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*. 2016;530(7588):51-6.
38. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003;9(6):727-8.
39. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278(5341):1295-300.
40. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13193-7.
41. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 1997;278(5341):1291-5.
42. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387(6629):183-8.

43. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999;5(5):512-7.
44. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med.* 2000;6(1):82-5.
45. Gupta RK, Gregson J, Parkin N, Haile-Selassie H, Tanuri A, Andrade Forero L, et al. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):346-55.
46. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs.* 2012;72(9):e1-25.
47. Neumann AU, Tubiana R, Calvez V, Robert C, Li TS, Agut H, et al. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. Comet Study Group. *AIDS.* 1999;13(6):677-83.
48. Garcia F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS.* 1999;13(11):F79-86.
49. Zaccarelli M, Santoro MM, Armenia D, Borghi V, Gennari W, Gori C, et al. Genotypic resistance test in proviral DNA can identify resistance mutations never detected in historical genotypic test in patients with low level or undetectable HIV-RNA. *J Clin Virol.* 2016;82:94-100.
50. Turriziani O, Bucci M, Stano A, Scagnolari C, Bellomi F, Fimiani C, et al. Genotypic resistance of archived and circulating viral strains in the blood of treated HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;44(5):518-24.
51. Meybeck A, Alidjinou EK, Huleux T, Boucher A, Tetart M, Choisy P, et al. Virological Outcome After Choice of Antiretroviral Regimen Guided by Proviral HIV-1 DNA Genotyping in a Real-Life Cohort of HIV-Infected Patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2020;34(2):51-8.

52. Huber M, Metzner KJ, Geissberger FD, Shah C, Leemann C, Klimkait T, et al. MinVar: A rapid and versatile tool for HIV-1 drug resistance genotyping by deep sequencing. *J Virol Methods*. 2017;240:7-13.
53. Gupta RK, Peppas D, Hill AL, Galvez C, Salgado M, Pace M, et al. Evidence for HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV*. 2020.
54. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019;568(7751):244-8.
55. Brown TR. I am the Berlin patient: a personal reflection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(1):2-3.
56. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-8.
57. Brown TR. The London Patient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2020;36(4):251-2.
58. Scarborough RJ, Goguen RP, Gatignol A. A second patient cured of HIV infection: hopes and limitations. *Virologie (Montrouge)*. 2019;23(3):1-4.
59. McDougal JS, Kennedy MS, Slish JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JK. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*. 1986;231(4736):382-5.
60. Maddon PJ, Dalglish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 1986;47(3):333-48.
61. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998;393(6686):648-59.

62. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312(5996):763-7.
63. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984;312(5996):767-8.
64. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S, et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature*. 1986;323(6090):725-8.
65. Korin YD, Zack JA. Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol*. 1998;72(4):3161-8.
66. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8.
67. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science*. 1996;271(5253):1291-3.
68. Rappersberger K, Gartner S, Schenk P, Stingl G, Groh V, Tschachler E, et al. Langerhans' cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology*. 1988;29(4):185-94.
69. Niedecken H, Lutz G, Bauer R, Kreysel HW. Langerhans cell as primary target and vehicle for transmission of HIV. *Lancet*. 1987;2(8557):519-20.
70. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med*. 1997;3(12):1369-75.



71. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*. 1992;257(5068):383-7.
72. Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell*. 1994;78(3):389-98.
73. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA. The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity*. 1994;1(4):317-25.
74. Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA. Cell-cell interactions regulate dendritic cell-dependent HIV-1 production in CD4+ T lymphocytes. *Adv Exp Med Biol*. 1995;378:461-3.
75. Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, Clark G, et al. HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood*. 2001;98(8):2482-8.
76. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol*. 2002;3(10):975-83.
77. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-97.
78. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2002;76(2):707-16.
79. Fulcher JA, Hwangbo Y, Zioni R, Nickle D, Lin X, Heath L, et al. Compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during infection. *J Virol*. 2004;78(15):7883-93.

80. Ellery PJ, Tippet E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, et al. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol.* 2007;178(10):6581-9.
81. Arfi V, Riviere L, Jarrosson-Wuilleme L, Goujon C, Rigal D, Darlix JL, et al. Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2008;82(13):6557-65.
82. Triques K, Stevenson M. Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *J Virol.* 2004;78(10):5523-7.
83. Dong C, Kwas C, Wu L. Transcriptional restriction of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in undifferentiated primary monocytes. *J Virol.* 2009;83(8):3518-27.
84. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):5215-20.
85. Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Foster J, Zakharova O, et al. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1353-66.
86. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, et al. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2009;83(7):3258-67.
87. Zalar A, Figueroa MI, Ruibal-Ares B, Bare P, Cahn P, de Bracco MM, et al. Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Res.* 2010;87(2):269-71.
88. Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science.* 1986;233(4760):215-9.
89. Baxter AE, Russell RA, Duncan CJ, Moore MD, Willberg CB, Pablos JL, et al. Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. *Cell Host Microbe.* 2014;16(6):711-21.

90. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest.* 1986;77(5):1712-5.
91. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science.* 1986;233(4768):1089-93.
92. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-59.
93. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science.* 1998;280(5362):427-31.
94. Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2003;187(5):769-76.
95. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(21):9838-42.
96. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996;272(5265):1167-70.
97. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-22.
98. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):123-6.
99. Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science.* 1996;274(5289):985-9.

100. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, Santiago ML, et al. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell*. 2010;143(5):789-801.
101. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*. 1995;1(2):129-34.
102. Jekle A, Keppler OT, De Clercq E, Schols D, Weinstein M, Goldsmith MA. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. *J Virol*. 2003;77(10):5846-54.
103. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995;375(6531):497-500.
104. Schindler M, Munch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*. 2006;125(6):1055-67.
105. Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol*. 1995;154(10):5555-66.
106. Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, Fauci AS, Orenstein JM. gp120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymph nodes of HIV-1-infected individuals: an immunoelectron microscopic study. *AIDS*. 1997;11(1):27-32.
107. Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, et al. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med*. 1998;187(8):1295-303.
108. Fleury S, de Boer RJ, Rizzardì GP, Wolthers KC, Otto SA, Welbon CC, et al. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med*. 1998;4(7):794-801.

109. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*. 2000;95(1):249-55.
110. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*. 2003;17(13):1881-8.
111. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278(5342):1447-50.
112. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505(7484):509-14.
113. Luo X, Herzig E, Doitsh G, Grimmatt ZW, Munoz-Arias I, Greene WC. HIV-2 Depletes CD4 T Cells through Pyroptosis despite Vpx-Dependent Degradation of SAMHD1. *J Virol*. 2019;93(24).
114. Munoz-Arias I, Doitsh G, Yang Z, Sowinski S, Ruelas D, Greene WC. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. *Cell Host Microbe*. 2015;18(4):463-70.
115. Galloway NL, Doitsh G, Monroe KM, Yang Z, Munoz-Arias I, Levy DN, et al. Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. *Cell Rep*. 2015;12(10):1555-63.
116. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*. 2000;407(6803):523-6.
117. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.

118. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med.* 1995;1(1):59-64.
119. Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet.* 1994;344(8938):1671-3.
120. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68(9):6103-10.
121. Altfeld M, Allen TM, Yu XG, Johnston MN, Agrawal D, Korber BT, et al. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature.* 2002;420(6914):434-9.
122. Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Li H, Schafer JL, et al. Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat Immunol.* 2015;16(9):927-32.
123. Bandyopadhyay S, Ziegner U, Campbell DE, Miller DS, Hoxie JA, Starr SE. Natural killer cell-mediated lysis of T cell lines chronically infected with HIV-1. *Clin Exp Immunol.* 1990;79(3):430-5.
124. Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2007;195(10):1452-60.
125. Streeck H, Jolin JS, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson RC, Kwon DS, et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *J Virol.* 2009;83(15):7641-8.
126. Jansen CA, Piriou E, Bronke C, Vingerhoed J, Kostense S, van Baarle D, et al. Characterization of virus-specific CD8(+) effector T cells in the course of HIV-1 infection: longitudinal analyses in slow and rapid progressors. *Clin Immunol.* 2004;113(3):299-309.

127. Reeves DB, Duke ER, Wagner TA, Palmer SE, Spivak AM, Schiffer JT. A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4811.
128. Gunthard HF, Frost SD, Leigh-Brown AJ, Ignacio CC, Kee K, Perelson AS, et al. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol.* 1999;73(11):9404-12.
129. Hosmane NN, Kwon KJ, Bruner KM, Capoferri AA, Beg S, Rosenbloom DI, et al. Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med.* 2017;214(4):959-72.
130. Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH, et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell.* 2015;160(3):420-32.
131. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell.* 2013;155(3):540-51.
132. Simonetti FR, Sobolewski MD, Fyne E, Shao W, Spindler J, Hattori J, et al. Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7):1883-8.
133. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900.
134. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
135. Peretz Y, He Z, Shi Y, Yassine-Diab B, Goulet JP, Bordi R, et al. CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002840.

- 136.Hoffmann M, Pantazis N, Martin GE, Hickling S, Hurst J, Meyerowitz J, et al. Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection. *PLoS Pathog.* 2016;12(7):e1005661.
- 137.Alter G, Rihn S, Streeck H, Teigen N, Piechocka-Trocha A, Moss K, et al. Ligand-independent exhaustion of killer immunoglobulin-like receptor-positive CD8+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2008;82(19):9668-77.
- 138.Chung AW, Isitman G, Navis M, Kramski M, Center RJ, Kent SJ, et al. Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(18):7505-10.
- 139.Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature.* 1991;354(6353):453-9.
- 140.Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med.* 2004;10(3):282-9.
- 141.Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile JP, Cohen EA. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood.* 2010;115(7):1354-63.
- 142.Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, et al. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe.* 2010;8(5):397-409.
- 143.Alter G, Heckerman D, Schneidewind A, Fadda L, Kadie CM, Carlson JM, et al. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature.* 2011;476(7358):96-100.
- 144.Josefsson L, von Stockenstrom S, Faria NR, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, et al. The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(51):E4987-96.



145. Persaud D, Ray SC, Kajdas J, Ahonkhai A, Siberry GK, Ferguson K, et al. Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(3):381-90.
146. von Stockenstrom S, Odevall L, Lee E, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, et al. Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis*. 2015;212(4):596-607.
147. Kearney MF, Spindler J, Shao W, Yu S, Anderson EM, O'Shea A, et al. Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1004010.
148. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422(6929):307-12.
149. Phair J, Palella F. Renal disease in HIV-infected individuals. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(4):285-9.
150. Heron JE, Bagnis CI, Gracey DM. Contemporary issues and new challenges in chronic kidney disease amongst people living with HIV. *AIDS Res Ther*. 2020;17(1):11.
151. Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):2-18.
152. Dillon SM, Frank DN, Wilson CC. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: a two-way street. *AIDS*. 2016;30(18):2737-51.
153. Eggers C, Arendt G, Hahn K, Husstedt IW, Maschke M, Neuen-Jacob E, et al. HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Neurol*. 2017;264(8):1715-27.
154. Singhvi D, Bon J, Morris A. Obstructive Lung Disease in HIV-Phenotypes and Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2019;16(4):359-69.

155. Mergener K, Facke M, Welker R, Brinkmann V, Gelderblom HR, Krausslich HG. Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology*. 1992;186(1):25-39.
156. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science*. 1999;283(5398):80-3.
157. Mattei S, Glass B, Hagen WJ, Krausslich HG, Briggs JA. The structure and flexibility of conical HIV-1 capsids determined within intact virions. *Science*. 2016;354(6318):1434-7.
158. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J*. 2003;22(7):1707-15.
159. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a007443.
160. Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med*. 1984;311(20):1292-7.
161. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1-25.
162. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*. 1985;313(6000):277-84.
163. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*. 1985;40(1):9-17.
164. Sanchez-Pescador R, Power MD, Barr PJ, Steimer KS, Stempien MM, Brown-Shimer SL, et al. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science*. 1985;227(4686):484-92.
165. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. 1985;313(6002):450-8.

- 166.Starcich B, Ratner L, Josephs SF, Okamoto T, Gallo RC, Wong-Staal F. Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science*. 1985;227(4686):538-40.
- 167.Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328(6132):728-30.
- 168.Arya SK, Beaver B, Jagodzinski L, Ensoli B, Kanki PJ, Albert J, et al. New human and simian HIV-related retroviruses possess functional transactivator (tat) gene. *Nature*. 1987;328(6130):548-50.
- 169.Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. 1988;334(6182):532-4.
- 170.Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science*. 1988;241(4870):1221-3.
- 171.Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of HIV-1 Vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990;3(1):11-8.
- 172.Dedera D, Hu W, Vander Heyden N, Ratner L. Viral protein R of human immunodeficiency virus types 1 and 2 is dispensable for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. *J Virol*. 1989;63(7):3205-8.
- 173.Matsuda Z, Chou MJ, Matsuda M, Huang JH, Chen YM, Redfield R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6968-72.
- 174.Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*. 1987;326(6114):662-9.
- 175.Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*. 1987;330(6145):266-9.

176. Hu W, Vander Heyden N, Ratner L. Analysis of the function of viral protein X (Vpx) of HIV-2. *Virology*. 1989;173(2):624-30.
177. Dayton AI, Terwilliger EF, Potz J, Kowalski M, Sodroski JG, Haseltine WA. Cis-acting sequences responsive to the rev gene product of the human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988). 1988;1(5):441-52.
178. Terwilliger E, Burghoff R, Sia R, Sodroski J, Haseltine W, Rosen C. The *art* gene product of human immunodeficiency virus is required for replication. *J Virol*. 1988;62(2):655-8.
179. Franchini G, Robert-Guroff M, Ghayeb J, Chang NT, Wong-Staal F. Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' *orf* protein in cultured T cells. *Virology*. 1986;155(2):593-9.
180. Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, Gallo RC, Wong-Staal F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*. 1986;46(6):807-17.
181. Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*. 1993;67(11):6365-78.
182. Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins: ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*. 2008;3(6):388-98.
183. Guyader M, Emerman M, Montagnier L, Peden K. Vpx mutants of HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. *EMBO J*. 1989;8(4):1169-75.
184. Kappes JC, Conway JA, Lee SW, Shaw GM, Hahn BH. Human immunodeficiency virus type 2 vpx protein augments viral infectivity. *Virology*. 1991;184(1):197-209.
185. Simon JH, Gaddis NC, Fouchier RA, Malim MH. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med*. 1998;4(12):1397-400.

186. Balliet JW, Kolson DL, Eiger G, Kim FM, McGann KA, Srinivasan A, et al. Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes Vpr, Vpu, and Nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology*. 1994;200(2):623-31.
187. Eckstein DA, Sherman MP, Penn ML, Chin PS, De Noronha CM, Greene WC, et al. HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2001;194(10):1407-19.
188. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*. 1992;66(11):6489-95.
189. von Schwedler U, Song J, Aiken C, Trono D. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J Virol*. 1993;67(8):4945-55.
190. Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, et al. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science*. 1987;237(4817):888-93.
191. Hirsch VM, Sharkey ME, Brown CR, Brichacek B, Goldstein S, Wakefield J, et al. Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nat Med*. 1998;4(12):1401-8.
192. Aldrovandi GM, Zack JA. Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice. *J Virol*. 1996;70(3):1505-11.
193. Jamieson BD, Aldrovandi GM, Planelles V, Jowett JB, Gao L, Bloch LM, et al. Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for in vivo replication and pathogenicity. *J Virol*. 1994;68(6):3478-85.
194. Beaumont T, van Nuenen A, Broersen S, Blattner WA, Lukashov VV, Schuitemaker H. Reversal of human immunodeficiency virus type 1 IIIB to a neutralization-resistant phenotype in an accidentally infected laboratory worker with a progressive clinical course. *J Virol*. 2001;75(5):2246-52.

- 195.Lang SM, Weeger M, Stahl-Hennig C, Coulibaly C, Hunsmann G, Muller J, et al. Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 1993;67(2):902-12.
- 196.Gibbs JS, Lackner AA, Lang SM, Simon MA, Sehgal PK, Daniel MD, et al. Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *J Virol.* 1995;69(4):2378-83.
- 197.Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med.* 2002;22(3):611-35.
- 198.Sattentau QJ, Dalgleish AG, Weiss RA, Beverley PC. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science.* 1986;234(4780):1120-3.
- 199.Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science.* 1996;274(5287):602-5.
- 200.Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell.* 1996;87(4):745-56.
- 201.Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996;272(5263):872-7.
- 202.Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 1996;381(6584):661-6.
- 203.Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 1996;381(6584):667-73.
- 204.Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.* 1996;384(6605):179-83.
- 205.Myszka DG, Sweet RW, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong PD, Hendrickson WA, et al. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):9026-31.

206. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996;272(5270):1955-8.
207. Munro JB, Gorman J, Ma X, Zhou Z, Arthos J, Burton DR, et al. Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science*. 2014;346(6210):759-63.
208. Chen B. Molecular mechanism of HIV-1 entry. *Trends Microbiol*. 2019;27(10):878-91.
209. Wang H, Barnes CO, Yang Z, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. Partially Open HIV-1 Envelope Structures Exhibit Conformational Changes Relevant for Coreceptor Binding and Fusion. *Cell Host Microbe*. 2018;24(4):579-92 e4.
210. Yang Z, Wang H, Liu AZ, Gristick HB, Bjorkman PJ. Asymmetric opening of HIV-1 Env bound to CD4 and a coreceptor-mimicking antibody. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(12):1167-75.
211. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6125-9.
212. Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol*. 1991;65(4):1910-5.
213. Pancio HA, Vander Heyden N, Ratner L. The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. *J Virol*. 2000;74(13):6162-7.
214. Nermut MV, Fassati A. Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J Virol*. 2003;77(15):8196-206.
215. Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2001;75(8):3626-35.

216. Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med.* 1998;188(11):2113-25.
217. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol.* 2002;159(3):441-52.
218. Arhel N, Genovesio A, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC, et al. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods.* 2006;3(10):817-24.
219. Naghavi MH, Valente S, Hatzioannou T, de Los Santos K, Wen Y, Mott C, et al. Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells. *EMBO J.* 2007;26(1):41-52.
220. Malikov V, Naghavi MH. Localized Phosphorylation of a Kinesin-1 Adaptor by a Capsid-Associated Kinase Regulates HIV-1 Motility and Uncoating. *Cell Rep.* 2017;20(12):2792-9.
221. Fackler OT, Krausslich HG. Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):409-15.
222. Lukic Z, Dharan A, Fricke T, Diaz-Griffero F, Campbell EM. HIV-1 uncoating is facilitated by dynein and kinesin 1. *J Virol.* 2014;88(23):13613-25.
223. Malikov V, da Silva ES, Jovasevic V, Bennett G, de Souza Aranha Vieira DA, Schulte B, et al. HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus. *Nat Commun.* 2015;6:6660.
224. Caly L, Kassouf VT, Moseley GW, Diefenbach RJ, Cunningham AL, Jans DA. Fast track, dynein-dependent nuclear targeting of human immunodeficiency virus Vpr protein; impaired trafficking in a clinical isolate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(3):735-40.
225. Gallay P, Swingler S, Aiken C, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell.* 1995;80(3):379-88.



- 226.Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7311-5.
- 227.Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*. 1993;365(6447):666-9.
- 228.Depienne C, Roques P, Creminon C, Fritsch L, Casseron R, Dormont D, et al. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res*. 2000;260(2):387-95.
- 229.Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, et al. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol*. 2000;299(2):359-68.
- 230.Carnes SK, Zhou J, Aiken C. HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus. *J Virol*. 2018;92(20).
- 231.Dharan A, Opp S, Abdel-Rahim O, Keceli SK, Imam S, Diaz-Griffero F, et al. Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(50):E10707-E16.
- 232.Jayappa KD, Ao Z, Wang X, Moulant AJ, Shekhar S, Yang X, et al. Human immunodeficiency virus type 1 employs the cellular dynein light chain 1 protein for reverse transcription through interaction with its integrase protein. *J Virol*. 2015;89(7):3497-511.
- 233.Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014;384(9939):258-71.
- 234.Rawle DJ, Harrich D. Toward the "unravelling" of HIV: Host cell factors involved in HIV-1 core uncoating. *PLoS Pathog*. 2018;14(10):e1007270.
- 235.Aiken C. Viral and cellular factors that regulate HIV-1 uncoating. *Curr Opin HIV AIDS*. 2006;1(3):194-9.

236. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(8):471-83.
237. Mamede JI, Cianci GC, Anderson MR, Hope TJ. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(34):E7169-E78.
238. Francis AC, Melikyan GB. Live-Cell Imaging of Early Steps of Single HIV-1 Infection. *Viruses.* 2018;10(5).
239. Iordanskiy S, Berro R, Altieri M, Kashanchi F, Bukrinsky M. Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology.* 2006;3:4.
240. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.* 1997;71(7):5382-90.
241. Francis AC, Marin M, Shi J, Aiken C, Melikyan GB. Time-Resolved Imaging of Single HIV-1 Uncoating In Vitro and in Living Cells. *PLoS Pathog.* 2016;12(6):e1005709.
242. Francis AC, Melikyan GB. Single HIV-1 Imaging Reveals Progression of Infection through CA-Dependent Steps of Docking at the Nuclear Pore, Uncoating, and Nuclear Transport. *Cell Host Microbe.* 2018;23(4):536-48 e6.
243. Hulme AE, Perez O, Hope TJ. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(24):9975-80.
244. Perez-Caballero D, Hatzioannou T, Zhang F, Cowan S, Bieniasz PD. Restriction of human immunodeficiency virus type 1 by TRIM-CypA occurs with rapid kinetics and independently of cytoplasmic bodies, ubiquitin, and proteasome activity. *J Virol.* 2005;79(24):15567-72.
245. Xu H, Franks T, Gibson G, Huber K, Rahm N, Strambio De Castillia C, et al. Evidence for biphasic uncoating during HIV-1 infection from a novel imaging assay. *Retrovirology.* 2013;10:70.
246. Hulme AE, Kelley Z, Foley D, Hope TJ. Complementary Assays Reveal a Low Level of CA Associated with Viral Complexes in the Nuclei of HIV-1-Infected Cells. *J Virol.* 2015;89(10):5350-61.

247. Peng K, Muranyi W, Glass B, Laketa V, Yant SR, Tsai L, et al. Quantitative microscopy of functional HIV post-entry complexes reveals association of replication with the viral capsid. *Elife*. 2014;3:e04114.
248. Matreyek KA, Yucel SS, Li X, Engelman A. Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003693.
249. Matreyek KA, Engelman A. The requirement for nucleoporin NUP153 during human immunodeficiency virus type 1 infection is determined by the viral capsid. *J Virol*. 2011;85(15):7818-27.
250. Zhou L, Sokolskaja E, Jolly C, James W, Cowley SA, Fassati A. Transportin 3 promotes a nuclear maturation step required for efficient HIV-1 integration. *PLoS Pathog*. 2011;7(8):e1002194.
251. Zurnic Bonisch I, Dirix L, Lemmens V, Borrenberghs D, De Wit F, Vernailen F, et al. Capsid-Labelled HIV To Investigate the Role of Capsid during Nuclear Import and Integration. *J Virol*. 2020;94(7).
252. Blanco-Rodriguez G, Gazi A, Monel B, Frabetti S, Scoca V, Mueller F, et al. Remodeling of the core leads HIV-1 pre-integration complex in the nucleus of human lymphocytes. *J Virol*. 2020.
253. Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(10):5486-93.
254. Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013;341(6148):903-6.
255. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Hurbain I, et al. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity*. 2013;39(6):1132-42.
256. Rasaiyaah J, Tan CP, Fletcher AJ, Price AJ, Blondeau C, Hilditch L, et al. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature*. 2013;503(7476):402-5.

257. Lori F, di Marzo Veronese F, de Vico AL, Lusso P, Reitz MS, Jr., Gallo RC. Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol.* 1992;66(8):5067-74.
258. Zhang H, Zhang Y, Spicer T, Henrard D, Poiesz BJ. Nascent human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription occurs within an enveloped particle. *J Virol.* 1995;69(6):3675-82.
259. Trono D. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol.* 1992;66(8):4893-900.
260. Cosnefroy O, Murray PJ, Bishop KN. HIV-1 capsid uncoating initiates after the first strand transfer of reverse transcription. *Retrovirology.* 2016;13(1):58.
261. Coffin JM, Fan H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu Rev Virol.* 2016;3(1):29-51.
262. Matreyek KA, Engelman A. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses.* 2013;5(10):2483-511.
263. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(14):6580-4.
264. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(18):9825-30.
265. Hearps AC, Jans DA. HIV-1 integrase is capable of targeting DNA to the nucleus via an importin alpha/beta-dependent mechanism. *Biochem J.* 2006;398(3):475-84.
266. Gallay P, Stitt V, Mundy C, Oettinger M, Trono D. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol.* 1996;70(2):1027-32.
267. Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol.* 1999;145(6):1145-52.

- 268.Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, et al. HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):e1002439.
- 269.Lee K, Ambrose Z, Martin TD, Oztop I, Mulky A, Julias JG, et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe.* 2010;7(3):221-33.
- 270.Logue EC, Taylor KT, Goff PH, Landau NR. The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. *J Virol.* 2011;85(24):12950-61.
- 271.Ocwieja KE, Brady TL, Ronen K, Huegel A, Roth SL, Schaller T, et al. HIV integration targeting: a pathway involving Transportin-3 and the nuclear pore protein RanBP2. *PLoS Pathog.* 2011;7(3):e1001313.
- 272.Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, Li X, et al. The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase. *J Virol.* 2010;84(1):397-406.
- 273.Christ F, Thys W, De Rijck J, Gijsbers R, Albanese A, Arosio D, et al. Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol.* 2008;18(16):1192-202.
- 274.De Houwer S, Demeulemeester J, Thys W, Taltynov O, Zmajkovicova K, Christ F, et al. Identification of residues in the C-terminal domain of HIV-1 integrase that mediate binding to the transportin-SR2 protein. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34059-68.
- 275.Larue R, Gupta K, Wuensch C, Shkriabai N, Kessl JJ, Danhart E, et al. Interaction of the HIV-1 intasome with transportin 3 protein (TNPO3 or TRN-SR2). *J Biol Chem.* 2012;287(41):34044-58.
- 276.Maertens GN, Cook NJ, Wang W, Hare S, Gupta SS, Oztop I, et al. Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2728-33.

277. Achuthan V, Perreira JM, Sowd GA, Puray-Chavez M, McDougall WM, Paulucci-Holthausen A, et al. Capsid-CPSF6 Interaction Licenses Nuclear HIV-1 Trafficking to Sites of Viral DNA Integration. *Cell Host Microbe*. 2018;24(3):392-404 e8.
278. Price AJ, Fletcher AJ, Schaller T, Elliott T, Lee K, KewalRamani VN, et al. CPSF6 defines a conserved capsid interface that modulates HIV-1 replication. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002896.
279. Bejarano DA, Peng K, Laketa V, Borner K, Jost KL, Lucic B, et al. HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex. *Elife*. 2019;8.
280. Jang S, Cook NJ, Pye VE, Bedwell GJ, Dudek AM, Singh PK, et al. Differential role for phosphorylation in alternative polyadenylation function versus nuclear import of SR-like protein CPSF6. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(9):4663-83.
281. Lin DH, Zimmermann S, Stuwe T, Stuwe E, Hoelz A. Structural and functional analysis of the C-terminal domain of Nup358/RanBP2. *J Mol Biol*. 2013;425(8):1318-29.
282. Meehan AM, Saenz DT, Guevera R, Morrison JH, Peretz M, Fadel HJ, et al. A cyclophilin homology domain-independent role for Nup358 in HIV-1 infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(2):e1003969.
283. Dharan A, Talley S, Tripathi A, Mamede JI, Majetschak M, Hope TJ, et al. KIF5B and Nup358 Cooperatively Mediate the Nuclear Import of HIV-1 during Infection. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):e1005700.
284. Kane M, Rebensburg SV, Takata MA, Zang TM, Yamashita M, Kvaratskhelia M, et al. Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2. *Elife*. 2018;7.
285. Di Nunzio F, Fricke T, Miccio A, Valle-Casuso JC, Perez P, Souque P, et al. Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology*. 2013;440(1):8-18.

- 286.Koh Y, Wu X, Ferris AL, Matreyek KA, Smith SJ, Lee K, et al. Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 capsid and cellular factors nucleoporin 153 and LEDGF/p75 on the efficiency and specificity of viral DNA integration. *J Virol.* 2013;87(1):648-58.
- 287.Woodward CL, Prakobwanakit S, Mosessian S, Chow SA. Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2009;83(13):6522-33.
- 288.Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, Fischer U, Albright AV, Gonzalez-Scarano F, et al. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol.* 1998;72(7):6004-13.
- 289.Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reiling N, Lee MA, Ratner L, et al. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* 1998;17(4):909-17.
- 290.Vodicka MA, Koepf DM, Silver PA, Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* 1998;12(2):175-85.
- 291.Jenkins Y, McEntee M, Weis K, Greene WC. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol.* 1998;143(4):875-85.
- 292.Yao XJ, Subbramanian RA, Rougeau N, Boisvert F, Bergeron D, Cohen EA. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol.* 1995;69(11):7032-44.
- 293.Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC. Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 2001;75(3):1522-32.
- 294.Nie Z, Bergeron D, Subbramanian RA, Yao XJ, Checroune F, Rougeau N, et al. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol.* 1998;72(5):4104-15.

295. Karni O, Friedler A, Zakai N, Gilon C, Loyter A. A peptide derived from the N-terminal region of HIV-1 Vpr promotes nuclear import in permeabilized cells: elucidation of the NLS region of the Vpr. *FEBS Lett.* 1998;429(3):421-5.
296. Di Marzio P, Choe S, Ebright M, Knoblauch R, Landau NR. Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 1995;69(12):7909-16.
297. Mahalingam S, Collman RG, Patel M, Monken CE, Srinivasan A. Functional analysis of HIV-1 Vpr: identification of determinants essential for subcellular localization. *Virology.* 1995;212(2):331-9.
298. Subbramanian RA, Yao XJ, Dilhuydy H, Rougeau N, Bergeron D, Robitaille Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity. *J Mol Biol.* 1998;278(1):13-30.
299. Takeda E, Murakami T, Matsuda G, Murakami H, Zako T, Maeda M, et al. Nuclear exportin receptor CAS regulates the NPI-1-mediated nuclear import of HIV-1 Vpr. *PLoS One.* 2011;6(11):e27815.
300. Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, et al. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45091-8.
301. Kamata M, Nitahara-Kasahara Y, Miyamoto Y, Yoneda Y, Aida Y. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 2005;79(6):3557-64.
302. Miyatake H, Sanjoh A, Murakami T, Murakami H, Matsuda G, Hagiwara K, et al. Molecular mechanism of HIV-1 Vpr for binding to importin-alpha. *J Mol Biol.* 2016;428(13):2744-57.
303. Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Hashimoto Y, Matsuda G, Takeshima SN, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(4):838-43.



304. Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, et al. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol.* 2007;81(10):5284-93.
305. Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem.* 1998;273(21):13347-52.
306. de Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavois MV, Moir RD, Goldman RD, et al. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science.* 2001;294(5544):1105-8.
307. Sherman PA, Fyfe JA. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5119-23.
308. Bushman FD, Craigie R. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(4):1339-43.
309. Ellison V, Abrams H, Roe T, Lifson J, Brown P. Human immunodeficiency virus integration in a cell-free system. *J Virol.* 1990;64(6):2711-5.
310. Farnet CM, Haseltine WA. Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(11):4164-8.
311. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science.* 1990;249(4976):1555-8.
312. Vink C, Yeheskiely E, van der Marel GA, van Boom JH, Plasterk RH. Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6691-8.
313. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell.* 1991;67(6):1211-21.

- 314.Sherman PA, Dickson ML, Fyfe JA. Human immunodeficiency virus type 1 integration protein: DNA sequence requirements for cleaving and joining reactions. *J Virol.* 1992;66(6):3593-601.
- 315.Chow SA, Vincent KA, Ellison V, Brown PO. Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science.* 1992;255(5045):723-6.
- 316.Yoder KE, Espeseth A, Wang XH, Fang Q, Russo MT, Lloyd RS, et al. The base excision repair pathway is required for efficient lentivirus integration. *PLoS One.* 2011;6(3):e17862.
- 317.Goetze RW, Kim DH, Schinazi RF, Kim B. A CRISPR/Cas9 approach reveals that the polymerase activity of DNA polymerase beta is dispensable for HIV-1 infection in dividing and nondividing cells. *J Biol Chem.* 2017;292(34):14016-25.
- 318.Bennett GR, Peters R, Wang XH, Hanne J, Sobol RW, Bundschuh R, et al. Repair of oxidative DNA base damage in the host genome influences the HIV integration site sequence preference. *PLoS One.* 2014;9(7):e103164.
- 319.Cosnefroy O, Tocco A, Lesbats P, Thierry S, Calmels C, Wiktorowicz T, et al. Stimulation of the human RAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration in vitro and in infected cells. *J Virol.* 2012;86(1):513-26.
- 320.Thierry S, Benleulmi MS, Sinzelle L, Thierry E, Calmels C, Chaignepain S, et al. Dual and Opposite Effects of hRAD51 Chemical Modulation on HIV-1 Integration. *Chem Biol.* 2015;22(6):712-23.
- 321.Daniel R, Greger JG, Katz RA, Taganov KD, Wu X, Kappes JC, et al. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol.* 2004;78(16):8573-81.
- 322.Zheng Y, Ao Z, Wang B, Jayappa KD, Yao X. Host protein Ku70 binds and protects HIV-1 integrase from proteasomal degradation and is required for HIV replication. *J Biol Chem.* 2011;286(20):17722-35.

323. Waninger S, Kuhen K, Hu X, Chatterton JE, Wong-Staal F, Tang H. Identification of cellular cofactors for human immunodeficiency virus replication via a ribozyme-based genomics approach. *J Virol*. 2004;78(23):12829-37.
324. Manic G, Maurin-Marlin A, Laurent F, Vitale I, Thierry S, Delelis O, et al. Impact of the Ku complex on HIV-1 expression and latency. *PLoS One*. 2013;8(7):e69691.
325. Jeanson L, Subra F, Vaganay S, Hervy M, Marangoni E, Bourhis J, et al. Effect of Ku80 depletion on the preintegrative steps of HIV-1 replication in human cells. *Virology*. 2002;300(1):100-8.
326. Daniel R, Katz RA, Skalka AM. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science*. 1999;284(5414):644-7.
327. Skalka AM, Katz RA. Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 1:971-8.
328. Knyazhanskaya E, Anisenko A, Shadrina O, Kalinina A, Zatsepin T, Zalevsky A, et al. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase. *Retrovirology*. 2019;16(1):30.
329. Anisenko AN, Knyazhanskaya ES, Zalevsky AO, Agapkina JY, Sizov AI, Zatsepin TS, et al. Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting. *Sci Rep*. 2017;7(1):5649.
330. Studamire B, Goff SP. Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors. *Retrovirology*. 2008;5:48.
331. Rumbaugh JA, Fuentes GM, Bambara RA. Processing of an HIV replication intermediate by the human DNA replication enzyme FEN1. *J Biol Chem*. 1998;273(44):28740-5.
332. Dynan WS, Yoo S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(7):1551-9.
333. Anisenko AN, Knyazhanskaya ES, Zatsepin TS, Gottikh MB. Human Ku70 protein binds hairpin RNA and double stranded DNA through two different sites. *Biochimie*. 2017;132:85-93.

334. Baekelandt V, Claeys A, Cherepanov P, De Clercq E, De Strooper B, Nuttin B, et al. DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J Virol.* 2000;74(23):11278-85.
335. Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, Lieber M, et al. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J.* 2001; 20(12):3272-81.
336. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110(4):521-9.
337. Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O'Doherty U, Bushman F. HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *AIDS.* 2009;23(12):1461-71.
338. Marini B, Kertesz-Farkas A, Ali H, Lucic B, Lisek K, Manganaro L, et al. Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature.* 2015;521(7551):227-31.
339. Lelek M, Casartelli N, Pellin D, Rizzi E, Souque P, Severgnini M, et al. Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication. *Nat Commun.* 2015;6:6483.
340. Barr SD, Ciuffi A, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman FD. HIV integration site selection: targeting in macrophages and the effects of different routes of viral entry. *Mol Ther.* 2006;14(2):218-25.
341. Kok YL, Vongrad V, Shilaih M, Di Giallonardo F, Kuster H, Kouyos R, et al. Monocyte-derived macrophages exhibit distinct and more restricted HIV-1 integration site repertoire than CD4(+) T cells. *Sci Rep.* 2016;6:24157.
342. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):a006916.
343. Forget J, Yao XJ, Mercier J, Cohen EA. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein transactivation function: mechanism and identification of domains involved. *J Mol Biol.* 1998;284(4):915-23.

344. Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao LJ. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem.* 1995;270(43):25564-9.
345. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, Cullen BR. Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7791-6.
346. Rosen CA, Sodroski JG, Haseltine WA. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell.* 1985;41(3):813-23.
347. Mbonye UR, Gokulrangan G, Datt M, Dobrowolski C, Cooper M, Chance MR, et al. Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4(+) T lymphocytes. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003338.
348. Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 1998;92(4):451-62.
349. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, Cullen BR. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J.* 1998;17(23):7056-65.
350. Marciniak RA, Sharp PA. HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J.* 1991;10(13):4189-96.
351. Parada CA, Roeder RG. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature.* 1996;384(6607):375-8.
352. Daly TJ, Cook KS, Gray GS, Maione TE, Rusche JR. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature.* 1989;342(6251):816-9.

353. Heaphy S, Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Karn J, et al. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell*. 1990;60(4):685-93.
354. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature*. 1986;321(6068):412-7.
355. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989;338(6212):254-7.
356. Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*. 1997;7(10):767-75.
357. Bogerd HP, Echarri A, Ross TM, Cullen BR. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J Virol*. 1998;72(11):8627-35.
358. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj JW, Luhrmann R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*. 1995;82(3):475-83.
359. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331(6153):280-3.
360. Wilson W, Braddock M, Adams SE, Rathjen PD, Kingsman SM, Kingsman AJ. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*. 1988;55(6):1159-69.
361. Korniy N, Goyal A, Hoffmann M, Samatova E, Peske F, Pohlmann S, et al. Modulation of HIV-1 Gag/Gag-Pol frameshifting by tRNA abundance. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(10):5210-22.

362. Strebel K, Klimkait T, Maldarelli F, Martin MA. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J Virol.* 1989;63(9):3784-91.
363. Geyer M, Munte CE, Schorr J, Kellner R, Kalbitzer HR. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J Mol Biol.* 1999;289(1):123-38.
364. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature.* 1992;360(6402):358-61.
365. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, et al. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988;53(1):55-67.
366. Decroly E, Benjannet S, Savaria D, Seidah NG. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* 1997;405(1):68-72.
367. Hallenberger S, Moulard M, Sordel M, Klenk HD, Garten W. The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol.* 1997;71(2):1036-45.
368. Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(15):5781-5.
369. Jacobs E, Gheysen D, Thines D, Francotte M, de Wilde M. The HIV-1 Gag precursor Pr55gag synthesized in yeast is myristoylated and targeted to the plasma membrane. *Gene.* 1989;79(1):71-81.
370. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11364-9.
371. Ono A, Freed EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13925-30.

- 372.Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol.* 2011;85(19):9749-66.
- 373.Chukkapalli V, Ono A. Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. *J Mol Biol.* 2011;410(4):512-24.
- 374.Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(2):523-7.
- 375.Nguyen DH, Hildreth JE. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol.* 2000;74(7):3264-72.
- 376.Chen J, Nikolaitchik O, Singh J, Wright A, Bencsics CE, Coffin JM, et al. High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(32):13535-40.
- 377.Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(45):19114-9.
- 378.Kutluay SB, Zang T, Blanco-Melo D, Powell C, Jannain D, Errando M, et al. Global changes in the RNA binding specificity of HIV-1 gag regulate virion genesis. *Cell.* 2014;159(5):1096-109.
- 379.Aldovini A, Young RA. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol.* 1990;64(5):1920-6.
- 380.Berkowitz RD, Luban J, Goff SP. Specific binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein and nucleocapsid protein to viral RNAs detected by RNA mobility shift assays. *J Virol.* 1993;67(12):7190-200.
- 381.Gorelick RJ, Nigida SM, Jr., Bess JW, Jr., Arthur LO, Henderson LE, Rein A. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol.* 1990;64(7):3207-11.



- 382.Clavel F, Orenstein JM. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol.* 1990;64(10):5230-4.
- 383.Lever A, Gottlinger H, Haseltine W, Sodroski J. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol.* 1989;63(9):4085-7.
- 384.Luban J, Goff SP. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol.* 1994;68(6):3784-93.
- 385.Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus Vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol.* 1990;64(6):3097-9.
- 386.Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* 1993;67(12):7229-37.
- 387.Kondo E, Mammano F, Cohen EA, Gottlinger HG. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J Virol.* 1995;69(5):2759-64.
- 388.Checroune F, Yao XJ, Gottlinger HG, Bergeron D, Cohen EA. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the P6 domain of Pr55gag. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;10(1):1-7.
- 389.Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J Biol Chem.* 1999;274(13):9083-91.
- 390.Selig L, Pages JC, Tanchou V, Preveral S, Berlioz-Torrent C, Liu LX, et al. Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol.* 1999;73(1):592-600.
- 391.Pancio HA, Ratner L. Human immunodeficiency virus type 2 Vpx-Gag interaction. *J Virol.* 1998;72(6):5271-5.

- 392.Kutluay SB, Bieniasz PD. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001200.
- 393.Tedbury PR, Ablan SD, Freed EO. Global rescue of defects in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation: implications for matrix structure. *PLoS Pathog.* 2013;9(11):e1003739.
- 394.Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(7):3099-104.
- 395.Alfadhli A, Barklis RL, Barklis E. HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *Virology.* 2009;387(2):466-72.
- 396.Murakami T, Freed EO. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol.* 2000;74(8):3548-54.
- 397.Tedbury PR, Freed EO. The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Trends Microbiol.* 2014;22(7):372-8.
- 398.Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol.* 2011;410(4):582-608.
- 399.Weiss ER, Gottlinger H. The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J Mol Biol.* 2011;410(4):525-33.
- 400.VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, et al. 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.* 2001;98(14):7724-9.
- 401.Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 2001;107(1):55-65.
- 402.Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med.* 2001;7(12):1313-9.

403. Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(8):3195-9.
404. Demirov DG, Orenstein JM, Freed EO. The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J Virol*. 2002;76(1):105-17.
405. Ajasin DO, Rao VR, Wu X, Ramasamy S, Pujato M, Ruiz AP, et al. CCL2 mobilizes ALIX to facilitate Gag-p6 mediated HIV-1 virion release. *Elife*. 2019;8.
406. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 2003;114(6):689-99.
407. Usami Y, Popov S, Gottlinger HG. Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J Virol*. 2007;81(12):6614-22.
408. Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*. 2007;128(5):841-52.
409. Meng B, Ip NCY, Abbink TEM, Kenyon JC, Lever AML. ESCRT-II functions by linking to ESCRT-I in human immunodeficiency virus-1 budding. *Cell Microbiol*. 2020;22(5):e13161.
410. Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe*. 2013;14(3):232-41.
411. Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol*. 1994;68(10):6782-6.
412. Lee SK, Potempa M, Swanstrom R. The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *J Biol Chem*. 2012;287(49):40867-74.

413. Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol.* 1998;72(4):2846-54.
414. Peng C, Ho BK, Chang TW, Chang NT. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol.* 1989;63(6):2550-6.
415. Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C, et al. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13555-60.
416. Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, et al. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol.* 1994;68(12):8017-27.
417. Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, Tomasselli AG, Tarpley WG, Moss B. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(19):7472-6.
418. McQuade TJ, Tomasselli AG, Liu L, Karacostas V, Moss B, Sawyer TK, et al. A synthetic HIV-1 protease inhibitor with antiviral activity arrests HIV-like particle maturation. *Science.* 1990;247(4941):454-6.
419. Kappes JC, Morrow CD, Lee SW, Jameson BA, Kent SB, Hood LE, et al. Identification of a novel retroviral gene unique to human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVMAC. *J Virol.* 1988;62(9):3501-5.
420. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 2012;287(49):40875-83.
421. Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X, Yu XF. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev.* 2004;18(23):2867-72.

422. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*. 2003;302(5647):1056-60.
423. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev*. 2004;18(23):2861-6.
424. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002;418(6898):646-50.
425. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*. 2003;9(11):1404-7.
426. Svarovskaia ES, Xu H, Mbisa JL, Barr R, Gorelick RJ, Ono A, et al. Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35822-8.
427. Luo K, Liu B, Xiao Z, Yu Y, Yu X, Gorelick R, et al. Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol*. 2004;78(21):11841-52.
428. Navarro F, Bollman B, Chen H, Konig R, Yu Q, Chiles K, et al. Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology*. 2005;333(2):374-86.
429. Iwatani Y, Takeuchi H, Strebel K, Levin JG. Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J Virol*. 2006;80(12):5992-6002.
430. Schafer A, Bogerd HP, Cullen BR. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology*. 2004;328(2):163-8.
431. Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J, Kleiman L. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33177-84.

- 432.Suspène R, Sommer P, Henry M, Ferris S, Guetard D, Pochet S, et al. APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(8):2421-9.
- 433.Yu Q, König R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(5):435-42.
- 434.Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* 2003;424(6944):94-8.
- 435.Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.* 2003;114(1):21-31.
- 436.Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.* 2003;424(6944):99-103.
- 437.Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell.* 2003;113(6):803-9.
- 438.Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol.* 2004;14(15):1392-6.
- 439.Suspène R, Rusniok C, Vartanian JP, Wain-Hobson S. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(17):4677-84.
- 440.Koulinska IN, Chaplin B, Mwakagile D, Essex M, Renjifo B. Hypermutation of HIV type 1 genomes isolated from infants soon after vertical infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19(12):1115-23.

- 441.Kijak GH, Janini LM, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Arroyo MA, Robb ML, et al. Variable contexts and levels of hypermutation in HIV-1 proviral genomes recovered from primary peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2008;376(1):101-11.
- 442.Holmes RK, Koning FA, Bishop KN, Malim MH. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2587-95.
- 443.Guo F, Cen S, Niu M, Saadatmand J, Kleiman L. Inhibition of tRNA(3)(Lys)-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*. 2006;80(23):11710-22.
- 444.Mbisa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweiler IJ, Svarovskaia ES, et al. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol*. 2007;81(13):7099-110.
- 445.Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, et al. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(21):7096-108.
- 446.Newman EN, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol*. 2005;15(2):166-70.
- 447.Bishop KN, Holmes RK, Malim MH. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol*. 2006;80(17):8450-8.
- 448.Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3369-74.
- 449.Wang J, Shackelford JM, Casella CR, Shivers DK, Rapaport EL, Liu B, et al. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology*. 2007;359(2):243-52.

450. Zhao K, Du J, Rui Y, Zheng W, Kang J, Hou J, et al. Evolutionarily conserved pressure for the existence of distinct G2/M cell cycle arrest and A3H inactivation functions in HIV-1 Vif. *Cell Cycle*. 2015;14(6):838-47.
451. Evans EL, 3rd, Becker JT, Fricke SL, Patel K, Sherer NM. HIV-1 Vif's Capacity To Manipulate the Cell Cycle Is Species Specific. *J Virol*. 2018;92(7).
452. Salamango DJ, Ikeda T, Moghadasi SA, Wang J, McCann JL, Serebrenik AA, et al. HIV-1 Vif triggers cell cycle arrest by degrading cellular PPP2R5 phospho-regulators. *Cell Rep*. 2019;29(5):1057-65 e4.
453. Marelli S, Williamson JC, Protasio AV, Naamati A, Greenwood EJ, Deane JE, et al. Antagonism of PP2A is an independent and conserved function of HIV-1 Vif and causes cell cycle arrest. *Elife*. 2020;9.
454. Greenwood EJ, Matheson NJ, Wals K, van den Boomen DJ, Antrobus R, Williamson JC, et al. Temporal proteomic analysis of HIV infection reveals remodelling of the host phosphoproteome by lentiviral Vif variants. *Elife*. 2016;5.
455. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 1996;2(3):338-42.
456. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):397-401.
457. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12144-9.
458. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*. 2015;526(7572):218-23.
459. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 2015;526(7572):212-7.



- 460.Zutz A, Scholz C, Schneider S, Pierini V, Munchhoff M, Sutter K, et al. SERINC5 Is an Unconventional HIV Restriction Factor That Is Upregulated during Myeloid Cell Differentiation. *J Innate Immun.* 2020;1-11.
- 461.Ross TM, Oran AE, Cullen BR. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol.* 1999;9(12):613-21.
- 462.Wildum S, Schindler M, Munch J, Kirchhoff F. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 downmodulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol.* 2006;80(16):8047-59.
- 463.Lindwasser OW, Chaudhuri R, Bonifacino JS. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med.* 2007;7(2):171-84.
- 464.Schwartz O, Dautry-Varsat A, Goud B, Marechal V, Subtil A, Heard JM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J Virol.* 1995;69(1):528-33.
- 465.Klotman ME, Kim S, Buchbinder A, DeRossi A, Baltimore D, Wong-Staal F. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):5011-5.
- 466.Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol.* 1989;63(9):3708-13.
- 467.Kaminchik J, Bashan N, Itach A, Sarver N, Gorecki M, Panet A. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products translated in vitro and expressed in mammalian cells. *J Virol.* 1991;65(2):583-8.
- 468.Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyo EM, Pavlakis GN. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1990;64(6):2519-29.

469. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol.* 1992;66(1):226-34.
470. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol.* 1992;66(12):7193-200.
471. Jabbar MA, Nayak DP. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J Virol.* 1990;64(12):6297-304.
472. Crise B, Buonocore L, Rose JK. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol.* 1990;64(11):5585-93.
473. Bour S, Schubert U, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol.* 1995;69(3):1510-20.
474. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, et al. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell.* 1998;1(4):565-74.
475. Binette J, Dube M, Mercier J, Halawani D, Latterich M, Cohen EA. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology.* 2007;4:75.
476. Levesque K, Zhao YS, Cohen EA. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem.* 2003;278(30):28346-53.
477. Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS. Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000869.

- 478.Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol.* 1990;64(11):5448-56.
- 479.Bour S, Perrin C, Strebel K. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33800-6.
- 480.Cortes MJ, Wong-Staal F, Lama J. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J Biol Chem.* 2002;277(3):1770-9.
- 481.Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol.* 1999;9(12):622-31.
- 482.Guan Y, Pazgier M, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Al-Darmarki S, Flinko R, et al. Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1 envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(1):E69-78.
- 483.Prevoost J, Richard J, Ding S, Pacheco B, Charlebois R, Hahn BH, et al. Envelope glycoproteins sampling states 2/3 are susceptible to ADCC by sera from HIV-1-infected individuals. *Virology.* 2018;515:38-45.
- 484.Alsahafi N, Bakouche N, Kazemi M, Richard J, Ding S, Bhattacharyya S, et al. An Asymmetric Opening of HIV-1 Envelope Mediates Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Cell Host Microbe.* 2019;25(4):578-87 e5.
- 485.Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen EA. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology.* 2014;11:15.
- 486.Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* 2014;88(5):2633-44.

487. Prevost J, Richard J, Medjahed H, Alexander A, Jones J, Kappes JC, et al. Incomplete Downregulation of CD4 Expression Affects HIV-1 Env Conformation and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses. *J Virol*. 2018;92(13).
488. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451(7177):425-30.
489. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. 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*. 2008;3(4):245-52.
490. Varthakavi V, Smith RM, Bour SP, Strebel K, Spearman P. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):15154-9.
491. Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, et al. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000450.
492. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990;64(2):621-9.
493. Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe*. 2007;2(3):193-203.
494. Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog*. 2006;2(5):e39.
495. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Fruh K, Moses AV. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *J Virol*. 2009;83(16):7931-47.

- 496.Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, et al. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000856.
- 497.Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, et al. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem.* 2009;284(50):35060-72.
- 498.Dube M, Paquay C, Roy BB, Bego MG, Mercier J, Cohen EA. HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface. *Traffic.* 2011;12(12):1714-29.
- 499.Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad E, Cohen EA. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology.* 2013;10:128.
- 500.Franchini G, Gurgo C, Guo HG, Gallo RC, Collalti E, Fagnoli KA, et al. Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature.* 1987;328(6130):539-43.
- 501.Sato A, Igarashi H, Adachi A, Hayami M. Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes.* 1990;4(4):303-12.
- 502.Hattori N, Michaels F, Fagnoli K, Marcon L, Gallo RC, Franchini G. The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(20):8080-4.
- 503.Henderson LE, Sowder RC, Copeland TD, Benveniste RE, Oroszlan S. Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science.* 1988;241(4862):199-201.
- 504.Franchini G, Rusche JR, O'Keeffe TJ, Wong-Staal F. The human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) contains a novel gene encoding a 16 kD protein associated with mature virions. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1988;4(4):243-50.

505. Marcon L, Michaels F, Hattori N, Fagnoli K, Gallo RC, Franchini G. Dispensable role of the human immunodeficiency virus type 2 Vpx protein in viral replication. *J Virol.* 1991;65(7):3938-42.
506. Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology.* 1995;206(2):935-44.
507. Tristem M, Marshall C, Karpas A, Petrik J, Hill F. Origin of *vpx* in lentiviruses. *Nature.* 1990;347(6291):341-2.
508. Tristem M, Purvis A, Quicke DL. Complex evolutionary history of primate lentiviral *vpr* genes. *Virology.* 1998;240(2):232-7.
509. Sharp PM, Bailes E, Stevenson M, Emerman M, Hahn BH. Gene acquisition in HIV and SIV. *Nature.* 1996;383(6601):586-7.
510. Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from *vpx* and *vpr*. *EMBO J.* 1992;11(9):3405-12.
511. Muller MC, Barre-Sinoussi F. SIVagm: genetic and biological features associated with replication. *Front Biosci.* 2003;8:d1170-85.
512. Zhu Y, Gelbard HA, Roshal M, Pursell S, Jamieson BD, Planelles V. Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 *vpr* genes. *J Virol.* 2001;75(8):3791-801.
513. Stivahtis GL, Soares MA, Vodicka MA, Hahn BH, Emerman M. Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *J Virol.* 1997;71(6):4331-8.
514. Hakata Y, Miyazawa M, Landau NR. Interactions with DCAF1 and DDB1 in the CRL4 E3 ubiquitin ligase are required for Vpr-mediated G2 arrest. *Virol J.* 2014;11:108.
515. DePaula-Silva AB, Cassiday PA, Chumley J, Bosque A, Monteiro-Filho CMR, Mahon CS, et al. Determinants for degradation of SAMHD1, Mus81 and induction of G2 arrest in HIV-1 Vpr and SIVagm Vpr. *Virology.* 2015;477:10-7.

516. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr. *J Mol Biol.* 2003;327(1):215-27.
517. Khamisri B, Murao F, Yoshida A, Sakurai A, Uchiyama T, Shirai H, et al. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpr/Vpx proteins. *Microbes Infect.* 2006;8(1):10-5.
518. Lu YL, Spearman P, Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol.* 1993;67(11):6542-50.
519. Zhao LJ, Mukherjee S, Narayan O. Biochemical mechanism of HIV-I Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J Biol Chem.* 1994;269(22):15577-82.
520. Mahalingam S, Khan SA, Murali R, Jabbar MA, Monken CE, Collman RG, et al. Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(9):3794-8.
521. Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, Kieber-Emmons T, Weiner DB. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 1997;71(9):6339-47.
522. Zhou Y, Lu Y, Ratner L. Arginine residues in the C-terminus of HIV-1 Vpr are important for nuclear localization and cell cycle arrest. *Virology.* 1998;242(2):414-24.
523. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1189-91.
524. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004;14(6):1188-90.
525. Sherman MP, de Noronha CM, Eckstein LA, Hataye J, Mundt P, Williams SA, et al. Nuclear export of Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages. *J Virol.* 2003;77(13):7582-9.

- 526.Jenkins Y, Sanchez PV, Meyer BE, Malim MH. Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging. *J Virol.* 2001;75(17):8348-52.
- 527.Rajendra Kumar P, Singhal PK, Vinod SS, Mahalingam S. A non-canonical transferable signal mediates nuclear import of simian immunodeficiency virus Vpx protein. *J Mol Biol.* 2003;331(5):1141-56.
- 528.Belshan M, Ratner L. Identification of the nuclear localization signal of human immunodeficiency virus type 2 Vpx. *Virology.* 2003;311(1):7-15.
- 529.Singhal PK, Kumar PR, Rao MR, Kyasani M, Mahalingam S. Simian immunodeficiency virus Vpx is imported into the nucleus via importin alpha-dependent and -independent pathways. *J Virol.* 2006;80(1):526-36.
- 530.Singhal PK, Rajendra Kumar P, Subba Rao MR, Mahalingam S. Nuclear export of simian immunodeficiency virus Vpx protein. *J Virol.* 2006;80(24):12271-82.
- 531.Matsuda Z, Yu X, Yu QC, Lee TH, Essex M. A virion-specific inhibitory molecule with therapeutic potential for human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(8):3544-8.
- 532.Yuan X, Matsuda Z, Matsuda M, Essex M, Lee TH. Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990;6(11):1265-71.
- 533.Yu XF, Matsuda M, Essex M, Lee TH. Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J Virol.* 1990;64(11):5688-93.
- 534.Lavallee C, Yao XJ, Ladha A, Gottlinger H, Haseltine WA, Cohen EA. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J Virol.* 1994;68(3):1926-34.
- 535.Kappes JC, Parkin JS, Conway JA, Kim J, Brouillette CG, Shaw GM, et al. Intracellular transport and virion incorporation of Vpx requires interaction with other virus type-specific components. *Virology.* 1993;193(1):222-33.



536. Paillart JC, Gottlinger HG. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol.* 1999;73(4):2604-12.
537. Kondo E, Gottlinger HG. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 1996;70(1):159-64.
538. Wu X, Conway JA, Kim J, Kappes JC. Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein. *J Virol.* 1994;68(10):6161-9.
539. Jenkins Y, Pornillos O, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI, Malim MH. Biochemical analyses of the interactions between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6(Gag). *J Virol.* 2001;75(21):10537-42.
540. Singh SP, Tomkowicz B, Lai D, Cartas M, Mahalingam S, Kalyanaraman VS, et al. Functional role of residues corresponding to helical domain II (amino acids 35 to 46) of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* 2000;74(22):10650-7.
541. Dong CZ, De Rocquigny H, Remy E, Mellac S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Synthesis and biological activities of fluorescent acridine-containing HIV-1 nucleocapsid proteins for investigation of nucleic acid-NCp7 interactions. *J Pept Res.* 1997;50(4):269-78.
542. de Rocquigny H, Caneparo A, Delaunay T, Bischerour J, Mouscadet JF, Roques BP. Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus. *Eur J Biochem.* 2000;267(12):3654-60.
543. Zhang S, Pointer D, Singer G, Feng Y, Park K, Zhao LJ. Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene.* 1998;212(2):157-66.
544. Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Krausslich HG. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2000;74(3):1168-77.

545. Accola MA, Ohagen A, Gottlinger HG. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag). *J Virol.* 2000;74(13):6198-202.
546. Müller B, Tessmer U, Schubert U, Kräusslich HG. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol.* 2000;74(20):9727-31.
547. Accola MA, Bukovsky AA, Jones MS, Gottlinger HG. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agm). *J Virol.* 1999;73(12):9992-9.
548. Briggs JA, Simon MN, Gross I, Krausslich HG, Fuller SD, Vogt VM, et al. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(7):672-5.
549. Kewalramani VN, Park CS, Gallombardo PA, Emerman M. Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect. *Virology.* 1996;218(2):326-34.
550. Belzile JP, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen EA. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4A-VPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e85.
551. Le Rouzic E, Belaidouni N, Estrabaud E, Morel M, Rain JC, Transy C, et al. HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle.* 2007;6(2):182-8.
552. Hrecka K, Gierszewska M, Srivastava S, Kozackiewicz L, Swanson SK, Florens L, et al. Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(28):11778-83.
553. Srivastava S, Swanson SK, Manel N, Florens L, Washburn MP, Skowronski J. Lentiviral Vpx accessory factor targets VprBP/DCAF1 substrate adaptor for cullin 4 E3 ubiquitin ligase to enable macrophage infection. *PLoS Pathog.* 2008;4(5):e1000059.

554. Belzile JP, Richard J, Rougeau N, Xiao Y, Cohen EA. HIV-1 Vpr induces the K48-linked polyubiquitination and proteasomal degradation of target cellular proteins to activate ATR and promote G2 arrest. *J Virol*. 2010;84(7):3320-30.
555. Wen X, Duus KM, Friedrich TD, de Noronha CM. The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J Biol Chem*. 2007;282(37):27046-57.
556. Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature*. 2006;443(7111):590-3.
557. Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell*. 2006;23(5):709-21.
558. Zhang S, Feng Y, Narayan O, Zhao LJ. Cytoplasmic retention of HIV-1 regulatory protein Vpr by protein-protein interaction with a novel human cytoplasmic protein VprBP. *Gene*. 2001;263(1-2):131-40.
559. Le Rouzic E, Morel M, Ayinde D, Belaidouni N, Letienne J, Transy C, et al. Assembly with the Cul4A-DDB1DCAF1 ubiquitin ligase protects HIV-1 Vpr from proteasomal degradation. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21686-92.
560. Gerard FC, Yang R, Romani B, Poisson A, Belzile JP, Rougeau N, et al. Defining the interactions and role of DCAF1/VPRBP in the DDB1-cullin4A E3 ubiquitin ligase complex engaged by HIV-1 Vpr to induce a G2 cell cycle arrest. *PLoS One*. 2014;9(2):e89195.
561. Zhou X, DeLucia M, Hao C, Hrecka K, Monnie C, Skowronski J, et al. HIV-1 Vpr protein directly loads helicase-like transcription factor (HLTF) onto the CUL4-DCAF1 E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2017;292(51):21117-27.
562. DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Monteiro-Filho CM, Arganaraz ER, Planelles V. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol J*. 2007;4:57.

563. Wang X, Singh S, Jung HY, Yang G, Jun S, Sastry KJ, et al. HIV-1 Vpr protein inhibits telomerase activity via the EDD-DDB1-VPRBP E3 ligase complex. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15474-80.
564. Jung HY, Wang X, Jun S, Park JI. Dyrk2-associated EDD-DDB1-VprBP E3 ligase inhibits telomerase by TERT degradation. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7252-62.
565. Jowett JBM, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*. 1995;69(10):6304-13.
566. Roshal M, Kim B, Zhu Y, Nghiem P, Planelles V. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25879-86.
567. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, et al. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res*. 2006;66(2):627-31.
568. Zimmerman ES, Sherman MP, Blackett JL, Neidleman JA, Kreis C, Mundt P, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces DNA replication stress in vitro and in vivo. *J Virol*. 2006;80(21):10407-18.
569. Collins DR, Lubow J, Lukic Z, Mashiba M, Collins KL. Vpr Promotes Macrophage-Dependent HIV-1 Infection of CD4+ T Lymphocytes. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1005054.
570. Agostini I, Popov S, Hao T, Li JH, Dubrovsky L, Chaika O, et al. Phosphorylation of Vpr regulates HIV type 1 nuclear import and macrophage infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18(4):283-8.
571. Barnitz RA, Wan F, Tripuraneni V, Bolton DL, Lenardo MJ. Protein kinase A phosphorylation activates Vpr-induced cell cycle arrest during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2010;84(13):6410-24.
572. Zhou Y, Ratner L. Phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr regulates cell cycle arrest. *J Virol*. 2000;74(14):6520-7.

573. Miller CM, Akiyama H, Agosto LM, Emery A, Ettinger CR, Swanstrom RI, et al. Virion-associated Vpr alleviates a postintegration block to HIV-1 infection of dendritic cells. *J Virol.* 2017;91(13).
574. Bregnard C, Benkirane M, Laguette N. DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front Microbiol.* 2014;5:176.
575. Guenzel CA, Herate C, Benichou S. HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Front Microbiol.* 2014;5:127.
576. Belzile JP, Abrahamyan LG, Gerard FC, Rougeau N, Cohen EA. Formation of mobile chromatin-associated nuclear foci containing HIV-1 Vpr and VPRBP is critical for the induction of G2 cell cycle arrest. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001080.
577. Lai M, Zimmerman ES, Planelles V, Chen J. Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo. *J Virol.* 2005;79(24):15443-51.
578. Zimmerman ES, Chen J, Andersen JL, Ardon O, Dehart JL, Blackett J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Mol Cell Biol.* 2004;24(21):9286-94.
579. Laguette N, Bregnard C, Hue P, Basbous J, Yatim A, Larroque M, et al. Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell.* 2014;156(1-2):134-45.
580. Iijima K, Kobayashi J, Ishizaka Y. Structural alteration of DNA induced by viral protein R of HIV-1 triggers the DNA damage response. *Retrovirology.* 2018;15(1):8.
581. Scrima A, Konickova R, Czyzewski BK, Kawasaki Y, Jeffrey PD, Groisman R, et al. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell.* 2008;135(7):1213-23.
582. Sugasawa K. UV-DDB: a molecular machine linking DNA repair with ubiquitination. *DNA Repair (Amst).* 2009;8(8):969-72.

583. Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, et al. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell*. 2006;22(3):383-94.
584. Bourbigot S, Beltz H, Denis J, Morellet N, Roques BP, Mely Y, et al. The C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr adopts an antiparallel dimeric structure in solution via its leucine-zipper-like domain. *Biochem J*. 2005;387(Pt 2):333-41.
585. Wang L, Mukherjee S, Narayan O, Zhao LJ. Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene*. 1996;178(1-2):7-13.
586. Shimura M, Toyoda Y, Iijima K, Kinomoto M, Tokunaga K, Yoda K, et al. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *J Cell Biol*. 2011;194(5):721-35.
587. Taneichi D, Iijima K, Doi A, Koyama T, Minemoto Y, Tokunaga K, et al. Identification of SNF2h, a chromatin-remodeling factor, as a novel binding protein of Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011;6(2):177-87.
588. Maudet C, Sourisce A, Dragin L, Lahouassa H, Rain JC, Bouaziz S, et al. HIV-1 Vpr induces the degradation of ZIP and sZIP, adaptors of the NuRD chromatin remodeling complex, by hijacking DCAF1/VprBP. *PLoS One*. 2013;8(10):e77320.
589. Forouzanfar F, Ali S, Wallet C, De Rovere M, Ducloy C, El Mekdad H, et al. HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing. *Sci Rep*. 2019;9(1):13154.
590. Nakai-Murakami C, Shimura M, Kinomoto M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, et al. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene*. 2007;26(4):477-86.
591. Andersen JL, Zimmerman ES, DeHart JL, Murala S, Ardon O, Blackett J, et al. ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2005;12(4):326-34.

- 592.Li G, Elder RT, Qin K, Park HU, Liang D, Zhao RY. Phosphatase type 2A-dependent and -independent pathways for ATR phosphorylation of CHK1. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7287-98.
- 593.Li G, Park HU, Liang D, Zhao RY. Cell cycle G2/M arrest through an S phase-dependent mechanism by HIV-1 viral protein R. *Retrovirology.* 2010;7:59.
- 594.Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell.* 2010;37(4):492-502.
- 595.Sirbu BM, Couch FB, Feigerle JT, Bhaskara S, Hiebert SW, Cortez D. Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes Dev.* 2011;25(12):1320-7.
- 596.Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, et al. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell.* 2013;155(5):1088-103.
- 597.Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol.* 2014;16(1):2-9.
- 598.Yuan H, Kamata M, Xie YM, Chen IS. Increased levels of WEE1 kinase in G2 are necessary for Vpr- and gamma irradiation-induced G2 arrest. *J Virol.* 2004;78(15):8183-90.
- 599.O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P. CHK1 is a WEE1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting CDC2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* 1997;16(3):545-54.
- 600.Russell P, Nurse P. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell.* 1987;49(4):559-67.
- 601.Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, et al. CHK1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 2000;14(12):1448-59.
- 602.Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of CDC25C on serine-216. *Science.* 1997;277(5331):1501-5.

603. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, et al. Conservation of the CHK1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to CDK regulation through CDC25. *Science*. 1997;277(5331):1497-501.
604. Goh WC, Manel N, Emerman M. The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology*. 2004;318(1):337-49.
605. Kino T, Gragerov A, Valentin A, Tsopanomialou M, Ilyina-Gragerova G, Erwin-Cohen R, et al. Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol*. 2005;79(5):2780-7.
606. Kamata M, Watanabe N, Nagaoka Y, Chen IS. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr binds to the N lobe of the WEE1 kinase domain and enhances kinase activity for CDC2. *J Virol*. 2008;82(12):5672-82.
607. Yuan H, Xie YM, Chen IS. Depletion of WEE1 kinase is necessary for both human immunodeficiency virus type 1 Vpr- and gamma irradiation-induced apoptosis. *J Virol*. 2003;77(3):2063-70.
608. Westervelt P, Henkel T, Trowbridge DB, Orenstein J, Heuser J, Gendelman HE, et al. Dual regulation of silent and productive infection in monocytes by distinct human immunodeficiency virus type 1 determinants. *J Virol*. 1992;66(6):3925-31.
609. Yan J, Shun MC, Zhang Y, Hao C, Skowronski J. HIV-1 Vpr counteracts HLTF-mediated restriction of HIV-1 infection in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(19):9568-77.
610. Yan J, Shun MC, Hao C, Zhang Y, Qian J, Hrecka K, et al. HIV-1 Vpr reprograms CLR4(DCAF1) E3 ubiquitin ligase to antagonize Exonuclease 1-mediated restriction of HIV-1 infection. *MBio*. 2018;9(5).
611. Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Ishimoto A, et al. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J Virol*. 1989;63(9):4110-4.



- 612.Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, et al. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*. 2009;138(1):63-77.
- 613.Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*. 2009;138(1):78-89.
- 614.Zhou X, DeLucia M, Ahn J. SLX4-SLX1 protein-independent down-regulation of MUS81-EME1 protein by HIV-1 Viral protein R (Vpr). *J Biol Chem*. 2016;291(33):16936-47.
- 615.Berger G, Lawrence M, Hue S, Neil SJ. G2/M cell cycle arrest correlates with primate lentiviral Vpr interaction with the SLX4 complex. *J Virol*. 2015;89(1):230-40.
- 616.Fregoso OI, Emerman M. Activation of the DNA damage response is a conserved function of HIV-1 and HIV-2 Vpr that is independent of SLX4 recruitment. *mBio*. 2016;7(5).
- 617.Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. 2017;18(9):517-34.
- 618.Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. TET proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.
- 619.Lv L, Wang Q, Xu Y, Tsao LC, Nakagawa T, Guo H, et al. Vpr targets TET2 for degradation by CRL4(VprBP) E3 ligase to sustain IL-6 expression and enhance HIV-1 replication. *Mol Cell*. 2018;70(5):961-70 e5.
- 620.An J, Rao A, Ko M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp Mol Med*. 2017;49(4):e323.
- 621.Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med*. 1990;172(1):151-8.

- 622.Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. TET2 is required to resolve inflammation by recruiting HDAC2 to specifically repress IL-6. *Nature*. 2015;525(7569):389-93.
- 623.Wang Q, Su L. Vpr enhances HIV-1 Env processing and virion infectivity in macrophages by modulating TET2-dependent IFITM3 expression. *MBio*. 2019;10(4).
- 624.Yu J, Li M, Wilkins J, Ding S, Swartz TH, Esposito AM, et al. IFITM proteins restrict HIV-1 infection by antagonizing the envelope glycoprotein. *Cell Rep*. 2015;13(1):145-56.
- 625.Lu J, Pan Q, Rong L, He W, Liu SL, Liang C. The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol*. 2011;85(5):2126-37.
- 626.Compton AA, Bruel T, Porrot F, Mallet A, Sachse M, Euvrard M, et al. IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe*. 2014;16(6):736-47.
- 627.Tartour K, Appourchaux R, Gaillard J, Nguyen XN, Durand S, Turpin J, et al. IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology*. 2014;11:103.
- 628.Lee WJ, Fu RM, Liang C, Sloan RD. IFITM proteins inhibit HIV-1 protein synthesis. *Sci Rep*. 2018;8(1):14551.
- 629.Zhang X, Zhou T, Frabutt DA, Zheng YH. HIV-1 Vpr increases Env expression by preventing Env from endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). *Virology*. 2016;496:194-202.
- 630.Mashiba M, Collins DR, Terry VH, Collins KL. Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. *Cell Host Microbe*. 2014;16(6):722-35.
- 631.Lubow J, Virgilio MC, Merlino M, Collins DR, Mashiba M, Peterson BG, et al. Mannose receptor is an HIV restriction factor counteracted by Vpr in macrophages. *Elife*. 2020;9.
- 632.Sukegawa S, Miyagi E, Bouamr F, Farkasova H, Strebel K. Mannose Receptor 1 Restricts HIV Particle Release from Infected Macrophages. *Cell Rep*. 2018;22(3):786-95.

- 633.Caldwell RL, Egan BS, Shepherd VL. HIV-1 Tat represses transcription from the mannose receptor promoter. *J Immunol.* 2000;165(12):7035-41.
- 634.Vigerust DJ, Egan BS, Shepherd VL. HIV-1 Nef mediates post-translational down-regulation and redistribution of the mannose receptor. *J Leukoc Biol.* 2005;77(4):522-34.
- 635.Marno KM, Ogunkolade BW, Pade C, Oliveira NM, O'Sullivan E, McKnight A. Novel restriction factor RNA-associated early-stage anti-viral factor (REAF) inhibits human and simian immunodeficiency viruses. *Retrovirology.* 2014;11:3.
- 636.McKnight A, Griffiths DJ, Dittmar M, Clapham P, Thomas E. Characterization of a late entry event in the replication cycle of human immunodeficiency virus type 2. *J Virol.* 2001;75(15):6914-22.
- 637.Marno KM, O'Sullivan E, Jones CE, Diaz-Delfin J, Pardieu C, Sloan RD, et al. RNA-Associated Early-Stage Antiviral Factor Is a Major Component of Lv2 Restriction. *J Virol.* 2017;91(10).
- 638.Gibbons JM, Marno KM, Pike R, Lee WJ, Jones CE, Ogunkolade BW, et al. HIV-1 accessory protein Vpr interacts with REAF/RPRD2 to mitigate its antiviral activity. *J Virol.* 2020;94(4).
- 639.Lahouassa H, Blondot ML, Chauveau L, Chougui G, Morel M, Leduc M, et al. HIV-1 Vpr degrades the HLTF DNA translocase in T cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(19):5311-6.
- 640.Hrecka K, Hao C, Shun MC, Kaur S, Swanson SK, Florens L, et al. HIV-1 and HIV-2 exhibit divergent interactions with HLTF and UNG2 DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(27):E3921-30.
- 641.Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179-204.
- 642.Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S. The interaction of Vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol.* 2000;74(15):7039-47.

643. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.* 1995;69(8):5087-94.
644. Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28419-25.
645. Mansky LM. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology.* 1996;222(2):391-400.
646. Hansen EC, Ransom M, Hesselberth JR, Hosmane NN, Capoferri AA, Bruner KM, et al. Diverse fates of uracilated HIV-1 DNA during infection of myeloid lineage cells. *Elife.* 2016;5.
647. Kennedy EM, Daddacha W, Slater R, Gavegnano C, Fromentin E, Schinazi RF, et al. Abundant non-canonical dUTP found in primary human macrophages drives its frequent incorporation by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 2011;286(28):25047-55.
648. Weil AF, Ghosh D, Zhou Y, Seiple L, McMahon MA, Spivak AM, et al. Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):E448-57.
649. Sire J, Querat G, Esnault C, Priet S. Uracil within DNA: an actor of antiviral immunity. *Retrovirology.* 2008;5:45.
650. Amie SM, Noble E, Kim B. Intracellular nucleotide levels and the control of retroviral infections. *Virology.* 2013;436(2):247-54.
651. Carter RJ, Parsons JL. Base excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. *Mol Cell Biol.* 2016;36(10):1426-37.
652. Selig L, Benichou S, Rogel ME, Wu LI, Vodicka MA, Sire J, et al. Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol.* 1997;71(6):4842-6.

653. Priet S, Navarro JM, Gros N, Querat G, Sire J. Functional role of HIV-1 virion-associated uracil DNA glycosylase 2 in the correction of G:U mispairs to G:C pairs. *J Biol Chem.* 2003;278(7):4566-71.
654. Bouhamdan M, Xue Y, Baudat Y, Hu B, Sire J, Pomerantz RJ, et al. Diversity of HIV-1 Vpr interactions involves usage of the WXXF motif of host cell proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(14):8009-16.
655. Willetts KE, Rey F, Agostini I, Navarro JM, Baudat Y, Vigne R, et al. DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase is specifically incorporated into human immunodeficiency virus type 1 viral particles through a Vpr-independent mechanism. *J Virol.* 1999;73(2):1682-8.
656. Guenzel CA, Herate C, Le Rouzic E, Maidou-Peindara P, Sadler HA, Rouyez MC, et al. Recruitment of the nuclear form of uracil DNA glycosylase into virus particles participates in the full infectivity of HIV-1. *J Virol.* 2012;86(5):2533-44.
657. Yang B, Chen K, Zhang C, Huang S, Zhang H. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11667-75.
658. Priet S, Gros N, Navarro JM, Boretto J, Canard B, Querat G, et al. HIV-1-associated uracil DNA glycosylase activity controls dUTP misincorporation in viral DNA and is essential to the HIV-1 life cycle. *Mol Cell.* 2005;17(4):479-90.
659. Schrofelbauer B, Yu Q, Zeitlin SG, Landau NR. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J Virol.* 2005;79(17):10978-87.
660. Zhou D, Wang Y, Tokunaga K, Huang F, Sun B, Yang R. The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 2015;195:25-34.
661. Fenard D, Houzet L, Bernard E, Tupin A, Brun S, Mougel M, et al. Uracil DNA glycosylase 2 negatively regulates HIV-1 LTR transcription. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(18):6008-18.

662. Bouhamdan M, Benichou S, Rey F, Navarro JM, Agostini I, Spire B, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol.* 1996;70(2):697-704.
663. Ahn J, Vu T, Novince Z, Guerrero-Santoro J, Rapic-Otrin V, Gronenborn AM. HIV-1 Vpr loads uracil DNA glycosylase-2 onto DCAF1, a substrate recognition subunit of a cullin 4A-ring E3 ubiquitin ligase for proteasome-dependent degradation. *J Biol Chem.* 2010;285(48):37333-41.
664. Nekorchuk MD, Sharifi HJ, Furuya AK, Jellinger R, de Noronha CM. HIV relies on neddylation for ubiquitin ligase-mediated functions. *Retrovirology.* 2013;10:138.
665. Langevin C, Maidou-Peindara P, Aas PA, Jacquot G, Otterlei M, Slupphaug G, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr modulates cellular expression of UNG2 via a negative transcriptional effect. *J Virol.* 2009;83(19):10256-63.
666. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362(6418):355-8.
667. Embretson J, Zupancic M, Beneke J, Till M, Wolinsky S, Ribas JL, et al. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and in situ hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(1):357-61.
668. Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, Thompson L, Baseler M, Massari F, et al. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science.* 1989;245(4915):305-8.
669. Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science.* 1991;254(5030):423-7.
670. Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *J Clin Invest.* 2016;126(2):409-14.

- 671.Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a007096.
- 672.Levy DN, Refaeli Y, Weiner DB. Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J Virol.* 1995;69(2):1243-52.
- 673.Levy DN, Refaeli Y, MacGregor RR, Weiner DB. Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(23):10873-7.
- 674.Marban C, Redel L, Suzanne S, Van Lint C, Lecestre D, Chasserot-Golaz S, et al. COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(7):2318-31.
- 675.Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, et al. Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 2007;26(2):412-23.
- 676.Eilebrecht S, Le Douce V, Riclet R, Targat B, Hallay H, Van Driessche B, et al. HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(8):4962-71.
- 677.Le Douce V, Colin L, Redel L, Cherrier T, Herbein G, Aunis D, et al. LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(5):1904-15.
- 678.Le Douce V, Forouzanfar F, Eilebrecht S, Van Driessche B, Ait-Ammar A, Verdikt R, et al. HIC1 controls cellular- and HIV-1- gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci Rep.* 2016;6:34920.
- 679.Gangwani MR, Kumar A. Multiple protein kinases via activation of transcription factors NF-kappaB, AP-1 and C/EBP-delta regulate the IL-6/IL-8 production by HIV-1 Vpr in astrocytes. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135633.

680. Roux P, Alfieri C, Hrimech M, Cohen EA, Tanner JE. Activation of transcription factors NF-kappaB and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *J Virol*. 2000;74(10):4658-65.
681. Hohne K, Businger R, van Nuffel A, Bolduan S, Koppensteiner H, Baeyens A, et al. Virion encapsidated HIV-1 Vpr induces NFAT to prime non-activated T cells for productive infection. *Open Biol*. 2016;6(7).
682. Ayyavoo V, Mahboubi A, Mahalingam S, Ramalingam R, Kudchodkar S, Williams WV, et al. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med*. 1997;3(10):1117-23.
683. Liu R, Lin Y, Jia R, Geng Y, Liang C, Tan J, et al. HIV-1 Vpr stimulates NF-kappaB and AP-1 signaling by activating TAK1. *Retrovirology*. 2014;11:45.
684. Varin A, Decrion AZ, Sabbah E, Quivy V, Sire J, Van Lint C, et al. Synthetic Vpr protein activates activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and NF-kappaB and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *J Biol Chem*. 2005;280(52):42557-67.
685. Amini S, Saunders M, Kelley K, Khalili K, Sawaya BE. Interplay between HIV-1 Vpr and Sp1 modulates p21(WAF1) gene expression in human astrocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46046-56.
686. Burdo TH, Nonnemacher M, Irish BP, Choi CH, Krebs FC, Gartner S, et al. High-affinity interaction between HIV-1 Vpr and specific sequences that span the C/EBP and adjacent NF-kappaB sites within the HIV-1 LTR correlate with HIV-1-associated dementia. *DNA Cell Biol*. 2004;23(4):261-9.
687. Lahti AL, Manninen A, Saksela K. Regulation of T cell activation by HIV-1 accessory proteins: Vpr acts via distinct mechanisms to cooperate with Nef in NFAT-directed gene expression and to promote transactivation by CREB. *Virology*. 2003;310(1):190-6.



688. Felzien LK, Woffendin C, Hottiger MO, Subbramanian RA, Cohen EA, Nabel GJ. HIV transcriptional activation by the accessory protein, Vpr, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5281-6.
689. Jäger S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*. 2011;481(7381):365-70.
690. Greenwood EJD, Williamson JC, Sienkiewicz A, Naamati A, Matheson NJ, Lehner PJ. Promiscuous targeting of cellular proteins by Vpr drives systems-level proteomic remodeling in HIV-1 infection. *Cell Rep*. 2019;27(5):1579-96 e7.
691. Battle DJ, Kasim M, Yong J, Lotti F, Lau CK, Mouaikel J, et al. The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:313-20.
692. Hamamoto S, Nishitsuji H, Amagasa T, Kannagi M, Masuda T. Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol*. 2006;80(12):5670-7.
693. Nishitsuji H, Hayashi T, Takahashi T, Miyano M, Kannagi M, Masuda T. Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 is critical for HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009;4(11):e7825.
694. Fujita M, Otsuka M, Miyoshi M, Khamisri B, Nomaguchi M, Adachi A. Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *J Virol*. 2008;82(15):7752-6.
695. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012;13(3):223-8.
696. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-7.

697. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E, et al. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature*. 2011;480(7377):379-82.
698. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med*. 2012;18(11):1682-7.
699. DeLucia M, Mehrens J, Wu Y, Ahn J. HIV-2 and SIVmac accessory virulence factor Vpx down-regulates SAMHD1 enzyme catalysis prior to proteasome-dependent degradation. *J Biol Chem*. 2013;288(26):19116-26.
700. Schwefel D, Groom HC, Boucherit VC, Christodoulou E, Walker PA, Stoye JP, et al. Structural basis of lentiviral subversion of a cellular protein degradation pathway. *Nature*. 2014;505(7482):234-8.
701. Franzolin E, Pontarin G, Rampazzo C, Miazzi C, Ferraro P, Palumbo E, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(35):14272-7.
702. Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, et al. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med*. 2014;20(8):936-41.
703. Welbourn S, Dutta SM, Semmes OJ, Strebel K. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1. *J Virol*. 2013;87(21):11516-24.
704. White TE, Brandariz-Nunez A, Valle-Casuso JC, Amie S, Nguyen LA, Kim B, et al. The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe*. 2013;13(4):441-51.
705. St Gelais C, de Silva S, Hach JC, White TE, Diaz-Griffero F, Yount JS, et al. Identification of cellular proteins interacting with the retroviral restriction factor SAMHD1. *J Virol*. 2014;88(10):5834-44.
706. Cribier A, Descours B, Valadao AL, Laguette N, Benkirane M. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep*. 2013;3(4):1036-43.

707. Valle-Casuso JC, Allouch A, David A, Lenzi GM, Studdard L, Barre-Sinoussi F, et al. p21 restricts HIV-1 in monocyte-derived dendritic cells through the reduction of deoxynucleoside triphosphate biosynthesis and regulation of SAMHD1 antiviral activity. *J Virol*. 2017;91(23).
708. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993;366(6456):701-4.
709. Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene*. 1998;16(2):217-25.
710. Jauregui P, Landau NR. DNA damage induces a SAMHD1-mediated block to the infection of macrophages by HIV-1. *Sci Rep*. 2018;8(1):4153.
711. Pauls E, Ruiz A, Riveira-Munoz E, Permanyer M, Badia R, Clotet B, et al. p21 regulates the HIV-1 restriction factor SAMHD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(14):E1322-4.
712. Schott K, Fuchs NV, Derua R, Mahboubi B, Schnellbacher E, Seifried J, et al. Dephosphorylation of the HIV-1 restriction factor SAMHD1 is mediated by PP2A-B55alpha holoenzymes during mitotic exit. *Nat Commun*. 2018;9(1):2227.
713. Hossain D, Ferreira Barbosa JA, Cohen EA, Tsang WY. HIV-1 Vpr hijacks EDD-DYRK2-DDB1(DCAF1) to disrupt centrosome homeostasis. *J Biol Chem*. 2018;293(24):9448-60.
714. Casey Klockow L, Sharifi HJ, Wen X, Flagg M, Furuya AK, Nekorchuk M, et al. The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology*. 2013;444(1-2):191-202.
715. Chowdhury IH, Wang XF, Landau NR, Robb ML, Polonis VR, Birx DL, et al. HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest. *Virology*. 2003;305(2):371-7.

- 716.Kino T, Gragerov A, Slobodskaya O, Tsopanomichalou M, Chrousos GP, Pavlakis GN. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol.* 2002;76(19):9724-34.
- 717.Kim B, Nguyen LA, Daddacha W, Hollenbaugh JA. Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 2012;287(26):21570-4.
- 718.Hollenbaugh JA, Tao S, Lenzi GM, Ryu S, Kim DH, Diaz-Griffero F, et al. dNTP pool modulation dynamics by SAMHD1 protein in monocyte-derived macrophages. *Retrovirology.* 2014;11:63.
- 719.Oo A, Kim DH, Schinazi RF, Kim B. Viral protein X reduces the incorporation of mutagenic noncanonical rNTPs during lentivirus reverse transcription in macrophages. *J Biol Chem.* 2020;295(2):657-66.
- 720.Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature.* 2011;474(7353):658-61.
- 721.Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology.* 2012;9:87.
- 722.Reinhard C, Bottinelli D, Kim B, Luban J. Vpx rescue of HIV-1 from the antiviral state in mature dendritic cells is independent of the intracellular deoxynucleotide concentration. *Retrovirology.* 2014;11:12.
- 723.Baldauf HM, Stegmann L, Schwarz SM, Ambiel I, Trotard M, Martin M, et al. Vpx overcomes a SAMHD1-independent block to HIV reverse transcription that is specific to resting CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(10):2729-34.
- 724.Chougui G, Munir-Matloob S, Matkovic R, Martin MM, Morel M, Lahouassa H, et al. HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat Microbiol.* 2018;3(8):891-7.

725. Yurkovetskiy L, Guney MH, Kim K, Goh SL, McCauley S, Dauphin A, et al. Primate immunodeficiency virus proteins Vpx and Vpr counteract transcriptional repression of proviruses by the HUSH complex. *Nat Microbiol.* 2018;3(12):1354-61.
726. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989;340(6230):245-6.
727. Hamdi A, Colas P. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(2):109-18.
728. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2000;403(6770):623-7.
729. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(8):645-54.
730. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012;196(6):801-10.
731. Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science.* 2013;339(6125):1328-31.
732. Kim DI, Birendra KC, Zhu W, Motamedchaboki K, Doye V, Roux KJ. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):E2453-61.
733. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, Motamedchaboki K, et al. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell.* 2016;27(8):1188-96.
734. Samavarchi-Tehrani P, Samson R, Gingras AC. Proximity dependent biotinylation: key enzymes and adaptation to proteomics approaches. *Mol Cell Proteomics.* 2020.
735. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):880-7.

736. Bagci H, Sriskandarajah N, Robert A, Boulais J, Elkholi IE, Tran V, et al. Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms. *Nat Cell Biol.* 2020;22(1):120-34.
737. Lambert JP, Tucholska M, Go C, Knight JD, Gingras AC. Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J Proteomics.* 2015;118:81-94.
738. Lodge R, Gilmore JC, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Cohen EA. Regulation of CD4 receptor and HIV-1 entry by microRNAs-221 and -222 during differentiation of THP-1 Cells. *Viruses.* 2018;10(1).
739. Lukhele S, Cohen EA. Conserved residues within the HIV-1 Vpu transmembrane-proximal hinge region modulate BST2 binding and antagonism. *Retrovirology.* 2017;14(1):18.
740. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* 2001;24(3):218-29.
741. Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD. The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell.* 1985;40(4):795-803.
742. Senecoff JF, Bruckner RC, Cox MM. The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(21):7270-4.
743. O'Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 1991;251(4999):1351-5.
744. Waldhuber MG, Bateson M, Tan J, Greenway AL, McPhee DA. Studies with GFP-Vpr fusion proteins: induction of apoptosis but ablation of cell-cycle arrest despite nuclear membrane or nuclear localization. *Virology.* 2003;313(1):91-104.
745. Schopp IM, Amaya Ramirez CC, Debeljak J, Kreibich E, Skribbe M, Wild K, et al. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat Commun.* 2017;8:15690.

746. Watson ER, Brown NG, Peters JM, Stark H, Schulman BA. Posing the APC/C E3 ubiquitin ligase to orchestrate cell division. *Trends Cell Biol.* 2019;29(2):117-34.
747. Chang LF, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D. Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature.* 2014;513(7518):388-93.
748. Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):644-56.
749. Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D. Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature.* 2015;522(7557):450-4.
750. Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP. An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 2006;20(4):449-60.
751. Prinz S, Hwang ES, Visintin R, Amon A. The regulation of CDC20 proteolysis reveals a role for APC components CDC23 and CDC27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol.* 1998;8(13):750-60.
752. Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator HCT1 is controlled by the kinase CDC28 and the phosphatase CDC14. *Curr Biol.* 1999;9(5):227-36.
753. He J, Chao WC, Zhang Z, Yang J, Cronin N, Barford D. Insights into degron recognition by APC/C coactivators from the structure of an Acm1-Cdh1 complex. *Mol Cell.* 2013;50(5):649-60.
754. Reis A, Levasseur M, Chang HY, Elliott DJ, Jones KT. The CRY box: a second APCcdh1-dependent degron in mammalian cdc20. *EMBO Rep.* 2006;7(10):1040-5.
755. Tian W, Li B, Warrington R, Tomchick DR, Yu H, Luo X. Structural analysis of human Cdc20 supports multisite degron recognition by APC/C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(45):18419-24.
756. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature.* 1991;349(6305):132-8.

- 757.King RW, Glotzer M, Kirschner MW. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell.* 1996;7(9):1343-57.
- 758.Pfleger CM, Kirschner MW. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 2000;14(6):655-65.
- 759.Di Fiore B, Davey NE, Hagting A, Izawa D, Mansfeld J, Gibson TJ, et al. The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Dev Cell.* 2015;32(3):358-72.
- 760.Di Fiore B, Wurzenberger C, Davey NE, Pines J. The Mitotic Checkpoint Complex Requires an Evolutionary Conserved Cassette to Bind and Inhibit Active APC/C. *Mol Cell.* 2016;64(6):1144-53.
- 761.Diaz-Martinez LA, Tian W, Li B, Warrington R, Jia L, Brautigam CA, et al. The Cdc20-binding Phe box of the spindle checkpoint protein BubR1 maintains the mitotic checkpoint complex during mitosis. *J Biol Chem.* 2015;290(4):2431-43.
- 762.Rudner AD, Murray AW. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol.* 2000;149(7):1377-90.
- 763.Kramer ER, Scheuringer N, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM. Mitotic regulation of the APC activator proteins Cdc20 and Cdh1. *Mol Biol Cell.* 2000;11(5):1555-69.
- 764.Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol.* 2001;154(5):925-36.
- 765.Miller JJ, Summers MK, Hansen DV, Nachury MV, Lehman NL, Loktev A, et al. Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* 2006;20(17):2410-20.
- 766.Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, et al. Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/CCdh1. *Mol Biol Cell.* 2008;19(3):1007-21.



767. Mailand N, Diffley JF. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell*. 2005;122(6):915-26.
768. Zhao WM, Fang G. Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33516-24.
769. Littlepage LE, Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*. 2002;16(17):2274-85.
770. Stewart S, Fang G. Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res*. 2005;65(19):8730-5.
771. Song L, Rape M. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell*. 2010;38(3):369-82.
772. Wan L, Tan M, Yang J, Inuzuka H, Dai X, Wu T, et al. APC(Cdc20) suppresses apoptosis through targeting Bim for ubiquitination and destruction. *Dev Cell*. 2014;29(4):377-91.
773. Qi W, Yu H. KEN-box-dependent degradation of the Bub1 spindle checkpoint kinase by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J Biol Chem*. 2007;282(6):3672-9.
774. Alfieri C, Chang L, Zhang Z, Yang J, Maslen S, Skehel M, et al. Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature*. 2016;536(7617):431-6.
775. Turnell AS, Stewart GS, Grand RJ, Rookes SM, Martin A, Yamano H, et al. The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. *Nature*. 2005;438(7068):690-5.
776. Yamada M, Watanabe K, Mistrik M, Vesela E, Protivankova I, Mailand N, et al. ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev*. 2013;27(22):2459-72.
777. Donzelli M, Squatrito M, Ganoth D, Hershko A, Pagano M, Draetta GF. Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J*. 2002;21(18):4875-84.

778. Kieffer I, Lorenzo C, Dozier C, Schmitt E, Ducommun B. Differential mitotic degradation of the Cdc25B phosphatase variants. *Oncogene*. 2007;26(57):7847-58.
779. Chen F, Zhang Z, Bower J, Lu Y, Leonard SS, Ding M, et al. Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):1990-5.
780. Gurden MD, Holland AJ, van Zon W, Tighe A, Vergnolle MA, Andres DA, et al. Cdc20 is required for the post-anaphase, KEN-dependent degradation of centromere protein F. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 3):321-30.
781. Seki A, Fang G. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-Cdh1 during mitotic exit. *J Biol Chem*. 2007;282(20):15103-13.
782. Bashir T, Dorrello NV, Amador V, Guardavaccaro D, Pagano M. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*. 2004;428(6979):190-3.
783. Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell*. 2008;134(2):256-67.
784. Gao D, Inuzuka H, Korenjak M, Tseng A, Wu T, Wan L, et al. Cdh1 regulates cell cycle through modulating the claspin/Chk1 and the Rb/E2F1 pathways. *Mol Biol Cell*. 2009;20(14):3305-16.
785. Zhang WN, Zhou J, Zhou T, Li AL, Wang N, Xu JJ, et al. Phosphorylation-triggered CUEDC2 degradation promotes UV-induced G1 arrest through APC/C(Cdh1) regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11017-22.
786. Gao YF, Li T, Chang Y, Wang YB, Zhang WN, Li WH, et al. Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 2011;13(8):924-33.
787. Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters JM, Hunt T. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 2001;153(1):137-48.

- 788.den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol.* 2001;153(1):121-36.
- 789.Clute P, Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol.* 1999;1(2):82-7.
- 790.Budhavarapu VN, White ED, Mahanic CS, Chen L, Lin FT, Lin WC. Regulation of E2F1 by APC/C Cdh1 via K11 linkage-specific ubiquitin chain formation. *Cell Cycle.* 2012;11(10):2030-8.
- 791.Peart MJ, Poyurovsky MV, Kass EM, Urist M, Verschuren EW, Summers MK, et al. APC/C(Cdc20) targets E2F1 for degradation in prometaphase. *Cell Cycle.* 2010;9(19):3956-64.
- 792.Hsu JY, Reimann JD, Sorensen CS, Lukas J, Jackson PK. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):358-66.
- 793.Ping Z, Lim R, Bashir T, Pagano M, Guardavaccaro D. APC/C (Cdh1) controls the proteasome-mediated degradation of E2F3 during cell cycle exit. *Cell Cycle.* 2012;11(10):1999-2005.
- 794.Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, et al. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell.* 2012;45(1):123-31.
- 795.Reimann JD, Gardner BE, Margottin-Goguet F, Jackson PK. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev.* 2001;15(24):3278-85.
- 796.Reimann JD, Freed E, Hsu JY, Kramer ER, Peters JM, Jackson PK. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell.* 2001;105(5):645-55.
- 797.Lai F, Hu K, Wu Y, Tang J, Sang Y, Cao J, et al. Human KIAA1018/FAN1 nuclease is a new mitotic substrate of APC/C(Cdh1). *Chin J Cancer.* 2012;31(9):440-8.
- 798.Puklowski A, Homsy Y, Keller D, May M, Chauhan S, Kossatz U, et al. The SCF-FBXW5 E3-ubiquitin ligase is regulated by PLK4 and targets HsSAS-6 to control centrosome duplication. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):1004-9.

- 799.Laoukili J, Alvarez-Fernandez M, Stahl M, Medema RH. FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner. *Cell Cycle*. 2008;7(17):2720-6.
- 800.McGarry TJ, Kirschner MW. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*. 1998;93(6):1043-53.
- 801.Li L, Zhou Y, Wang GF, Liao SC, Ke YB, Wu W, et al. Anaphase-promoting complex/cyclosome controls HEC1 stability. *Cell Prolif*. 2011;44(1):1-9.
- 802.Kim AH, Puram SV, Bilimoria PM, Ikeuchi Y, Keough S, Wong M, et al. A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell*. 2009;136(2):322-36.
- 803.Lasorella A, Stegmuller J, Guardavaccaro D, Liu G, Carro MS, Rothschild G, et al. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature*. 2006;442(7101):471-4.
- 804.Drosopoulos K, Tang C, Chao WC, Linardopoulos S. APC/C is an essential regulator of centrosome clustering. *Nat Commun*. 2014;5:3686.
- 805.Sedgwick GG, Hayward DG, Di Fiore B, Pardo M, Yu L, Pines J, et al. Mechanisms controlling the temporal degradation of Nek2A and Kif18A by the APC/C-Cdc20 complex. *EMBO J*. 2013;32(2):303-14.
- 806.Feine O, Zur A, Mahbubani H, Brandeis M. Human Kid is degraded by the APC/C(Cdh1) but not by the APC/C(Cdc20). *Cell Cycle*. 2007;6(20):2516-23.
- 807.Singh SA, Winter D, Kirchner M, Chauhan R, Ahmed S, Ozlu N, et al. Co-regulation proteomics reveals substrates and mechanisms of APC/C-dependent degradation. *EMBO J*. 2014;33(4):385-99.
- 808.Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, Clarke PR. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-Cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J*. 2010;29(14):2407-20.

- 809.Hames RS, Wattam SL, Yamano H, Bacchieri R, Fry AM. APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *EMBO J.* 2001;20(24):7117-27.
- 810.Hayes MJ, Kimata Y, Wattam SL, Lindon C, Mao G, Yamano H, et al. Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol.* 2006;8(6):607-14.
- 811.Wang Y, Zhan Q. Cell cycle-dependent expression of centrosomal ninein-like protein in human cells is regulated by the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem.* 2007;282(24):17712-9.
- 812.Klitzing C, Huss R, Illert AL, Froschl A, Wotzel S, Peschel C, et al. APC/C(Cdh1)-mediated degradation of the F-box protein NIPA is regulated by its association with Skp1. *PLoS One.* 2011;6(12):e28998.
- 813.Li L, Zhou Y, Sun L, Xing G, Tian C, Sun J, et al. NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules' affinity. *Cell Signal.* 2007;19(10):2046-55.
- 814.Amador V, Ge S, Santamaria PG, Guardavaccaro D, Pagano M. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell.* 2007;27(3):462-73.
- 815.Yamada K, Tamamori-Adachi M, Goto I, Iizuka M, Yasukawa T, Aso T, et al. Degradation of p21Cip1 through anaphase-promoting complex/cyclosome and its activator Cdc20 (APC/CCdc20) ubiquitin ligase complex-mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin-dependent kinase 2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2011;286(51):44057-66.
- 816.Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S, Bolanos JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol.* 2009;11(6):747-52.
- 817.Lindon C, Pines J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol.* 2004;164(2):233-41.

- 818.Zhang L, Park CH, Wu J, Kim H, Liu W, Fujita T, et al. Proteolysis of Rad17 by Cdh1/APC regulates checkpoint termination and recovery from genotoxic stress. *EMBO J.* 2010;29(10):1726-37.
- 819.Chabes AL, Pflieger CM, Kirschner MW, Thelander L. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3925-9.
- 820.Garzon J, Rodriguez R, Kong Z, Chabes A, Rodriguez-Acebes S, Mendez J, et al. Shortage of dNTPs underlies altered replication dynamics and DNA breakage in the absence of the APC/C cofactor Cdh1. *Oncogene.* 2017;36(42):5808-18.
- 821.Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 1997;91(1):35-45.
- 822.Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature.* 1999;400(6739):37-42.
- 823.Zur A, Brandeis M. Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J.* 2001;20(4):792-801.
- 824.Karamysheva Z, Diaz-Martinez LA, Crow SE, Li B, Yu H. Multiple anaphase-promoting complex/cyclosome degrons mediate the degradation of human Sgo1. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1772-80.
- 825.Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG, Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature.* 2004;428(6979):194-8.
- 826.Ke PY, Chang ZF. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24(2):514-26.
- 827.Ke PY, Hu CM, Chang YC, Chang ZF. Hiding human thymidine kinase 1 from APC/C-mediated destruction by thymidine binding. *FASEB J.* 2007;21(4):1276-84.

- 828.Ke PY, Kuo YY, Hu CM, Chang ZF. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev.* 2005;19(16):1920-33.
- 829.Ichim G, Mola M, Finkbeiner MG, Cros MP, Herceg Z, Hernandez-Vargas H. The histone acetyltransferase component TRRAP is targeted for destruction during the cell cycle. *Oncogene.* 2014;33(2):181-92.
- 830.Rape M, Kirschner MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature.* 2004;432(7017):588-95.
- 831.Summers MK, Pan B, Mukhyala K, Jackson PK. The unique N terminus of the UbcH10 E2 enzyme controls the threshold for APC activation and enhances checkpoint regulation of the APC. *Mol Cell.* 2008;31(4):544-56.
- 832.Curtis NL, Bolanos-Garcia VM. The anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C): a versatile E3 ubiquitin ligase. *Subcell Biochem.* 2019;93:539-623.
- 833.Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):369-81.
- 834.Rodier G, Coulombe P, Tanguay PL, Boutonnet C, Meloche S. Phosphorylation of SKP2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J.* 2008;27(4):679-91.
- 835.Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science.* 1998;282(5394):1721-4.
- 836.Hall MC, Warren EN, Borchers CH. Multi-kinase phosphorylation of the APC/C activator Cdh1 revealed by mass spectrometry. *Cell Cycle.* 2004;3(10):1278-84.
- 837.Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, et al. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitylation of p27. *Nat Cell Biol.* 2001;3(3):321-4.

838. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995;269(5224):682-5.
839. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*. 1999;1(4):193-9.
840. Wang W, Nacusi L, Sheaff RJ, Liu X. Ubiquitination of p21Cip1/WAF1 by SCFSkp2: substrate requirement and ubiquitination site selection. *Biochemistry*. 2005;44(44):14553-64.
841. Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25752-7.
842. Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JD, Jackson PK. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell*. 2003;4(6):813-26.
843. Guardavaccaro D, Kudo Y, Boulaire J, Barchi M, Busino L, Donzelli M, et al. Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell*. 2003;4(6):799-812.
844. Liu ST, Zhang H. The mitotic checkpoint complex (MCC): looking back and forth after 15 years. *AIMS Mol Sci*. 2016;3(4):597-634.
845. Lara-Gonzalez P, Scott MI, Diez M, Sen O, Taylor SS. BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 24):4332-45.
846. Izawa D, Pines J. The mitotic checkpoint complex binds a second Cdc20 to inhibit active APC/C. *Nature*. 2015;517(7536):631-4.
847. Eytan E, Wang K, Miniowitz-Shemtov S, Sitry-Shevah D, Kaisari S, Yen TJ, et al. Disassembly of mitotic checkpoint complexes by the joint action of the AAA-ATPase TRIP13 and p31(comet). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):12019-24.
848. Liu W, Li W, Fujita T, Yang Q, Wan Y. Proteolysis of Cdh1 enhances susceptibility to UV radiation-induced apoptosis. *Carcinogenesis*. 2008;29(2):263-72.



849. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012;47(4):497-510.
850. Escribano-Diaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkac J, et al. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*. 2013;49(5):872-83.
851. Ha K, Ma C, Lin H, Tang L, Lian Z, Zhao F, et al. The anaphase promoting complex impacts repair choice by protecting ubiquitin signalling at DNA damage sites. *Nat Commun*. 2017;8:15751.
852. Cotto-Rios XM, Jones MJ, Busino L, Pagano M, Huang TT. APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol*. 2011;194(2):177-86.
853. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007;450(7169):509-14.
854. Lafranchi L, de Boer HR, de Vries EG, Ong SE, Sartori AA, van Vugt MA. APC/C(Cdh1) controls CtIP stability during the cell cycle and in response to DNA damage. *EMBO J*. 2014;33(23):2860-79.
855. Kucharski TJ, Minshall PE, Moustafa-Kamal M, Turnell AS, Teodoro JG. Reciprocal Regulation between 53BP1 and the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Is Required for Genomic Stability during Mitotic Stress. *Cell Rep*. 2017;18(8):1982-95.
856. Hu CM, Chang ZF. Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence? *J Biomed Sci*. 2007;14(4):491-7.
857. Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:681-706.
858. Allouch A, David A, Amie SM, Lahouassa H, Chartier L, Margottin-Goguet F, et al. p21-mediated RNR2 repression restricts HIV-1 replication in macrophages by inhibiting dNTP biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(42):E3997-4006.

859. Delavaine L, La Thangue NB. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*. 1999;18(39):5381-92.
860. Zhu X, Shi C, Peng Y, Yin L, Tu M, Chen Q, et al. Thymidine kinase 1 silencing retards proliferative activity of pancreatic cancer cell via E2F1-TK1-P21 axis. *Cell Prolif*. 2018;51(3):e12428.
861. Liu J, Fuchs SY. Cross-talk between APC/C and CBP/p300. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(7):760-2.
862. Singh RK, Dagnino L. Cdh1 regulates E2F1 degradation in response to differentiation signals in keratinocytes. *Oncotarget*. 2017;8(3):4977-93.
863. Huang J, Bonni A. A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. *Genes Dev*. 2016;30(6):622-38.
864. Ercilla A, Llopis A, Feu S, Aranda S, Ernfors P, Freire R, et al. New origin firing is inhibited by APC/CCdh1 activation in S-phase after severe replication stress. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(10):4745-62.
865. Mo M, Shahar S, Fleming SB, Mercer AA. How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. *Trends Microbiol*. 2012;20(9):440-8.
866. Fehr AR, Yu D. Control the host cell cycle: viral regulation of the anaphase-promoting complex. *J Virol*. 2013;87(16):8818-25.
867. Kornitzer D, Sharf R, Kleinberger T. Adenovirus E4orf4 protein induces PP2A-dependent growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae* and interacts with the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J Cell Biol*. 2001;154(2):331-44.
868. Mui MZ, Roopchand DE, Gentry MS, Hallberg RL, Vogel J, Branton PE. Adenovirus protein E4ORF4 induces premature APC-CDC20 activation in *Saccharomyces cerevisiae* by a protein phosphatase 2A-dependent mechanism. *J Virol*. 2010;84(9):4798-809.
869. Li S, Brignole C, Marcellus R, Thirlwell S, Binda O, McQuoid MJ, et al. The adenovirus E4orf4 protein induces G2/M arrest and cell death by blocking protein phosphatase 2A activity regulated by the B55 subunit. *J Virol*. 2009;83(17):8340-52.

870. Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, Green MR. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of P53. *Genes Dev.* 2004;18(16):1952-7.
871. Heilman DW, Teodoro JG, Green MR. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies. *J Virol.* 2006;80(15):7535-45.
872. Kim S, Park SY, Yong H, Famulski JK, Chae S, Lee JH, et al. HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene.* 2008;27(24):3457-64.
873. Pandey V, Kumar V. HBx protein of hepatitis B virus promotes reinitiation of DNA replication by regulating expression and intracellular stability of replication licensing factor Cdc6. *J Biol Chem.* 2012;287(24):20545-54.
874. Chae S, Ji JH, Kwon SH, Lee HS, Lim JM, Kang D, et al. HBxAPalpha/Rsf-1-mediated HBx-hBubR1 interactions regulate the mitotic spindle checkpoint and chromosome instability. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1680-8.
875. Tran K, Kamil JP, Coen DM, Spector DH. Inactivation and disassembly of the anaphase-promoting complex during human cytomegalovirus infection is associated with degradation of the APC5 and APC4 subunits and does not require UL97-mediated phosphorylation of Cdh1. *J Virol.* 2010;84(20):10832-43.
876. Clark E, Spector DH. Studies on the contribution of human cytomegalovirus UL21a and UL97 to viral growth and inactivation of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) E3 ubiquitin ligase reveal a unique cellular mechanism for downmodulation of the APC/C subunits APC1, APC4, and APC5. *J Virol.* 2015;89(13):6928-39.
877. Fehr AR, Gualberto NC, Savaryn JP, Terhune SS, Yu D. Proteasome-dependent disruption of the E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex by HCMV protein pUL21a. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002789.

878. Tran K, Mahr JA, Choi J, Teodoro JG, Green MR, Spector DH. Accumulation of substrates of the anaphase-promoting complex (APC) during human cytomegalovirus infection is associated with the phosphorylation of Cdh1 and the dissociation and relocalization of APC subunits. *J Virol.* 2008;82(1):529-37.
879. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne-Andrea C, Thierry F. High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle.* 2005;4(11):1608-15.
880. Tan CL, Teissier S, Gunaratne J, Quek LS, Bellanger S. Stranglehold on the spindle assembly checkpoint: the human papillomavirus E2 protein provokes BUBR1-dependent aneuploidy. *Cell Cycle.* 2015;14(9):1459-70.
881. Patel D, McCance DJ. Compromised spindle assembly checkpoint due to altered expression of Ubch10 and Cdc20 in human papillomavirus type 16 E6- and E7-expressing keratinocytes. *J Virol.* 2010;84(21):10956-64.
882. Yu Y, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits the anaphase promoting complex/cyclosome activity by dysregulating Emi1 expression in mitosis. *Virology.* 2013;446(1-2):251-9.
883. Liu B, Hong S, Tang Z, Yu H, Giam CZ. HTLV-I Tax directly binds the CDC20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):63-8.
884. Kuo YL, Giam CZ. Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 Tax leads to senescence. *EMBO J.* 2006;25(8):1741-52.
885. Liu B, Liang MH, Kuo YL, Liao W, Boros I, Kleinberger T, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes unscheduled degradation of Pds1p/securin and Clb2p/cyclin B1 and causes chromosomal instability. *Mol Cell Biol.* 2003;23(15):5269-81.
886. Merling R, Chen C, Hong S, Zhang L, Liu M, Kuo YL, et al. HTLV-1 Tax mutants that do not induce G1 arrest are disabled in activating the anaphase promoting complex. *Retrovirology.* 2007;4:35.

887. Mo M, Fleming SB, Mercer AA. Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(46):19527-32.
888. Mo M, Fleming SB, Mercer AA. ORF virus cell cycle regulator, PACR, competes with subunit 11 of the anaphase promoting complex for incorporation into the complex. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 12):3010-5.
889. Charman M, Herrmann C, Weitzman MD. Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. *FEBS Lett.* 2019;593(24):3531-50.
890. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science.* 1986;231(4739):719-22.
891. Boyer TG, Martin ME, Lees E, Ricciardi RP, Berk AJ. Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature.* 1999;399(6733):276-9.
892. Mymryk JS, Smith MM. Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(2):95-102.
893. Lillie JW, Green M, Green MR. An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell.* 1986;46(7):1043-51.
894. Jelsma TN, Howe JA, Mymryk JS, Eveleigh CM, Cunniff NF, Bayley ST. Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology.* 1989;171(1):120-30.
895. Wang HG, Rikitake Y, Carter MC, Yaciuk P, Abraham SE, Zerler B, et al. Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J Virol.* 1993;67(1):476-88.
896. Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, et al. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* 1994;8(8):869-84.

- 897.Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-9.
- 898.Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston DM, Eckner R. A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature*. 1995;374(6517):81-4.
- 899.Howe JA, Mymryk JS, Egan C, Branton PE, Bayley ST. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(15):5883-7.
- 900.Howe JA, Bayley ST. Effects of Ad5 E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A. *Virology*. 1992;186(1):15-24.
- 901.Li S, Szymborski A, Miron MJ, Marcellus R, Binda O, Lavoie JN, et al. The adenovirus E4orf4 protein induces growth arrest and mitotic catastrophe in H1299 human lung carcinoma cells. *Oncogene*. 2009;28(3):390-400.
- 902.Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T, Kleinberger T. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(18):10080-5.
- 903.Roopchand DE, Lee JM, Shahinian S, Paquette D, Bussey H, Branton PE. Toxicity of human adenovirus E4orf4 protein in *Saccharomyces cerevisiae* results from interactions with the Cdc55 regulatory B subunit of PP2A. *Oncogene*. 2001;20(38):5279-90.
- 904.Mui MZ, Kucharski M, Miron MJ, Hur WS, Berghuis AM, Blanchette P, et al. Identification of the adenovirus E4orf4 protein binding site on the B55alpha and Cdc55 regulatory subunits of PP2A: Implications for PP2A function, tumor cell killing and viral replication. *PLoS Pathog*. 2013;9(11):e1003742.
- 905.Rosenberger JK, Cloud SS. Chicken anemia virus. *Poult Sci*. 1998;77(8):1190-2.
- 906.Noteborn MH, Todd D, Verschueren CA, de Gauw HW, Curran WL, Veldkamp S, et al. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*. 1994;68(1):346-51.

907. Jeurissen SH, Wagenaar F, Pol JM, van der Eb AJ, Noteborn MH. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J Virol.* 1992;66(12):7383-8.
908. Goryo M, Sugimura H, Matsumoto S, Umemura T, Itakura C. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Avian Pathol.* 1985;14(4):483-96.
909. Danen-Van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, Klein B, Zhuang S, Falkenburg JH, et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(11):5843-7.
910. Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, Jochemsen AG, van der Eb AJ, Noteborn MH. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 1995;55(3):486-9.
911. Bullenkamp J, Cole D, Malik F, Alkhatibi H, Kulasekararaj A, Odell EW, et al. Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/Apoptin. *Cell Death Dis.* 2012;3:e296.
912. Chaabane W, Ghavami S, Malecki A, Los MJ. Human Gyrovirus-Apoptin interferes with the cell cycle and induces G2/M arrest prior to apoptosis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2017;65(6):545-52.
913. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):48-64.
914. Martin-Lluesma S, Schaeffer C, Robert EI, van Breugel PC, Leupin O, Hantz O, et al. Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology.* 2008;48(5):1467-76.
915. Sitterlin D, Bergametti F, Transy C. UVDDDB p127-binding modulates activities and intracellular distribution of hepatitis B virus X protein. *Oncogene.* 2000;19(38):4417-26.
916. Hodgson AJ, Hyser JM, Keasler VV, Cang Y, Slagle BL. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal HBV replication. *Virology.* 2012;426(1):73-82.

- 917.Decorsiere A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*. 2016;531(7594):386-9.
- 918.Minor MM, Hollinger FB, McNeese AL, Jung SY, Jain A, Hyser JM, et al. Hepatitis B virus HBx protein mediates the degradation of host restriction factors through the Cullin 4 DDB1 E3 ubiquitin ligase complex. *Cells*. 2020;9(4).
- 919.Schottstedt V, Blumel J, Burger R, Drosten C, Groner A, Gurtler L, et al. Human Cytomegalovirus (HCMV). *Transfus Med Hemother*. 2010;37(6):365-75.
- 920.Lu M, Shenk T. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol*. 1996;70(12):8850-7.
- 921.Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology*. 1996;224(1):150-60.
- 922.Dittmer D, Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol*. 1997;71(2):1629-34.
- 923.Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, et al. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol*. 1995;69(11):6697-704.
- 924.Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol*. 1998;72(5):3729-41.
- 925.Spector DH. Human cytomegalovirus riding the cell cycle. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(3):409-19.
- 926.Hume AJ, Finkel JS, Kamil JP, Coen DM, Culbertson MR, Kalejta RF. Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function. *Science*. 2008;320(5877):797-9.



927. Prichard MN, Sztul E, Daily SL, Perry AL, Frederick SL, Gill RB, et al. Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggregates. *J Virol.* 2008;82(10):5054-67.
928. Li R, Liao G, Nirujogi RS, Pinto SM, Shaw PG, Huang TC, et al. Phosphoproteomic Profiling Reveals Epstein-Barr Virus Protein Kinase Integration of DNA Damage Response and Mitotic Signaling. *PLoS Pathog.* 2015;11(12):e1005346.
929. Davis ZH, Verschueren E, Jang GM, Kleffman K, Johnson JR, Park J, et al. Global mapping of herpesvirus-host protein complexes reveals a transcription strategy for late genes. *Mol Cell.* 2015;57(2):349-60.
930. Elbasani E, Gramolelli S, Gunther T, Gabaev I, Grundhoff A, Ojala PM. Kaposi sarcoma herpesvirus lytic replication is independent of the anaphase promoting complex activity. *J Virol.* 2020.
931. McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem.* 2017;398(8):919-27.
932. Wang HK, Duffy AA, Broker TR, Chow LT. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes Dev.* 2009;23(2):181-94.
933. Fournier N, Raj K, Saudan P, Utzig S, Sahli R, Simanis V, et al. Expression of human papillomavirus 16 E2 protein in *Schizosaccharomyces pombe* delays the initiation of mitosis. *Oncogene.* 1999;18(27):4015-21.
934. Fan X, Liu Y, Heilman SA, Chen JJ. Human papillomavirus E7 induces rereplication in response to DNA damage. *J Virol.* 2013;87(2):1200-10.
935. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology.* 2019;16(1):21.
936. Lemoine FJ, Marriott SJ. Accelerated G1 phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J Biol Chem.* 2001;276(34):31851-7.

937. Neuveut C, Low KG, Maldarelli F, Schmitt I, Majone F, Grassmann R, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of Cyclin D-CDK and p110Rb. *Mol Cell Biol.* 1998;18(6):3620-32.
938. Haig DM. ORF virus infection and host immunity. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(2):127-31.
939. Ben-Israel H, Kleinberger T. Adenovirus and cell cycle control. *Front Biosci.* 2002;7:d1369-95.
940. Xia Y, Cheng X, Li Y, Valdez K, Chen W, Liang TJ. Hepatitis B Virus Deregulates the Cell Cycle To Promote Viral Replication and a Premalignant Phenotype. *J Virol.* 2018;92(19).
941. Zavada V, Erban V, Rezacova D, Vonka V. Thymidine-kinase in cytomegalovirus infected cells. *Arch Virol.* 1976;52(4):333-9.
942. Estes JE, Huang ES. Stimulation of cellular thymidine kinases by human cytomegalovirus. *J Virol.* 1977;24(1):13-21.
943. Munger J, Bajad SU, Collier HA, Shenk T, Rabinowitz JD. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* 2006;2(12):e132.
944. Businger R, Deutschmann J, Gruska I, Milbradt J, Wiebusch L, Gramberg T, et al. Human cytomegalovirus overcomes SAMHD1 restriction in macrophages via pUL97. *Nat Microbiol.* 2019;4(12):2260-72.
945. Kucharski TJ, Gamache I, Gjoerup O, Teodoro JG. DNA damage response signaling triggers nuclear localization of the chicken anemia virus protein Apoptin. *J Virol.* 2011;85(23):12638-49.
946. Sanchez Y, Bachant J, Wang H, Hu F, Liu D, Tetzlaff M, et al. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science.* 1999;286(5442):1166-71.
947. de Boer HR, Guerrero Llobet S, van Vugt MA. Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(5):949-60.

- 948.Mechali F, Hsu CY, Castro A, Lorca T, Bonne-Andrea C. Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol*. 2004;78(5):2615-9.
- 949.Lv XB, Xie F, Hu K, Wu Y, Cao LL, Han X, et al. Damaged DNA-binding protein 1 (DDB1) interacts with Cdh1 and modulates the function of APC/CCdh1. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18234-40.
- 950.Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Ireland JT, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*. 2008;135(1):49-60.
- 951.Bushman FD, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, et al. Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000437.
- 952.Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe*. 2008;4(5):495-504.
- 953.Romani B, Cohen EA. Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the Cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr Opin Virol*. 2012;2(6):755-63.
- 954.Planelles V, Jowett JBM, Li QX, Xie Y, Hahn B, Chen IS. Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol*. 1996;70(4):2516-24.
- 955.Zhou Z, He M, Shah AA, Wan Y. Insights into APC/C: from cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Div*. 2016;11:9.
- 956.Micklem G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley JF. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature*. 1993;366(6450):87-9.
- 957.Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):5-20.
- 958.Inada T, Makino S. Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front Genet*. 2014;5:135.
- 959.Parrish NF, Gao F, Li H, Giorgi EE, Barbian HJ, Parrish EH, et al. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):6626-33.

960. Apps R, Del Prete GQ, Chatterjee P, Lara A, Brumme ZL, Brockman MA, et al. HIV-1 Vpu mediates HLA-C downregulation. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):686-95.
961. Fujimitsu K, Yamano H. PP2A-B56 binds to APC1 and promotes CDC20 association with the APC/C ubiquitin ligase in mitosis. *EMBO Rep*. 2020;21(1):e48503.
962. Tighe A, Staples O, Taylor S. MPS1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets MAD2 to kinetochores. *J Cell Biol*. 2008;181(6):893-901.
963. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, et al. Host microRNAs-221 and -222 inhibit HIV-1 entry in macrophages by targeting the CD4 viral receptor. *Cell Rep*. 2017;21(1):141-53.
964. Bego MG, Cong L, Mack K, Kirchhoff F, Cohen EA. Differential control of BST2 restriction and plasmacytoid dendritic cell antiviral response by antagonists encoded by HIV-1 group M and O strains. *J Virol*. 2016;90(22):10236-46.
965. Pflieger CM, Lee E, Kirschner MW. Substrate recognition by the CDC20 and CDH1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*. 2001;15(18):2396-407.
966. Liu G, Zhang J, Larsen B, Stark C, Breitkreutz A, Lin ZY, et al. ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1015-7.
967. Teo G, Liu G, Zhang J, Nesvizhskii AI, Gingras AC, Choi H. SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INteractome software. *J Proteomics*. 2014;100:37-43.
968. Chatr-Aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, Rust J, Chang C, Kolas NK, et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D369-D79.
969. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, et al. Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(3):391-7.
970. Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science*. 2012;335(6067):422-6.

971. Werner S, Pimenta-Marques A, Bettencourt-Dias M. Maintaining centrosomes and cilia. *J Cell Sci.* 2017;130(22):3789-800.
972. Yang J, Adamian M, Li T. Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol Biol Cell.* 2006;17(2):1033-40.
973. Bahe S, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Leiss F, Nigg EA. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J Cell Biol.* 2005;171(1):27-33.
974. Mayor T, Stierhof YD, Tanaka K, Fry AM, Nigg EA. The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol.* 2000;151(4):837-46.
975. Khodjakov A, Rieder CL, Sluder G, Cassels G, Sibon O, Wang CL. De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J Cell Biol.* 2002;158(7):1171-81.
976. Strnad P, Leidel S, Vinogradova T, Euteneuer U, Khodjakov A, Gonczy P. Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle. *Dev Cell.* 2007;13(2):203-13.
977. Tsou MF, Stearns T. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature.* 2006;442(7105):947-51.
978. Pagan J, Pagano M. FBXW5 controls centrosome number. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):888-90.
979. Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Reiter JF. Odf1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell.* 2010;18(3):410-24.
980. Spektor A, Tsang WY, Khoo D, Dynlacht BD. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell.* 2007;130(4):678-90.
981. Schmidt TI, Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Lavoie SB, Stierhof YD, et al. Control of centriole length by CPAP and CP110. *Curr Biol.* 2009;19(12):1005-11.
982. Tsang WY, Bossard C, Khanna H, Peranen J, Swaroop A, Malhotra V, et al. CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell.* 2008;15(2):187-97.

- 983.D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, Saraf A, Florens L, Washburn MP, et al. SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation. *Nature*. 2010;466(7302):138-42.
- 984.Hossain D, Javadi Esfehiani Y, Das A, Tsang WY. Cep78 controls centrosome homeostasis by inhibiting EDD-DYRK2-DDB1(VprBP). *EMBO Rep*. 2017;18(4):632-44.
- 985.Gould RR, Borisy GG. The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol*. 1977;73(3):601-15.
- 986.Mennella V, Keszthelyi B, McDonald KL, Chhun B, Kan F, Rogers GC, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1159-68.
- 987.Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1148-58.
- 988.Luders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):161-7.
- 989.Shao W, Yang J, He M, Yu XY, Lee CH, Yang Z, et al. Centrosome anchoring regulates progenitor properties and cortical formation. *Nature*. 2020;580(7801):106-12.
- 990.Wang G, Chen Q, Zhang X, Zhang B, Zhuo X, Liu J, et al. PCM1 recruits Plk1 to the pericentriolar matrix to promote primary cilia disassembly before mitotic entry. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 6):1355-65.
- 991.Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(11):709-21.
- 992.Geissler S, Pereira G, Spang A, Knop M, Soues S, Kilmartin J, et al. The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *EMBO J*. 1996;15(15):3899-911.

993. Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature*. 1995;378(6557):638-40.
994. Mitchison T, Evans L, Schulze E, Kirschner M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell*. 1986;45(4):515-27.
995. Haren L, Stearns T, Luders J. Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. *PLoS One*. 2009;4(6):e5976.
996. Lee K, Rhee K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol*. 2011;195(7):1093-101.
997. Xie S, Yang Y, Lin X, Zhou J, Li D, Liu M. Characterization of a novel EB1 acetylation site important for the regulation of microtubule dynamics and cargo recruitment. *J Cell Physiol*. 2018;233(3):2581-9.
998. Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, et al. EB1 acetylation by P300/CBP-associated factor (PCAF) ensures accurate kinetochore-microtubule interactions in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(41):16564-9.
999. Morris EJ, Nader GP, Ramalingam N, Bartolini F, Gundersen GG. Kif4 interacts with EB1 and stabilizes microtubules downstream of Rho-mDia in migrating fibroblasts. *PLoS One*. 2014;9(3):e91568.
1000. Sabo Y, Walsh D, Barry DS, Tinaztepe S, de Los Santos K, Goff SP, et al. HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe*. 2013;14(5):535-46.
1001. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(12):773-86.
1002. Capalbo G, Mueller-Kuller T, Markovic S, Klein SA, Dietrich U, Hoelzer D, et al. Knockdown of ERM family member moesin in host cells increases HIV type 1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27(12):1317-22.

1003. Dumas A, Le-Bury G, Marie-Anais F, Herit F, Mazzolini J, Guilbert T, et al. The HIV-1 protein Vpr impairs phagosome maturation by controlling microtubule-dependent trafficking. *J Cell Biol.* 2015;211(2):359-72.
1004. Rosenstiel PE, Gruosso T, Letourneau AM, Chan JJ, LeBlanc A, Husain M, et al. HIV-1 Vpr inhibits cytokinesis in human proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2008;74(8):1049-58.
1005. Chang F, Re F, Sebastian S, Sazer S, Luban J. HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. *Mol Biol Cell.* 2004;15(4):1793-801.
1006. Minemoto Y, Shimura M, Ishizaka Y, Masamune Y, Yamashita K. Multiple centrosome formation induced by the expression of Vpr gene of human immunodeficiency virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258(2):379-84.
1007. Guarguaglini G, Duncan PI, Stierhof YD, Holmstrom T, Duensing S, Nigg EA. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1095-107.
1008. Farina F, Gaillard J, Guerin C, Coute Y, Sillibourne J, Blanchoin L, et al. The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat Cell Biol.* 2016;18(1):65-75.
1009. Hames RS, Crookes RE, Straatman KR, Merdes A, Hayes MJ, Faragher AJ, et al. Dynamic recruitment of Nek2 kinase to the centrosome involves microtubules, PCM-1, and localized proteasomal degradation. *Mol Biol Cell.* 2005;16(4):1711-24.
1010. Hearn T, Spalluto C, Phillips VJ, Renforth GL, Copin N, Hanley NA, et al. Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(5):1581-7.
1011. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 2003;426(6966):570-4.



1012. Thauvin-Robinet C, Lee JS, Lopez E, Herranz-Perez V, Shida T, Franco B, et al. The oral-facial-digital syndrome gene C2CD3 encodes a positive regulator of centriole elongation. *Nat Genet.* 2014;46(8):905-11.
1013. Hall J, Hall A, Pursifull N, Barbar E. Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes. *Biochemistry.* 2008;47(46):11940-52.
1014. Rapali P, Szenes A, Radnai L, Bakos A, Pal G, Nyitray L. DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J.* 2011;278(17):2980-96.
1015. Lawo S, Bashkurov M, Mullin M, Ferreria MG, Kittler R, Habermann B, et al. HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol.* 2009;19(10):816-26.
1016. Uehara R, Nozawa RS, Tomioka A, Petry S, Vale RD, Obuse C, et al. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):6998-7003.
1017. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):865-7.
1018. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor (NY)1997.
1019. Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, et al. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4+ T cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003812.
1020. Krisko JF, Martinez-Torres F, Foster JL, Garcia JV. HIV restriction by APOBEC3 in humanized mice. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003242.
1021. Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, et al. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol.* 2010;84(18):9546-56.

1022. Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, et al. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J Virol.* 2012;86(9):5000-13.
1023. Watkins RL, Zou W, Denton PW, Krisko JF, Foster JL, Garcia JV. In vivo analysis of highly conserved Nef activities in HIV-1 replication and pathogenesis. *Retrovirology.* 2013;10:125.
1024. Zou W, Denton PW, Watkins RL, Krisko JF, Nochi T, Foster JL, et al. Nef functions in BLT mice to enhance HIV-1 replication and deplete CD4+CD8+ thymocytes. *Retrovirology.* 2012;9:44.
1025. Sawaya BE, Khalili K, Mercer WE, Denisova L, Amini S. Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem.* 1998;273(32):20052-7.
1026. Schrofelbauer B, Hakata Y, Landau NR. HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):4130-5.
1027. Wen X, Casey Klockow L, Nekorchuk M, Sharifi HJ, de Noronha CM. The HIV1 protein Vpr acts to enhance constitutive DCAF1-dependent UNG2 turnover. *PLoS One.* 2012;7(1):e30939.
1028. Kim K, Kim JM, Kim JS, Choi J, Lee YS, Neamati N, et al. VprBP has intrinsic kinase activity targeting histone H2A and represses gene transcription. *Mol Cell.* 2013;52(3):459-67.
1029. Kim K, Heo K, Choi J, Jackson S, Kim H, Xiong Y, et al. Vpr-binding protein antagonizes p53-mediated transcription via direct interaction with H3 tail. *Mol Cell Biol.* 2012;32(4):783-96.
1030. Nakagawa T, Mondal K, Swanson PC. VprBP (DCAF1): a promiscuous substrate recognition subunit that incorporates into both RING-family CRL4 and HECT-family EDD/UBR5 E3 ubiquitin ligases. *BMC Mol Biol.* 2013;14:22.
1031. Maddika S, Chen J. Protein kinase DYRK2 is a scaffold that facilitates assembly of an E3 ligase. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):409-19.
1032. He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y. DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 2006;20(21):2949-54.

1033. Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H. CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1277-83.
1034. Kohlmaier G, Loncarek J, Meng X, McEwen BF, Mogensen MM, Spektor A, et al. Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Curr Biol.* 2009;19(12):1012-8.
1035. Tang CJ, Fu RH, Wu KS, Hsu WB, Tang TK. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):825-31.
1036. Afonso PV, Zamborlini A, Saib A, Mahieux R. Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology.* 2007;4:27.
1037. Zamborlini A, Lehmann-Che J, Clave E, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Roingeard P, et al. Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology.* 2007;4:63.
1038. Bolton DL, Barnitz RA, Sakai K, Lenardo MJ. 14-3-3 theta binding to cell cycle regulatory factors is enhanced by HIV-1 Vpr. *Biol Direct.* 2008;3:17.
1039. Watanabe N, Yamaguchi T, Akimoto Y, Rattner JB, Hirano H, Nakauchi H. Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Exp Cell Res.* 2000;258(2):261-9.
1040. Gaynor EM, Chen IS. Analysis of apoptosis induced by HIV-1 Vpr and examination of the possible role of the hHR23A protein. *Exp Cell Res.* 2001;267(2):243-57.
1041. Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, Walker M, et al. DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep.* 2007;8(6):603-9.
1042. Mullee LI, Morrison CG. Centrosomes in the DNA damage response--the hub outside the centre. *Chromosome Res.* 2016;24(1):35-51.
1043. Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J.* 2002;21(24):6801-10.

1044. de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, Lancelot S, Opi S, et al. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology*. 2005;2:5.
1045. Aprea S, Del Valle L, Mameli G, Sawaya BE, Khalili K, Peruzzi F. Tubulin-mediated binding of human immunodeficiency virus-1 Tat to the cytoskeleton causes proteasomal-dependent degradation of microtubule-associated protein 2 and neuronal damage. *J Neurosci*. 2006;26(15):4054-62.
1046. Treier M, Staszewski LM, Bohmann D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*. 1994;78(5):787-98.
1047. Barbelanne M, Hossain D, Chan DP, Peranen J, Tsang WY. Nephrocystin proteins NPHP5 and Cep290 regulate BBSome integrity, ciliary trafficking and cargo delivery. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2185-200.
1048. Barbelanne M, Song J, Ahmadzai M, Tsang WY. Pathogenic NPHP5 mutations impair protein interaction with Cep290, a prerequisite for ciliogenesis. *Hum Mol Genet*. 2013;22(12):2482-94.
1049. Das A, Qian J, Tsang WY. USP9X counteracts differential ubiquitination of NPHP5 by MARCH7 and BBS11 to regulate ciliogenesis. *PLoS Genet*. 2017;13(5):e1006791.
1050. Lingaraju GM, Bunker RD, Cavadini S, Hess D, Hassiepen U, Renatus M, et al. Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature*. 2014;512(7513):161-5.
1051. Chutiwitoonchai N, Siarot L, Takeda E, Shioda T, Ueda M, Aida Y. HIV-1 Vpr abrogates the effect of TSG101 overexpression to support virus release. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163100.
1052. Janket ML, Manickam P, Majumder B, Thotala D, Wagner M, Schafer EA, et al. Differential regulation of host cellular genes by HIV-1 viral protein R (Vpr): cDNA microarray analysis using isogenic virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(4):1126-32.
1053. Muthumani K, Hwang DS, Choo AY, Mayilvahanan S, Dayes NS, Thieu KP, et al. HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int Immunol*. 2005;17(2):103-16.

1054. Zahoor MA, Xue G, Sato H, Aida Y. Genome-wide transcriptional profiling reveals that HIV-1 Vpr differentially regulates interferon-stimulated genes in human monocyte-derived dendritic cells. *Virus Res.* 2015;208:156-63.
1055. Zahoor MA, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima SN, Aida Y. HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2014;9(8):e106418.
1056. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science.* 2008;319(5865):921-6.
1057. Sigl R, Wandke C, Rauch V, Kirk J, Hunt T, Geley S. Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 22):4208-17.
1058. Greil C, Krohs J, Schnerch D, Follo M, Felthaus J, Engelhardt M, et al. The role of APC/C(Cdh1) in replication stress and origin of genomic instability. *Oncogene.* 2016;35(23):3062-70.
1059. Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell.* 2000;6(4):839-49.
1060. Li D, Lopez A, Sandoval C, Nichols-Doyle R, Fregoso OI. HIV Vpr modulates the host DNA damage response at two independent steps to damage DNA and repress double-strand DNA break repair. *BioRxiv.* 2020.
1061. Li D, Lopez A, Sandoval C, Nichols Doyle R, Fregoso OI. HIV Vpr Modulates the Host DNA Damage Response at Two Independent Steps to Damage DNA and Repress Double-Strand DNA Break Repair. *mBio.* 2020;11(4).
1062. Volcic M, Sparrer KMJ, Koepke L, Hotter D, Sauter D, Sturzel CM, et al. Vpu modulates DNA repair to suppress innate sensing and hyper-integration of HIV-1. *Nat Microbiol.* 2020.
1063. Morgan DO. The D box meets its match. *Mol Cell.* 2013;50(5):609-10.

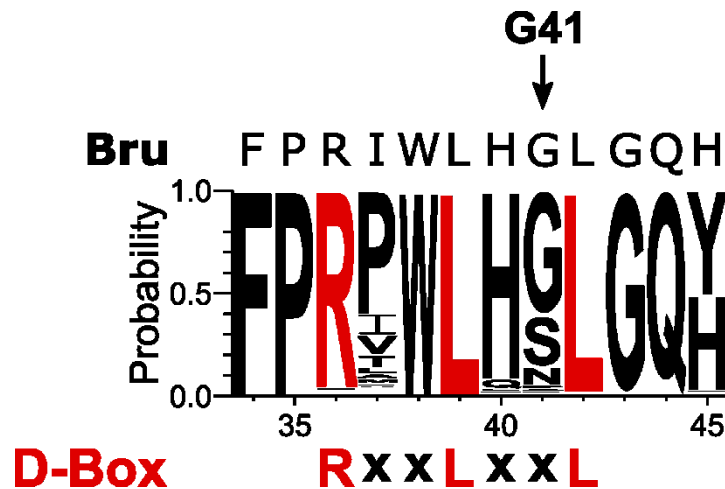
1064. Fu AK, Hung KW, Fu WY, Shen C, Chen Y, Xia J, et al. APC(Cdh1) mediates EphA4-dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci.* 2011;14(2):181-9.
1065. Ganner A, Lienkamp S, Schafer T, Romaker D, Wegierski T, Park TJ, et al. Regulation of ciliary polarity by the APC/C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17799-804.
1066. Mondal G, Ohashi A, Yang L, Rowley M, Couch FJ. Tex14, a Plk1-regulated protein, is required for kinetochore-microtubule attachment and regulation of the spindle assembly checkpoint. *Mol Cell.* 2012;45(5):680-95.
1067. Chen M, Elder RT, Yu M, O'Gorman MG, Selig L, Benarous R, et al. Mutational analysis of Vpr-induced G2 arrest, nuclear localization, and cell death in fission yeast. *J Virol.* 1999;73(4):3236-45.
1068. Yao XJ, Rougeau N, Duisit G, Lemay J, Cohen EA. Analysis of HIV-1 Vpr determinants responsible for cell growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Retrovirology.* 2004;1:21.
1069. Lee SJ, Rodriguez-Bravo V, Kim H, Datta S, Foley EA. The PP2A(B56) phosphatase promotes the association of Cdc20 with APC/C in mitosis. *J Cell Sci.* 2017;130(10):1760-71.
1070. McCall CM, Miliani de Marval PL, Chastain PD, 2nd, Jackson SC, He YJ, Kotake Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-binding protein VprBP, a WD40 protein associated with the DDB1-CUL4 E3 ubiquitin ligase, is essential for DNA replication and embryonic development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(18):5621-33.
1071. Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, Chen Y, Chau V, Read MA, et al. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep.* 2002;3(2):177-82.
1072. Osaka F, Kawasaki H, Aida N, Saeki M, Chiba T, Kawashima S, et al. A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev.* 1998;12(15):2263-8.

1073. Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, et al. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene*. 1999;18(48):6829-34.
1074. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009;458(7239):732-6.
1075. Gingras AC, Abe KT, Raught B. Getting to know the neighborhood: using proximity-dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles. *Curr Opin Chem Biol*. 2019;48:44-54.
1076. Yao XJ, Kobinger G, Dandache S, Rougeau N, Cohen E. HIV-1 Vpr-chloramphenicol acetyltransferase fusion proteins: sequence requirement for virion incorporation and analysis of antiviral effect. *Gene Ther*. 1999;6(9):1590-9.
1077. Kobinger GP, Borsetti A, Nie Z, Mercier J, Daniel N, Gottlinger HG, et al. Virion-targeted viral inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins. *J Virol*. 1998;72(7):5441-8.
1078. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, et al. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell*. 2006;125(1):187-99.
1079. Kristensen AR, Foster LJ. Protein correlation profiling-SILAC to study protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*. 2014;1188:263-70.
1080. Zhang X, Aida Y. HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing. *Curr HIV Res*. 2009;7(2):163-8.
1081. Herzel L, Ottoz DSM, Alpert T, Neugebauer KM. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(10):637-50.
1082. Collart MA. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7(4):438-54.

1083. Fabian MR, Frank F, Rouya C, Siddiqui N, Lai WS, Karetnikov A, et al. Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(6):735-9.
1084. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, et al. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes Infect.* 2006;8(11):2647-56.
1085. Moura R, Pontillo A, D'Adamo P, Pirastu N, Campos Coelho A, Crovella S. Exome analysis of HIV patients submitted to dendritic cells therapeutic vaccine reveals an association of CNOT1 gene with response to the treatment. *J Int AIDS Soc.* 2014;17:18938.
1086. Liu J, Sisk JM, Gama L, Clements JE, Witwer KW. Tristetraprolin expression and microRNA-mediated regulation during simian immunodeficiency virus infection of the central nervous system. *Mol Brain.* 2013;6:40.
1087. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell.* 2017;171(1):34-57.
1088. Murphy DJ, MacKenzie IZ. The mortality and morbidity associated with umbilical cord prolapse. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995;102(10):826-30.
1089. Steger DJ, Eberharter A, John S, Grant PA, Workman JL. Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):12924-9.



## Annexes



### Annexe 1. Conservation de la boîte D présente dans la séquence protéique de Vpr

Représentation partielle de la séquence protéique de Vpr, comprise entre les acides aminés 34 et 45. Cette séquence a été obtenue en analysant 4 835 variants de Vpr provenant de la banque de donnée des séquences du VIH (Los Alamos National Laboratory; <http://www.hiv.lanl.gov/>). Les acides aminés en rouge indiquent les résidus d'un motif correspondant à une boîte D (RxxLxxL) qui sont potentiellement reconnus par les coactivateurs du complexe APC/C comme un domaine de reconnaissance de substrat. Les acides aminés R<sup>36</sup>, L<sup>39</sup> et L<sup>42</sup> sont conservés respectivement dans 96%, 99.9% et 98.5% des variants de Vpr analysés. Bru indique la séquence du variant de Vpr alignée au-dessus du logo. G41 indique un acide aminé décrit comme important pour l'activité de dégradation d'APC1 médiée par Vpr. *Probability* indique la probabilité, de 0 à 1, de trouver l'acide aminé indiqué à la place indiquée dans les séquences de Vpr.

## Annexe 2. Licence d'utilisation (Figure 1.7)



### American Soc for Biochemistry & Molecular Biology - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Jérémy Ferreira Barbosa ("You") and American Soc for Biochemistry & Molecular Biology ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Soc for Biochemistry & Molecular Biology, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	26-Apr-2020	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1030915-1	Publisher	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BI
ISSN	1083-351X	Portion	Chart/graph/table/figure

#### LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of biological chemistry	Country	United States of America
Author/Editor	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOL	Rightsholder	American Soc for Biochemistry & Molecular Biology
Date	01/01/1905	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	<a href="http://www.jbc.org/">http://www.jbc.org/</a>

#### REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Canada
Number of charts / graphs / tables / figures requested	1	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	CAD
Rights Requested	Main product		

#### NEW WORK DETAILS

Title	�tude de l'interactome et identification de nouvelles cibles de la protéine virale Vpr du VIH-1	Institution name	Université de Montréal
Instructor name	Jérémy Ferreira Barbosa	Expected presentation date	2020-05-01

## ADDITIONAL DETAILS

---

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Jérémy Ferreira Barbosa
------------------------	-----	---	-------------------------

## REUSE CONTENT DETAILS

---

Title, description or numeric reference of the portion(s)	10.1074/jbc.M117.798801	Title of the article/chapter the portion is from	HIV-1 Vpr protein directly loads helicase-like transcription factor (HLTF) onto the CRL4-DCAF1 E3 ubiquitin ligase
Editor of portion(s)	Charles E. Samuel	Author of portion(s)	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOL
Volume of serial or monograph	292	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	21124	Publication date of portion	2017-10-27

## PUBLISHER TERMS AND CONDITIONS

Journal of Biological Chemistry permissions policies: • If you are an author of the content for which you are seeking permission, or if you are not an author but are requesting permission to copy, distribute, transmit and adapt the work for noncommercial purposes (e.g. reproduction of a figure for educational purposes such as schoolwork, or appending a reprinted article to a PhD dissertation), you do not need to seek permission using the options listed below, as long as any reuse includes the credit line in the reuse policies listed above. • Parties who are not authors on the article who wish to reuse content for commercial purposes such as reproducing a figure in a book, journal, or coursepack published by a commercial publisher, do need permission and should request permission by completing the form below. For more information please see Journal of Biological Chemistry: <http://www.jbc.org/site/misc/edpolicy.xhtml#copyright>

## CCC Republication Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

### Annexe 3. Licence d'utilisation (Figure 2.1)



#### American Soc for Biochemistry & Molecular Biology - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Jérémy Ferreira Barbosa ("You") and American Soc for Biochemistry & Molecular Biology ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Soc for Biochemistry & Molecular Biology, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	26-Apr-2020	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1030918-1	Publisher	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
ISSN	1535-9484	Portion	Chart/graph/table/figure

#### LICENSED CONTENT

Publication Title	Molecular & cellular proteomics	Country	United States of America
Author/Editor	American Society for Biochemistry and Molecular Biology.	Rightsholder	American Soc for Biochemistry & Molecular Biology
Date	01/01/2002	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	<a href="http://www.mcponline.org/">http://www.mcponline.org/</a>

#### REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Canada
Number of charts / graphs / tables / figures requested	1	Translation	Original language plus one translation
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	CAD
Rights Requested	Main product		

#### NEW WORK DETAILS

Title	Étude de l'interactome et identification de nouvelles cibles de la protéine virale Vpr du VIH-1	Institution name	Université de Montréal
Instructor name	Jérémy Ferreira Barbosa	Expected presentation date	2020-05-01

## ADDITIONAL DETAILS

---

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Jérémy Ferreira Barbosa
------------------------	-----	---	-------------------------

## REUSE CONTENT DETAILS

---

Title, description or numeric reference of the portion(s)	10.1074/mcp.R120.001941	Title of the article/chapter the portion is from	Proximity dependent biotinylation: key enzymes and adaptation to proteomics approaches
Editor of portion(s)	N/A	Author of portion(s)	American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
Volume of serial or monograph	N/A	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	Figure 4	Publication date of portion	2020-03-03

## PUBLISHER TERMS AND CONDITIONS

Journal of Biological Chemistry permissions policies: • If you are an author of the content for which you are seeking permission, or if you are not an author but are requesting permission to copy, distribute, transmit and adapt the work for noncommercial purposes (e.g. reproduction of a figure for educational purposes such as schoolwork, or appending a reprinted article to a PhD dissertation), you do not need to seek permission using the options listed below, as long as any reuse includes the credit line in the reuse policies listed above. • Parties who are not authors on the article who wish to reuse content for commercial purposes such as reproducing a figure in a book, journal, or coursepack published by a commercial publisher, do need permission and should request permission by completing the form below. For more information please see Journal of Biological Chemistry: <http://www.jbc.org/site/misc/edpolicy.xhtml#copyright>

## CCC Republication Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

3.2.

#### Annexe 4. Licence d'utilisation (Figure 3.1)

##### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 26, 2020

---

---

This Agreement between Jérémy A Ferreira Barbosa ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4816560151706
License date	Apr 26, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination
Licensed Content Author	Leifu Chang et al
Licensed Content Date	Jun 15, 2015
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Étude de l'interactome et identification de nouvelles cibles de la protéine virale Vpr du VIH-1
Institution name	Université de Montréal
Expected presentation date	May 2020
Portions	Figure 1
Requestor Location	Jérémy A Ferreira Barbosa 110 Pine Ave W  Montréal, QC H2W 1R7 Canada Attn:
Total	0.00 CAD

Terms and Conditions

**Springer Nature Customer Service Centre GmbH  
Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the **Licensor**). By clicking

## Annexe 5. Licence d'utilisation (Chapitre 3)



Marketplace™

### American Soc for Biochemistry & Molecular Biology - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Jérémy Ferreira Barbosa ("You") and American Soc for Biochemistry & Molecular Biology ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Soc for Biochemistry & Molecular Biology, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	26-Apr-2020	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1030910-1	Publisher	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BI
ISSN	1083-351X	Portion	Chapter/article

#### LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of biological chemistry	Country	United States of America
Author/Editor	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOL	Rightsholder	American Soc for Biochemistry & Molecular Biology
Date	01/01/1905	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	<a href="http://www.jbc.org/">http://www.jbc.org/</a>

#### REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page range(s)	9448-9460	Distribution	Canada
Total number of pages	12	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	CAD

#### NEW WORK DETAILS

Title	Étude de l'interactome et identification de nouvelles cibles de la protéine virale Vpr du VIH-1	Institution name	Université de Montréal
Instructor name	Jérémy Ferreira Barbosa	Expected presentation date	2020-05-01

#### ADDITIONAL DETAILS



Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Jérémy Ferreira Barbosa
------------------------	-----	---	-------------------------

## REUSE CONTENT DETAILS

---

Title, description or numeric reference of the portion(s)	10.1074/jbc.RA117.001444	Title of the article/chapter the portion is from	HIV-1 Vpr hijacks EDD-DYRK2-DDB1DCAF1 to disrupt centrosome homeostasis
Editor of portion(s)	Charles E. Samuel	Author of portion(s)	AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOL
Volume of serial or monograph	293	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	9448-9460	Publication date of portion	2018-05-03

## PUBLISHER TERMS AND CONDITIONS

Journal of Biological Chemistry permissions policies: • If you are an author of the content for which you are seeking permission, or if you are not an author but are requesting permission to copy, distribute, transmit and adapt the work for noncommercial purposes (e.g. reproduction of a figure for educational purposes such as schoolwork, or appending a reprinted article to a PhD dissertation), you do not need to seek permission using the options listed below, as long as any reuse includes the credit line in the reuse policies listed above. • Parties who are not authors on the article who wish to reuse content for commercial purposes such as reproducing a figure in a book, journal, or coursepack published by a commercial publisher, do need permission and should request permission by completing the form below. For more information please see Journal of Biological Chemistry: <http://www.jbc.org/site/misc/edpolicy.xhtml#copyright>

## CCC Republication Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republishing", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
  - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
  - 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following