Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1 : effets des IFN-alpha et de la protéine virale Rev

Alexandra Tauzin

▶ **To cite this version:**

Alexandra Tauzin. Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1 : effets des IFN-alpha et de la protéine virale Rev. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7133 . tel-03259855

HAL Id: tel-03259855

https://theses.hal.science/tel-03259855

Submitted on 14 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

Ecole doctorale BioSPC n°562

Laboratoires INSERM U941 et U1124

Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1 : Effets des IFN-α et de la protéine virale Rev

Par Alexandra Tauzin

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par Fabrizio Mammano

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2020

Devant le jury composé de :

Martine Braibant, Maître de conférences, Université de Tours, Rapporteur
Caroline Goujon, Chargé de recherche, Université de Montpellier, Rapporteur
Rémi Cheynier, Directeur de recherche, Université de Paris, Président du jury
Andrea Cimarelli, Directeur de recherche, Université de Lyon, Examinateur
Fabrizio Mammano, Directeur de recherche, Université de Paris, Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/fr/

Résumé

Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1 : Effets des IFN-α et de la protéine virale Rev

Ce travail a porté sur l'étude de deux mécanismes impliqués dans la modulation de la susceptibilité cellulaire à l'infection par le VIH-1. Premièrement, nous avons étudié l'effet des 12 sous-types d'IFN-α sur l'inhibition de la réplication virale. Nous avons montré que les IFN-α avaient des puissances d'inhibition différentes. Nous avons initialement confirmé que le sous-type 14 est le plus puissant. Nous avons également décortiqué l'effet de chaque IFN-α sur les différentes étapes du cycle viral. Nous avons observé que différentes étapes du cycle sont affectées par les IFN-α et ce de manières différentes selon le sous-type. Ainsi, certains sous-types sont plus puissants sur les étapes précoces alors que d'autres semblent plus efficaces sur les étapes tardives. L'étude du transcriptome induit par les différents sous-types nous suggère que la plus forte inhibition de l'IFN-α14 serait en partie liée à un plus fort niveau d'induction de plusieurs facteurs de restriction.
Deuxiemement, nous avons étudié un mécanisme d'interférence induit par le virus lui-même. Nous avions déjà observé que la protéine virale Rev pouvait interférer avec une seconde infection virale. Nous avons observé que tous les domaines fonctionnels de Rev (localisation nucléaire, multimérisation, liaison à l'ARN, export nucléaire) sont nécessaires pour cette interférence. Nous avons ensuite identifié l'étape du cycle viral ciblée par Rev comme étant l'import nucléaire et/ou l'intégration. De même, nous avons montré que certaines souches virales sont résistantes à la restriction médiée par Rev. Les résultats de notre étude suggèrent que la capside virale jouerait un rôle dans ce mécanisme et un ou plusieurs facteurs cellulaires pourraient également être impliqués.

Mots clefs : VIH-1, IFN-α, Rev, restriction, cycle viral

Modulation of cell susceptibility to HIV-1 infection: Effects of IFN-α and of the viral protein Rev

This work focused on the study of two mechanisms involved in the modulation of cellular susceptibility to HIV-1 infection. First, we studied the effect of the 12 IFN-α subtypes on the inhibition of viral replication. We showed that IFN-α have different inhibition potencies. We initially confirmed that subtype 14 is the most potent. We also examined the effect of each IFN-α on the different steps of the viral replication cycle. We observed that different steps are affected to various extent by IFN-α depending on the subtype. Thus, some subtypes are more potent on the early steps while others seem to be more effective on the late steps. The study of the transcriptome induced by the different subtypes suggests that the inhibition potency of IFN-α14 is partly related to a higher level of induction of several restriction factors.
Second, we studied an interference mechanism induced by the virus itself. We had already observed that the viral protein Rev could interfere with a second viral infection. We observed that all functional domains of Rev (nuclear localization, multimerization, RNA binding, nuclear export) are necessary for interference. We then identified the steps of the viral cycle targeted by Rev as nuclear import and/or integration. In addition, we demonstrated that some viral strains are resistant to Rev-mediated restriction. Our results suggest that the viral capsid may be involved in this mechanism and one or several cellular factors could be involved.

Keywords : HIV-1, IFN-α, Rev, restriction, viral cycle

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ma thèse, le Dr Caroline Goujon et le Dr Martine Braibant, d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Dr Rémi Cheynier et le Dr Andrea Cimarelli pour le temps qu'ils ont accordé à l'étude de mon sujet de doctorat.

Je remercie le Pr François Clavel et le Dr Robert Barouki pour m'avoir accueilli au sein de leur unité respective. Je remercie également le Dr Jérôme Estaquier qui nous a fait de la place dans son équipe après notre départ de l'hôpital Saint-Louis.

Je remercie l'ANRS d'avoir financé ce projet de thèse.

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse, le Dr Fabrizio Mammano, pour m'avoir donné ma chance en stage de master 2 et m'avoir proposé de faire ma thèse sous sa direction. Merci d'avoir passé énormément d'heures dans mes débuts au laboratoire à m'expliquer pleins de choses. Cela m'a permis d'avoir toujours une bonne compréhension de ce que je faisais. Je te remercie également de m'avoir fait confiance toutes ces années et permis de participer à ces nombreux projets. Grâce à cette confiance, j'ai moi-même pris en confiance en moi et j'espère que je ne te décevrais pas dans mes travaux futurs et que, même si je ne travaille plus sous ta direction, je continuerais de collaborer avec toi.

Je remercie Olivia Blake et Armando Espinosa, que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant leur stage de M2. Vous encadrer tous les deux a été une épreuve pour moi, car je ne me sentais pas toujours légitime, mais ça a également été très enrichissant. J'ai dû apprendre à m'adapter à vos caractères et personnalités très différentes et j'ai surtout appris à me remettre en question pour essayer de vous aider au mieux. J'espère sincèrement que vous garderez autant de plaisir que moi de cette expérience et je suis convaincue que tout se passera bien pour vous, car vous êtes aussi brillant l'un que l'autre.

Je remercie sincèrement tous mes anciens collègues de l'ex unité 941 (les membres du FLLS), qui a fermé trop tôt, et dans laquelle j'ai passé des moments mémorables.
Tout d'abord le Dr Jacques Dutrieux, pour qui j'ai une profonde gratitude. Jacques, tu as a vraiment été mon maître Kenobi au début de ma thèse (je ne pouvais pas ne pas faire une référence à Star Wars). Tu m'as formé à énormément de manip, tu as toujours été là quand j'avais la moindre question et j'aurais vraiment été perdue sans toi. Tu es vraiment quelqu'un d'exceptionnel et même si je sais que des gens indispensables, il y en a plein les cimetières, ça facilite vraiment la vie quand tu en as un près de toi.

Je remercie également mes anciennes voisines de bureau. Tout d'abord Julie Migraine qui m'a beaucoup aidé dans mes débuts au labo. Ta gentillesse est vraiment inégalable et c'était très réconfortant de savoir que je pouvais toujours compter sur quelqu'un.
Je remercie également Anne de Verneuil avec qui j'ai toujours passé de très bons moments, souvent autour d'un gâteau.
Je remercie aussi Elise Diaz, qui est arrivée trop tard dans l'unité, car on était déjà sur la fin. Elise, tu as apporté un souffle frais à l'équipe et tu t'es vite intégrée car tu as tout de suite compris l'ambiance de notre unité. Je garde de très bons souvenirs avec toi.
Je remercie Hélène Roux avec qui j'ai passé de très nombreux moments mémorables.
Je remercie également tous les anciens de l'U941, Juliette, Aude, Anthony, Linda, Maud qui ont

toujours été accueillants et bienveillants.

Je remercie également tous les membres de ma nouvelle équipe au sein de l'unité 1124. Je remercie Morgane Picard, avec qui je partage mon bureau et qui arrive toujours à trouver de nouvelles méthodes pour me faire peur.

Je remercie tout particulièrement Selvy qui est toujours très disponible. Selvy tu m'as énormément aidé pendant la fin de ma thèse, tu m'as permis de finir plus sereinement mes travaux. Tu es toujours motivée pour apprendre de nouvelles expériences et je sais qu'avec toi mes projets scientifiques seront parfaitement finalisés.

Je remercie profondément Sonia André. Sonia, toi aussi tu es quelqu'un d'exceptionnel, tu nous as accueilli à bras ouverts dans le labo, tu es toujours de bonne humeur, de bon conseil et je ne m'ennuie jamais avec toi, tu es ma sœur de labo et je te souhaite vraiment tout le meilleur.

Je remercie le président du FLLS, mon jumeau maléfique, mon bro, Alexandre Nicolas. On est devenu amis parce que tu ne m'as pas laissé le choix. Et heureusement que tu ne m'as pas laissé le choix. Je pense que c'est toi que je dois le plus remercier, tu m'as supporté pendant toutes ces années et surtout, tu m'as épaulé dans les pires moments. Je t'en serai toujours reconnaissante.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu pendant ma thèse et plus particulièrement Camille et Emilie qui m'ont écouté me plaindre toutes ces années. Camille, on a vécu la même chose au même moment et c'était plus simple de pouvoir partager ça avec toi. Emilie, tu es toujours de bons conseils, et même quand rien ne va, tu as l'art de toujours trouver des solutions.

Et pour finir, je remercie ma famille pour son soutien quotidien, et tout particulièrement ma maman et Roger pour m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) toutes ces années. Je sais que ça n'a pas été facile pour vous tous les jours mais ça y est, c'est fini pour moi. Vous pouvez souffler.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
APOBEC : Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like
ARN : Acide ribonucléique
ARNg : Acide ribonucléique génomique
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ARNm : Acide ribonucléique messager
AZT : Zidovudine
CA : Antagoniste de CCR5
CCR5 : Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CD4 : Cluster de différenciation 4
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCR4 : Récepteur à C-X-C chimiokine de type 4
DIS : Séquence d'initiation de la dimérisation
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate
DTG : Dolutégravir
FDC : Combinaison à dose fixe
FI : Inhibiteur de fusion
IFITM : Interferon induced transmembrane protein
IFN : Interféron
IKKε : I-kappaB kinase epsilon
INSTI : Inhibiteur d'intégrase
IRES : Site interne d'entrée du ribosome
IRF : Interferon regulatory factor
ISG : Interferon stimulated genes
ISRE : Interferon stimulated response element
JAK : Just another kinase
KD : Constante de dissociation
LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2
LTR : Long terminal repeat
MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA5 : Melanoma differentiation-associated protein 5
MDDC : Monocyte-derived dendritic cells
Mx2 : Myxovirus resistance 2
MYD88 *:* Myeloid differentiation primary response protein 88
NVP : Névirapine
NLR : Nod like receptor
NK : Lymphocytes natural killer
NNRTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse,
NPC : Complexes de pores nucléaires
NRTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse,
Nup : Nucléoporine
PAI : Inhibiteur post-attachement
PAMP : Pathogen associated molecular patterns
PBMC : Cellules mononucléaires du sang périphérique
PBS : Primer binding site
pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PE : Activateur pharmacocinétique
PHA : Phytohémagglutinine
PI : Inhibiteur de protéase
PIC : Complexe de préintégration
PQBP1 : Polyglutamine-binding protein 1
PRR : Pattern recognition receptor
RIG-I : Retinoic acid-inducible gene I protein
RLR : RIG-I-like receptors
RRE : Rev response element
SAMHD1 : Sterile alpha motif and HD domain 1
SERINC : Serine incorporator
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV : Virus de l'immunodéficience simienne
STAT : Signal transducers and activators of transcription
STING : Stimulator of interferon genes protein
TAR : Trans-acting responsive element
TBK1 : TANK Binding Kinase 1
TBP : TATA-binding protein
TIRAP : Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLR : Toll-like receptors
TRAM : Thyroid hormone receptor activator molecule
TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRIM : Tripartite motif family
TYK2 : Non-receptor tyrosine-protein kinase
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

Table des matières

Résumé **2**
Remerciements **3**
Liste des abréviations **5**
Table des matières **7**
Table des illustrations **11**
Introduction **13**
I. Généralités sur le VIH-1 et le SIDA 15
A- Découverte du VIH-1 et épidémiologie 15
B- Cellules cibles et physiopathologie du VIH-1 15
C- Traitements 16
II. Le VIH-1 et son cycle réplicatif 18
A- Gènes et protéines virales 18
B- Cycle de réplication virale 20
1. Attachement du virion 20
2. Entrée virale 20
3. Transcription inverse 22
4. Décapsidation 22
5. Import nucléaire 24
6. Intégration 26
7. Transcription et traduction virales 26
8. Assemblage 27
9. Bourgeonnement 27
10. Maturation 27
C- Séquences régulatrices du VIH-1 29
III. Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1 29
Partie 1 : Modulation de la susceptibilité cellulaire par les Interférons alpha **31**
A- Les Pattern Recognition Receptors (PRR) 31
B- PRR impliqués dans la reconnaissance du VIH-1 33
1. Senseurs membranaires 33
2. Senseurs cytoplasmiques 33
C- Echappement du VIH-1 à la reconnaissance par les PRR 34
D- Les Interférons 36
1. Généralités sur les Interférons 36
2. Les Interférons α 36

a) Le récepteur IFNAR ... 36
a) Activation de la voie Jak/Stat ... 38
b) Les Interferon Stimulated Genes (ISG) ... 38
c) Facteurs de restriction et facteurs inhibiteurs du VIH ... 38
d) Evasion du virus aux facteurs de restriction ... 41
E- Les 12 sous-types d'IFN-α ... 43
1. Affinité des IFN-α pour leur récepteur ... 43
2. Réponses antivirales et antiprolifératives aux IFN-α ... 45
3. Profil d'induction des IFN-α au cours d'une infection VIH-1 ... 45
4. Profil d'inhibition du VIH-1 par les 12 sous-types d'IFN-α ... 47
F- Utilisation clinique des IFN de type I ... 51
1. Historique ... 51
2. Les IFN-α dans le traitement du VIH-1 ... 52
Partie 2 : Interférence « intrinsèque » ... 55
A- Interférence liée aux récepteurs du VIH ... 55
1. Interférence liée au récepteur CD4 ... 55
2. Rôles des corécepteurs CXCR4 et CCR5 ... 58
a) Corécepteur CXCR4 ... 58
b) Corécepteur CCR5 ... 58
B- Interférence indépendante des récepteurs ... 60
1. Preuves de l'existence d'une interférence indépendante des récepteurs ... 60
2. Rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale ... 62
3. La protéine virale Rev ... 64
a) Fonction d'export des ARN viraux de la protéine Rev ... 64
b) Cofacteurs de la protéine Rev ... 66
c) Fonction de la protéine Rev dans les étapes tardives du cycle ... 66
d) Rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale ... 66
e) Rôle de la protéine Rev dans l'activation de la réponse immunitaire ... 66
Objectifs ... 70
Matériels et Méthodes ... 73
I. Cultures cellulaires ... 74
II. Plasmides ... 74
III. Productions virales ... 74
IV. qPCR ... 75
V. Marquages ... 76
A- Gag ... 76
B- HSA ... 76

VI. Analyses 76
Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1 77
VII. IFN-α 77
VIII. Tests de prolifération cellulaire 77
IX. Tests de mortalité cellulaire 77
X. Mesure de l'activité des IFN-α sur les cellules HL116 77
XI. Réplication virale mesurée en cycles multiples 78
XII. Infection en cycle unique 78
A- Avec un virus sauvage 78
B- Avec un virus exprimant la luciférase 78
XIII. Test de fusion (Vpr-β-Lactamase) 78
XIV. Test d'efficacité de la transcription inverse 79
XV. Test d'efficacité de bourgeonnement 79
XVI. Test d'infectivité résiduelle 79
XVII. Analyses RNAseq 80
Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale 80
XVIII. Création des lignées MT4R5 80
XIX. Western Blot des proteines Rev et actine 80
XX. Mesure de la transcription inverse, de l'import et de l'intégration 81
XXI. Mesure de l'expression protéique 81
XXII. Mesure de l'interférence d'un lentivirus 81
Résultats 82
Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1 84
I. Puissance d'induction d'un ISG générique par chaque sous-type d'IFN-α 84
II. Rôle des IFN-α dans la prolifération et la viabilité cellulaire 86
A- Effet des IFN-α sur la prolifération cellulaire des cellules MT4R5 86
B- Effet des IFN-α sur la mort cellulaire des cellules MT4R5 88
C- Effet des IFN-α sur la prolifération et la mort cellulaires de lymphocytes primaires 88
III. Effets des IFN sur la réplication du VIH-1 à cycle multiple 90
IV. Capacité des sous-types d'IFN-α à inhiber les différentes étapes du cycle viral 90
A- Etapes précoces du cycle de réplication virale 90
1. Entrée virale 92
2. Effet de l'inhibition de l'entrée virale sur les étapes en aval 94
3. Transcription inverse 94
A- Etapes tardives du cycle de réplication virale 96

1. Transcription, traduction et maturation de la protéine p24 98
2. Bourgeonnement 98
3. Infectivité résiduelle 98
B- Résumé des effets des sous-types d'IFN-α sur le cycle viral 100
V. Analyse du transcriptome induit par les sous-types d'IFN-α 100
A- Expression des facteurs de restriction inhibant la réplication du VIH-1 100
B- Analyse préliminaire du transcriptome complet 102
Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale 104
I. Lignées cellulaires MT4R5 Rev 104
A- Obtention des lignées cellulaires MT4R5 Rev 104
B- Expression de Rev dans les lignées MT4R5 Rev 106
C- Fonctionnalité de Rev dans les lignées MT4R5 Rev 106
II. L'expression de Rev est suffisante pour l'interférence virale 106
III. Etape du cycle affectée 110
A- Entrée virale 110
B- Transcription inverse 110
C- Import nucléaire et intégration 112
IV. Mécanisme d'action de Rev dans l'interférence 114
A- Implication des gènes accessoires 114
B- Rev interfère avec le VIH-1 de manière souche dépendante 116
C- La capside virale est un déterminant de la susceptibilité à l'interférence médiée par Rev 116
Projets collaboratifs 119
Discussion et Perspectives 121
Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1 122
Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale 130
Références bibliographiques 135
Annexes 162
Article 1 : Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection (publié) 163
Article 2 : Dynamics of HIV-1 coinfection in different susceptible target cell populations during cell-free infection (publié) 174
Article 3 : Anti-HIV-1 activity of pepRF1, a proteolysis-resistant CXCR4 antagonist derived from Dengue virus capsid protein (en révision) 182
Article 4 : Reservoir (en préparation) 208
Article 5 : Inhibition of HIV replication by the 12 interferon-α subtypes (en préparation) 208
Article 6 : Rev (en préparation) 208

Table des illustrations

FIGURE 1 : PATHOGENESE DE L'INFECTION VIH-1 AU COURS DES 3 PHASES : EN PRIMO-INFECTION (A GAUCHE), EN PHASE CHRONIQUE (AU CENTRE) ET EN STADE SIDA (A DROITE). 14
FIGURE 2 : STUCTURE DU VIRION AVANT (GAUCHE) ET APRES (DROITE) MATURATION. 17
FIGURE 3 : GENOME DU VIH-1 (SOUCHE HXB2). 17
FIGURE 4 : CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1. 19
FIGURE 5 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA TRANSCRIPTION INVERSE DU VIH-1. 21
FIGURE 6 : FACTEURS INTERAGISSANT AVEC LA CAPSIDE VIRALE PENDANT LES PHASES PRECOCES D'UNE INFECTION VIH-1. 23
FIGURE 7 : LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ETAPE D'INTEGRATION DU VIH-1. 25
FIGURE 8 : STRUCTURE DU PROMOTEUR LTR DU VIH-1. 28
FIGURE 9 : SEQUENCES REGULATRICES DU VIH-1. 28
FIGURE 10 : VOIES DE SIGNALISATION MEDIEES PAR LES PRR. 30
FIGURE 11 : PRR IMPLIQUES DANS LA RECONNAISSANCE DU VIH-1. 32
FIGURE 12 : REPRESENTATION DU COMPLEXE IFNAR1, IFNAR2 ET IFN-A. 35
FIGURE 13 : INDUCTION DE L'EXPRESSION DES ISG PAR LES INTERFERONS DE TYPE I. 37
FIGURE 14 : FACTEURS DE RESTRICTION DU VIH-1. 39
FIGURE 15 : CINETIQUES ET CONSTANTES D'AFFINITE DE CHAQUE SOUS-TYPE D'IFN-A POUR LES DEUX SOUS-UNITES DU RECEPTEUR IFNAR. 42
FIGURE 16 : MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-PROLIFERATIVE (PAR RAPPORT A L'IFN-A2) DANS 2 LIGNEES CELLULAIRES (A). 44
FIGURE 17 : MESURE DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE CHAQUE SOUS-TYPE D'IFN-A FACE A DEUX VIRUS DIFFERENTS EN FONCTION DE LA LIGNEE CELLULAIRE. 44
FIGURE 18 : PROFILS D'EXPRESSION DES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN-A DANS DES PBMC DE PATIENTS. 46
FIGURE 19 : EXPRESSION DES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN-A DANS DES PDC SUITE A UNE EXPOSITION AU VIH-1. 46
FIGURE 20 : INHIBITION DE LA REPLICATION DU VIH-1 PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN-A. 46
FIGURE 21 : CORRELATION INVERSE ENTRE LA CAPACITE ANTIVIRALE ET LE NOMBRE DE COPIES INDUIT APRES INFECTION DE CHAQUE SOUS-TYPE D'IFN-A. 48
FIGURE 22 : INHIBITION DE LA REPLICATION DU VIH-1 PAR DEUX IFN-A *IN VIVO*. 48
FIGURE 23 : REDUCTION DE L'INFECTION VIH-1 PAR L'IFN-A14. 50
FIGURE 24 : ENDOCYTOSE DE CD4 MEDIEE PAR LA PROTEINE VIRALE NEF. 54
FIGURE 25 : CONTRIBUTION DES PROTEINES VPU, ENV ET NEF DANS L'INTERFERENCE VIRALE. 56
FIGURE 26 : CINETIQUE DE LA SOUS-EXPRESSION DU RECEPTEUR CD4 A LA SURFACE CELLULAIRE DANS DES PBMC INFECTES. 56
FIGURE 27 : MESURE DE L'INTERFERENCE VIRALE DANS DES MACROPHAGES. 59
FIGURE 28 : MODELE SCHEMATIQUE DE L'INTERACTION ENTRE REV ET L'INTEGRASE. 61
FIGURE 29 : MESURE DE LA FREQUENCE DES CELLULES DOUBLEMENT INFECTEES EN FONCTION DU TEMPS ENTRE LES DEUX INFECTIONS. 61
FIGURE 30 : EFFET DE L'EXPRESSION DES PROTEINES VIRALES SUR LA MISE EN PLACE DE L'INTERFERENCE. 63
FIGURE 31 : STRUCTURE DE LA PROTEINE VIRALE REV. 63
FIGURE 32 : VOIE D'EXPORT DES ARN VIRAUX PAR REV *VIA* CRM1. 63
FIGURE 33 : REPRESENTATION DE L'INTERACTOME DE REV. 65
FIGURE 34 : LES ETAPES TARDIVES DU CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1 INDUISENT UNE ACTIVATION IMMUNITAIRE DES MACROPHAGES. 67
FIGURE 35 : L'EXPORT DES ARNCI *VIA* LA VOIE CRM1 EST NECESSAIRE POUR L'ACTIVATION DES MACROPHAGES. 67
TABLEAU 1 : LISTE ET QUANTITE DES PLASMIDES UTILISES POUR PRODUIRE LES DIFFERENTS VIRUS. 75
FIGURE 36 : MESURE DE LA PUISSANCE D'INDUCTION D'UN ISG PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN- A. 83
FIGURE 37 : CORRELATION ENTRE L'AFFINITE DES SOUS-TYPES D'IFN-A POUR LEUR RECEPTEUR ET LEUR CAPACITE A INDUIRE L'ACTIVATION DE L'ELEMENT ISRE. 85
FIGURE 38 : MESURE DE L'EFFET DES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN-A SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE. 85
FIGURE 39 : MESURE DE L'EFFET DES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN- A SUR LA MORT CELLULAIRE. 87
FIGURE 40 : MESURE DE L'EFFET DES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN- A SUR LA PROLIFERATION ET LA MORT CELLULAIRES DANS DES LYMPHOCYTES PRIMAIRES. 87
FIGURE 41 : MESURE DE L'INHIBITION DE LA PROPAGATION DU VIH-1 PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES D'IFN-A. 89
FIGURE 42 : MESURE DE L'INHIBITION DES ETAPES PRECOCES DU CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1 PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES

d'IFN-a dans des lymphocytes primaires ou dans des cellules MT4R5. 91
Figure 43 : Mesure de l'inhibition de l'entree virale du VIH-1 par les differents sous-types d'IFN-a. 91
Figure 44 : Correlation inverse entre l'induction de l'expression de la proteine IFITM1 par les sous-types d'IFN-a et l'efficacite de l'entree virale. 93
Figure 45 : Mesure de l'effet de l'inhibition de l'entree virale sur les etapes en aval. 93
Figure 46 : Mesure de l'inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par les differents sous-types d'IFN-a. 95
Figure 47 : Correlation inverse entre l'induction de l'expression de la proteine TRIM5a par les sous-types d'IFN-a et l'efficacite de la transcription inverse. 95
Figure 48 : Mesure de l'induction de l'expression de Mx2 par les differents sous-types d'IFN-a. 97
Figure 49 : Mesure de l'inhibition de l'expression proteique du VIH-1 par les differents sous-types d'IFN-a. 97
Figure 50 : Mesure de l'efficacite de bourgeonnement des virus produits en presence des differents sous-types d'IFN-a. 97
Figure 51 : Mesure de l'infectivite residuelle des virions produits en presence des differents sous-types d'IFN-a. 99
Tableau 2 : Recapitulatif des effets des 12 sous-types d'IFN-a au niveau des differentes etapes du cycle de replication de la souche NLAd8 dans des cellules MT4R5. 99
Figure 52 : Heatmap du niveau d'induction des facteurs de restriction connus du VIH-1. 101
Tableau 3 : Description des mutants de Rev. 103
Figure 53 : Expression de Rev dans les lignees MT4R5 Rev. 105
Figure 54 : Etude de la fonctionnalite de la proteine Rev dans les cellules MT4R5 transuites. 105
Figure 55 : Mesure de l'inhibition de l'expression de deux proteines du VIH-1 par Rev (sauvage ou mutee). 107
Figure 56 : Phases d'expression proteique du VIH-1 en conditions normales (A) et dans les cellules exprimant Rev (B). 107
Figure 57 : Mesure de l'inhibition de l'infection en fonction de l'enveloppe portee par le virus. 109
Figure 58 : Mesure de la quantite d'ADN viral retrotranscrit dans les cellules exprimant la proteine Rev sauvage ou mutee. 109
Figure 59 : Mesure du nombre de genomes integres par cellule et de la formation de cercles a 2 LTR. 111
Figure 60 : Quantification de la formation de cercles a 2 LTR apres traitement avec un inhibiteur de l'integrase. 111
Figure 61 : Mesure de l'interference induite par Rev contre un lentivirus. 113
Figure 62 : Mesure de l'inhibition par Rev sauvage ou mutee de differentes souches du VIH-1. 115
Figure 63 : Alignement des sequences de la capside des virus NL4-3, Bru et du lentivirus (R8.74). 115
Figure 64 : Mesure de l'inhibition par Rev sauvage ou mutee d'un virus NL4-3 portant la mutation N74D dans sa capside. 115
Figure 65 : Mesure de l'interference virale mediee par Rev dans differents isolats du VIH-1. 117
Figure 66 : Alignement des sequences de la matrice et de l'integrase des differentes souches virales. 117
Figure 67 : Schema decrivant les mecanismes impliques dans l'interference virale intrinseque du VIH-1. 134

Introduction

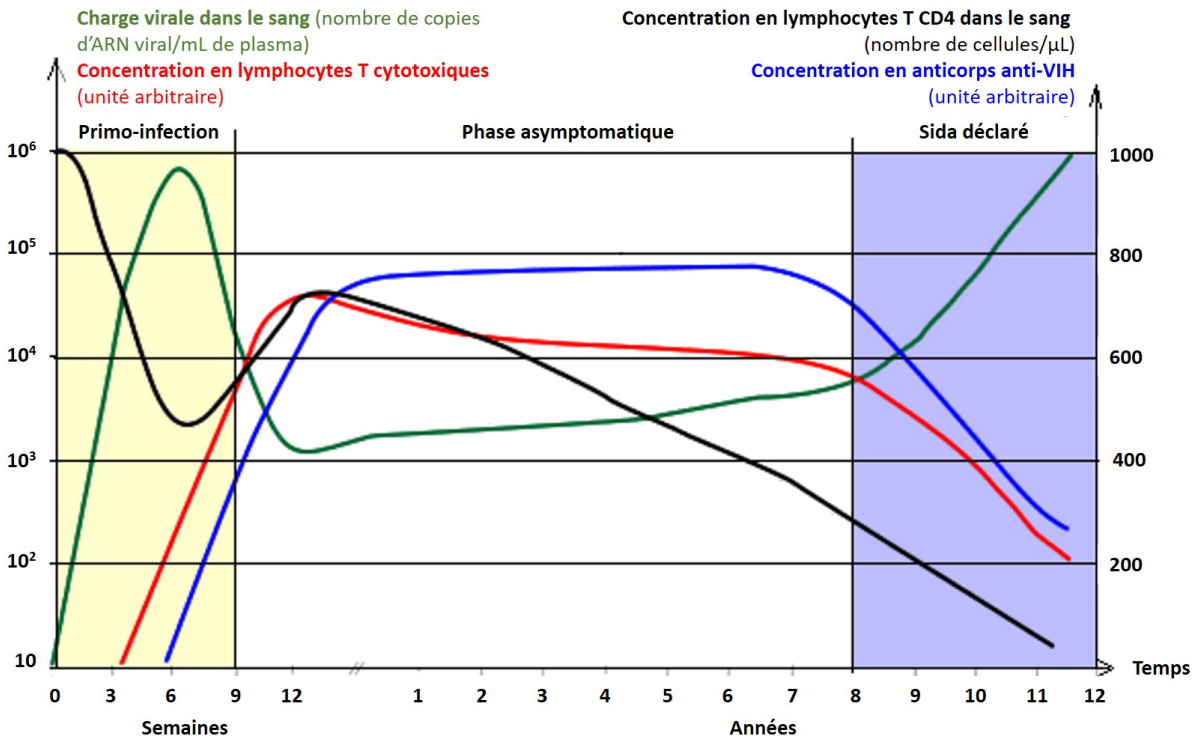


Figure 1 : Pathogénèse de l'infection VIH-1 au cours des 3 phases : en primo-infection (à gauche), en phase chronique (au centre) et en stade SIDA (à droite).

Sont représentés sur le graphe, le nombre de lymphocytes T CD4 (noir) et T cytotoxiques (rouge), le titre d'anticorps anti-VIH (bleu) et la charge virale au cours de l'infection (vert) (Site de l'ENS de Lyon).

I. Généralités sur le VIH-1 et le SIDA

A- Découverte du VIH-1 et épidémiologie

Le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) a été isolé et décrit pour la première fois en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983). Cette découverte fait suite à une épidémie qui a commencé en 1981 et s'est propagée dans le monde entier. Les symptômes de cette maladie étaient la réduction importante du nombre de lymphocytes T CD4+ dans le sang causant un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et l'apparition de maladies opportunistes conduisant systématiquement à la mort des patients. Le VIH-1 a émergé chez l'homme suite à plusieurs transmissions zoonotiques d'un virus de singe, le Simian Immunodeficiency Virus (SIV) (Hahn et al., 2000). Chez l'homme, ce virus se transmet par voie sexuelle, contact avec le sang, lors de l'accouchement et de l'allaitement.

Depuis le début de l'épidémie, près de 75 millions de personnes ont été infectées par le VIH-1 et environ 32 millions en sont mortes. En 2018, 37,9 millions de personnes dans le monde vivaient avec le VIH et 24,5 millions seulement avaient accès à un traitement antiviral (source : ONUSIDA). En 2018, 1,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH et 770 000 personnes sont décédées de causes liées au SIDA. L'Afrique Sub-Saharienne est la partie du monde la plus touchée par le virus.

B- Cellules cibles et physiopathologie du VIH-1

La nécessité de la liaison du VIH-1 au récepteur CD4 et aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 pour infecter les cellules lui confère un tropisme spécifique pour les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Les cellules dendritiques quant à elles peuvent internaliser le virus, le transmettre aux lymphocytes ou dans certaines conditions, être infectées. L'infection d'autres types cellulaires a également été décrite, mais leur rôle semble marginal. Chez la majorité des patients, en absence de traitement, l'infection par le VIH-1 se manifeste en trois phases (Naif, 2013):

La primo-infection, souvent asymptomatique, ou avec des symptômes pseudo-grippaux non spécifiques (fièvre, malaise, lymphadénopathie, diarrhée, éruptions cutanées) (Schacker et al., 1996). Pendant cette phase, le virus réplique efficacement et établit une infection permanente dans tous les compartiments du corps (Figure 1). On observe également une forte déplétion en lymphocytes T CD4+ et une expansion des CD8+. Puis le haut niveau de virémie dans le sang, qui dépasse 1 million de copies d'ARN viral par millilitre, va chuter jusqu'à atteindre un plateau très variable selon les individus, appelé « *set point* », généralement de dix milles à cent milles copies d'ARN viral par milliltre. Survient ensuite une phase chronique asymptomatique de durée variable selon les patients (en moyenne 8 à 10 ans en l'absence de traitement). Pendant cette phase, il y a une déplétion progressive des lymphocytes T CD4+ dans le sang et les ganglions lymphatiques jusqu'à atteindre un seuil trop bas (200 cellules/µl ou moins) pour assurer le fonctionnement du système immunitaire. Le patient entre alors dans la troisième phase de la maladie, le stade SIDA. Pendant cette phase, on observe une dérégulation du système immunitaire et une inflammation systémique ainsi qu'une réplication persistante du virus. Au cours de cette dernière phase, le système immunitaire est trop affaibli, ce qui conduit à l'apparition de maladies opportunistes comme des infections *à Pneumocystis jirovecii, mycobacteria, cytomegalovirus, Toxoplasma gondii, Cryptococcus* ou des cancers peu fréquents chez les individus immunocompétents, comme le sarcome de Kaposi ou des lymphomes non-Hodgkiniens qui vont conduire fatalement à la mort du patient.

C- Traitements

Un des obstacles majeurs au développement d'un traitement efficace contre le VIH a été sa vaste diversité génétique. En effet, la transcriptase inverse du virus n'a pas d'activité correctrice, ce qui crée une erreur environ toutes les 10000 bases (environ une erreur par génome et par cycle viral) (Roberts et al., 1988). Ce virus présente également une dynamique de réplication très rapide. Chez un patient non traité, on observe une production d'environ 10^9 nouvelles particules virales par jour au début de l'infection (Ho et al., 1995). De plus, dans un cas de coinfection d'une cellule par deux virus, des évènements de recombinaisons entre les virus peuvent avoir lieu. Ces phénomènes combinés conduisent à une très large population virale très diversifiée. On parle alors de quasi-espèces.

Au début de l'épidémie, il n'existait pas de molécule antirétrovirale. Le traitement consistait à soigner les maladies opportunistes qui se présentaient pendant la phase SIDA. La première molécule utilisée en thérapie a été l'azidothymidine (AZT), en 1987, qui avait été développée pour le traitement des cancers. Cette molécule est capable d'inhiber l'étape de transcription inverse du virus. Cependant, des résistances virales à l'AZT se sont rapidement développées.
Les traitements ont été révolutionnés au milieu des années 90 avec le développement des inhibiteurs de protéase et d'autres inhibiteurs de la transcriptase inverse. Ceci a permis l'administration d'une combinaison de ces molécules aux patients, (*combines Antiretroviral Therapy*, cART) qui provoque une réduction très importante de la réplication virale et par conséquent de la charge virale plasmatique, et réduit la probabilité d'émergence de mutants résistants à ces inhibiteurs. Ces traitements ont fait chuter drastiquement la mortalité et la morbidité liées au VIH-1 (Barré-Sinoussi et al., 2013).

Il existe aujourd'hui six classes différentes d'antirétroviraux qui ciblent plusieurs étapes du cycle viral : les antagonistes du corécepteur CCR5, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de l'intégrase et les inhibiteurs de la protéase (Puhl et al., 2019). Actuellement les patients sont traités par une combinaison de trois antirétroviraux dirigés au moins contre deux cibles virales distinctes, généralement un inhibiteur de l'intégrase associé à deux inhibiteurs de la transcriptase inverse. Ces traitements sont très efficaces dans la majorité des cas, permettant un contrôle de la virémie et prévenant la transmission du virus au sein de couples sérodiscordants ou de la mère à l'enfant lors de l'accouchement. Cependant, les traitements doivent être pris à vie, car ils ne permettent pas l'éradication de l'infection et l'arrêt du traitement conduit presque toujours à un rebond de la virémie.

Maintenant que les traitements antirétroviraux sont efficaces pour inhiber la réplication virale, un des nouveaux enjeux est la guérison de l'infection par le VIH-1. Cependant, l'obstacle majeur à l'éradication de ce virus vient de l'existence d'un réservoir viral. Les réservoirs viraux peuvent désigner à la fois des sanctuaires anatomiques, qui sont peu accessibles par le traitement à cause d'une mauvaise diffusion des antirétroviraux dans ces tissus, ou alors des cellules (principalement des lymphocytes T CD4 mémoires) dans lesquelles le virus a intégré son génome et est en phase de latence (Chun et al., 1995). Dans ces cellules, le virus n'est pas reconnu par le système immunitaire car elles n'expriment pas d'antigènes et les traitements n'ont aucun effet. Ce réservoir peut alors se maintenir car ces cellules ont une longue durée de vie et peuvent continuer de proliférer, amplifiant en même temps le provirus intégré dans leur génome (amplification clonale) (Anderson and Maldarelli, 2018).
Actuellement, toujours aucun vaccin n'est efficace pour prévenir l'infection par le VIH-1.

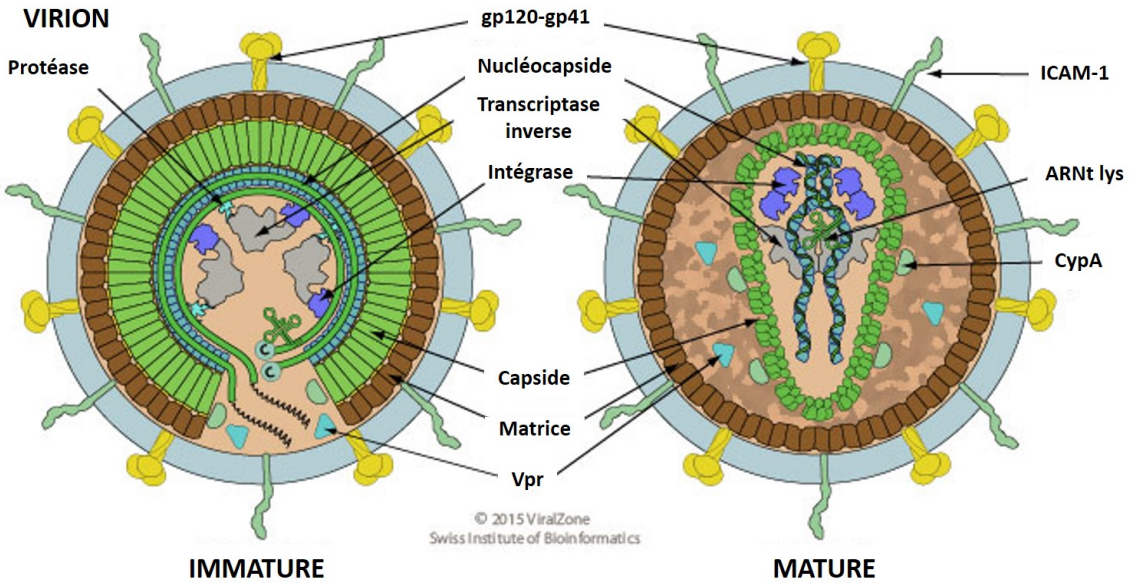


Figure 2 : Stucture du virion avant (gauche) et après (droite) maturation.

Le VIH-1 possède une enveloppe composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchassées les glycoprotéines d'enveloppe ainsi que des protéines cellulaires. Sous l'enveloppe se trouvent les protéines de structure qui protègent l'ARN génomique double brin ainsi que plusieurs protéines virales et cellulaires qui ont été encapsidées lors du précédent bourgeonnement (Source : Viralzone).

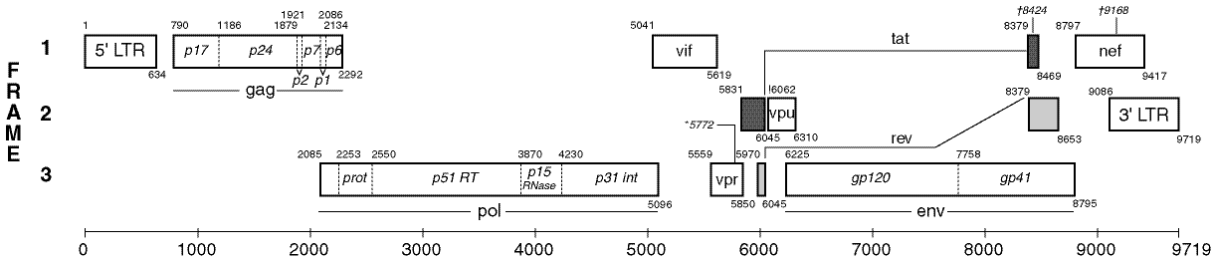


Figure 3 : Génome du VIH-1 (souche HXB2).

Le génome du VIH-1 est composé de 9 gènes. Il contient plusieurs éléments de régulation ainsi que plusieurs cadres de lecture qui donneront lieu à la synthèse de 15 protéines virales (Source : HIV sequence database, Los Alamos National Laboratory).

II. Le VIH-1 et son cycle réplicatif

Le VIH-1 est un virus appartenant à la famille des *retroviridae* du genre lentivirus. C'est un virus à ARN simple brin de polarité positive diploïde. Son génome mesure un peu moins de 10 000 bases. C'est un virus enveloppé faisant environ 100 à 120 nm de diamètre avec une capside de forme conique (Figure 2).

A- Gènes et protéines virales

Le génome du VIH-1 est composé de 9 gènes codant pour 15 protéines (Figure 3) :

Le gène *gag* code pour une polyprotéine précurseur Pr55Gag qui donnera les protéines de structure après clivage par la protéase (Jalalirad and Laughrea, 2010) :

- La matrice (MA-p17) est une protéine myristillée permettant le ciblage du précurseur Gag vers les radeaux lipidiques de la membrane de la cellule hôte au moment de l'assemblage. Dans le virion mature, elle forme la couche protéique externe, sous la membrane lipidique. Elle pourrait également être impliquée dans la liaison de l'ARN viral et l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC).
- La capside (CA-p24) est responsable de la multimérisation des précurseurs Gag. Une fois maturée, elle forme la couche protéique conique interne qui contient le génome viral.
- La nucléocapside (NC-p7) est capable de se lier à l'ARN viral. Pendant les phases tardives du cycle, elle participe à la dimérisation de l'ARN génomique, à son encapsidation, à l'incorporation d'ARNt ainsi qu'à l'assemblage des virions néo-formés.
- La protéine p6 joue un rôle dans l'étape tardive du bourgeonnement en interagissant avec certaines protéines cellulaires. p6 permet également l'incorporation de la protéine virale Vpr dans la particule virale.

Le gène *pol* code pour une polyprotéine qui donnera les enzymes virales (Frankel and Young, 1998a) :

- La protéase (PR-p10) est un homodimère de 22 kDa. Pendant l'étape de maturation, la protéase va s'autocliver puis clivera les polyprotéines Gag et Gag-Pol dans les virions néoformés.
- La transcriptase inverse (RT-p66/51) est une ADN polymérase ARN dépendante composée de deux sous-unités de 51 kD et de 66 kDa. Elle permet la transcription de l'ARN viral en ADN double brin. Elle a également une activité RNaseH conduisant à la dégradation de l'ARNv des hybrides ARN/ADN permettant la synthèse du deuxième brin d'ADN. La transcriptase inverse du VIH-1 n'a pas d'activité correctrice, ce qui induit l'accumulation d'erreurs lors de la transcription inverse.
- L'intégrase (IN-p32) est une protéine de 32 kDa qui fonctionne sous forme de tétramère. Elle catalyse l'intégration de l'ADN viral double brin dans celui de la cellule hôte.

Le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Checkley et al., 2011) :

- Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous la forme d'un précurseur gp160. La gp160 est clivée protéoliquement par une enzyme cellulaire (une protéase furine ou furine-like) en gp120 et gp41 matures. Le clivage de la gp160 est nécessaire pour l'activité de fusion et donc l'infectiosité des virions. Après clivage, la gp120 et la gp41 forment un complexe lié de manière non covalente qui est transporté à la membrane cellulaire. La forme biologique active de Env est un trimère de dimères gp120/gp41.

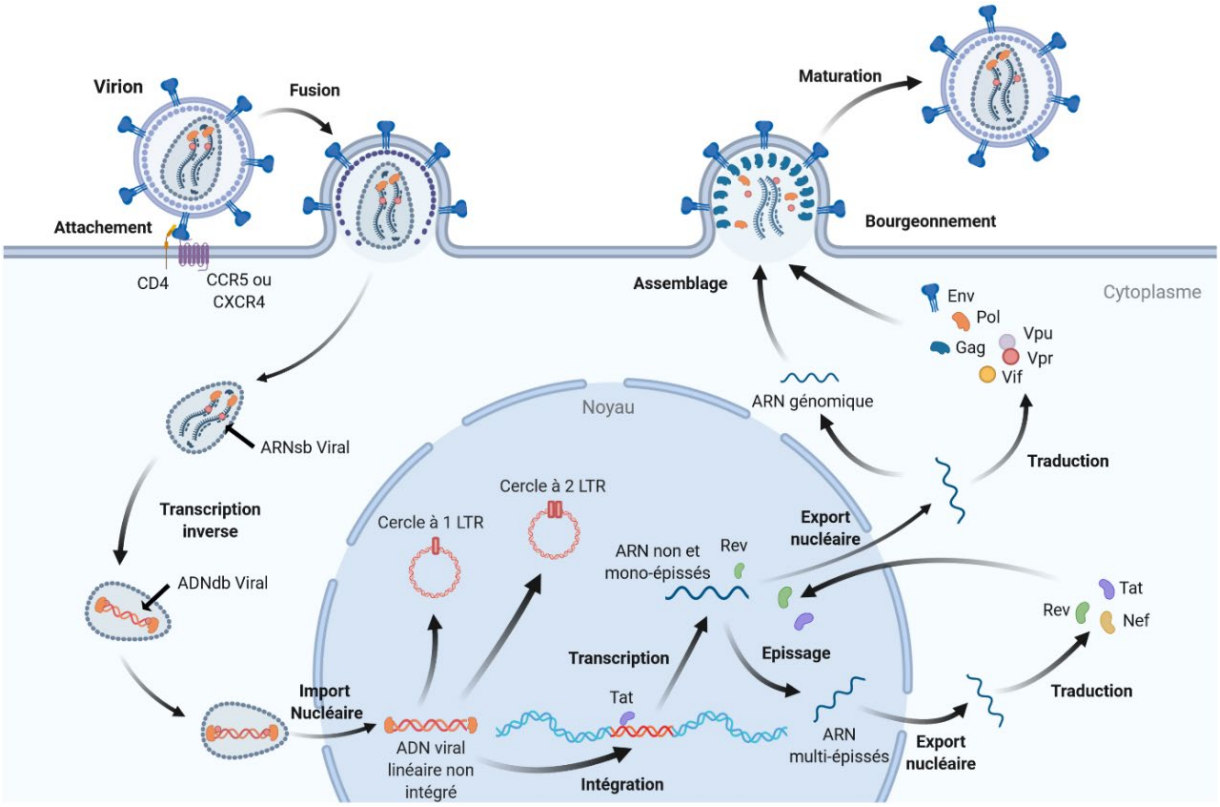


Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1.

Le VIH se fixe à la surface cellulaire grâce à l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4. L'enveloppe du VIH fusionne avec la membrane plasmique de la cellule permettant la libération de la capside dans le cytoplasme. L'ARN génomique du VIH-1 est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse. L'ADN viral est transporté dans le noyau et s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Les ARN viraux génomiques et messagers sont transcrits, exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines virales, permettant ensuite l'assemblage et le bourgeonnement de nouvelles particules virales qui sont libérées à la membrane cellulaire (schéma réalisé sur BioRender.com).

Les gènes restant codent pour les deux protéines régulatrices (Tat et Rev) et les protéines accessoires (Vif, Nef, Vpu et Vpr) (Li et al., 2005) :

- Tat est une protéine de 101 acides aminés codée par deux exons. C'est la protéine transactivatrice du virus. Lors de la transcription du génome viral, Tat se lie à la séquence TAR de l'ARN naissant, permettant son élongation et augmentant son efficacité de transcription.
- Rev est une protéine de 116 acides aminés également codée par deux exons. Rev régule l'expression des ARN viraux en se liant sur la séquence Rev Response Element (RRE) présente dans les ARN non et partiellement épissés.
- Vif est une protéine de 192 acides aminés présente dans la particule virale. Vif stimule la transcription inverse et inhibe l'incorporation d'APOBEC3G, un facteur de restriction du virus, dans les virions néoformés.
- Nef est une protéine de 27 kDa qui entraine une diminution de l'expression de surface de la protéine CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH-I). En diminuant l'expression de CD4, elle favorise le bourgeonnement ainsi que l'infectiosité virale. Nef interfère également avec certaines voies de signalisation cellulaire et des protéines cellulaires capables de réduire l'infectivité virale.
- Vpu est une petite protéine de 9 kDa. Elle favorise le bourgeonnement des virions en neutralisant l'effet du facteur de restriction BST2. Vpu diminue aussi l'expression du récepteur CD4**.**
- Vpr est une protéine de 96 acides aminés qui est incorporée dans les virions en se liant à p6. Elle participe à l'import nucléaire du complexe de préintégration. Vpr induit aussi un arrêt du cycle cellulaire en G2 ainsi que l'apoptose. Elle peut également transactiver le promoteur viral et certains gènes cellulaires.

B- Cycle de réplication virale

1. Attachement du virion

Le virion va adhérer à la cellule cible grâce à des protéines cellulaires enchassées dans sa membrane au moment du précédent bourgeonnement. Ces liaisons peuvent être non spécifiques, comme une interaction avec les protéoglycanes à héparane sulfate chargées négativement à la surface des cellules (Saphire et al., 2001) ou peuvent être plus spécifiques comme l'interaction avec l'intégrine α4β7 (Arthos et al., 2008). Elles peuvent également reconnaitre la molécule DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000). La liaison de ces molécules à la surface cellulaire va permettre un rapprochement des protéines d'enveloppe du virion avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4.

2. Entrée virale

La première étape de l'entrée est la liaison de la sous-unité gp120 de la protéine virale Env au récepteur cellulaire CD4 (Figure 4). Cette liaison entraine un changement de conformation de Env permettant sa liaison au corécepteur CCR5 ou CXCR4. La liaison du corécepteur à Env conduit à un nouveau changement de conformation qui induit l'exposition du peptide de fusion de la gp41. Ce peptide s'insère alors dans la membrane cellulaire et initie une fusion des deux membranes. Ceci créé un pore de fusion et permet la libération de la capside virale dans le cytoplasme (Klasse, 2012 ; Wilen et al., 2012).

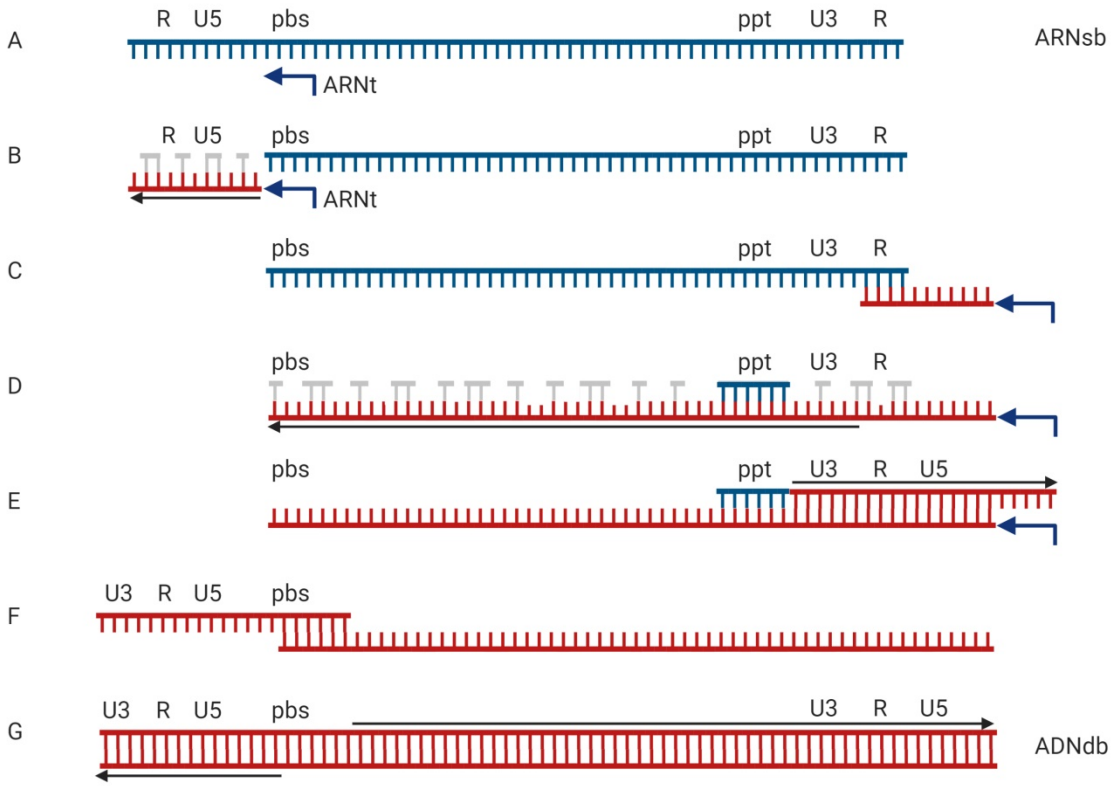


Figure 5 : Les différentes étapes de la transcription inverse du VIH-1.

Un ARNt s'apparie à la région PBS située dans le LTR en 5' (A), puis la transcriptase inverse synthétise l'ADN négatif et dégrade la matrice ARN (B). L'ADN synthétisé est transféré sur la séquence R en 3' (C) et poursuit la synthèse de l'ADN négatif et la dégradation de l'ARN (D). La séquence ppt résistante à la dégradation par la RNase H sert d'amorce pour la synthèse de l'ADN positif (E). Un deuxième transfert de brin à lieu (F) permettant la synthèse totale des brins positif et négatif (G) (schéma réalisé sur BioRender.com).

3. Transcription inverse

Durant son étape cytoplasmique, l'ARN génomique viral est rétrotranscrit en ADN double brin et acheminé aux pores nucléaires. La transcription inverse est effectuée par la transcriptase inverse présente dans le virion et est probablement déclenchée par l'exposition du complexe viral à des dNTPs présents dans le cytoplasme. La transcriptase inverse du VIH-1 a deux activités enzymatiques, une activité d'ADN polymérase ARN dépendante, permettant la synthèse de nouveaux brins d'ADN et une activité de ribonucléase (RNaseH) permettant la dégradation de l'ARN génomique et de l'amorce ARNt.

L'ARNg de polarité positive sert de matrice et un $ARNt^{Lys3}$, incorporé lors du précédent bourgeonnement, sert d'amorce. L'ARNt se fixe sur la séquence PBS (pour *Primer Binding Site*) présente en 5' et permet de rétrotranscrire la partie 5' de l'ARNg (séquence R et U5) (Hu and Hughes, 2012b). En même temps, la RNaseH dégrade l'ARN matrice (Figure 5). Ce petit brin d'ADN est alors transféré sur la séquence R situé en 3' du génome permettant la synthèse complète du brin d'ADN négatif et la dégradation de l'ARN matrice (Basu et al., 2008). La séquence PPT (pour *PolyPurine Tract*) proche d'U3 est résistante à la RNaseH et sert d'amorce pour la synthèse du brin positif. Ceci va conduire à la synthèse des régions U3, R et U5 dans la région 3' du génome. Ce brin est ensuite transféré en 5' et permet la synthèse complète du brin positif de l'ADN viral. Le PPT en 3' est nécessaire à la transcription inverse. En revanche, le cPPT ne l'est pas mais augmente fortement la capacité du virus à compléter la synthèse de l'ADNc (Charneau et al., 1992).

Pendant la transcription inverse, la transcriptase inverse change souvent de brin matrice, entrainant des recombinaisons entre les deux brins d'ARN et des formes recombinantes si les deux brins d'ARN ne sont pas identiques. Ces sauts intramoléculaires entre les deux brins conduisent aussi à des délétions, des insertions et des duplications (Hu and Hughes, 2012c).

4. Décapsidation

La capside renferme le génome viral (2 molécules d'ARN simple brin) et quelques protéines virales (capside, nucléocapside, transcriptase inverse, intégrase et Vpr). Le rôle de la capside dans la transcription inverse ainsi que le lieu (cytoplasme, enveloppe nucléaire, noyau) et le moment de la décapsidation, très tôt après la fusion virale ou très tard, juste avant l'intégration nucléaire, restent sujets à débat (Campbell and Hope, 2015).

Certaines études ont montré qu'il n'y avait pas de protéines de capside associées au complexe de transcription inverse et suggèrent donc que la décapsidation a lieu très tôt après la fusion virale et est complète (Panté and Kann, 2002 ; Yang et al., 2012). D'autres études suggèrent qu'une certaine quantité de protéines de capside se désassemblent dans le cytoplasme pendant l'acheminement au noyau mais qu'une majorité d'entre elles restent associées au complexe de transcription inverse (Hulme et al., 2011; Xu et al., 2013). D'autres articles ont mis en évidence que la capside virale reste intacte jusqu'à son arrivée aux pores nucléaires et que la décapsidation avait lieu au moment de l'import nucléaire (Lahaye et al., 2013 ; Fernandez et al., 2019 ; Francis et al., 2020). Récemment, il a été montré que la protéine TRN-1 (Transportine-1) serait nécessaire à la décapsidation. TRN-1 se lierait à la protéine de capside au niveau des pores nucléaires, entrainant un profond changement conformationnel de la capside et permettant la libération du génome viral (Fernandez et al., 2019). Après la décapsidation, TRN-1 permettrait le transport de CA dans le noyau. Il a aussi été montré que des multimères de capside restaient associés à l'ADN rétrotranscrit et seraient aussi importés dans le noyau (Blanco-Rodriguez et al., 2020). Ces complexes s'accumuleraient en particulier dans des sous domaines du noyau (Nuclear speckles) qui contiennent des régions génomiques dans

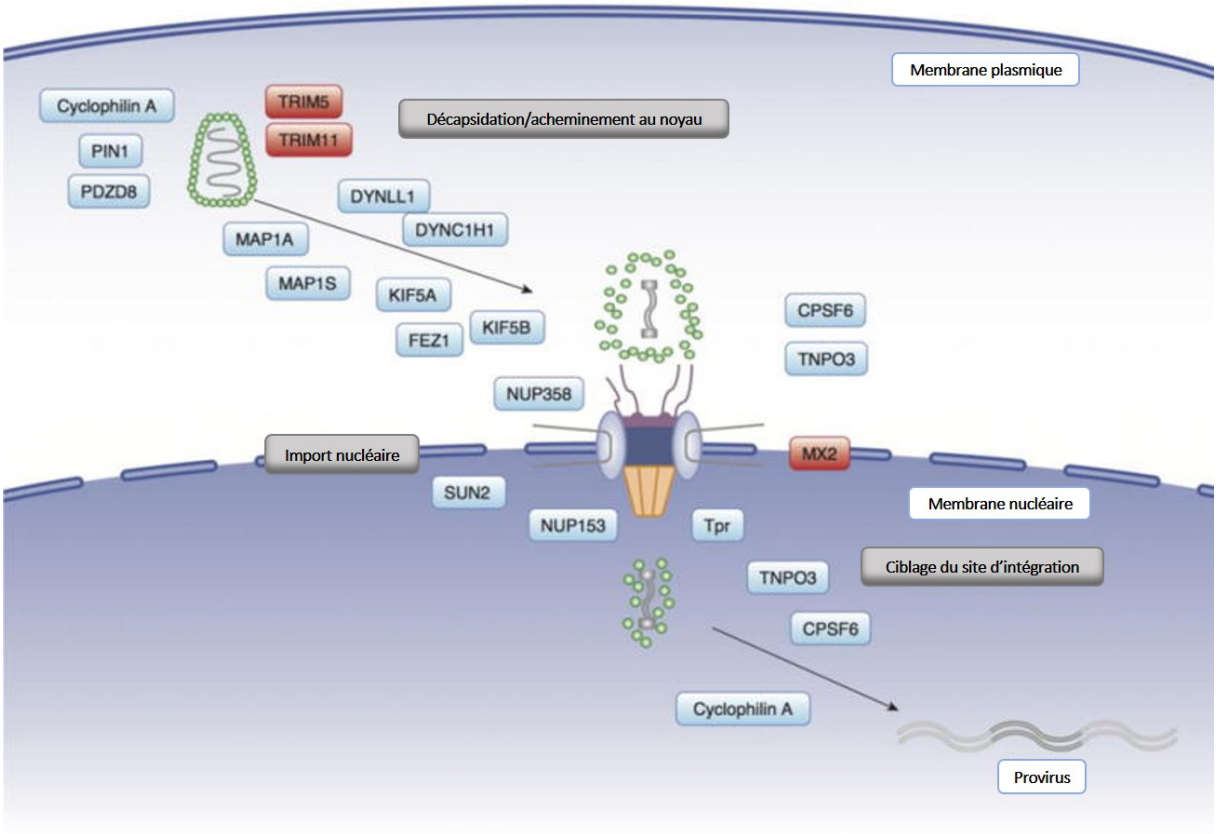


Figure 6 : Facteurs interagissant avec la capside virale pendant les phases précoces d'une infection VIH-1.

Après la fusion, la capside virale est acheminée à la membrane nucléaire puis le complexe de préintégration sera importé dans le noyau. Pendant ce transport et après l'import nucléaire, les effecteurs viraux intéragissent avec de nombreux facteurs cellulaires (Yamashita and Engelman, 2017).

lesquels l'ADN viral s'intègre préférentiellement (Francis et al., 2020). Cependant, des études très récentes ont montré que des capsides intactes pouvaient être retrouvées dans le noyau (Burdick et al., 2020) et que la transcription inverse s'y acheverait (Dharan et al., 2020). La décapsidation aurait ainsi lieu dans le noyau juste avant l'intégration (Burdick et al., 2020). De manière intéressante, cette équipe a également observé que la décapsidation de virus portant des mutations (N74D/A77V) dans leur capside, les rendant incapables de se lier au facteur CPSF6, se faisait au niveau de l'enveloppe nucléaire (Burdick et al., 2020). L'ensemble de ces études suggèrent que la décapsidation et l'import nucléaire sont peut-être des étapes du cycle dépendantes à la fois du type cellulaire mais également de la souche virale étudiée.

5. Import nucléaire

Une fois l'ARN rétrotranscrit en ADNv, celui-ci reste associé à plusieurs protéines virales et cellulaires qui forment le complexe de préintégration compétent pour l'import nucléaire. Contrairement à la plupart des rétrovirus qui entrent dans le noyau de la cellule cible au cours d'un cycle de division, l'import nucléaire du génome du VIH-1 est un phénomène actif qui passe par les complexes de pores nucléaires et permet l'infection des cellules qui ne sont pas en division (Weinberg et al., 1991 ; Lewis et al., 1992). Les complexes de pores nucléaires (NPC) sont de larges structures multi-protéiques qui traversent la membrane nucléaire et sont responsables des échanges passifs et actifs entre le noyau et le cytoplasme. L'import nucléaire est une étape du cycle viral très étudiée et encore controversée. Au cours de cette étape, le PIC va interagir avec de nombreux facteurs cellulaires.

Certaines nucléoporines (NUP), une famille de protéines qui composent les NPC, comme NUP153, NUP358 sont impliquées dans l'import nucléaire du VIH-1 (Bhargava et al., 2018). NUP358 est située à la surface cytoplasmique des NPC. Cette protéine peut se lier à la protéine de capside (Schaller et al., 2011). Sa déplétion inhibe l'infection virale à une étape post-transcriptionelle. NUP153 a aussi été montré comme nécessaire pour l'entrée nucléaire du PIC (Di Nunzio et al., 2013). NUP153 se lie également directement à la protéine de capside dans le PIC (Matreyek et al., 2013).

Le rôle de deux autres protéines cellulaires ne faisant pas partie des NPC a été démontré dans l'import nucléaire, TNPO3 et CPSF6 (Price et al., 2012). TNPO3, qui est une importine-β-like karyopherin, a été montrée comme interagissant avec la protéine de capside et l'intégrase (Zhou et al., 2011 ; Valle-Casuso et al., 2012 ; Larue et al., 2012). Quelques études suggèrent que TNPO3 favorise l'import nucléaire du PIC (Christ et al., 2008 ; Logue et al., 2011 ; De Iaco and Luban, 2011 ; Cribier et al., 2011). Sa déplétion réduit fortement le nombre de provirus intégrés. CPSF6 est un composant de la machinerie de clivage et polyadénylation des ARNm. Cette protéine contient un domaine de reconnaissance de l'ARN en N-terminal, un domaine riche en proline central et un domaine C-terminal riche en séquences repétées arginine/serine, arginine/glutamate et arginine/aspartate qui sont nécessaires pour sa localisation nucléaire. La déplétion de TNPO3 conduit à une localisation cytoplasmique de CPSF6 suggérant que son import nucléaire est médiée par TNPO3 (De Iaco et al., 2013). CPSF6 est capable de se lier à la protéine de capside dans le cytoplasme et la séquestration de CPSF6 dans le cytoplasme inhibe l'infection virale (Chin et al., 2015). De plus, la déplétion de CPSF6 conduit à une réduction de la localisation nucléaire de l'ADN viral ainsi qu'une réduction de l'intégration (Chin et al., 2015). Il a été suggéré que CPSF6 faciliterait l'entrée nucléaire en permettant la liaison de la capside à TNPO3 (Yamashita and Engelman, 2017).

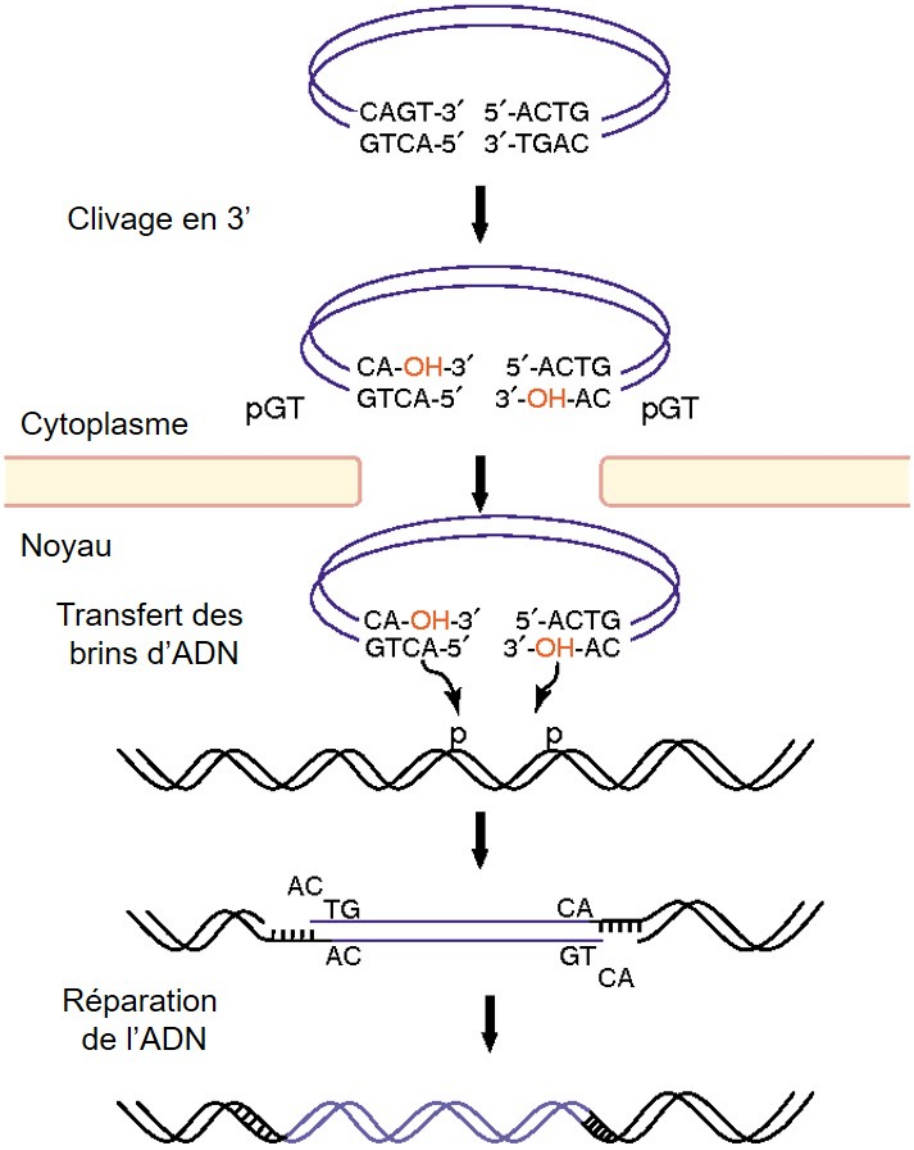


Figure 7 : Les différentes étapes de l’étape d’intégration du VIH-1.

Deux nucléotides sont éliminés à chaque extrémité 3’ de l’ADNv formant des extrémités CA sortantes Ces extrémités sortantes attaquent une paire de liaison phosphodiester sur des brins opposés de l’ADN cellulaire et se lient de façon covalence à l’ADN cellulaire. Les jonctions entre les brins viraux et cellulaires sont réparées par des enzymes cellulaires (Van Maele et al., 2006).

6. Intégration

Une fois dans le noyau, le génome viral, qui est maintenant sous forme d'ADN double brin, est intégré dans le génome de la cellule hôte par l'intégrase virale présente dans le complexe de préintégration. Celui-ci peut s'intégrer n'importe où dans le génome, mais les zones du génome denses en gènes et actives transcriptionnellement sont ciblées de façon préférentielle. Ce ciblage est guidé en partie par la capside et l'intégrase virales mais également par des facteurs cellulaires comme CPSF6 et LEDGF/p75 (Maertens et al., 2003 ; Ciuffi et al., 2005 ; Sowd et al., 2016). La déplétion de ces deux facteurs cellulaires conduit à une réduction significative de l'intégration et à une modification de la distribution des sites d'intégration. Il semblerait également que CypA affecte le site d'intégration dans la phase nucléaire (Schaller et al., 2011).

L'intégration est catalysée par un tétramère d'intégrase lié aux deux extrémités de l'ADN viral. La première étape de l'intégration est l'élimination de deux nucléotides à chaque extrémité 3' de l'ADNv conduisant la formation d'extrémités AC sortantes (Figure 7). Ces deux extrémités sortantes sont capables d'attaquer une paire de liaison phosphodiester sur des brins opposés de l'ADN cellulaire cible. L'activité de transfert de brin de l'intégrase permettra alors de relier les extrémités 3' de l'ADN de manière covalente à l'ADN cellulaire. Puis les enzymes cellulaires vont réparer les jonctions entre les brins viraux et cellulaires (Craigie and Bushman, 2012).
Cependant, une fois dans le noyau, tous les génomes ne vont pas s'intégrer dans le génome de l'hôte et peuvent se circulariser sous différentes formes. Cette circularisation peut être causée par un phénomène d'autointégration, l'extrémité 3' sortante de l'ADN va attaquer des sites dans le génome viral. Les cercles à 1 LTR sont formés exclusivement après recombinaison homologue des deux LTR. Les cercles à 2 LTR sont les produits d'événements de réparation non homologues par des enzymes cellulaires (Sloan and Wainberg, 2011). Il a également été montré que l'ADN peut rester sous forme linéaire non intégrée (Hamid et al., 2017).

7. Transcription et traduction virales

Une fois intégré dans le génome de la cellule hôte, le provirus pourra être transcrit. L'expression génique du VIH-1 est complexe et hautement régulée par les protéines Tat et Rev. La région LTR située en 5' du génome agit comme promoteur viral. Le LTR contient plusieurs éléments de régulation comme des sites de liaison SP1 et une boite TATA qui recrute des TATA-binding protein (TBP). Ces éléments vont permettre la fixation de TFIID et TAF, des facteurs d'initiation de la transcription cellulaire ainsi que l'ARN polymérase II. Le LTR contient également des domaines de liaison de NF-kB qui vont favoriser la transcription (Nilson and Price, 2011).
Le génome viral va initialement être transcrit à bas bruit par la machinerie de transcription cellulaire. Le VIH-1 utilise également la machinerie post-transcriptionnelle cellulaire pour maturer ses ARN. Comme les ARN cellulaires, les ARN viraux subissent plusieurs modifications (coiffe, polyadénylation, épissage) avant leur export du noyau. La plupart des souches VIH-1 contiennent 4 sites donneurs et 8 sites accepteurs d'épissage ce qui conduit à la production de plus de 40 ARNm viraux différents dans les cellules infectées (Karn and Stoltzfus, 2012a).

Trois classes d'ARNm viraux ont été identifiées :

- Les ARN multi-épissés de 1,7 à 2 kb qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef.
- Les ARN partiellement épissés d'environ 4,3 à 5,5 kb qui permettront la traduction des protéines Vif, Vpr, Vpu et Env.
- Les ARN non épissés qui donneront l'ARN génomique et les ARNm permettant la synthèse des protéines codées par *gag* et *pol*.

Dans un premier temps, les ARN viraux multi-épissés sont exportés dans le cytoplasme et donneront lieu à la traduction des protéines régulatrices Tat et Rev et de la protéine accessoire Nef. Tat est la protéine transactivatrice du virus. Une fois synthétisée, elle est importée dans le noyau et se fixe sur la région TAR. La région TAR (Transactivation-response element) est située juste en aval du site d'initiation de la transcription (entre les nucléotides +1 et +59) dans le LTR. La liaison de Tat à TAR va induire le recrutement de P-TEFb et d'autres facteurs d'élongation qui vont fortement augmenter la transcription virale (Karn and Stoltzfus, 2012a). Rev est une protéine navette. Une fois synthétisée, elle est importée dans le noyau où elle se multimérise et se fixe aux ARN non et mono-épissés grâce à une séquence RRE présente dans le gène *env* de ces deux classes d'ARN viraux. Elle permet leur export nucléaire *via* la voie CRM1 et prévient leur dégradation. Ces ARN non et mono-épissés permettent la synthèse du reste des protéines virales et constituent aussi l'ARN génomique qui sera encapsidé dans les futures particules virales. La traduction des protéines virales est exclusivement dépendante de la machinerie cellulaire *via* les ribosomes. Cependant, l'initiation de la traduction des protéines virales se fait par différents mécanismes, elle peut-être coiffe-dépendante comme la majorité des ARNm cellulaires ou peut se faire *via* un site interne d'entrée du ribosome (IRES) (Ohlmann et al., 2014).

8. Assemblage

L'assemblage du virion nécessite l'empaquetement de multiples composants viraux et cellulaires nécessaises pour que les virions soient infectieux. Ceux-ci comprennent deux copies d'ARNg viraux, des $ARNt^{Lys3}$ cellulaires, des protéines d'enveloppe Env, Vpr et des polyprotéines Gag et GagPol avec les trois enzymes virales : transcriptase inverse, intégrase et protéase. Vif et Nef peuvent également être retrouvées en petites quantités dans les virions. L'assemblage viral se fait à la membrane plasmique, dans des microdomaines spécialisés. La polyprotéine précurseur Gag joue un rôle central dans l'étape d'assemblage. En effet, sa seule expression est suffisante pour produire des pseudo-particules virales (Muriaux et al., 2001). La région N-terminale de Gag (MA) médie sa liaison à la face cytoplasmique de la membrane plasmique et recrute les protéines Env qui y ont été adressées après leur synthèse (Wyma et al., 2000). La partie centrale de Gag (CA) permet les intéractions protéine-protéine nécessaires pour créer des particules sphériques immatures. La partie NC de Gag est la région qui se lie à l'ARNg *via* la séquence ψ et permet l'encapsidation du génome dans la nouvelle particule virale (Corbin et al., 2008 ; Freed, 2015).

9. Bourgeonnement

Pour bourgeonner, le virus détourne le complexe protéique cellulaire ESCRT. La partie C-terminale de Gag (p6) contient un domaine PTAP permettant la fixation de TSG101, une sous-unité du complexe hétérotétramérique ESCRT-I. p6 contient aussi un domaine « YPXL » permettant la liaison du facteur ALIX. Ceci va permettre le recrutement des complexes ESCRT-II ou III qui participent au bourgeonnement et la protéine VPS4 qui médie la fission des membranes plasmique et virale (Sundquist and Kräusslich, 2012). Les virions néoformés acquièrent donc leur enveloppe lors du bourgeonnement à la membrane plasmique cellulaire.

10. Maturation

La maturation a lieu pendant ou après le bourgeonnement. La protéase virale incorporée dans les virions au sein du précurseur Gag-Pol est activée (par autoclivage) et clive les polyprotéines Gag et Gag-Pol à différents sites pour former des protéines matures (Hill et al., 2005). Cette protéolyse est nécessaire pour rendre les virions matures et infectieux. Le clivage de Gag entraine également de fortes modifications structurales qui donnent à la capside une forme conique.

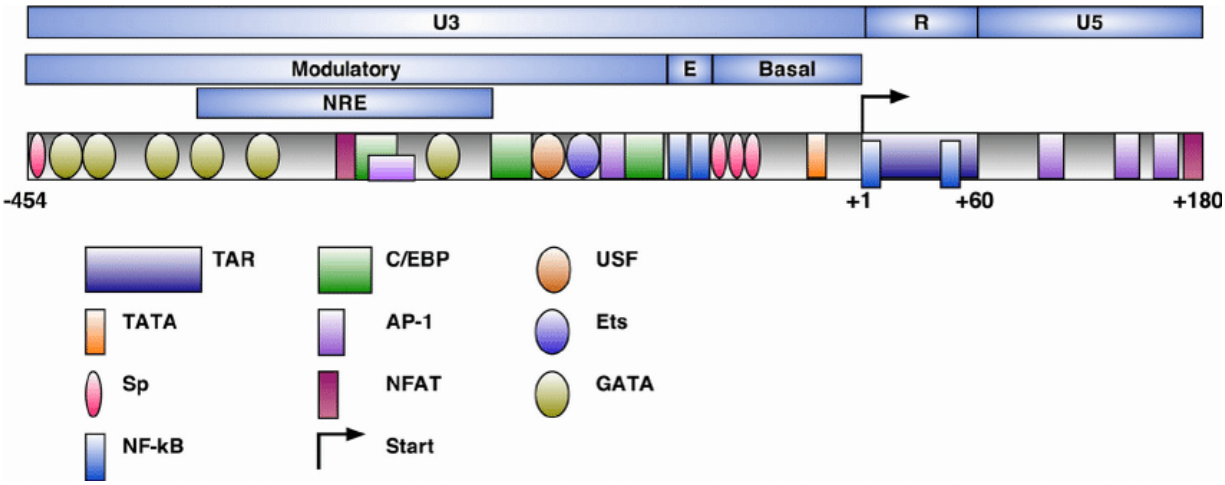


Figure 8 : Structure du promoteur LTR du VIH-1.

Le promoteur du VIH-1 est divisé en 3 régions, U3, R et U5. La région U3 contient une région modulatrice, une région enhancer et une région basale permettant l'activation et la régulation de la transcription. La région R contient la séquence TAR sur laquelle va se fixer la protéine transactivatrice Tat (Churchill et al., 2015).

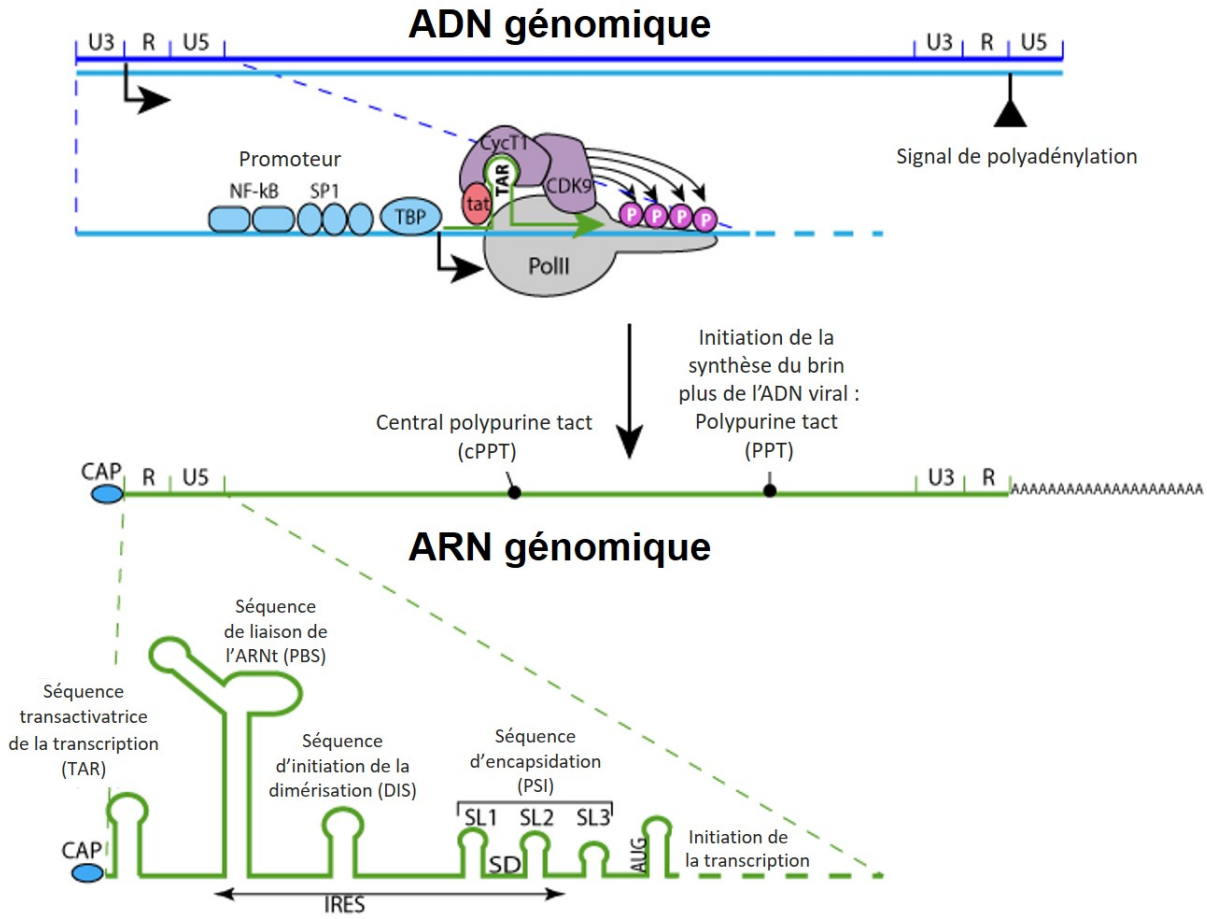


Figure 9 : Séquences régulatrices du VIH-1.

Le génome du VIH-1 possède plusieurs séquences régulatrices impliquées dans la régulation de la transcription inverse, l'import nucléaire, la transcription, la dimérisation et l'encapsidation au cours du cycle viral (Source : Viralzone).

C- Séquences régulatrices du VIH-1

On retrouve de nombreux éléments de régulations dans le génome du VIH-1 impliqués dans différentes étapes du cycle viral. Dans la région 5' du génome, on retrouve la région LTR qui constitue le promoteur du VIH-1. Sous forme d'ADN, on retrouve, de 5' à 3', les régions U3, R et U5. U3 contient une région modulatrice de la transcription, qui comprend des éléments de régulation négatifs et des sites de fixation à la fois pour des facteurs activateurs et répresseurs, une région Enhancer où l'on retrouve deux sites de liaison du facteur de transcription NF-kB et une région Basal/Core dans laquelle se trouve 3 sites de liaison du facteur Sp1 et une boite TATA très conservée (Figure 8). La transcription de l'ARN commence au premier nucléotide de la région R qui contient la séquence TAR (trans-acting responsive element) qui formera une structure ARN en boucle permettant la fixation de Tat (Churchill et al., 2015).
Durant l'assemblage des virions, des ARN de transfert sont incorporés dans la particule virale. Dans le génome viral, on retrouve la séquence PBS de 18 nucléotides (positions 183 à 201) (Figure 9) qui participe au placement et à la stabilisation de l'ARN de transfert RNA^{Lys3} et qui sert d'amorce à l'initiation de la transcription inverse (Kaushik and Pandey, 2002). On retrouve ensuite dans le génome viral la séquence d'initiation de la dimérisation (DIS) qui est une séquence palindrome très conservée en forme de tige boucle. Cette séquence permet la dimérisation de deux copies d'ARN génomiques de manière non covalente (Mundigala et al., 2014). L'encapsidation de l'ARN génomique est dépendante de la séquence Ψ présente dans les ARN non épissés. Elle est formée de 4 structures en forme tige boucle (SL1 à SL4) qui interagiront avec la protéine de nucléocapside au moment de l'assemblage (Figure 9) (Dietz et al., 2008). Au centre et en 3' du génome du VIH-1, on retrouve les séquences appelées cPPT et PPT, qui sont impliquées dans l'initiation de la synthèse du brin plus de l'ADN viral (Iglesias et al., 2011). La séquence RRE est un segment de 350 nucléotides couvrant la jonction entre la gp120 et la gp41 présente dans le gène *env.* Elle est présente dans certains ARNm viraux ainsi que l'ARN génomique et est nécessaire pour leur export du noyau. C'est une séquence ARN complexe très conservée contenant plusieurs structures en tige boucle (Fernandes et al., 2012).

III. Modulation de la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1

Lors de ma thèse, j'ai développé deux axes de recherches principaux. Dans les deux cas, je me suis intéressée à la réduction de la susceptibilité cellulaire à l'infection par le VIH-1, mais les causes de cette réduction sont de natures diverses. Cependant, comme discuté à la fin de mon manuscrit, des données récentes de la littérature suggèrent des liens entre ces phénomènes. D'une part, j'ai étudié l'effet des différents sous-types d'interférons-α sur la modulation de la susceptibilité des cellules. Les interférons sont produits par la cellule infectée elle-même (ou des cellules immunitaires sentinelles) en réponse à la détection du virus et vont alerter les cellules voisines. Ils permettent l'établissement d'un état antiviral dans les cellules infectées et les cellules avoisinantes qui les rendent moins permissives à l'infection pour permettre un contrôle de celle-ci. D'autre part, je me suis intéréssée à l'interférence virale intrinsèque, un phénomène par lequel une première infection par un virus réduit la susceptibilité de la cellule à une deuxième infection. Il est généralement admis que l'interférence permet de prolonger la durée de vie de la cellule infectée car une deuxième infection pourrait entrainer une trop forte toxicité et conduirait à la mort de la cellule par apoptose ou toxicité.

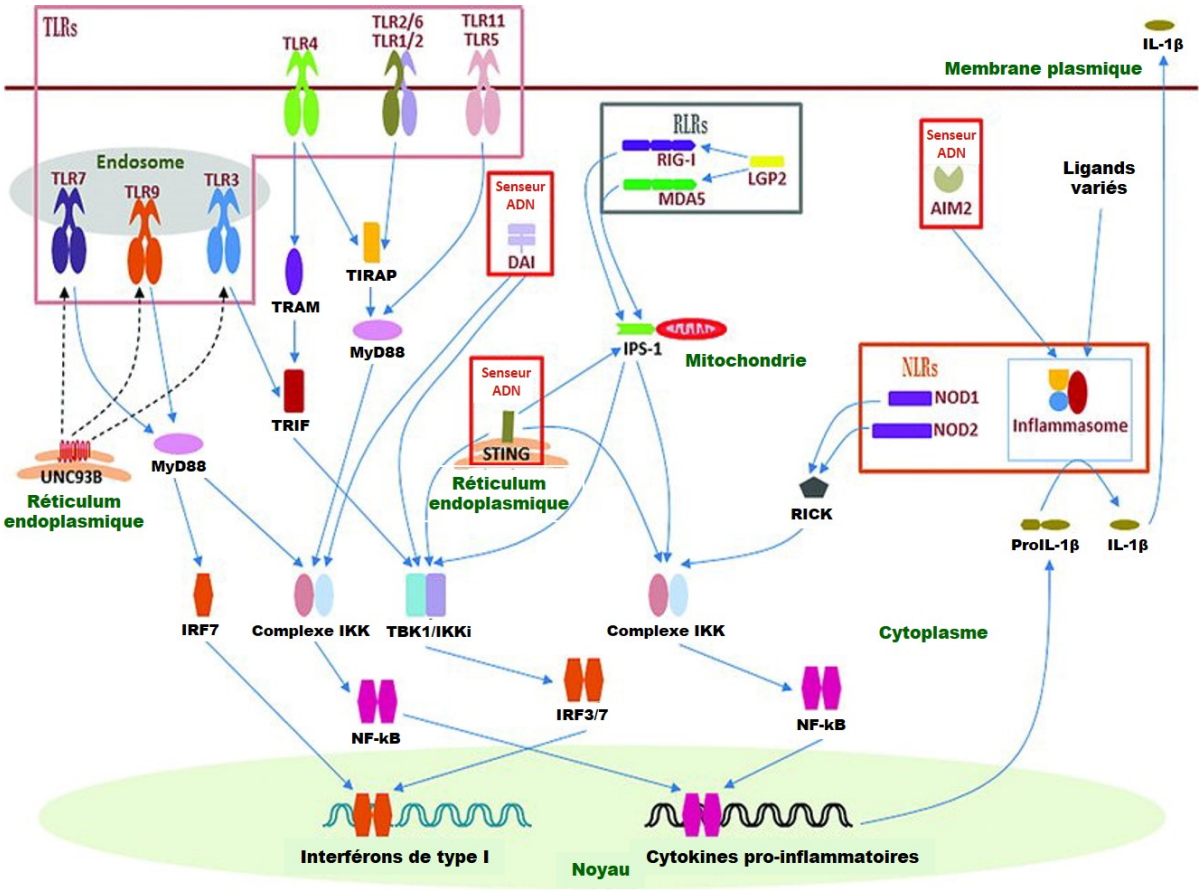


Figure 10 : Voies de signalisation médiées par les PRR.

Les PAMP peuvent être reconnus par différentes classes de PRR situés à la surface de la membrane plasmique, dans les endosomes ou dans le cytoplasme de la cellule. La détection des PAMP par les PRR conduit à l'activation de différentes voies de signalisation entrainant la production d'interféron de type I et/ou de cytokines pro-inflammatoires (Kumar et al., 2011).

Partie 1 : Modulation de la susceptibilité cellulaire par les Interférons alpha

Avant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique, la réponse immunitaire innée antivirale intracellulaire joue un rôle majeur. Elle constitue la première ligne de défense contre l'infection et module la réponse adaptative. Celle-ci agit directement au niveau cellulaire par des mécanismes très complexes et hautement régulés.

A- Les Pattern Recognition Receptors (PRR)

Les agents infectieux expriment plusieurs « signatures », les Pathogen-Assiociated Molecular Pattern (PAMP) qui sont des motifs conservés au sein des pathogènes. On retrouve par exemple les lipopolysaccharides exprimés par les bactéries à Gram-, l'acide lipotéichoïque exprimé par les bactéries à Gram+, les acides nucléiques particuliers non cellulaires tels que l'ADN simple brin ou l'ARN double brin associés aux virus etc… (Kumar et al., 2011).
Ces PAMP sont reconnus par des composants du système immunitaire, les Pattern Recognition Receptors (PRR). Chez l'Homme, toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment des PRR et ont donc la capacité de reconnaître une infection grâce à la détection des PAMP.
Plusieurs classes de PRR ont été décrites. Parmi elles, on retrouve les Toll-like receptors (TLRs), les RIG-I-like receptors (RLRs), les NOD-like receptors (NLR) ainsi que d'autres senseurs cytoplasmiques de l'ARN ou ADN (Figure 10).

Les TLR1, 2, 4, 5, et 6 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent les PAMP provenant des bactéries, champignons et protozoaires présents dans le milieu extracellulaire. Les TLR3, 7, 8 et 9 sont exprimés dans les compartiments endosomaux et reconnaissent principalement les acides nucléiques bactériens et viraux (Kawai and Akira, 2010). Les RLR sont des senseurs qui reconnaissent les formes d'ARN viral (ARN double brin, ARN triphosphorylés en 5') dans le cytoplasme des cellules infectées. On dénombre à ce jour 3 membres de cette famille, RIG-1 (pour *Retinoic acid-inducible gene I protein*), MDA5 (pour *Melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (pour *Laboratory of genetics and physiology 2*). Ces 3 senseurs sont tous exprimés de manière ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules (Loo and Gale, 2011).
Les NLR sont une grande famille de PRR qui reconnaissent un large éventail de ligands dans le cytoplasme des cellules infectées, comme des composants de la paroi des bactéries, des toxines, etc… (Kanneganti et al., 2007). En fonction de la nature du pathogène détecté, certains PRR seront engagés et activeront des voies de signalisation différentes.

La reconnaisance des PAMP par les TLR, conduit au recrutement de différents facteurs comme MyD88 (pour *Myeloid differentiation primary response protein 88*), TRIF (pour *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), TIRAP (pour *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein*) et TRAM (pour *Thyroid hormone receptor activator molecule*). Selon l'adaptateur engagé, deux voies de signalisation vont être activées. Tous les TLR engagent la voie MyD88 sauf le TLR3, reconnaissant des formes virales d'ARN double brin, qui utilise la voie de signalisation TRIF. TLR4 est capable de recruter à la fois MyD88 et TRIF (Bergantz et al., 2019).
La voie de signalisation *via* MyD88 conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF7 (pour *Interferon Regulatory transcription Factors 7*) et NF-κB impliqués dans la transcription des IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires respectivement. L'induction d'IFN de type I par MyD88 est dépendante de l'activation des facteurs IRF qui, en absence d'activation, sont séquestrés

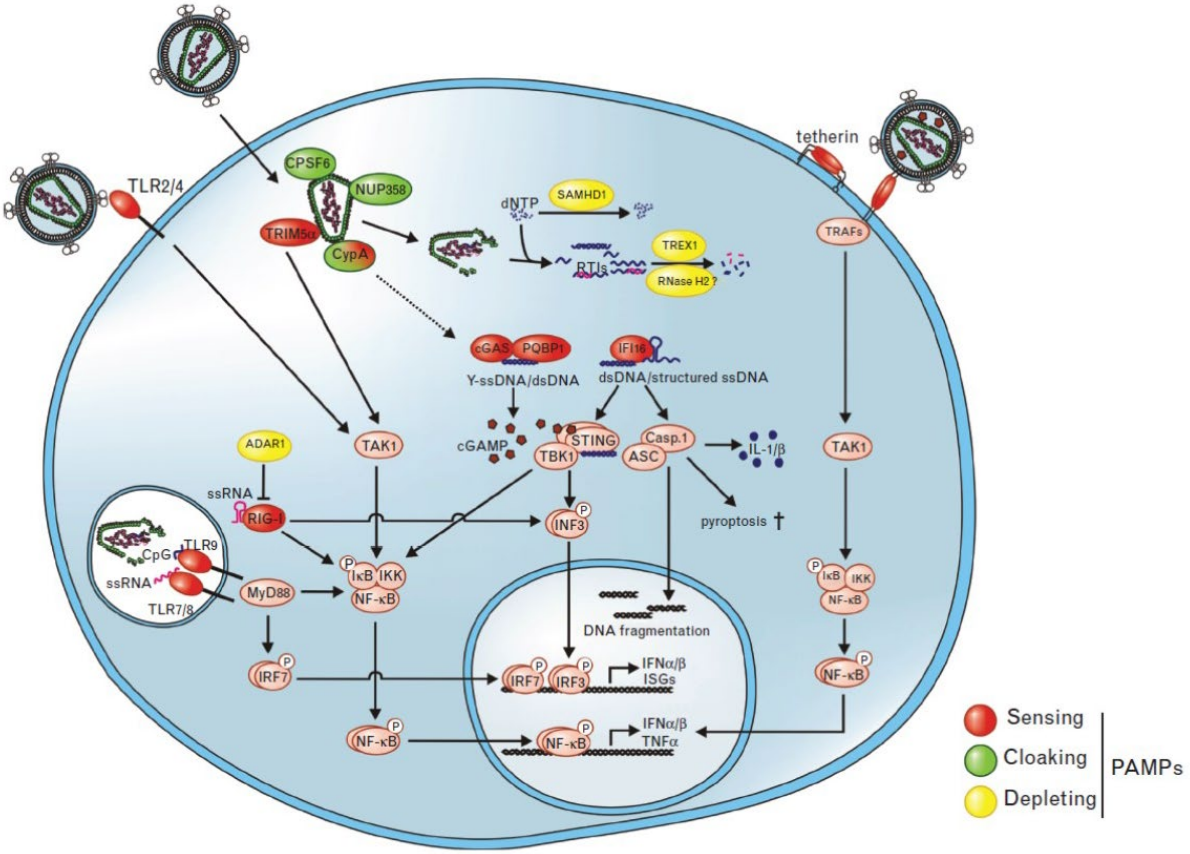


Figure 11 : PRR impliqués dans la reconnaissance du VIH-1.

Pendant le cycle viral, différents éléments viraux peuvent être détectés par les senseurs cellulaires. Cependant, de nombreuses protéines virales ont été mises en évidence comme pouvant empêcher la reconnaissance de l'infection (Sauter and Kirchhoff, 2016).

dans le cytoplasme sous forme inactive et ont besoin d'être phosphorylés pour être activés. IRF7 est le principal IRF impliqué dans la signalisation MyD88. MyD88 peut interagir directement avec lui et l'activer, ce qui conduit à sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription d'IFN-α et IFN-β (Thompson et al., 2011). Pour le TLR3, dont la signalisation est indépendante de MyD88, TRIF se lie et active les kinases IKKε (pour *I-kappaB kinase epsilon*) et TBK1 (pour *TANK Binding Kinase 1*) qui phosphorylent IRF3 conduisant à la production d'IFN-β.

RIG-1 et MDA-5, après reconnaissance des PAMP, interagissent avec l'adaptateur MAVS (pour *Mitochondrial antiviral-signaling protein*) localisé à la surface de la membrane externe des mitochondries. MAVS va alors activer des kinases, TBK1/IKKi, qui vont à leur tour activer IRF3/IRF7 conduisant à la production d'IFN-α et IFN-β. MAVS peut également activer le facteur NF-κB permettant la production de cytokines proinflammatoires.

B- PRR impliqués dans la reconnaissance du VIH-1

Au cours de l'infection VIH, plusieurs motifs sont susceptibles d'être reconnus par les PRR comme les protéines et le génome viral, qui passe par plusieurs phases (ARN simple brin, puis hybride ARN/ADN pour finir en ADN double brin). Ces composants devraient, en théorie, être détectés par les TLR et/ou les senseurs cytosoliques. Un grand nombre de PRR sont impliqués dans la reconnaissance du VIH (Figure 11).

1. Senseurs membranaires

Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les TLR7 et 9 reconnaissent l'ARN viral simple brin et l'ADN viral CpG respectivement. Il a été montré que quand cette reconnaissance se fait dans les endosomes précoces, ils engagent la voie de signalisation de IRF7 conduisant à la production d'IFN de type I. En revanche, si cette reconnaissance se fait dans les lysosomes, elle active préférentiellement la voie NF-κB conduisant à la production de cytokines inflammatoires. Dans les monocytes, macrophages et mDC, les TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN viral simple brin dans les endosomes et stimulent l'expression des IFN de type I ainsi que des cytokines inflammatoires *via* IRF7 et NF-κB (Heil et al., 2004 ; Guiducci et al., 2006 ; Simmons et al., 2013 ; Joshi et al., 2019). La protéine d'enveloppe gp120 est reconnue par les TLR2 et 4 présents à la surface cellulaire dans les cellules épithéliales génitales des femmes, ce qui conduit à la production de cytokines proinflammatoires *via* la voie NF-κB (Nazli et al., 2013). BST2, qui est une protéine transmembranaire empêchant le bourgeonnement des virions néoformés, est également capable d'activer NF-κB (Van Damme et al., 2008).

2. Senseurs cytoplasmiques

Le récepteur cytoplasmique GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS) reconnait l'ADN viral rétrotranscrit dans le cytoplasme des macrophages et des cellules dendritiques (Gao et al., 2013). La liaison de l'ADN viral à cGAS catalyse la synthèse d'un isomère cGAMP qui se lie et active une protéine du réticulum endoplasmique, STING (pour *Stimulator of interferon genes protein*). STING va alors activer les protéines kinases IKK et TBK1 qui activent les facteurs de transcription NF-κB et IRF3 et induisent l'expression des interférons de type I et de certaines cytokines. La protéine PQBP1 (pour *Polyglutamine-binding protein 1*) a aussi été montrée comme pouvant se lier directement à l'ADN rétrotranscrit et coopérer avec cGAS pour synthétiser cGAMP et activer STING (Yoh et al., 2015). IFI16 (pour *Interferon γ-inducible protein 16*) qui est aussi un senseur cytosolique, reconnait des structures en tiges-boucles présentes dans l'ADN simple brin dans le cytoplasme des macrophages. Cette reconnaissance induit également une réponse IFN de type I par la voie d'activation STING-TBK1-IRF3/7 (Jakobsen et al., 2013).

RIG-1 semble également capable de détecter l'ARN viral sous forme simple brin dans le cytoplasme, conduisant ainsi à l'activation de IRF3 et l'induction d'ISG (Solis et al., 2011). De plus, RIG-1 serait capable de reconnaitre les ARNm viraux synthétisés après intégration dans les macrophages conduisant à une forte expression d'ISG (Nasr et al., 2017).

C- Echappement du VIH-1 à la reconnaissance par les PRR

Cependant, bien qu'il ait été montré que le VIH-1 peut être reconnu par ces PRR, l'infection des lymphocytes T et des macrophages par le VIH-1 ne conduit pas à une forte induction d'IFN de type I. Le virus est capable d'échapper à la reconnaissance par les PRR.

Une des raisons de ce phénomène serait que la capside virale reste plutôt intacte pendant la transcription inverse. Celle-ci irait directement aux pores nucléaires et libèrerait l'ADN double brin à proximité du noyau, empêchant ainsi sa reconnaissance par les PRR (Arhel et al., 2007). De plus, l'interaction de la capside virale avec des facteurs cellulaires (CPSF6, Nup358 et CypA) favoriserait l'échappement du VIH-1 à la reconnaissance par les PRR. En effet, lorsque des mutations dans la capside l'empêchent d'interagir avec ces cofacteurs cellulaires, on observe une reconnaissance du virus et une production d'IFN de type I *via* NF-κB et IRF-3 dans les macrophages (Rasaiyaah et al., 2013). Une autre raison à cet échappement est que le génome viral est dégradé par des nucléases cellulaires comme l'exonucléase cytoplasmique TREX1. Dans des cellules TREX1-/-, l'ADN viral s'accumule dans le cytoplasme, ce qui conduit à une activation des IFN de type I *via* la voie STING-TBK1-IRF3 qui inhibe la réplication et la propagation virale (Yan et al., 2010). Une autre protéine cellulaire impliquée dans la faible reconnaissance du VIH serait SAMHD1, une enzyme qui dégrade le réservoir cellulaire de dNTP. Cette déplétion en nucléotides réduit l'éfficacité de la transcription inverse et une infection productive dans les macrophages et les lymphocytes T quiescents, qui présentent une faible concentration en nucléotides, mais également la détection de l'infection par les senseurs (Baldauf et al., 2012 ; St Gelais et al., 2012).

Comme d'autres virus, le VIH-1 utilise aussi certaines de ses protéines pour contrecarrer directement l'activation immunitaire. Par exemple, dans les étapes tardives du cycle viral, la protéine accessoire Vpu est synthétisée et induit une réduction du niveau d'expression de la protéine BST2, réduisant ainsi l'activation de la voie NF-κB (Gustin and Douglas, 2013). Vpu est également capable d'inhiber βTrCP qui dégrade IκB-α, un inhibiteur de l'activité de NF-κB. Ceci conduit à la diminution de la voie de signalisation canonique de NF-kb (Bour et al., 2001). Il a aussi été montré que Vpu était capable d'adresser le facteur de régulation IRF3 aux endolysosomes où il sera dégradé, empêchant ainsi la mise en place d'une réponse immune (Doehle et al., 2012). La protéase virale antagoniserait aussi la détection de l'ARN viral simple brin par RIG-1 (Solis et al., 2011). De même, il a été observé que la gp41 inhiberait le sensing de TLR2 (Reuven et al., 2014) et la gp120 celui de TLR9 (Martinelli et al., 2007).

L'ensemble de ces mécanismes conduit à une faible induction d'IFN de type I par les cellules infectées. Or, les IFN de type I vont induire l'expression de centaines d'Interferon Stimulated Genes (ISG) dont de nombreux facteurs antiviraux capables d'inhiber la réplication du virus *in vitro* et probablement *in vivo*.

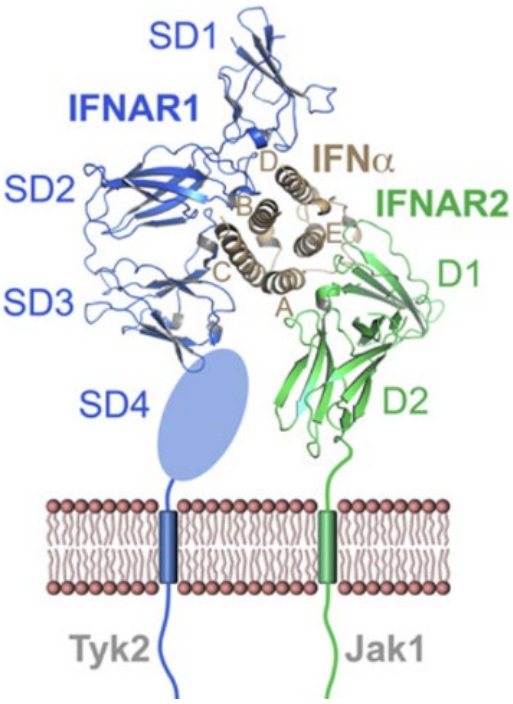


Figure 12 : Représentation du complexe IFNAR1, IFNAR2 et IFN-α.

(Thomas et al., 2011).

D- Les Interférons

1. Généralités sur les Interférons

Les IFN sont des glycoprotéines appartenant à la famille des cytokines, découvertes en 1957 (Isaacs and Lindenmann, 1957). Il existe chez l'homme 3 familles d'IFN qui agissent chacune *via* leur récepteur pour activer la voie de signalisation Jak/Stat.

Les interférons de type I sont représentés par les IFNα, IFNβ, IFNω, IFNε et IFNκ. L'expression des IFNα, IFNβ est quasiment ubiquitaire dans toutes les cellules de l'organisme alors que les trois autres sont limitées à certains tissus. Ils agissent *via* leur récepteur commun, le dimère IFNAR1/IFNAR2. Dans l'organisme, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont les principales productrices d'IFN de type I (Gilliet et al., 2008).
L'interféron de type II, représenté seulement par l'IFNγ, est produit principalement par les lymphocytes Natural Killer (NK) et les lymphocytes Natural Killer T (NKT) lors de la réponse innée et par les lymphocytes CD4 Th1 et lymphocytes CD8 cytotoxiques une fois que la réponse adaptive s'est mise en place. Il agit *via* son récepteur IFNGR. Il a été démontré comme ayant des propriétés immunorégulatrices, antivirales et anti-tumorales. Ses plus importants effets sont la promotion de l'activité des cellules NK, l'augmentation de la présentation d'antigènes et de l'activité lysosomale des macrophages, l'activation de l'oxide nitrique synthase inductible (iNOS), l'induction de la production d'IgG2a et IgG3 par les lymphocytes B plasmatiques activés et l'augmentation de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de type I et II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes ainsi que la promotion de l'adhésion et de la liaison nécessaire pour la migration des leucocytes et l'induction de facteurs de défense intrinsèques. (Kosmidis et al., 2018).
Les IFN de type III, constitués des IFNλ1 à 4, ont été découverts plus récemment et leurs rôles ne sont pas totalement élucidés. Ils agissent en se liant au récepteur IFNLR, exprimé principalement par les cellules épithéliales. Ils semblent cependant jouer un rôle dans les réponses antivirales comme les IFN de type I (Hemann et al., 2017).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux différents sous-types d'IFN-α qui jouent un rôle important dans la réponse antivirale en induisant l'expression d'effecteurs antiviraux à larges spectres capables de contrer de multiples virus.

2. Les Interférons α

Parmi les IFN de type I, on retrouve les IFN-α. Les IFN-α sont une famille multigénique composée de 13 gènes. Les IFN-α peuvent être produits par toutes les cellules de l'organisme. Certaines cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont capables de produire des quantités très importantes d'IFN en réponse à une infection (Gilliet et al., 2008). Une fois produits, les IFN-α sont sécrétés et peuvent diffuser dans le milieu extracellulaire. Ils agissent alors de manière paracrine et autocrine par stimulation de leur récepteur commun IFNAR.

a) Le récepteur IFNAR

Le récepteur IFNAR est un hétérodimère composé de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2 (Figure 12). Le récepteur IFNAR est unique parmi les récepteurs à cytokines par son nombre très important de ligands (16 IFN). IFNAR1 et IFNAR2 sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs de cytokines à structure hélicale de classe II (hCR). IFNAR1 possède 4 domaines extracellulaires (SD1 à SD4) et IFNAR2 2 domaines (D1-D2) chacun

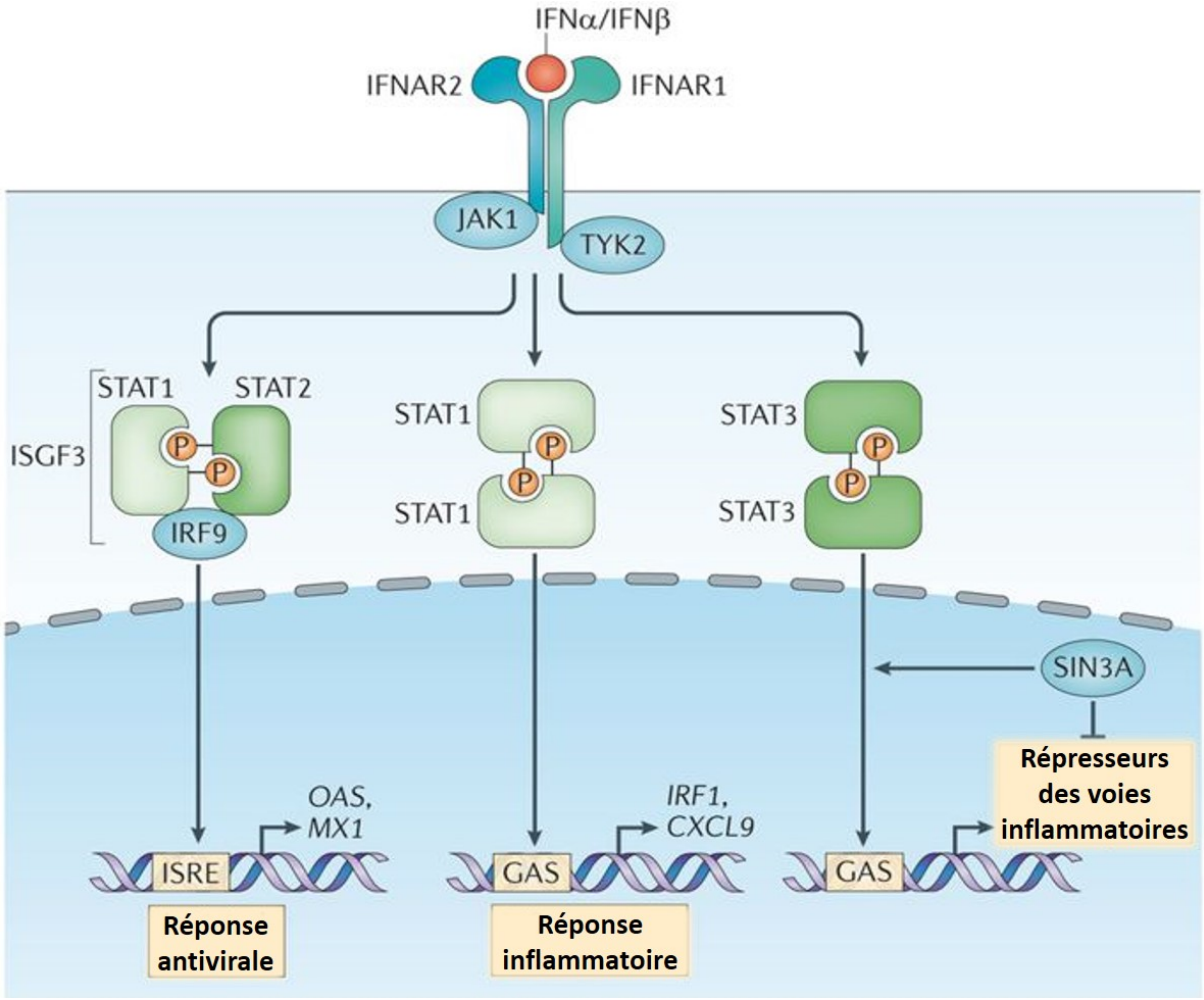


Figure 13 : Induction de l'expression des ISG par les Interférons de type I.

La liaison des IFN de type I à leur récepteur conduit à l'activation des protéines kinases JAK1 et TYK2. Ces kinases vont phosphoryler des membres de la familles STAT, permettant leurs dimérisation et translocation dans le noyau de la cellule. Le dimère pourra alors soit activer les ISG en se fixant aux séquences GAS, soit recruter IRF9 pour former le complexe ISGF3 qui activera la transcription des ISG en se fixant sur les séquences ISRE (Ivashkiv and Donlin, 2014).

contenant un sous-domaine fibronectine III-like. Le domaine intracellulaire d'IFNAR1 est associé à la Tyrosine Kinase 2 (TYK2) et celui d'IFNAR2 à la Janus kinase 1 (JAK1), deux kinases Janus (Thomas et al., 2011). Les IFN de type I ont une plus grande affinité pour IFNAR2 que pour IFNAR1 conduisant d'abord à la formation d'un dimère IFN/IFNAR2 qui recrutera ensuite IFNAR1 pour former un complexe ternaire (Sutter et al., 2018).

a) Activation de la voie Jak/Stat

La liaison de l'IFN au récepteur conduit à l'activation des protéines kinases cellulaires associées au récepteur : TYK2 et JAK1 (Figure 13). Ces kinases phosphorylent alors les protéines de la famille des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT1, 2, 3, 4, 5, 6 selon le type cellulaire). Ceci permet l'homodimérisation de STAT1 (STAT1-STAT1) ou l'hétérodimérisation de STAT1 et STAT2 (STAT1-STAT2) qui seront ensuite transloqués dans le noyau. Le dimère STAT1-STAT2 peut alors se fixer à la protéine IFN Regulatory factor 9 (IRF9) pour former le complexe ISG factor 3 (ISGF3). Ce complexe peut se lier aux IFN-stimulated response elements (ISRE) qui sont des séquences présentes dans les promoteurs des gènes stimulés par les IFN (ISG). D'autres complexes de STAT qui ne recrutent pas IRF9 peuvent se lier à d'autres séquences (IFNγ-activated site (GAS)) présentes dans les promoteurs d'autres gènes, en particulier des cytokines pro-inflammatoires ou des facteurs répresseurs de l'inflammation. La liaison des dimères STAT à ces séquences entraine la transcription de centaines d'ISG (Ivashkiv and Donlin, 2014).

b) Les Interferon Stimulated Genes (ISG)

Les ISG représentent une multiplicité de gènes impliqués dans de nombreuses et diverses fonctions cellulaires comme l'immunité et la défense contre les pathogènes, la prolifération, la transcription, la traduction, l'organisation du cytosquelette, la réparation de l'ADN endommagé, l'apoptose et le métabolisme lipidique (Schneider et al., 2014 ; Schoggins, 2019). Il a aussi été montré que les IFN de type I ont un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD4 et T CD8 et sont donc importants pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (González-Navajas et al., 2012). Ils sembleraient aussi avoir un rôle important dans l'activation de l'inflammasome (Kopitar-Jerala, 2017). Cependant, une grande majorité des ISG ont des fonctions encore inconnues. Les ISG jouent un rôle important dans l'inhibition de nombreuses familles virales. Certains ISG sont des facteurs de restriction des virus. D'autres ISG sont des facteurs de transcription qui activent ou inhibent d'autres gènes ce qui entraine une amplification de la réponse IFN.

c) Facteurs de restriction et facteurs inhibiteurs du VIH

Dans le cadre d'une infection, de nombreux facteurs induits par les IFN de type I sont capables d'inhiber la réplication virale, ce sont les facteurs de restriction. D'autres facteurs sont capables d'inhiber la réplication du virus mais ne sont pas induits par les IFN de type I, ce sont les facteurs inhibiteurs. Selon certains auteurs, la définition de facteurs de restriction implique l'existence de protéines virales antagonistes. Ces facteurs de restriction et facteurs inhibiteurs sont des protéines cellulaires jouant un rôle dans la première ligne de défense contre les pathogènes. La plupart des cellules de l'organisme les expriment de manière constitutive et à bas bruit. Après infection, ils sont fortement exprimés et permettent un contrôle plus ou moins efficace de celle-ci au niveau cellulaire. Les facteurs ont des structures et des fonctions assez diverses. Ils agissent contre différents composants viraux et sont en général efficaces contre différentes familles de virus. Dans le cadre d'une infection VIH-1, une dizaine de facteurs inhibant la réplication virale et agissant à différentes étapes du cycle ont été décrits (Figure 14) :

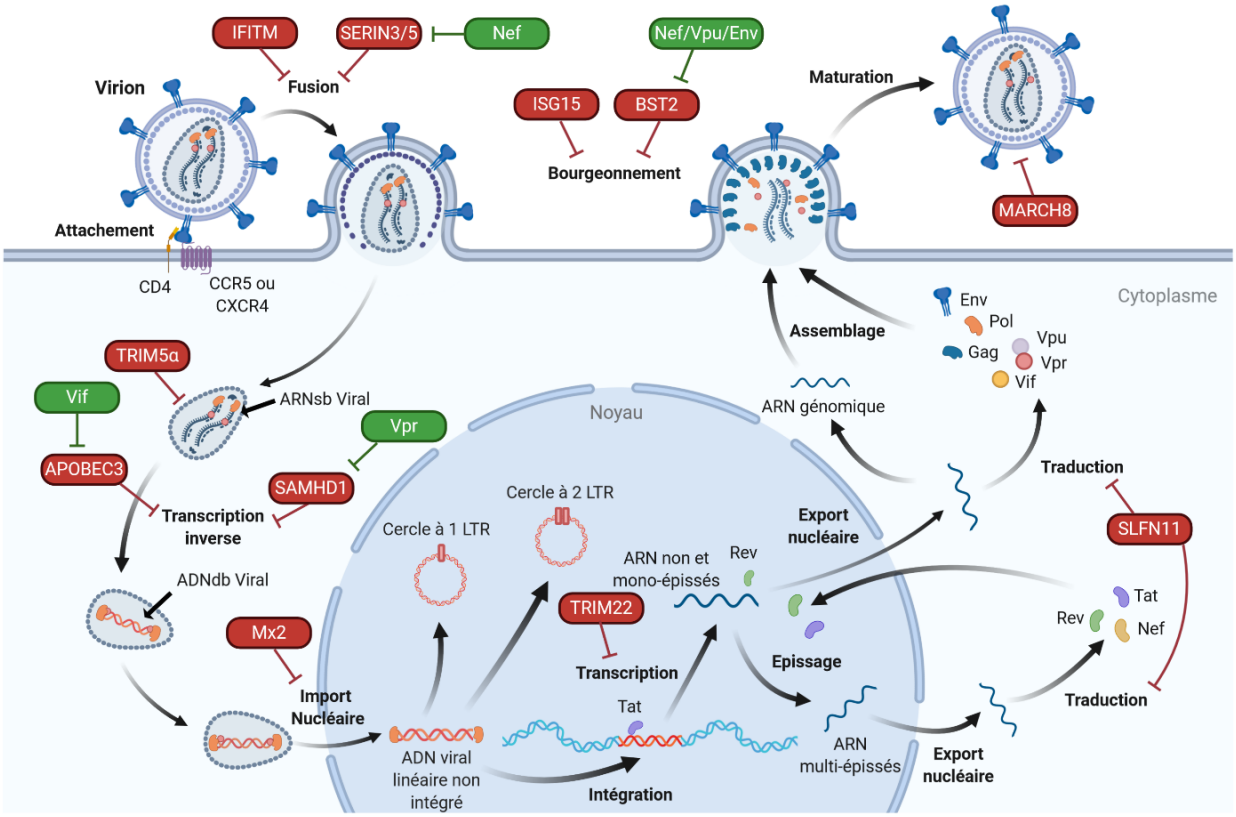


Figure 14 : Facteurs de restriction du VIH-1.

Presque toutes les étapes du cycle viral sont inhibées par des facteurs de restriction. Cependant, certaines protéines virales sont capables de contrecarrer ces facteurs de restriction permettant la réplication du virus (schéma réalisé sur BioRender.com, adapté de Seissler et al., 2017).

- **Entrée virale**

Les protéines IFITM (InterFeron-Induced TransMembrane) sont des protéines membranaires présentes à la fois à la membrane plasmique mais aussi à la membrane des endosomes et des lysosomes. Elles interfèrent avec la réplication virale au moment de l'entrée, probablement en modifiant la structure des membranes, ce qui empêche la fusion (Li et al., 2013).
Il a également été montré que les protéines IFITM et plus particulièrement IFITM2 et IFITM3 pouvaient être incorporées à la surface de virions néoformés, ce qui réduirait leur efficacité d'entrée lors du prochain cycle viral (Lu et al., 2011 ; Tartour et al., 2014 ; Compton et al., 2014). Il a été montré que les virus de tropisme X4 ou R5 avaient des sensibilités différentes aux IFITM (Tartour et al., 2017). Les virus X4 seraient plus sensibles aux IFITM2 et 3 qui sont localisées dans les endosomes alors que les virus R5 seraient sensibles aux IFITM1 situées à la membrane plasmique. De plus, il semblerait que les virus transmitted/founder (virus responsables de l'infection d'un nouvel individu) de tropisme R5 soient plus résistants à la restriction des IFITM que des virus X4 qui apparaissent dans un stade plus tardif de la maladie (Foster et al., 2016).

Les protéines SERINC3 (SERine INCorporator) et SERINC5 font parties d'une famille de protéines transmembranaires. Elles sont présentes de manière ubiquitaire à la surface cellulaire. Ce ne sont pas des facteurs inductibles par les IFN. Cependant, il a été montré que, bien que les IFN de type I n'induisent pas une augmentation du niveau d'expression des ARNm et des protéines SERINC5, ils induisent une augmentation de la quantité de protéines SERINC5 exprimée à la surface cellulaire, suggérant que la localisation cellulaire de SERINC5 est régulée par les IFN de type I (Passos et al., 2019). Au cours d'une infection VIH-1, les protéines SERINC3/5 seraient incorporées dans la membrane des virions au moment du bourgeonnement, ce qui empêcherait l'infection en inhibant la fusion entre les membranes virale et plasmique lors du cycle suivant (Rosa et al., 2015 ; Usami et al., 2015).

- **Transcription inverse**

TRIM5α (TRIpartite Motif-containing protein 5α), le premier facteur de restriction découvert pour le VIH-1, est une E3 Ubiquitin ligase qui va se lier aux mailles de la protéine de capside du virus dans le cytoplasme. La liaison de TRIM5α à la capside accélère la décapsidation. Ceci va gêner la synthèse de l'ADN viral, probablement en exposant l'ARN viral aux senseurs cytosoliques ou en déstabilisant le complexe de transcription inverse (Stremlau et al., 2004 ; Stremlau et al., 2006).

APOBEC3G (APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G) est une cytidine déaminase qui est encapsidée dans les virions néoformés grâce à sa capacité de liaison à la nucléocapside et aux acides nucléiques (Sheehy et al., 2003 ; Zennou et al., 2004). Dans les cellules nouvellement infectées, APOBEC3G reste associée au complexe de transcription inverse et interfère avec le processus de transcription inverse. De plus, elle créée de nombreuses hypermutations G vers A dans l'ADNv néosynthétisé, ce qui compromet fortement l'intégrité génétique du virion (Lecossier et al., 2003 ; Okada and Iwatani, 2016).

SAMHD1 (Sterile α Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1) est une 2'-désoxunucléoside 5'-triphosphate (dNTP) triphosphohydrolase. SAMHD1 déplète le niveau de dNTP présents dans le cytoplasme des cellules qui ne sont pas en division (macrophages, MDDC et cellules T mémoires). Ce manque de dNTP prive ainsi la transcriptase inverse du virus de substrats pour synthétiser l'ADNc (Laguette et al., 2011). SAMHD1 a également été décrit comme étant une nucléase pouvant dégrader l'ARN viral (Choi et al., 2015).

Daxx (pour *Death domain-associated protein 6*) est une protéine pouvant se lier à CypA par son domaine SIM (pour *SUMO-interacting motif*). Cette liaison conduit à la formation d'un complexe multiprotéique autour de la capside virale empêchant la décapsidation et inhibant ainsi la transcription inverse (Dutrieux et al., 2015 ; Maillet et al., 2020).

- **Import nucléaire**

La protéine Mx2 (pour *Myxovirus resistance protein 2*) est capable d'inhiber la réplication virale après l'étape de transcription inverse. Dans des cellules infectées où Mx2 est surexprimée, on observe une diminution du nombre de cercles à 2 LTR dans le noyau, qui est un marqueur de l'import nucléaire, suggérant que Mx2 inhibe cette étape (Goujon et al., 2013 ; Kane et al., 2013 ; Goujon, 2014). Il a également été montré que Mx2 pouvait interférer avec l'étape d'intégration (Goujon et al., 2013 ; Matreyek et al., 2014). De plus, il a été montré que Mx2 pouvait interagir avec la protéine de capside, ce qui déstabiliserait la décapsidation, soit directement soit de manière dépendante de CypA (Liu et al., 2013 ; Fricke et al., 2014).

- **Transcription et traduction**

Plusieurs études suggèrent que TRIM22 serait également un facteur de restriction du VIH-1. Il empêcherait la liaison du facteur Sp1 au promoteur LTR empêchant ainsi la transcription des gènes viraux (Kajaste-Rudnitski et al., 2011 ; Singh et al., 2011 ; Turrini et al., 2015).

La protéine Schlafen11 (SLFN11) agit également durant les étapes tardives du cycle en inhibant la synthèse des protéines virales. Cette protéine est capable de se lier aux ARNt de manière codon spécifique et de modifier le pool d'ARNt disponibles en présence du VIH (Li et al., 2012).

- **Bourgeonnement**

La protéine Tetherin ou BST2 (Bone marrow Stromal antigen 2) est une protéine transmembranaire. Elle empêche le relargage des virions bourgeonnant à la surface cellulaire par la formation de ponts protéiques entre les membranes cellulaire et virale (Neil et al., 2008).

L'ISG15 appartient à la famille des protéines Ubiquitin-like. L'ISG15 inhibe la réplication du VIH après une réaction d'ISGylation de Gag, qui inhibe son ubiquitinylation, empêchant l'interaction de Gag avec Tsg101 et le bourgeonnement viral (Pincetic et al., 2010).

March8 (Membrane-Associated RING-CH 8) est également une protéine membranaire qui induit une réduction du nombre de protéines d'enveloppe incorporées dans les virions conduisant à une diminution de l'infectivité de ceux-ci (Tada et al., 2015).

d) Evasion du virus aux facteurs de restriction

La primo-infection par le VIH-1 est caractérisée par une tempête cytokinique et un fort niveau d'IFN-α dans la circulation. Cette forte production d'IFN est associée à une augmentation du niveau d'expression des ISG et des facteurs de restriction. Cependant, elle ne permet pas de bloquer la propagation virale. Cela suggère donc que, malgré l'augmentation de l'expression des ISG, les virus ont été sélectionnés sur la base de leur capacité à contrecarrer les fonctions des IFN pour répliquer de manière efficace. Les mécanismes par lesquels l'évasion se fait sont nombreux et complexes. Ils impliquent un blocage de différentes voies de réponses à l'IFN, notamment dans la reconnaissance du virus, l'induction d'ISG et leur activité. Le VIH-1 a évolué de manière à échapper à ces facteurs de restriction de telle façon qu'ils sont incapables de contrôler la réplication virale dans les cellules de leur hôte.

Nef entraine une diminution des niveaux d'expression des protéines SERINC3/5 à la surface cellulaire en les adressant aux endosomes tardifs par interaction avec l'adaptateur de clathrine AP-2. Ceci empêche leur incorporation dans les virions néoformés et augmente ainsi leur infectivité (Rosa et al., 2015 ; Usami et al., 2015). La protéine virale Vif interagit avec les protéines APOBEC3 et induit le recrutement d'un complexe ubiquitine ligase E3 contenant le scaffold protein cullin 5 (CUL5) et le substrat adaptateur elongin B (ELOB) et ELOC qui conduisent à la polyubiquitylation des protéines APOBEC3 et leur dégradation par le protéasome

Subtype	R1[a] K_D (μM)	R2[a] k_a ($\times 10^6$ M^{-1} s^{-1})	R2[b] k_a ($\times 10^6$ M^{-1} s^{-1})	R2 k_d ($\times 10^{-3}$ s^{-1})	R2[a] K_D (nM)	R2[b] K_D (nM)
A2a	3.5	4.6		7.7	1.7	
A2b	3.8	5.5	11	7.3	1.3	0.66
A1	0.76				220.0	
A4	3	4.0		6.1	2.1	
A5	0.94	7.4	9	27.0	3.8	3.00
A6	0.83	10.7	50	6.2	0.6	0.12
A7	1.3	9.1	24	6.1	0.7	0.25
A8	0.53	6.4	10	9.9	1.6	0.59
A10	4.3	4.5	23	1.7	0.4	0.08
A14	0.68	3.2		2.3	0.7	
A16	1.1	4.6	11	5.1	1.1	0.46
A17	5.0	7.7	20	3.0	0.4	0.15
A21	1.25	5.4		27.0	5.0	

Figure 15 : Cinétiques et constantes d'affinité de chaque sous-type d'IFN-α pour les deux sous-unités du récepteur IFNAR.

Les constantes d'association (ka), les constantes de dissociation (kd) et les constantes d'affinité (KD) ont été mesurées par résonance plasmonique de surface avec IFNAR1-EC ou IFNAR2-EC immobilisés à la surface (a). Les constantes d'affinité de certains sous-types pour IFNAR2 ont également été mesurées par stopped-flow (b) (Lavoie et al., 2011).

(Sheehy et al., 2003). Vpu quant à elle, interagit avec BST2, ce qui conduit à son ubiquitinylation et sa dégradation dans les endolysosomes. Elle ne sera alors plus exprimée à la surface cellulaire et ne pourra plus empêcher le relargage des virions (Neil et al., 2008 ; Van Damme et al., 2008).

E- Les 12 sous-types d'IFN-α

À la suite d'une infection, les IFN-α sont produits en grandes quantités. Les IFN-α sont une famille multigénique composée de 13 gènes, tous localisés sur le chromosome 9 chez l'Homme et dérivant d'un gène ancestral, IFNA-like, par conversion et duplication génique, qui conduisent à l'expression de 12 protéines différentes : les IFN-α 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21 (les protéines IFN-α1 et 13 étant identiques) (Woelk et al., 2007). Les IFN-α présentent de fortes similitudes de structure : ils n'ont pas d'introns, ils ont des tailles très proches (entre 161 et 167 acides aminés) et des séquences très conservées (75 à 99% d'identité de séquences en acides aminés) (Gibbert et al., 2013). Bien qu'il existe 12 sous-types d'IFN-α, seul le sous-type IFN-α2 est actuellement utilisé en clinique et dans la plupart des études réalisées sur les IFN-α.

Depuis quelques années, plusieurs équipes s'intéressent aux effets des différents sous-types d'IFN-α afin de décrypter précisément le rôle de chacun. Ces études suggèrent de plus en plus qu'ils n'ont pas le même rôle et n'induisent pas les mêmes effets. Un des aspects intéressants des IFN de type I est qu'ils se lient tous au même récepteur, le dimère IFNAR1 et IFNAR2.

1. Affinité des IFN-α pour leur récepteur

Tous les IFN-α se lient au même site sur le récepteur, conduisant à la formation de complexes ternaires (IFNAR1-IFNAR2-IFN) très similaires structurellement (Li et al., 2008). La liaison de l'IFN au récepteur conduit à l'activation des tyrosines kinases associées au récepteur dans leur partie cytoplasmique. Ces kinases vont à leur tour activer une cascade de signalisation, principalement *via* les protéines STAT, conduisant à l'activation de centaines d'ISG. Comment en se liant au même récepteur, les différents sous-types sont capables d'induire des réponses différentes ?

Plusieurs études se sont intéressées à l'affinité des différents sous-types d'IFN-α pour leur récepteur IFNAR. Dans une première étude, les auteurs ont mesuré les constantes d'affinité de quelques sous-types (1, 2, 8 et 21) pour le récepteur (Jaks et al., 2007). Ils ont observé de grandes différences de valeur pour les cinétiques de dissociation entre les différents sous-types, notamment pour l'IFN-α1 qui présente une très forte constante de dissociation (Kd) pour IFNAR2. La constante de dissociation de l'IFN-α21 est également élevée. En revanche, les IFN-α2 et 8 présentent des constantes de dissociation plus faibles. Lorsqu'ils regardent les valeurs des constantes d'affinité (K_D) pour les deux sous-unités du récepteur, ils ont observé que les valeurs de K_D pour le récepteur IFNAR1 sont beaucoup plus élevées que pour IFNAR2, indiquant une moins forte affinité pour cette sous-unité du récepteur. Dans leur étude, les auteurs suggèrent également qu'il existerait une corrélation entre l'affinité des différents sous-types pour la sous-unité IFNAR2 et l'induction d'un ISG, le facteur ISGF3. De même, ils suggèrent aussi qu'il existerait une corrélation entre l'affinité des IFN-α pour la sous-unité IFNAR1 et leur activité antiprolifératives.

Dans une autre étude (Lavoie et al., 2011), les auteurs ont mesuré l'affinité de tous les sous-types pour IFNAR1 et IFNAR2, par résonance plasmonique de surface (Figure 15). Comme l'étude précédente, ils ont mesuré que l'IFN-α1 avait la moins forte affinité pour IFNAR2. Ils ont observé que les constantes d'affinités d'IFNAR1 et IFNAR2 étaient assez similaires avec des différences

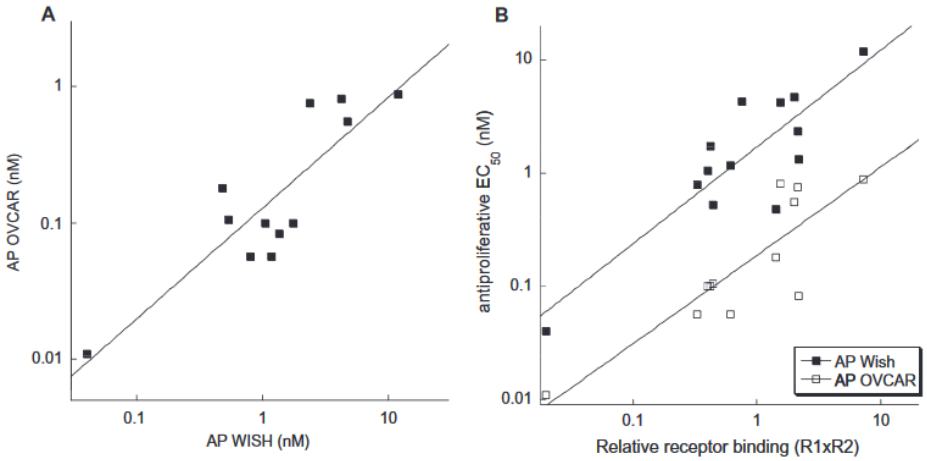


Figure 16 : Mesure de l'activité anti-prolifération (par rapport à l'IFN-α2) dans 2 lignées cellulaires (A).

Corrélation entre l'activité anti-prolifération et l'affinité de liaison de chaque sous-type d'IFN-α au récepteur hétérodimérique IFNAR (B) (Lavoie et al., 2011).

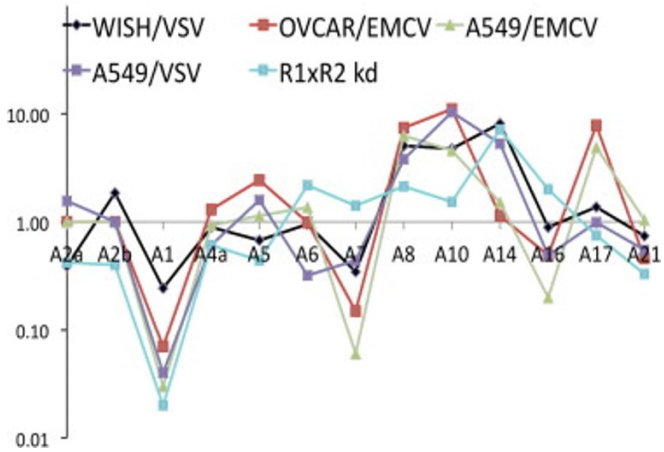


Figure 17 : Mesure de l'activité antivirale de chaque sous-type d'IFN-α face à deux virus différents en fonction de la lignée cellulaire.

L'activité antivirale contre es virus VSV et ECMV a été mesurée dans différentes lignées cellulaires (WISH, A549 et OVCAR (Lavoie et al., 2011).

d'un facteur 10 maximum (sauf pour l'IFN-α1) contrairement à ce qui avait été observé dans l'autre étude (Jaks et al., 2007) où ils trouvaient des valeurs de K_D beaucoup plus élevées pour IFNAR1 que pour IFNAR2. En revanche, les hiérarchies des valeurs de K_D des différents sous-types pour IFNAR1 et IFNAR2 sont conservées dans les deux études. Ainsi, ces deux études suggèrent que l'affinité des différents sous-types pour les deux sous-unités du récepteur IFNAR pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des ISG.

2. Réponses antivirales et antiprolifératives aux IFN-α

L'activation de la voie Jak/STAT par les différents sous-types d'IFN-α conduit à des activités antiproliférative et antivirale différentes sur des lignées cellulaires (Lavoie et al., 2011). Pour étudier les effets antiprolifératifs, les auteurs ont traité deux lignées cellulaires, des cellules WISH (dérivées de cellules HeLa) et des cellules OVCAR-3 (dérivées de carcinome ovarien) avec les différents sous-types d'IFN-α. Ils ont observé que les résultats étaient assez similaires entre les 2 lignées (Figure 16**A**) et que l'IFN-α1 avait l'activité antiproliférative la plus faible et l'IFN-α14, l'activité la plus forte. Ils ont également observé qu'il existait une corrélation entre l'activité antiproliférative et l'affinité des IFN aux deux sous-unités du récepteur (Figure 16B).

Dans cette même étude, les auteurs ont mesuré le potentiel antiviral des 12 sous-types dans 3 lignées cellulaires (WISH, OVCAR et A549) et contre deux virus (VSV et EMCV) (Figure 17). Ils ont observé que tous les sous-types d'IFN-α avaient des effets antiviraux différents. Cela dit, ceux-ci semblent être dépendants à la fois du type cellulaire mais également du virus. Par exemple, on n'observe pas le même profil d'inhibition du virus VSV dans les cellules WISH et dans les cellules A549. Dans la première lignée, les IFN-α14 et 8 sont les plus puissants à inhiber la réplication virale alors que dans les cellules A549, l'IFN-α10 est le plus puissant. De même, on observe qu'au sein d'une même lignée, certains IFN-α sont plus efficaces pour inhiber la réplication d'un virus mais pas forcément d'un autre. Par exemple, dans la lignée A549, le virus VSV est plus fortement inhibé par l'IFN-α10 alors que le virus EMCV est plus impacté par les IFN-α8 et 17.

Ces études ont mis en lumière les différences d'activité des sous-types d'IFN-α démontrant ainsi des fonctions non redondantes de ceux-ci. Ces résultats suggèrent donc des potentiels antiviraux différents qui semblent être à la fois spécifiques du virus et du type cellulaire. Quelques études se sont focalisées sur les potentiels antiviraux des 12 sous-types d'IFN-α face au VIH-1.

3. Profil d'induction des IFN-α au cours d'une infection VIH-1

Certaines études se sont intéressées au profil d'induction des IFN-α par l'infection VIH-1. La proportion de chaque sous-type d'IFN-α est assez difficile à déterminer à cause de la forte homologie de séquence qui existe entre les sous-types. Il n'existe pas d'anticorps spécifiques pour chaque IFN-α. La technique la plus utilisée consiste à mesurer le profil d'expression des ARNm de chaque IFN-α. Il est également compliqué de regarder le profil d'expression *in vivo* chez des patients, particulièrement en primo-infection, ou les échantillons sont très rares.

Certaines études réalisées dans des modèles animaux simiens pendant une infection SIV ont montré que les profils d'induction des IFN-α étaient à la fois dépendants du tissu analysé, du type cellulaire et du type de stimulus (Easlick et al., 2010 ; Zaritsky et al., 2013 ; Dutrieux et al., 2014). Par exemple, on observe chez le macaque à queue de cochon, une sous-expression de l'IFN-α dans le cerveau à 7 jours post-infection par rapport au contrôle non infecté. Dans les poumons, une surexpression des sous-types 6 et 13 seulement est détectée à partir de 14 jours post-infection. Dans la rate, tous les sous-types sont exprimés chez les singes infectés mais avec

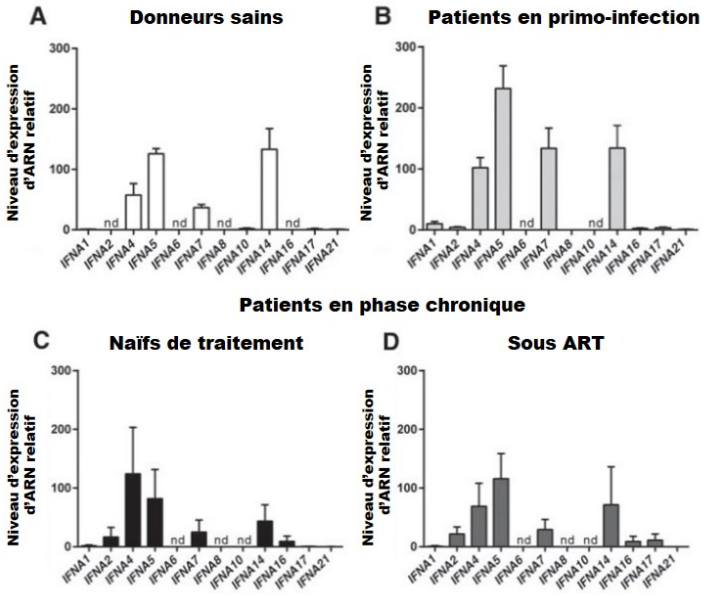


Figure 18 : Profils d'expression des différents sous-types d'IFN-α dans des PBMC de patients.

Ces expériences ont été faites chez des donneurs sains (A), des patients en primo-infection (B), des patients en phase chronique naïfs de traitement (C) ou sous traitement antiviral (D). La quantification a été faite par RT-qPCR (Li et al., 2017).

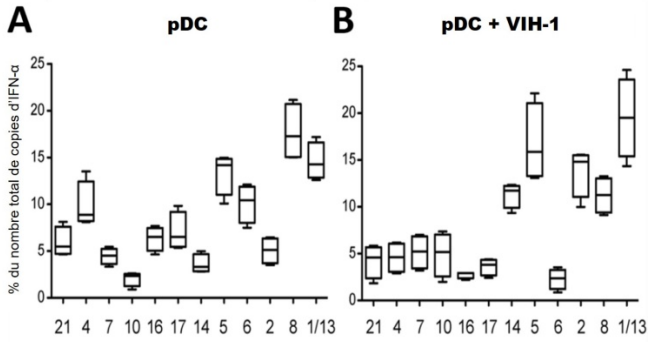


Figure 19 : Expression des différents sous-types d'IFN-α dans des pDC suite à une exposition au VIH-1.

Pourcentage de séquence de chaque sous-type d'IFN-α dans des pDC non infectées (A) et suite à une exposition au VIH-1 (B) (Harper et al., 2015).

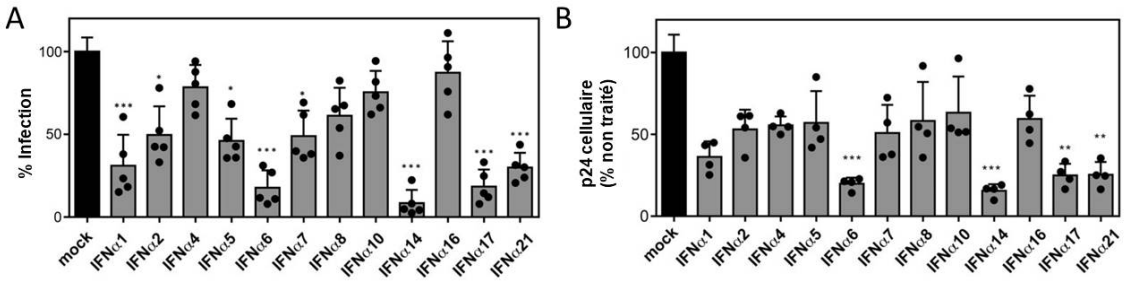


Figure 20 : Inhibition de la réplication du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des PBMC traitées avec les différents sous-types d'IFN-α ont été infectées avec le VIH-1. La quantité de virus produits en présence d'IFN-α ainsi que leur infectivité ont été mesurées après infection des cellules rapportrices TZM-bl avec les surnageants produits normalisés par volume (A). La quantité de protéine p24 dans les cellules a également été mesurée par ELISA (B) (Lavender et al., 2016).

de grandes différences d'induction. Les sous types 21, 17 et 4 sont induits beaucoup plus abondamment (Zaritsky et al., 2013). Chez le macaque rhésus, 3 jours post-infection, on observe dans le thymus l'induction de l'expression des sous-types 1, 2 et 3 chez la plupart des singes. De même, l'induction des sous-types 7, 14, 8 et 13 est fréquemment observée. En revanche les autres sous-types sont induits de manière plus sporadique (Dutrieux et al., 2014).

Une étude comparant les profils d'expression des IFN-α chez des patients en stade chronique ou en stade SIDA a montré une augmentation de l'expression des IFN-α6 et 2 chez les patients infectés par rapport aux donneurs sains (Lehmann et al., 2009). Les auteurs ont également observé une augmentation significative de l'expression des IFN-α1, 8, 14, 16, 17 et 21 chez les patients en stade SIDA contrairement aux patients en phase chronique. En revanche, l'expression des IFN-α4, 5, 7 et 10 ne semblent pas varier au cours de l'infection.

Dans une autre étude, une expression plus importante des IFN-α2 et 16 a été mesurée à la fois chez des patients en stade chronique sous ART ou naïf de traitement et chez des sujets non infectés (Li et al., 2017). Chez tous les patients en stade chronique, les IFN principalement induits étaient les IFN-α2, 4, 5, 6, 7, 14 et 16 (Figure 18). Les auteurs ont observé des profils d'expression des IFN assez similaires entre chaque patient.

Le profil d'expression des IFN-α suite à une infection VIH-1 a également été mesuré *in vitro* (Harper et al., 2015). Pour cela, les auteurs ont isolé des PBMC provenant de 4 donneurs différents et ont trié les pDC. Ils ont observé que dans les cellules où il n'y a pas de pDC, il n'y a pas non plus production d'IFN-α, confirmant que les pDC sont les principaux producteurs d'IFN. En revanche, la production d'IFN-α est très importante dans les pDC suite à une exposition au VIH-1. Ils ont également quantifié l'abondance relative de chaque sous-type d'IFN produit (Figure 19). Leurs résultats montrent un pattern d'expression très variable des IFN. En effet, les IFN-α1 et 5 sont très fortement induits ainsi que les sous-types 14 et 2 à la suite d'une infection VIH-1. En revanche, les autres sous-types d'IFN-α semblent peu induits par le VIH-1.

L'ensemble de ces études montre que l'infection par le VIH-1 conduit à l'expression des IFN-α. Cependant, le profil d'expression des différents sous types est très différent et semble varier en fonction du tissu analysé, du stade de la maladie ainsi que du traitement ou non des patients.

4. Profil d'inhibition du VIH-1 par les 12 sous-types d'IFN-α

Trois études se sont intéressées aux profils d'inhibition des IFN-α contre le VIH-1. Une étude réalisée dans des PBMC a montré que les IFN-α présentaient tous des profils d'inhibition du VIH-1 différents (Lavender et al., 2016). Dans leur étude, les auteurs ont traité des PBMC avec les IFN puis les ont infectées. 2 jours après infection, ils ont mesuré la quantité de protéine p24 cellulaire pour estimer la propagation du virus (Figure 20B). Ils ont également récolté les surnageants pour infecter des cellules rapportrices à volume égale. L'infection de ces cellules permet ainsi de mesurer la quantité et l'infectivité des virions produits en présence d'IFN-α (Figure 20A). Les deux expériences montrent des résultats similaires avec de fortes différences d'inhibition de l'infection en fonction du sous-type. On observe que les IFN-α6, 14, 17 et 21 entrainent une très forte réduction de la quantité de protéine p24 cellulaire. Les autres IFN présentent des effets plus modérés sur l'inhibition du virus (Figure 20B). Lorsqu'on regarde les résultats de l'infection des cellules rapportrices par les virions produits en présence d'IFN (Figure 20A), on retrouve le même profil d'inhibition, suggèrant que cette faible infection reflète le fait qu'il y a eu moins de virions relargués dans le milieu extracellulaire mais que l'infectivité des virions est peu affectée.

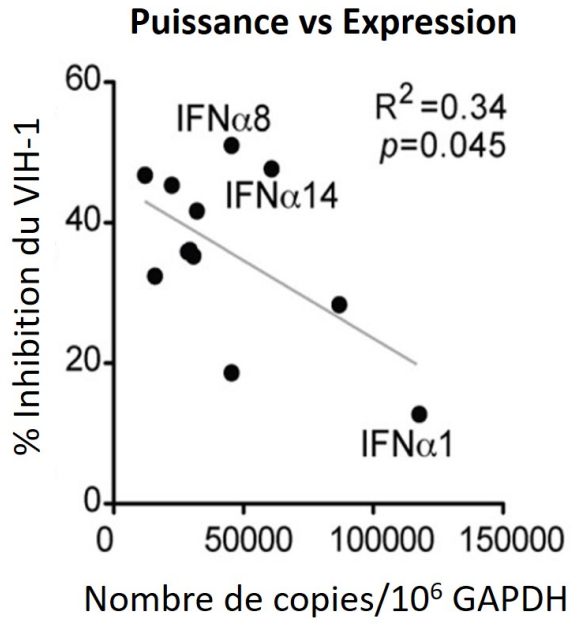


Figure 21 : Corrélation inverse entre la capacité antivirale et le nombre de copies induit après infection de chaque sous-type d'IFN-α.

(Harper et al., 2015).

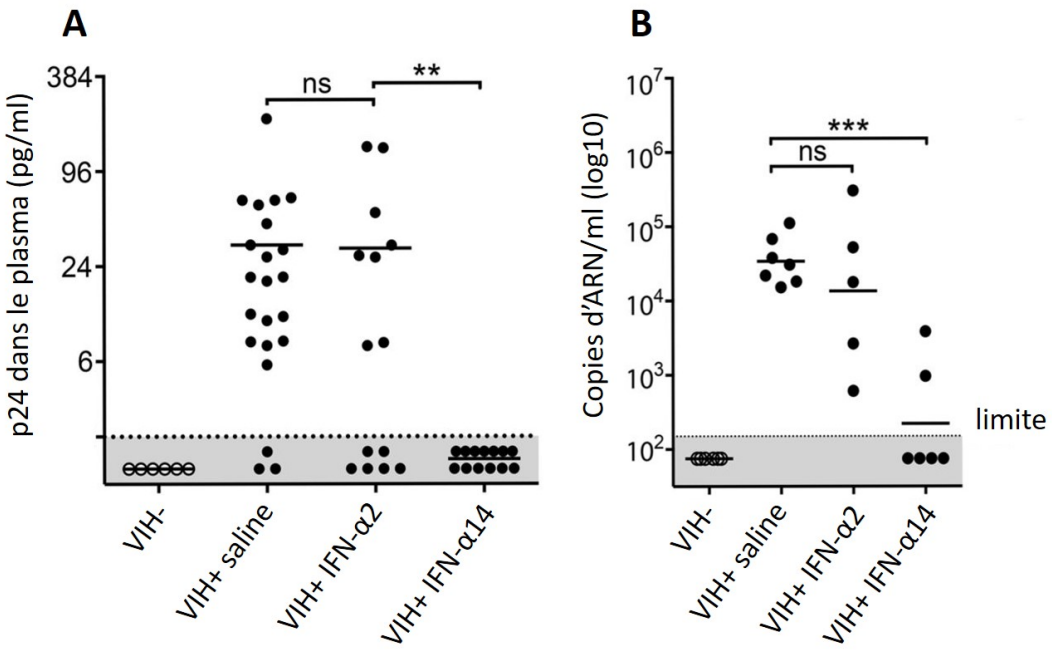


Figure 22 : Inhibition de la réplication du VIH-1 par deux IFN-α *in vivo*.

Des souris ont été infectées par le VIH-1 puis traitées quotidiennement ou non avec de l'IFN-α2 ou 14. 11 jours post-infection, la quantité de protéine p24 dans le plasma a été mesurée par ELISA (A) ainsi que le nombre de copies d'ARN viral par millilitre de plasma (B) par qPCR (Lavender et al., 2016).

Dans une étude précédente, les auteurs avaient montré que, dans un modèle de culture de lamina propria agrégée, les IFN-α8, 14 et 6 montraient les plus forts taux d'inhibition du VIH-1 (Harper et al., 2015). En revanche, les sous-types 1 et 2 n'avaient pas ou peu d'effets significatifs sur la réplication virale contrairement à ce qui a été décrit dans l'étude plus récente (Lavender et al., 2016). De même, ils observent que l'IFN-α8 était très puissant (Harper et al., 2015) alors qu'il n'a qu'un effet modéré dans l'autre étude (Lavender et al., 2016).

Pour déterminer l'impact antiviral des IFN-α produits après l'infection, les auteurs ont comparé le nombre de copies d'ARN de chaque IFN-α produit par les pDC infectées à leur propre effet antiviral. Ils ont observé qu'il existait une corrélation inverse entre ces deux facteurs, suggérant que les IFN les plus produits pendant l'infection sont parmi les moins puissants pour inhiber le virus (Figure 21). Par exemple, l'IFN-α1 est le plus fortement induit pendant l'infection mais est également le moins puissant contre le virus. Au contraire, l'IFN-α6 qui est un des plus puissants dans l'inhibition du VIH-1 fait partie des IFN les moins induits. Cependant, on observe quand même une forte induction des IFN-α8 et 14 qui semblent très puissants contre le VIH-1. Les auteurs ont également trouvé une forte corrélation entre le pouvoir inhibiteur des sous-types d'IFN et l'affinité au récepteur IFNAR2 établie par le groupe de Gideon Schreiber (Lavoie et al., 2011) mais pas avec le récepteur IFNAR1. Au vu de ces résultats, les auteurs ont suggéré que la puissance d'inhibition d'un IFN-α pourrait être corrélée à la puissance d'induction des ISG par celui-ci. Pour étudier cela, le profil d'induction de certains facteurs de restriction du VIH-1 a été analysé. Cependant, ces études se sont focalisées sur nombre limité d'IFN-α qui présentent soit de fortes affinités pour le récepteur et un fort potentiel antiviral soit une plus faible affinité pour le récepteur et un effet antiviral très modeste. Ils ont constaté que les puissances d'induction des ISG étaient différentes et dépendaient également des donneurs. Dans les deux études, il a été observé que les IFN les plus puissants induisaient plus fortement Mx2. Une corrélation entre la puissance d'inhibition des IFN et l'induction du facteur Mx2 a même été observée. BST2 semble également induit plus fortement par les IFN qui ont un effet antiviral plus important, cependant des différences sont observées entre chaque donneur. En revanche, l'induction des facteurs APOBEC3G et cGAS n'était pas associée à l'efficacité de l'IFN. Les facteurs SAMHD1 et TRIM5α ne semblent pas induits de manière significative par les IFN-α (Harper et al., 2015; Lavender et al., 2016). Cependant, il avait déjà été décrit l'IFN de type I n'induisait une augmentation du niveau d'expression dans différents types cellulaires (monocytes, cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes T CD4 quiescents)(St Gelais et al., 2012 ; Goujon et al., 2013b ; Dragin et al., 2013).

Dans une de ces études, l'efficacité des IFN-α a également été évaluée *in vivo* dans un modèle de souris humanisées (Lavender et al., 2016). Pour cela, les auteurs se sont focalisés sur deux sous-types d'IFN, l'IFN-α14, qui dans leur étude présentait la plus forte puissance d'inhibition de virus *in vitro* et l'IFN-α2, utilisé en clinique et dont les effets sont modérés sur le VIH-1 (Lavender et al., 2016). Ils ont infecté des souris avec une dose de VIH-1, puis les ont traitées avec la même dose d'IFN-α2 ou 14, 2h après l'infection, puis chaque jour pendant 10 jours. 11 jours post-infection, les souris ont été euthanasiées et l'infection a été mesurée. Les auteurs ont observé que le traitement à l'IFN-α14 permettait un bien meilleur contrôle de la réplication virale. En effet, chez les souris traitées avec l'IFN-α14, on observe une réduction significative de la quantité d'antigène p24 ainsi que du nombre de copies d'ARN viral dans le sang (Figure 22A et B). Il y également moins de souris p24 positives dans le groupe traité à l'IFN-α2 par rapport aux souris non traitées, cela dit, la réduction n'est pas significative et est beaucoup plus importante chez les souris traitées à l'IFN-α14.

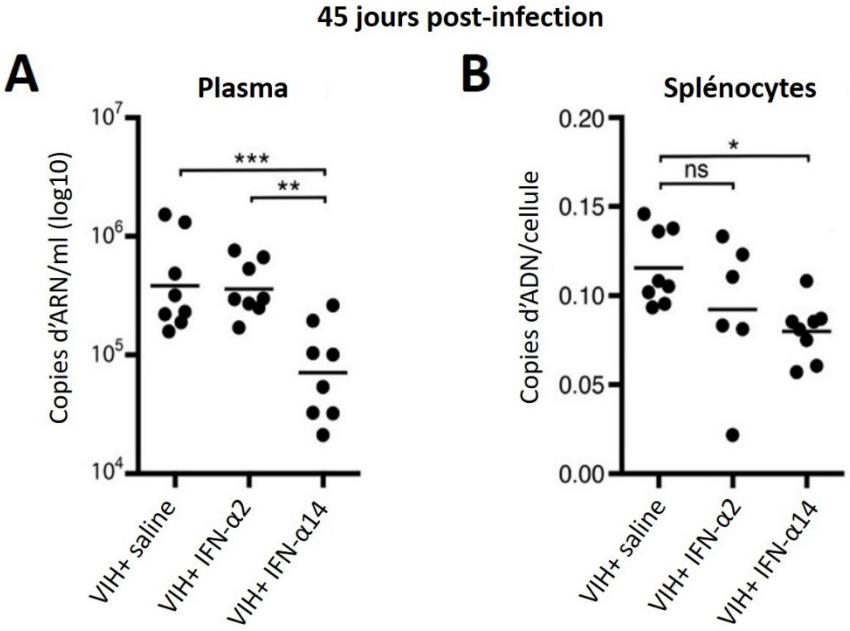


Figure 23 : Réduction de l'infection VIH-1 par l'IFN-α14.

Des souris ont été infectées avec un virus VIH-1. 35 jours post-infection, la quantité de p24 plasmatique est mesurée. Puis les souris sont traitées quotidiennement soit avec de l'IFN-α2, 14 ou non traitées pendant 10 jours. 45 jours post-infection, la quantité d'ARN viral plasmatique est mesurée par RT-qPCR (C) ainsi que le nombre de copies d'ADN par cellule (D) (Lavender et al., 2016).

Les auteurs ont également mesuré l'efficacité des 2 sous-types d'IFN-α à contrôler l'infection chronique chez les souris. Pour cela, ils ont infecté des souris, puis 35 jours post-infection, ils ont administré chaque jour pendant 10 jours une dose des deux IFN-α (Figure 23). 10 jours après traitement à l'IFN-α2, les auteurs n'observent pas de réduction significative de la quantité de p24, comparé aux souris non traitées. Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'ils mesurent le nombre de copies d'ARN dans le plasma (Figure 23A). En revanche, une diminution significative de ces facteurs est observée chez les souris ayant reçu un traitement à l'IFN-α14.
De même, ils observent que le traitement à l'IFN-α14 réduit la quantité d'ADN viral par cellule suggèrant que l'IFN-α14 pourrait réduire la taille du réservoir viral (Figure 23B).
Cette hypothèse a été testée par le même groupe en 2019 mais pas validée (Sutter et al., 2019). Dans leur étude, des souris humanisées ont été infectées avec le VIH-1. 6 semaines après l'infection, elles ont été traitées soit par cART, soit par cART en combinaison avec de l'IFN-α14 pendant 4 semaines. Les auteurs ont observé que l'addition d'IFN-α14 diminuait très fortement la charge virale dans le sang (de 8 fois) par rapport au traitement cART seul. Ils ont également observé que les traitements (avec ou sans IFN-α14) diminuaient la quantité d'ADN viral total dans les lymphocytes T CD4 de la rate. Cependant, l'ajout d'IFN-α14 n'induit pas une baisse plus importante de l'ADN par rapport au traitement seul. Lorsqu'ils regardent la taille du réservoir en mesurant le nombre de provirus intégrés, le traitement cART seul ne réduit pas significativement la taille du réservoir (ADN intégré). En revanche, l'ajout de l'IFN-α14 au traitement semble diminuer la quantité de provirus intégrés, toutefois, cette différence n'est pas significative en raison de la faible quantité d'échantillons disponibles. Cependant, lorsque les traitements sont interrompus, ils observent une augmentation de la quantité d'ARNv, de la quantité d'ADN et du nombre de génomes intégrés par cellules et ce, de manière équivalente entre les souris traitées juste par cART ou par cART en combinaison avec de l'IFN-α, suggérant que l'ajout d'IFN-α14 ne confère pas de bénéfice dans la prévention du rebond viral après une interruption de traitement.

A l'inverse de ces études, il a récemment été proposé que les différents sous-types d'IFN-α n'induisaient pas des réponses biologiques différentes mais dépendaient seulement de la dose administrée (Schlaepfer et al., 2019). Les différences seraient donc seulement quantitatives et non qualitatives. En effet, les auteurs ont observé que le traitement de différents types cellulaires (lymphocytes T CD4, macrophages et PBMC) avec quatre sous-types d'IFN-α (1, 2, 6 et 14) à des doses saturantes d'IFN-α conduisait au même profil d'induction de gènes et avaient les mêmes capacités antivirales contre le VIH-1. Cependant, si tel était le cas, on s'attendrait à ce que les IFN-α les plus puissants sur un virus donné soient également plus efficaces sur les autres virus, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres études (Lavoie et al., 2011). Même si les effets à des doses saturantes sont similaires, dans une infection et dans un contexte thérapeutique, ces concentrations saturantes ne seront probablement jamais atteintes. De plus, il demeure important d'identifier les sous-types d'IFN-α qui nécessitent la dose la plus faible pour obtenir l'effet biologique recherché, en limitant les effets indésirables.

F- Utilisation clinique des IFN de type I

1. Historique

Suite à la découverte des IFN et de leurs propriétés biologiques à la fois antivirale, proapoptotique et antiprolifération, une utilisation clinique a été envisagée pour le traitement d'infections virales et de cancers. Actuellement, parmi les IFN-α, seul le sous-type 2 est utilisé en clinique, principalement parce qu'il fut le premier sous-type isolé et cloné pour une large production et non après évaluation de ses capacités antivirales.
En 1986, la Food and Drug Administration américaine a approuvé pour la première fois

l'utilisation de l'IFN-α2 pour le traitement d'une leucémie. À ce jour, l'IFN-α est approuvé pour le traitement de plusieurs maladies dont des leucémies, mélanomes malins, lymphomes folliculaires, sarcomes de Kaposi associés au sida. L'utilisation de l'IFN-α est également répandue pour traiter de nombreux cancers, en particulier les cancers de la vessie et du rein, souvent comme complément d'autres thérapies (Pestka, 2007). Enfin, l'IFN-α2 était utilisé pour le traitement des hépatites chroniques B et C. Plus tard, l'IFN-β a été approuvé pour le traitement de la sclérose en plaques et l'IFN-γ pour celui de la maladie granulomateuse chronique et l'ostéopétrose maligne.

Les IFN entrainent beaucoup d'effets secondaires qui sont dépendants de la dose. Parmi eux, on trouve des symptômes grippaux courants (maux de tête, malaises, fièvre, frissons, fatigue, myalgie, douleurs dorsales et articulaires) et une lymphopénie chez la plupart des patients (Sleijfer et al., 2005). Bien que ces effets indésirables disparaissent souvent dans les heures suivant l'administration, ils limitent le dosage injecté par voie systémique. L'administration de fortes doses et pendant un long terme entrainent des effets secondaires pouvant être beaucoup plus graves. Il a été démontré que de fortes doses d'interféron ont une efficacité substantielle pour contrôler les cancers ou les maladies virales, mais malheureusement les patients ne peuvent souvent pas tolérer les doses nécessaires. Ainsi, malgré l'énorme potentiel des interférons dans le traitement des maladies, les effets secondaires empêchent souvent l'administration des doses nécessaires pour prévenir ou guérir la maladie. Le développement de nouvelles méthodes visant à réduire ces effets secondaires pourrait améliorer considérablement l'efficacité des interférons. Par exemple, administrer les interférons localement dans les tissus infectés ou les tumeurs permettrait sûrement de limiter les effets secondaires systémiques. De même, en cas d'infection virale, administrer un autre sous-type d'IFN qui présente des propriétés antivirales plus efficaces sur le virus ciblé spécifiquement semblerait plus approprié pour traiter une infection.

2. Les IFN-α dans le traitement du VIH-1

Au début de l'épidémie du VIH-1 et avant le développement d'antirétroviraux efficaces, plusieurs études visant à mesurer l'efficacité des IFN-α contre le virus ont été réalisées. Dans la plupart de ces études, l'utilisation de l'IFN de type I a montré sa capacité à réduire la charge virale. Cependant, cet impact était assez modéré (1 à 2 log) et transitoire (moins de 6 mois). De plus, dans ces études, les patients étaient à un stade assez avancé de la maladie et la lymphopénie en CD4 causée par de fortes doses d'IFN-α constitue un risque important pour eux (Noël et al., 2018).

Plus récemment, il a été montré que les IFN-α pouvaient avoir un rôle bénéfique ou délétère selon le stade de la maladie. La primoinfection est caractérisée par une forte tempête de cytokines. Parmis ces cytokines, on retrouve les IFN-α (Stacey et al., 2009). Il a été montré dans un modèle de souris humanisées que la déplétion des cellules pDC, pendant la phase précoce de l'infection, conduisait à une forte réduction de la production d'IFN-α et une augmentation de la réplication virale (Li et al., 2014). De même, l'administration d'un antagoniste d'IFNAR à des macaques rhésus conduit à une faible induction d'ISG, une augmentation de la taille du réservoir, accélère la déplétion en CD4 et entraine une progression plus rapide de la maladie (Sandler et al., 2014a). A l'inverse, l'administration précoce d'IFN-α2 pegylé améliore le contrôle viral et réduit la transmission virale. Ces données suggèrent que la signalisation IFN dans la phase précoce de l'infection est essentielle pour le contrôle de la réplication virale.

Au contraire, plusieurs études ont montré que la persistance de la signalisation IFN et de la production d'ISG pendant la phase chronique serait délétère. En effet, il a été observé que des patients présentant une plus forte virémie et une progression plus rapide vers la maladie avaient un profil d'expression génique anormal de leurs lymphocytes T CD4 (Sedaghat et al., 2008 ; Rotger et al., 2010). On retrouve chez ces patients une surexpression de nombreux ISG. Ces études suggèrent que l'activation chronique de la voie IFN est partiellement responsable du dysfonctionnement et de la perte des cellules T CD4 pendant la phase chronique. Elle est également associée à une virémie plus importante ainsi qu'à une progression plus rapide de la maladie (Hardy et al., 2013 ; Doyle et al., 2015).
Ces observations sont confortées par des études réalisées dans des modèles simiens, le macaque, un modèle pathogénique de la maladie, et le singe vert africain ou le sooty mangabey, des modèles non pathogéniques. L'analyse du profil d'expression génique dans les lymphocytes T CD4 montre une forte augmentation de l'expression des ISG dans les deux modèles simiens en phase aiguë de l'infection. Le niveau d'expression des ISG revient ensuite à la normale dans les semaines suivant l'infection dans les modèles non pathogéniques. En revanche, chez le macaque, la surexpression des ISG est maintenue. On observe également un fort niveau d'IFN-α qui est inversement corrélé avec le nombre de lymphocytes T CD4 (Bosinger et al., 2009 ; Campillo-Gimenez et al., 2010 ; Jacquelin et al., 2009 ; Harris et al., 2010).

Quelques pistes sont étudiées dans le but de bloquer cette activation permanente de la voie IFN. Des études réalisées chez des souris humanisées ont montré que des antagonistes d'IFNAR entrainaient une réduction de l'expression d'ISG et de marqueurs d'activation cellulaire. De plus, ceci conduit à une diminution de la virémie au stade chronique. L'administration d'un traitement antiviral en plus entraine une suppression de la virémie plus rapide et une baisse du réservoir inductible après arrêt du traitement (Zhen et al., 2016 ; Cheng et al., 2016).
Des inhibiteurs de la voie Jak/Stat sont également étudiés pour réduire l'activation chronique des cellules immunitaires. Il a notamment été montré que le ruxolitinib, un inhibiteur de Jak1/2 était efficace pour limiter la réplication et la réactivation in vitro (Gavegnano et al., 2014). De plus, il limiterait la production de certaines molécules inflammatoires (IL-6, TNFα, IL1β et IFN-γ) (Spivak et al., 2016).

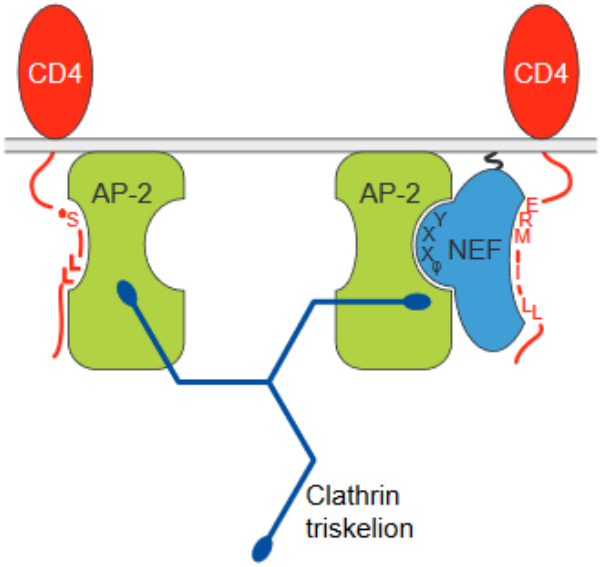


Figure 24 : Endocytose de CD4 médiée par la protéine virale Nef.

Nef se lie à la partie cytoplasmique de CD4 ainsi qu'à l'adaptateur AP-2 ce qui va entrainer l'endocytose de CD4 *via* la voie des clathrines (Oldridge and Marsh, 1998).

Partie 2 : Interférence « intrinsèque »

L'interférence virale intrinsèque est le phénomène par lequel une cellule infectée devient moins susceptible à une réinfection par un virus de la même famille grâce à des mécanismes liés à l'expression du premier virus lui-même (Marcus and Carver, 1967). Ce phénomène est commun à différentes familles virales. Il a été décrit pour le virus de la rougeole, de la grippe, de l'hépatite B et plusieurs rétrovirus, entre autres (Rott et al., 1972; Rott et al., 1981 ; Mikheeva and Ghendon, 1982).
L'infection d'une cellule par deux virions VIH différents peut conduire à des recombinaisons entre les deux génomes. La recombinaison nécessite l'incorporation des deux génomes dans une nouvelle particule virale qui subiront des recombinaisons lors de la transcription inverse du cycle suivant dans une nouvelle cellule cible (Galetto and Negroni, 2005).
Malgré l'avantage que peuvent conférer ces recombinaisons, les doubles infections sont peu fréquentes *in vivo* chez les patients et la plupart des cellules infectées contiennent un seul génome viral intégré (Josefsson et al., 2011). Les virus ont développé des mécanismes d'interférence virale pour limiter les doubles infections. Le but de cette interférence est d'empêcher une réplication virale qui serait excessive et conduirait à la mort de la cellule. Pour cela, le virus détourne certaines voies cellulaires. Pour le VIH-1, on observe deux grandes voies d'interférence, une liée aux récepteurs cellulaires et une autre indépendante des récepteurs.

A- Interférence liée aux récepteurs du VIH

Les mécanismes les plus décrits expliquant cette interférence dans le VIH, et qui sont communs à plusieurs familles virales, sont l'occupation et la modulation de l'expression de surface des récepteurs cellulaires.

1. Interférence liée au récepteur CD4

Il a été montré par de nombreuses équipes que quand des lymphocytes T CD4 sont infectés par le VIH-1, ils expriment une densité plus faible du récepteur CD4 à leur surface cellulaire. Trois protéines virales sont majoritairement impliquées dans la régulation négative de CD4 : Nef, Env et Vpu (Wildum et al., 2006).

Dans les lymphocytes T, le récepteur CD4 est associé à la protéine $p56^{Lck}$, une tyrosine kinase de la famille Src (Lin et al., 1998). $p56^{Lck}$ empêche normalement l'endocytose de CD4 à la surface cellulaire. En cas d'activation de la cellule par un antigène, le domaine intracellulaire de CD4 est phosphorylé, ce qui induit la dissociation de CD4 et $p56^{Lck}$ ainsi que l'activation d'un signal d'endocytose. CD4 interagit alors avec AP-2, un complexe adaptateur de clathrine, qui facilite son recrutement dans les vésicules de clathrine.

Au cours d'une infection VIH-1, Nef est très fortement exprimée dans les phases précoces post-intégration. Dans les lymphocytes T CD4, Nef se lie directement à un motif di-leucine-like présent dans le domaine cytoplasmique de CD4 et entraine la dissociation du complexe $CD4/p56^{lck}$ à la surface cellulaire. Nef est également capable de se lier à différentes protéines adaptatrices (AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4) qui contiennent des signaux de transport. La liaison simultanée de Nef à CD4 et AP-2 principalement (Figure 24) induit une endocytose du récepteur CD4 et un adressage à la voie de dégradation lysosomale (Chaudhuri et al., 2007 ; Oldridge and Marsh, 1998). De plus, la liaison de Nef à AP-1 et AP-3 dans le trans-Golgi peut détourner l'acheminement des molécules CD4 nouvellement synthétisées directement aux lysosomes où elles seront dégradées (Neri et al., 2011; Tavares et al., 2017).

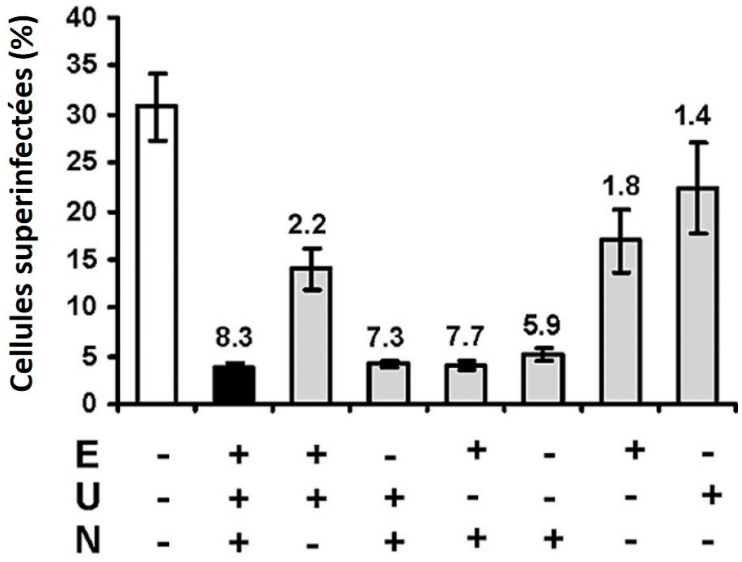


Figure 25 : Contribution des protéines Vpu, Env et Nef dans l'interférence virale.

Des cellules Jurkat ont été infectées avec des virus soit sauvages ou délétés des gènes *nef* (N) et/ou *vpu* (U) et/ou *env* (E) portant un gène rapporteur. Trois jours après, une deuxième infection a été faite avec un virus sauvage exprimant un autre gène rapporteur. Le pourcentage de cellules doublement infectées a été mesuré deux jours après la deuxième infection par cytométrie en flux. La valeur indiquée correspond à la réduction du nombre de cellules doublement positives par rapport à l'infection faite avec le virus n'exprimant pas les protéines Nef, Env et Vpu (Wildum et al., 2006).

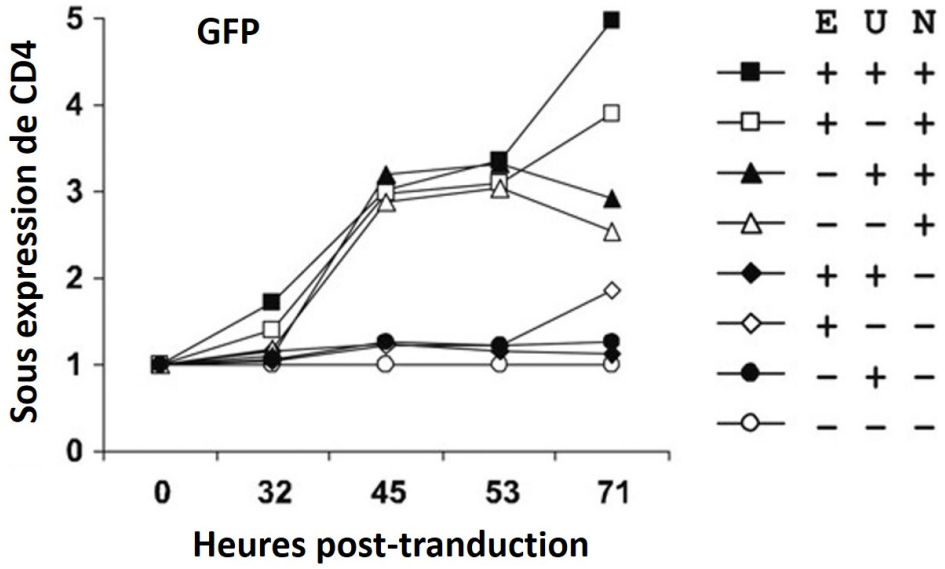


Figure 26 : Cinétique de la sous-expression du récepteur CD4 à la surface cellulaire dans des PBMC infectés.

Des PBMC activés ont été infectés avec un virus exprimant la GFP sauvage ou délété des gènes *nef* (N) et/ou *vpu* (U) et/ou *env* (E). L'expression de CD4 à la membrane plasmique a été mesurée par cytométrie en flux à 20, 32, 53, 45 et 71h post-infection (Wildum et al., 2006).

Les protéines Env et Vpu sont exprimées plus tardivement que Nef après l'intégration car leur expression est dépendante de celle de Rev. Env et Vpu vont entrainer une sous-expression de CD4 en empêchant le transport à la surface des protéines néosynthétisées. La gp160 (précurseur de Env) se lie à CD4 dans le réticulum endoplasmique et entraine la formation d'agrégats qui vont empêcher son transport à la surface. Cependant, la formation du complexe CD4/gp160 dans le RE bloque aussi le transport et la maturation de la protéine d'enveloppe (Bour et al., 1991 ; Crise et al., 1990). Une des fonctions de Vpu est d'induire la dégradation des molécules CD4 retenues dans le RE par la gp160 (Magadán et al., 2010 ; Willey et al., 1992). Vpu régule également l'expression de CD4 en adressant les molécules néoformées à la machinerie de dégradation E3 ubiquitine ligase qui va les conduire au protéasome. Ceci permet la libération de la gp160 et son adressage à la membrane plasmique.

Cette diminution du nombre de récepteurs à la surface membranaire réduit fortement la susceptibilité de la cellule à une seconde infection. Lorsqu'une cellule est infectée par un premier virus délété d'une ou de plusieurs de ces protéines, elle devient plus susceptible à une seconde infection (Figure 25). La protéine Nef est la plus puissante à induire une diminution de l'expression de surface de CD4. Les protéines Env et Vpu présentent des effets plus modérés.

Cependant, il a été montré que la sous-expression des protéines CD4 à la membrane ne semble pas associée aux virus à tropisme CCR5 présents dans les phases précoces de l'infection mais est plus caractéristique des virus de tropisme CXCR4 et CXCR4/CCR5 qui apparaissent plus tardivement (Chenine et al., 2000). Ceci serait dû à l'affinité de Env pour le récepteur CD4. La transition de récepteur R5 à R5X4 puis X4 est coordonnée avec une augmentation de l'affinité à CD4. Ces résultats ont également été observés dans une autre étude qui a montré que les gènes *nef* retrouvés chez des patients en stade SIDA semblent plus efficaces à induire la sous-expression de CD4 que des allèles présents chez des patients asymptomatiques (Argañaraz et al., 2003).

Des études sur la cinétique de la régulation négative de CD4 suggèrent que ce phénomène se met en place 2 jours après l'infection et seulement quelques heures avant que la cellule ne meure (Figure 26). La demi-vie des cellules infectées a été estimée à 1 à 2 jours chez les patients (Wildum et al., 2006). Cependant, certaines équipes ont montré que l'interférence virale intrinsèque se met en place très tôt, dès 4 à 24h après la première infection (Volsky et al., 1996). Ces résultats suggèrent donc que la sous-expression de CD4 n'est pas le principal effecteur impliqué dans l'interférence virale précoce (Wildum et al., 2006). De plus, il a été suggéré que la sous-expression à la membrane plasmique de CD4 serait plus importante pour la production de la progénie que pour l'interférence virale. En effet, la réduction de CD4 à la surface facilite le relargage des virions à la surface cellulaire (Lama, 2003).

2. Rôles des corécepteurs CXCR4 et CCR5

D'autres études suggèrent que l'infection par le VIH-1 pourrait également induire une régulation négative des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du virus à la membrane plasmique. Cependant, même si dans la plupart des études un effet est mesuré, les résultats sont assez contradictoires.

a) Corécepteur CXCR4

Une étude a montré que Nef était capable d'induire la sous-expression de CXCR4 à la surface cellulaire de lymphocytes primaires et de nombreuses lignées cellulaires (Venzke et al., 2006). Dans leur étude, les auteurs ont montré que ce mécanisme serait suffisant pour diminuer la susceptibilité des cellules à une surinfection par un virus de tropisme X4.

Une autre équipe a montré que certains allèles du gène *nef* du SIV ou du VIH-2, qui ont peu ou pas d'impact sur le niveau d'expression de CD4, étaient capables de réduire la surinfection des cellules par des souches ayant un tropisme X4, en induisant une réduction de l'expression de CXCR4 à la surface cellulaire (Wildum et al., 2006). A l'inverse, dans cette étude, un large panel d'allèles du gène *nef* du VIH-1 étaient incapables d'entrainer une diminution de l'expression de CXCR4 (à la surface cellulaire de cellules Jurkat et de PBMC).
Ces résultats ont également été observés dans une autre étude où aucune sous-expression du récepteur CXCR4 dans des cellules infectées par des virus VIH-1 ayant un tropisme X4 ou R5X4 n'a été vue (Chenine et al., 2000).

b) Corécepteur CCR5

Quelques études ont montré que le récepteur CCR5 pouvait être sous-exprimé pendant une infection VIH-1. Dans une étude, les auteurs ont montré que Nef était capable d'induire une sous-expression de CCR5 à la surface cellulaire de lymphocytes primaires et de différentes lignées cellulaires mais n'affecte pas sa synthèse (Michel et al., 2005). Ils ont également montré que ce mécanisme était conservé au niveau de l'évolution car les gènes *nef* du VIH-2 et du SIVmac sont également capables d'induire une régulation négative de CCR5. Une autre équipe a également observé une perte de l'expression de CCR5 à la surface des cellules infectées par un virus R5 (Chenine et al., 2000). Cependant, une autre étude a mis en évidence que l'expression du corécepteur R5 était rarement affectée par le VIH-1 (Wildum et al., 2006).

L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence que les protéines Env, Vpu et Nef entrainent une réduction de l'expression de CD4 à la surface cellulaire. La protéine Nef pourrait également être impliquée dans la sous-expression des corécepteurs CCR5 et CXCR4. Cependant, ces études montrent également que la sous-expression des récepteurs met de nombreuses heures à se mettre en place (au minimum 24h) or l'interférence virale peut s'observer dès quelques heures post-infection. Ceci suggère qu'il existe très probablement une ou plusieurs autres voies conduisant à cette interférence précoce, de manière indépendante des récepteurs.

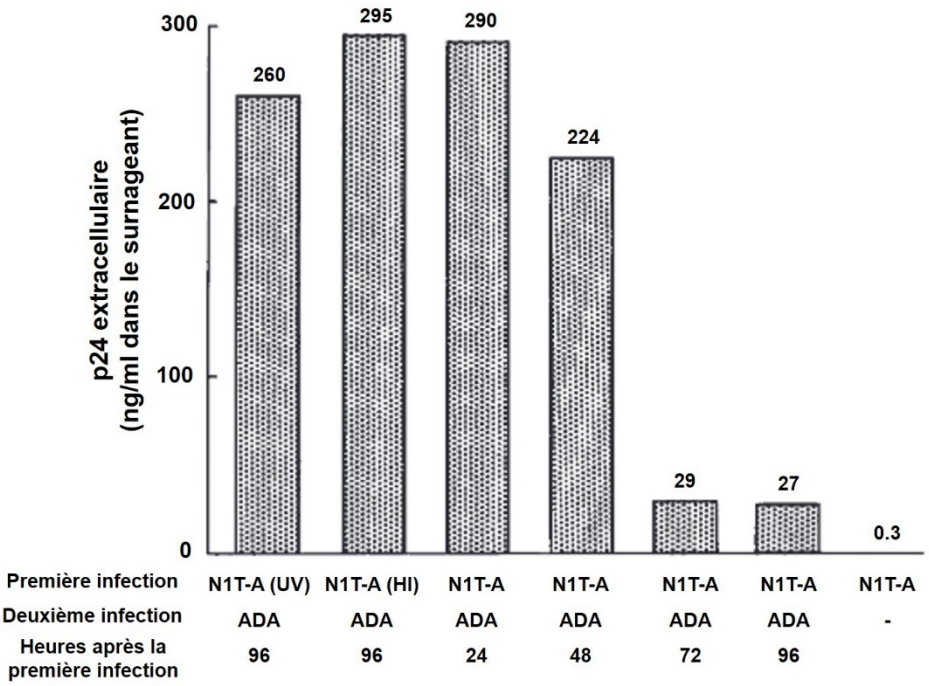


Figure 27 : Mesure de l'interférence virale dans des macrophages.

Des macrophages ont été infectés avec une souche N1T-A capable d'être rétrotranscrit mais pas de synthétiser des protéines dans les macrophages. Une deuxième infection avec une souche ADA a été faite à plusieurs temps après la première infection. L'interférence virale est estimée par mesure de l'antigène p24 du scond virus dans les surnageants 10 jours après la premère infection (UV : inactivation par les UV ; HI : inactivation par la chaleur) (Potash and Volsky, 1998).

B- Interférence indépendante des récepteurs

1. Preuves de l'existence d'une interférence indépendante des récepteurs

Plusieurs études ont montré que l'interférence virale pouvait être due à des mécanismes indépendants de la régulation des récepteurs cellulaires. Cependant, les mécanismes suggérés et les protéines virales identifiées comme agissant sur cette interférence diffèrent d'une étude à l'autre, probablement à cause des techniques utilisées dans ces études « anciennes », qui manquent de sensibilité et de spécificité.

Déjà en 1996, il avait été montré que la sous-expression des récepteurs n'était pas nécessaire pour établir une interférence (Volsky et al., 1996). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un phénomène d'interférence virale se mettait en place rapidement après la première infection, dès 24h, et donc en amont de la sous-expression des récepteurs cellulaires qui observée à 48h post-infection. Dans cette étude, les auteurs ont réalisé des expériences de surinfection avec deux souches de VIH-1 différentes (N1T-A et KS283) pouvant être distinguées car elles possèdent des sites de restriction différents dans leur génome. Ils ont infecté des cellules CEM avec un premier virus, puis surinfecté avec le deuxième à 4, 24 et 48h après la première infection. 4 jours après la première infection, la réplication virale des deux virus est estimée en regardant par Southern Blot la quantité d'ADN des deux virus après digestion. Les auteurs ont observé, que quand la seconde infection est faite 4h après la première, celle-ci est détectable. En revanche, quand elle est faite 24h après la première, la bande spécifique du deuxième virus est beaucoup plus faible. Quand les deux infections sont faites avec 48h d'intervalle, ils n'observent plus de bande du deuxième virus, suggérant que la première infection a bloqué la seconde. Les auteurs ont également observé que l'interférence dépend de la MOI de la première infection. En effet, lorsque la première infection est faite avec une très faible MOI, ils sont capables de détecter la seconde infection même lorsque celle-ci est faite 48h après la première.

Dans une autre étude, la même équipe a montré que l'étape de transcription inverse du premier virus est suffisante pour inhiber le deuxième virus (Potash and Volsky, 1998). En effet, losque des macrophages sont infectés avec la souche lymphotropique N1T-A, capable d'être rétrotranscrit en ADNv mais donnant lieu à peu ou pas de synthèse protéique, les cellules deviennent moins susceptibles à une seconde infection (Figure 27) (Huang et al., 1993). En revanche, lorsque la première infection est faite avec un virus inactivé (par UV ou par la chaleur) et donc incapable d'être rétrotranscrit, il n'y a pas d'interférence avec la seconde infection. Cependant, dans ce système, l'interférence se met en place plus tardivement, on observe une légère réduction de la seconde infection lorsque celle-ci est faite 48h après la première infection et n'est significative qu'à partir de 72h entre les deux infections.

Une autre équipe a mis en évidence des résultats similaires dans un modèle de cellules HUT-78 (F12) (Taddeo et al., 1993). Ces cellules portent dans leur génome un provirus entier donnant lieu à la synthèse et la production d'ARN et de protéines du virus. Cependant, elles ne conduisent pas à la production de nouvelles particules à cause d'un très grand nombre de mutations présentes dans le génome viral. Les auteurs ont observé que ces cellules sont résistantes à une deuxième infection. Ils ont observé que l'entrée virale n'est pas significativement impactée suggérant qu'elle n'est pas la principale cible de l'interférence. En revanche, ils ont montré que l'étape de transcription inverse est impactée et entraine la formation d'ADN viral incomplet. Dans une autre étude, la même équipe a montré que plusieurs protéines virales étaient impliquées dans cette interférence (D'Aloja et al., 1998). Pour

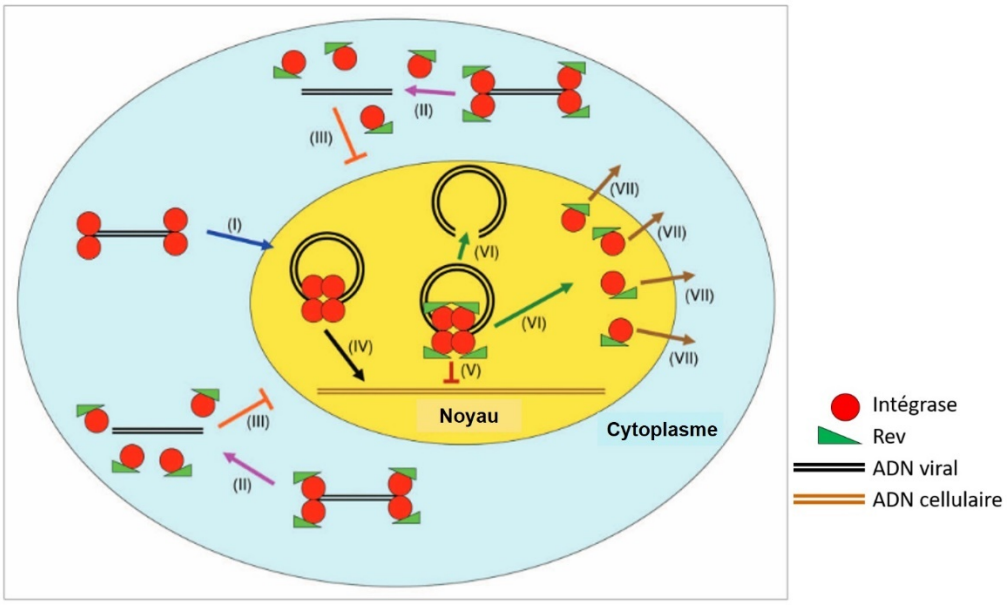


Figure 28 : Modèle schématique de l'interaction entre Rev et l'intégrase.

Dans le complexe de pré-intégration, l'intégrase est liée à l'ADN viral. Une certaine quantité de ces complexes Intégrase-ADN est transloquée dans le noyau et le provirus est intégré dans le génome de la cellule hôte. Puis Rev est synthétisé. Dans le cytoplasme, la liaison de Rev à l'intégrase induit la dissociation du complexe Intégrase-ADN et bloque l'import de l'intégrase. Dans le noyau, Rev va également interagir avec le complexe Intégrase-ADN, bloquer l'activité enzymatique de l'intégrase et entrainer la dissociation du complexe Intégrase-ADN comme dans le cytoplasme. Puis Rev médie l'export nucléaire de l'intégrase (Levin et al., 2010a).

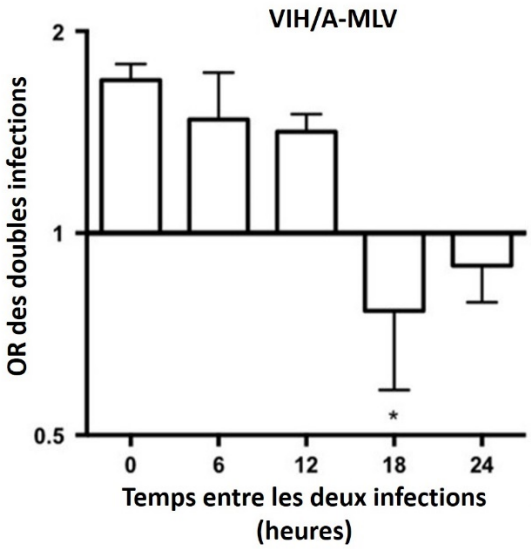


Figure 29 : Mesure de la fréquence des cellules doublement infectées en fonction du temps entre les deux infections.

Des cellules MT4R5 ont été infectées avec un virus exprimant la protéine HSA puis coinfectées (0h) ou surinfectées (3, 6, 12, 18 et 24h) avec un virus exprimant la GFP et portant une enveloppe du virus A-MLV (Remion et al., 2016).

démontrer cela, ils ont transfecté des cellules HeLa exprimant CD4 avec chacune des protéines virales codées par le virus présent dans les cellules F12, puis ont infecté les cellules avec un virus VIH-1. Ils ont ensuite mesuré l'activité de la transcriptase inverse (RT) au cours du temps. Ils ont observé que les cellules qui expriment les protéines Gag, Vif et Nef sont moins susceptibles à l'infection. Nef semble la protéine la plus puissante car aucune activité RT n'est mesurée même à des MOI importantes (0,5). Au contraire, les auteurs ont observé que l'expression dans ces cellules des protéines Rev, Tat ou Vpu conduit à une augmentation de la propagation virale. Ils ont aussi observé que les protéines Pol, Env et Vpr n'avaient pas d'effet sur la réplication du VIH.

2. Rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale

Plus récemment, deux équipes dont la notre ont mis en évidence le rôle de la protéine Rev dans le mécanisme de l'interférence virale indépendante des récepteurs.

L'équipe d'Abraham Loyter a mis en évidence dans une série d'articles le rôle de Rev dans l'interférence virale. Dans leurs études, les auteurs ont proposé plusieurs mécanismes par lesquels la protéine Rev pourrait bloquer la réplication virale d'un second virus (Figure 28).
Grâce à des expériences en double hybride et coimmunoprécipitation, ils ont observé que la protéine Rev et l'intégrase du virus pouvaient s'associer (Rosenbluh et al., 2007a ; Levin et al., 2009). Par l'utilisation de peptides dérivés à la fois de Rev (13-23 et 53-67) et de l'intégrase (66-80, 118-128 et 174-188) empêchant leur liaison, ils ont identifié les domaines d'interaction entre ces deux protéines (Rosenbluh et al., 2007b ; Levin et al., 2009). Cependant, cette interaction n'a jamais été confirmée par d'autres auteurs. Dans les expériences de surinfection, pour distinguer les deux virus, ils utilisent un premier virus défectif pour l'intégration et mesurent le nombre de copies intégrées du deuxième virus. Dans ce contexte, Rev est exprimé par le premier virus non intégré et ils montrent qu'il est exprimé de manière efficace dès 6h post-infection. Suite à l'expression de Rev dans les cellules, ils observent qu'il y a une réduction à la fois du nombre du deuxième provirus intégrés et du nombre de cercles à 2 LTR (Levin et al., 2010a ; Levin et al., 2010b). Ils proposent que la protéine Rev du premier virus intercepte l'intégrase du second virus dans le cytoplasme et empêche l'import nucléaire du PIC. Ils proposent également que Rev se lie à l'intégrase dans le noyau, conduisant à son export vers le cytoplasme. Les auteurs ont également observé que la protéine Rev pouvait interagir *in vitro* avec le complexe LEDGF/p75 impliqué dans l'intégration virale (Levin et al., 2010c). La liaison de Rev à LEDGF/p75 entrainerait sa dissociation de l'intégrase et bloquerait l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte.

Notre équipe a également mis en évidence le rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale (Remion et al., 2016). Dans cette étude, notre équipe a utilisé un système avec des virus rapporteurs (exprimant soit la GFP, soit l'antigène HSA). Des cellules MT4R5 sont infectées avec un premier virus puis, à différents intervalles de temps, par le deuxième virus. Pour mesurer l'interférence virale, la fréquence des simples et des doubles infections est mesurée par cytométrie en flux. L'interférence virale est estimée par calcul des Odds ratio (OR). Brièvement, lorsque l'OR est égal à 1, les deux infections sont considérées comme des événements indépendants. Quand l'OR est supérieur à 1, les doubles infections arrivent plus fréquemment qu'attendues. En revanche, lorsque l'OR est inférieur à 1, les doubles infections sont moins fréquentes que prévues.

Notre équipe a observé que quand les deux infections sont faites en même temps, la fréquence des doubles infections est plus importante qu'attendue (Figure 29), ce qui avait déjà été décrit (Dang et al., 2004). Notre équipe a également participé à la compréhension de ce phénomène de coinfection (Ito et al., 2017 ; Ito et al., 2018).

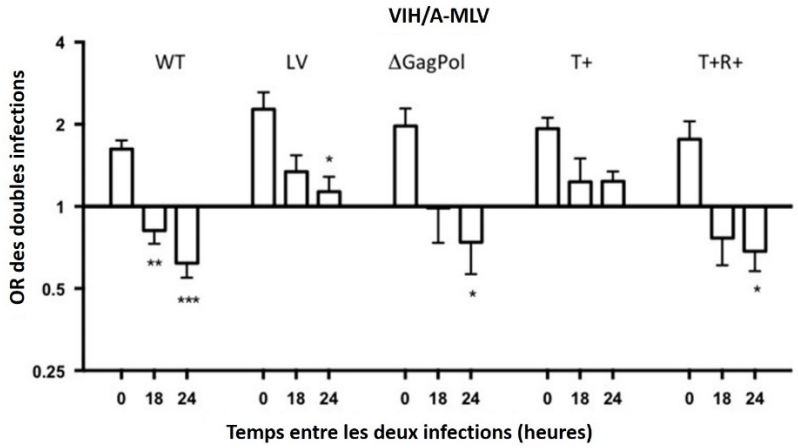


Figure 30 : Effet de l'expression des protéines virales sur la mise en place de l'interférence.

La première infection est faite avec un virus VIH sauvage (WT), un lentivirus (LV), un virus délété de Gag et Pol (ΔGagPol), un virus n'exprimant que Tat (T+) ou un virus exprimant Tat et Rev (T+R+). Puis la seconde infection est faite avec un virus VIH portant une enveloppe A-MLV (Remion et al., 2016).

Figure 31 : Structure de la protéine virale Rev.

La protéine virale Rev contient un domaine NIS (10-24), deux domaines de multimérisation (11-25 et 51-65), un domaine de liaison à l'ARNv (35-50), une séquence NLS (35-50) et une séquence NES (75-84).

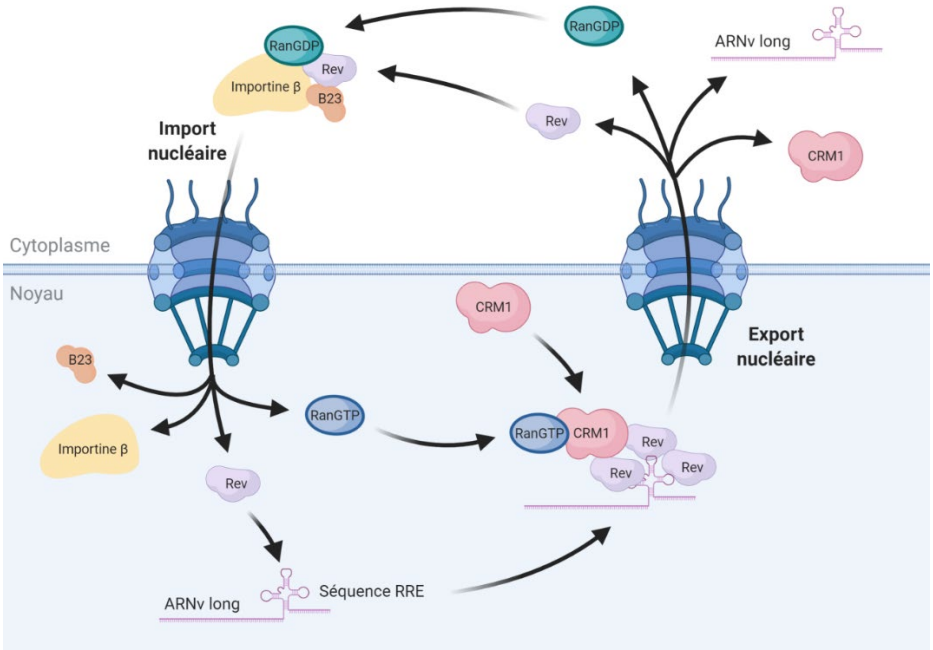


Figure 32 : Voie d'export des ARN viraux par Rev *via* CRM1.

Une fois synthétisée dans le cytoplasme, Rev est importée dans le noyau grâce à sa séquence NLS. Dans le noyau, Rev se lie sous forme de multimères à la séquence RRE présente dans les ARN non et mono-épissés. Ils pourront alors être exportés *via* la voie CRM1. Une fois dans le cytoplasme, le complexe Rev-RRE se dissocie et Rev peut recommencer un cycle d'import/export (schéma réalisé sur BioRender.com).

En revanche, lorsque la deuxième infection est faite plus tard dans le temps, la fréquence des doubles infections diminue progressivement. L'interférence virale devient significative lorsque les deux infections sont faites à 18h d'intervalle. Cette interférence virale est indépendante des récepteurs car elle a lieu même lorsque les virus portent l'enveloppe d'un autre lentivirus (A-MLV) (Remion et al., 2016).

Par des expériences de délétions ou d'expression des gènes viraux un par un, notre équipe a montré que l'expression des protéines Tat et Rev par le premier virus était suffisante et nécessaire pour mettre en place ce phénomène d'interférence. En revanche, la protéine Tat exprimée seule est incapable d'induire de l'interférence, suggérant le rôle de la protéine Rev dans ce mécanisme (Figure 30). De même, les autres protéines virales ne semblent pas impliquées dans l'interférence virale. En effet, lorsque la première infection est faite avec un virus délété pour chacun de ces gènes, on observe qu'il est toujours capable d'interférer avec le second, suggérant qu'ils ne sont pas impliqués dans ce phénomène (Remion et al., 2016). Ces résultats montrent donc que la protéine virale Rev joue un rôle central dans un mécanisme d'interférence virale indépendant de la sous-expression des récepteurs viraux.

3. La protéine virale Rev

Rev est une phosphoprotéine de 116 acides aminés faisant 19 kDa, majoritairement présente dans le noyau. Elle est exprimée précocément après l'intégration du provirus dans le génome de l'hôte. Elle possède une séquence de localisation nucléaire (NLS), située entre les résidus 35 et 50 lui permettant son import nucléaire ainsi qu'un signal NIS (*Nuclear Inhibitory Signal*) présent en N-terminal qui sert à maintenir sa localisation dans le noyau (Figure 31). Rev contient également un domaine de liaison à l'ARN, situé dans le même domaine que sa séquence NLS. Elle possède un autre domaine, situé entre les résidus 75 et 84, qui sert de signal d'export nucléaire (NES) après interaction avec des protéines cellulaires. Ces séquences lui permettent de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Elle possède également deux domaines d'oligomérisation (Suhasini and Reddy, 2009).

a) Fonction d'export des ARN viraux de la protéine Rev

Dans les premières étapes du cycle, les ARN viraux sont multi-épissés donnant lieu à la traduction de la protéine Rev, entre autres. Une fois traduit dans le cytoplasme, Rev se lie *via* sa séquence NLS à l'importine-β qui recrute Ran-GDP. Ce complexe est ensuite adressé au noyau (Figure 32). La phosphoprotéine B23 est également nécessaire à son import nucléaire. Une fois transloqué dans le noyau, Ran-GDP est converti en Ran-GTP par la protéine RCC1, ce qui entraine la dissociation de Rev et l'importine-β. L'importine-β retourne dans le cytoplasme pour recommencer un nouveau cycle d'import de Rev. Dans le noyau, Rev se lie à la séquence RRE présente dans le gène *env* de tous les transcrits viraux non ou mono-épissés ce qui masque la séquence NLS, empêchant sa liaison avec l'importine-β. Un premier monomère de Rev se lie au RRE avec une forte affinité, ce qui conduit ensuite au recrutement d'autres monomères de Rev (jusqu'à 12). Les monomères de Rev vont alors se fixer *via* leur séquence NES à CRM1, un membre de la famille des importines-β, entrainant leur export dans le cytoplasme par les pores nucléaires. L'export nucléaire se fait de manière active et est contrôlé par Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, Ran-GTP est hydrolysé en Ran-GDP (par RanBP1 et RanGAP1), entrainant la dissociation de CRM1 du complexe Rev/RRE. CRM1 est alors réimporté dans le noyau où il peut recommencer un cycle d'export. Une fois dans le cytoplasme, Rev se dissocie du RRE et va à nouveau se lier à l'Importine-β. L'ARN viral est quant à lui adressé à la machinerie de traduction cellulaire (Caputi, 2011 ; Mahboobi et al., 2015).

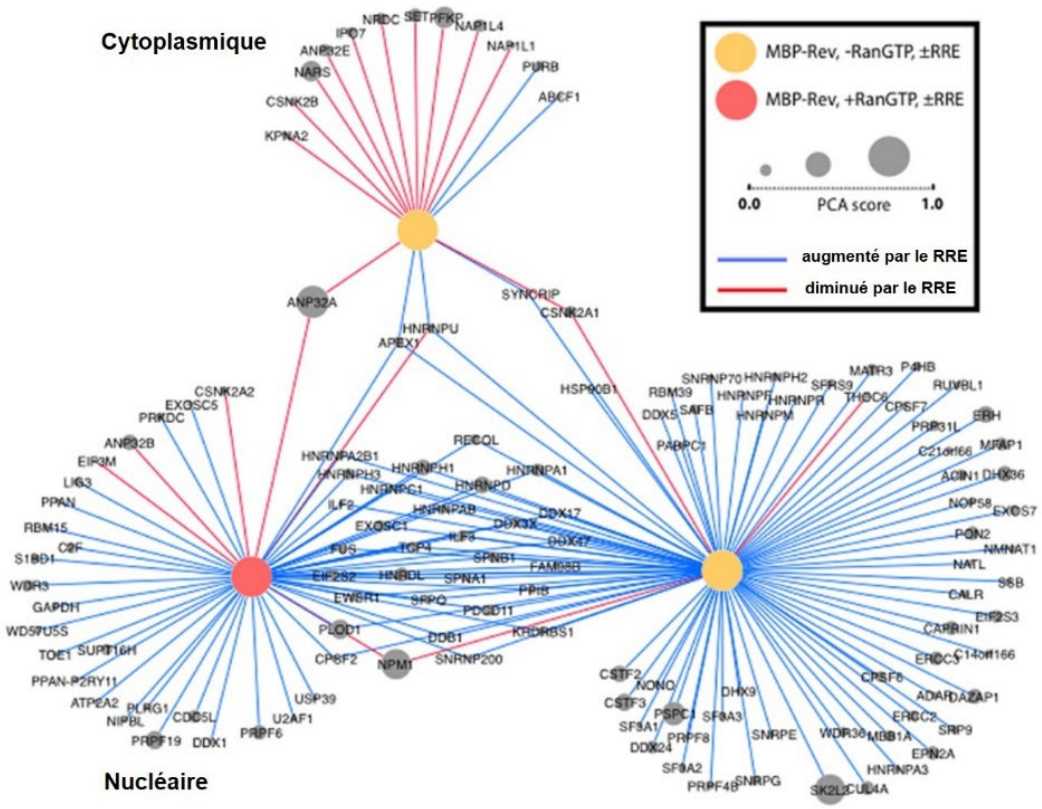


Figure 33 : Représentation de l'interactome de Rev.

(Naji et al., 2012)

b) Cofacteurs de la protéine Rev

En plus des protéines CRM1 et Ran, un certain nombre de protéines ont été reportées comme pouvant interagir avec Rev. Parmi elles, beaucoup de DEAD/H Box appartenant à la famille des hélicases (Yedavalli et al., 2004) ont été décrites comme interagissant avec Rev. Il a notamment été montré que DDX1, DDX3 et DDX5 favoriseraient l'infection virale en agissant comme cofacteurs de Rev dans les étapes tardives du cycle (Fang et al., 2004 ; Liu et al., 2011 ; Zhou et al., 2013).
Une équipe a réalisé une étude protéomique visant à identifier les partenaires cellulaires de Rev (Naji et al., 2012). Dans leur étude, ils ont montré que Rev pouvait interagir avec un grand nombre de facteurs cellulaires (environ 150). De plus, Rev dont la localisation prédominante est nucléaire, semble interagir davantage avec des facteurs nucléaires que cytosoliques. Ils ont également montré que la liaison de Rev à la séquence RRE jouait un rôle dans le recrutement des facteurs. A l'inverse, la liaison de Rev aux facteurs cytoplasmiques est altérée par la présence d'un RRE (Figure 33).

c) Fonction de la protéine Rev dans les étapes tardives du cycle

Plusieurs articles ont mis en évidence que Rev pouvait aussi favoriser la traduction des ARN viraux contenant une séquence RRE en plus de leur export. En effet, il a été montré que Rev augmentait l'association des ARN codant pour les protéines Gag, Vif, Vpr et Vpu/Env avec les polyribosomes (D'Agostino et al., 1992). Ce mécanisme dépendrait de la fixation de Rev à une séquence située dans la région 5'UTR des ARN (Kimura et al., 1996 ; Perales et al., 2005 ; Groom et al., 2009a ; Groom et al., 2009b).

Il a également été montré que Rev pouvait se lier à une boucle de la séquence SL1 du signal d'encapsidation Psi, qui a une structure similaire à celle du site de liaison de Rev dans le RRE (Greatorex et al., 2002). Des mutations diminuant l'affinité de cette boucle pour Rev conduisent à une réduction du nombre de génomes viraux exportés du noyau. Le nombre de virions produits reste inchangé, en revanche, ils sont défectifs pour la réplication. Rev pourrait également être impliquée dans l'encapsidation des ARN viraux (Greatorex et al., 2006 ; Brandt et al., 2007 ; Blissenbach et al., 2010).

d) Rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale

Comme décrit précédemment, notre équipe et celle d'Abraham Loyter ont mis en évidence que la protéine Rev a également un rôle dans l'interférence virale. Brièvement, notre équipe a montré que, dans un contexte de superinfection, la protéine Rev exprimée par le premier virus était nécessaire et suffisante pour interférer avec une seconde infection (Remion et al., 2016). De plus cette interférence est indépendante de l'expression de surface des récepteurs du virus. L'équipe d'Abraham Loyter a observé que la protéine Rev pouvait interagir avec l'intégrase du virus empêchant ainsi l'import nucléaire du complexe de pré-intégration mais également l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte (Rosenbluh et al., 2007b ; Levin et al., 2009 ; Levin et al., 2010a ; Levin et al., 2010b ; Levin et al., 2010c).

e) Rôle de la protéine Rev dans l'activation de la réponse immunitaire

Deux articles ont récemment démontré que Rev et l'export d'ARNv contenant des introns *via* la voie CRM1 seraient détectés par des signaux de dangers de la cellule conduisant à un déclenchement d'une réponse immunitaire innée.

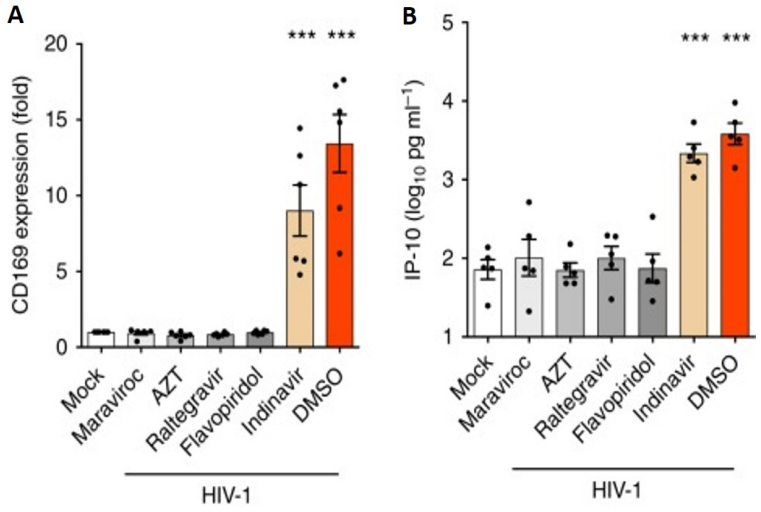


Figure 34 : Les étapes tardives du cycle de replication du VIH-1 induisent une activation immunitaire des macrophages.

Effets des inhibiteurs d'entrée, de transcription inverse, d'intégrase et de protéase sur l'expression de CD169 (B) et d'IP-10 (C) (Akiyama et al., 2018).

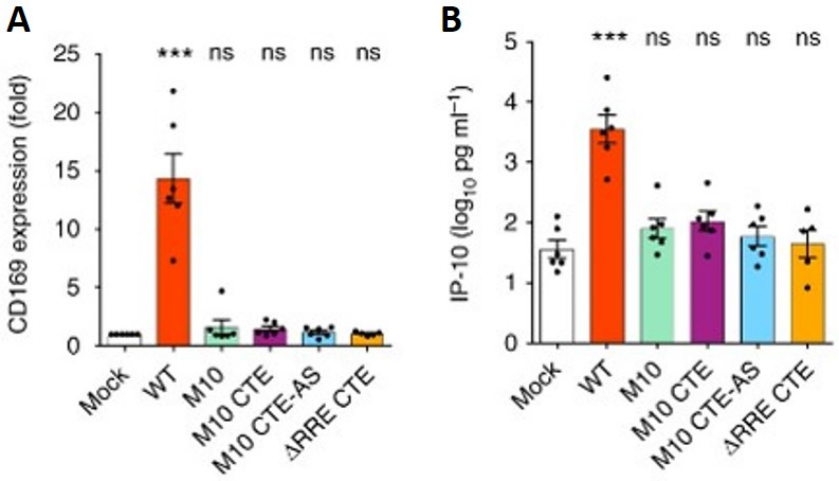


Figure 35 : L'export des ARNci *via* la voie CRM1 est nécessaire pour l'activation des macrophages.

Mesure de l'expression de CD169 (C) et IP-10 (D) après infection avec un virus sauvage ou avec les différentes constructions virales (Akiyama et al., 2018)

Dans un premier article, les auteurs ont observé que l'infection de cellules MDM par le VIH-1 conduit à l'induction d'un certain nombre d'ISG spécifiques des cellules myéloïdes et à la sécrétion de nombreuses molécules proinflammatoires (IFN-α et β, CD169, IP-10, ISG15, ISG54, ISG56, Viperin et Mx1) conduisant à leur activation (Akiyama et al., 2018). Dans une autre étude, les auteurs ont observé que l'infection de cellules dendritiques avec un virus sauvage conduit aussi à l'augmentation de l'expression de nombreuses molécules de costimulation et d'activation : HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD83, CCR7, CD141, ISG15, MX1, IFIT1, CXCL10, IFNB1 et IL15 ainsi qu'à une accumulation d'IFN-α, CCL7, IL-6, CXCL10 et TNF-α dans le surnageant, signe de maturation des cellules dendritiques. En revanche, l'augmentation de l'expression de ces molécules n'est pas observée après infection des cellules avec un lentivirus qui n'exprime pas Rev (entre autre) (McCauley et al., 2018).

Le traitement avant infection des cellules MDM avec des inhibiteurs de fusion, de transcription inverse, d'intégration ou de p-TEFβ (transcription dépendante de Tat) entraine une suppression de l'expression de ces molécules (Figure 34A et B). En revanche, le traitement avec des inhibiteurs de protéase entraine quand même l'expression de ces molécules suggérant que les étapes post-transcriptionnelles activeraient les cellules (Akiyama et al., 2018). Dans l'étude sur les cellules dendritiques, les auteurs ont observé que les étapes de transcription inverse et d'intégration sont nécessaires pour induire la maturation de ces cellules (McCauley et al., 2018). De plus, celle-ci est dépendante de l'expression des protéines Tat et Rev ensemble. En effet, lorsque ces protéines sont exprimées seules, ils n'observent pas l'activation des cellules. Ils ont également observé que lorsqu'ils remplacent le promoteur LTR par un promoteur inductible à la doxycycline, la maturation des cellules dendritiques dépend de l'induction du promoteur. De manière intéressante, le niveau d'expression de CD86 à la surface des cellules matures est dépendant de la concentration en doxycycline, suggérant que la maturation est dépendante du niveau de transcription du provirus.

Pour mesurer l'implication de Rev et sa fonction dans la maturation des cellules dendritiques, les auteurs ont inséré dans leur virus une séquence RTE/CTE (du murine intracisternal A-particle retroelement et du Simian Retrovirus de Type 1) à la place du gène *nef.* Ces deux éléments conduisent à l'export des ARN viraux *via* la voie NXF1 au lieu de la voie CRM1 par Rev. Après infection avec ces virus, les auteurs n'observent pas d'induction de la maturation des cellules dendritiques supposant que celle-ci est dépendante de Rev et de l'export *via* CRM1. De même, le traitement des cellules infectées avec de la leptomycine B (un inhibiteur de CRM1) empêche également la maturation des cellules denditiques. De la même façon, dans les monocytes, les auteurs ont aussi observé que quand des cellules MDM sont infectées avec des virus contenant des mutations affectant l'export des ARN non et mono-épissés (mutant M10 de Rev empêchant l'export des ARN ou des virus contenant des délétions dans le RRE) l'infection des MDM avec ces virus ne conduit pas à l'activation des cellules (Figure 35A et B) (Akiyama et al., 2018)**.** De même, l'insertion de la région CTE du Virus Mason-Pfizer monkey (MPMV) dans ces virus défectifs restaure l'export des ARNv par une autre voie que CRM1 et ne conduit pas à l'induction de CD169 et d'IP-10. Ils ont également observé que les cellules MDM s'activent lorsqu'elles sont infectées avec un lentivirus dont l'export des ARN est dépendant de Rev. En revanche, une infection faite avec un lentivirus dont l'expression protéique est indépendante de Rev ne conduit pas à l'activation des macrophages. De plus, le traitement des cellules avec un autre inhibiteur de CRM1 (KPT-330) inhibe aussi l'induction de CD169 et IP-10. Les auteurs ont également observé que l'infection des macrophages et des lymphocytes T par le VIH-1 conduisait également à leur activation *via* ce mécanisme (McCauley et al., 2018).

Leurs résultats indiquent donc que les ARN non ou partiellement épissés, exportés dans le cytoplasme par Rev *via* la voie CRM1, sont détectés par la cellule comme un signal de danger et induisent l'activation de nombreux facteurs. Cependant, dans les deux études, les auteurs ont supprimé l'expression de nombreux facteurs impliqués dans la signalisation de l'immunité innée (dont RIG-I et MDA5, des senseurs cytosoliques de l'ARN impliqués dans la voie de signalisation des MAVS) et aucun d'entre eux n'affecte la maturation des cellules dendritiques et des macrophages (Akiyama et al., 2018 ; McCauley et al., 2018). En revanche, l'inhibition du facteur MAVS par des shRNA, supprime l'induction de CD169, suggérant qu'un facteur de la voie MAVS non identifié détecterait ces ARN non épissés (Akiyama et al., 2018).

Objectifs

Ce travail de thèse s'est articulé autour de deux grands axes. Le premier axe portait sur les effets des différents sous-types d'IFN-α sur l'inhibition de la réplication virale du VIH-1. Lorsqu'un organisme est infecté par le VIH-1 (ou par d'autres pathogènes), le système immunitaire, en réponse à la détection du virus, déclenche des mécanismes de défense permettant la mise en place d'un état d'interférence virale qui limitera la propagation du virus. Cette réponse précoce est en grande partie médiée par les interférons de type I produits par la cellule infectée ou par des cellules sentinelles et transmise aux cellules avoisinantes. Les interférons de type I sont des cytokines de l'immunité innée qui induisent l'expression de nombreux gènes, les ISG, dont certains sont des facteurs antiviraux. Parmi les IFN de type I, le génome humain code pour 12 sous-types d'IFN-α, présentant de fortes homologies de leur séquence protéique et qui se lient tous au même récepteur de surface, le dimère IFNAR1/IFNAR2. La liaison des IFN-α au récepteur conduit à l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT. Cependant, bien que tous les sous-types se lient au même récepteur, il a été montré que les différents sous-types n'induisent pas les mêmes réponses, notamment antivirales dans le cadre d'une infection VIH-1.

Le premier objectif de ce travail de thèse était de mesurer les effets des 12 sous-types d'IFN-α sur l'inhibition du VIH-1 au niveau du cycle viral. Pour cela, nous avons étudié leurs effets, spécifiquement sur les différentes étapes du cycle de réplication du virus, à la fois dans une lignée de lymphocytes T et dans des lymphocytes primaires. Pour réaliser cela, nous avons utilisé des techniques permettant d'étudier spécifiquement des étapes du cycle du VIH-1, dont l'entrée, la rétrotranscription, l'expression des protéines virales, le bourgeonnement et l'infectiosité des virions néoformés. Nous avons également mesuré les effets des IFN-α sur la prolifération et la mort cellulaire, la modification de ces paramètres pouvant participer indirectement à l'effet antiviral global observé. Enfin, nous avons effectué une analyse du transcriptome après traitement des cellules cibles avec les différents sous-types d'IFN-α, afin d'identifier les gènes induits par chacun. Cette étude du transcriptome, combinée à l'analyse du phénotype de chaque IFN-α au niveau du cycle viral, incite à la recherche de nouveaux facteurs anti-VIH, ciblant des étapes spécifiques de la réplication du virus et permettant également une meilleure compréhension des modes d'action des IFN-α.

Le deuxième axe de cette thèse visait à étudier le rôle de la protéine Rev dans un mécanisme d'interférence virale. Au niveau cellulaire, le virus met en place des mécanismes empêchant une deuxième infection de la cellule, c'est l'interférence virale intrinsèque. Il est admis que l'avantage apporté par l'interférence virale est de réduire l'étendue de la mort cellulaire par apoptose et/ou par toxicité induite par une seconde infection. L'occupation et la sous-expression des récepteurs viraux est un mécanisme bien décrit de l'interférence virale. L'interférence indépendante des récepteurs a également été démontrée, mais ses mécanismes sont moins clairs. Nous avions rapporté le rôle clé de la protéine virale Rev dans l'interférence du VIH-1 indépendante des récepteurs. En supprimant systématiquement chaque gène viral, nous avions montré que l'expression de Rev est responsable de la grande majorité de l'interférence dans les premières 24h suivant l'infection initiale. La protéine virale Rev permet l'export des ARN viraux génomiques complets et des ARNm codant pour les protéines Gag, Pol et Env qui portent une séquence sensible à Rev (RRE). Des domaines distincts dans la protéine Rev permettent sa liaison à l'ARN, sa multimérisation, l'export nucléaire et sa localisation nucléaire.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était d'étudier les mécanismes impliqués dans l'interférence virale médiée par la protéine Rev. Pour cela, nous avons transduit une lignée de lymphocytes T permettant l'expression constitutive de la protéine Rev, soit sous sa forme sauvage, soit contenant des mutations spécifiques qui empêchent une ou deux fonctions de Rev, créant ainsi un système expérimental permettant d'étudier plus spécifiquement le rôle de Rev et

nous affranchir de la première infection. Grâce à ce système et à des techniques permettant de mesurer l'efficacité des différentes étapes du cycle viral, nous avons identifié l'étape impactée par Rev. De même, la construction de lignées cellulaires exprimant des protéines mutantes de Rev nous a permis d'identifier les fonctions de Rev nécessaires à cette interférence. En étudiant l'effet de Rev sur différentes souches virales, nous avons pu identifier différents facteurs cellulaires potentiellement impliqués dans ce mécanisme d'interférence virale. Cette étude a permis de mieux caractériser un phénomène d'interférence indépendant des récepteurs, observé depuis longtemps dans la littérature mais dont les paramètres étaient encore mal connus.

Matériels et Méthodes

I. Cultures cellulaires

Les cellules HEK-293T sont dérivées de la lignée HEK (cellules embryonnaires humaines de rein). Elles expriment l'antigène T du virus simien 40. Elles ont été utilisées pour les productions virales car elles sont facilement transfectables et peuvent produire des hauts titres de virus.
Les cellules TZM-bl sont dérivées de la lignée HeLa (cellules du col utérin). Elles expriment les récepteurs CD4, CCR5, CXCR4 ainsi que les gènes de la β-Galactosidase et de la Luciférase sous le contrôle du promoteur du VIH-1. Elles sont très sensibles pour mesurer l'infectivité des virus.
Les cellules HL116 sont dérivées de la lignée HT-1080 (cellules de fibrosarcome). Elles expriment le gène de la Luciférase Firefly sous le contrôle du promoteur interferon-inducible 6-16 (inductible par les différents IFN-α) et ont été utilisées pour mesurer la force d'induction d'un ISG générique.
Les cellules MT4R5 sont dérivées de la lignée MT4 (lymphocytes T CD4). Elles expriment les récepteurs CCR5 et CXCR4 et sont très susceptibles à l'infection VIH-1.
Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolés par Ficoll à partir de sang de donneurs sains, aliquotés et congelés à -80°C. Avant chaque expérience, les cellules sont décongelées et activées avec 100 unités/mL de phytohémagglutinine (PHA).

Les cellules HEK-293T et TZM-bl sont cultivées en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et des antibiotiques (pénicilline (100 UI/mL) et Streptomycine (100 µg/mL)). Les cellules HL116 sont en plus supplémentées avec du HAT (hypoxanthine (20 µg/ml), thymidine (20 µg/ml), aminoptérine (0.2 µg/ml)).
Les cellules MT4R5 et ses dérivées ainsi que les PBMC sont cultivées en Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Le milieu de culture des PBMC a en plus été supplémenté avec 100 U/mL d'IL-2.
Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide maintenue à 5% de CO_2 et les cultures cellulaires sont divisées deux fois par semaine.

II. Plasmides

Les plasmides exprimant les gènes *rev* sauvage et mutés nous ont été offert par le Professeur Michael Malim. Ces gènes ont été clonés dans un vecteur permettant l'expression du gène par un promoteur fort (pGK) et l'expression de la GFP par un IRES. Pour cela, les gène *rev* des plasmides ont été amplifiés par PCR avec la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies) et les amorces RevBsp119I (foward) 5'-ATTATTTTCGAAATGGCAAGGAAGAAGCGG-3' et RevBglII (reverse) 5'-CAGTGTAGATCTCTAT TCTTTAGCTCCTGATCC-3' permettant d'insérer des sites de restriction Bsp119I et BglII aux deux extrémités du gène. L'ADN amplifié a ensuite été digéré et ligué dans le vecteur pGK-IRES-GFP préalablement digéré avec les enzymes Bsp119I et BamHI donnant les plasmides pGK.Rev.eGFP.

III. Productions virales

Tous les virus ont été produits par transfection des cellules HEK-293T avec du JetPei (Dna transfection Reagent jetPEI, Polyplus, ref 101-10N) selon les instructions du kit avec un ratio ADN/JetPei de 1/2. La veille de la transfection, 1 million de cellules sont ensemencées en flacon de culture T75 cm^2. Le lendemain, le milieu de culture est changé 2 heures avant la transfection. Les cellules sont transfectées avec :

Virus	Quantité de plasmide
NLAd8 réplicatif	8 µg de pNLAd8
NL4-3-HSA réplicatif	8 µg de pNL4-3-IRES-HSA
Virus chimères Vpr-Blam	12 µg de pLN4-3Δenv + 4 µg de pEnv (Ad8 ou SRα) + 4 µg pVpr-Blam
Virus pseudotypés	7 µg de pLN4-3ΔenvHSA ou pLN4-3ΔenvGFP + 1 µg de pEnv (Ad8 ou SRα ou VSVg)
Virus Luciférase	7 µg de pLN4-3ΔenvLuc + 1 µg de pEnvAd8
Bru	7 µg de pBruΔenv +1 µg de pVSVg
NL4-3-N74D	7 µg de pNL4-3N74D + 1 µg de pVSVg
Virus défectif pour Rev	7 µg de pNL4-3Rev- + 1 µg de pRev
Vecteurs Rev sauvage ou mutant	12 µg de pR8.74 + 5 µg pGK.Rev.eGFP + 3 µg de pVSVg + 2 µg pCMV-Rev
Lentivirus	12 µg de pR8.74 + 5 µg pGK.Empty.eGFP+ 3 µg de pVSVg + 2 µg pCMV-Rev
HxB2	7 µg de pHxB2 + 1 µg de pVSVg
STCOR1	7 µg de pSTCOR1 + 1 µg de pVSVg
Ad17	7 µg de pAd17 + 1 µg de pVSVg
CH040	7 µg de pCH040 + 1 µg de pVSVg
CH077	7 µg de pCH077 + 1 µg de pVSVg
Virus codant Tat et Rev	12 µg de pR8.74 + 5 µg pTatRev + 3 µg de pVSVg + 2 µg pCMV-Rev
Virus codant Tat	12 µg de pR8.74 + 5 µg pTat + 3 µg de pVSVg + 2 µg pCMV-Rev

Tableau 1 : Liste et quantité des plasmides utilisés pour produire les différents virus.

Le lendemain des transfections, le milieu est retiré et du PBS est ajouté. Le PBS est ensuite retiré et du milieu frais est ajouté. Deux jours après la transfection, le surnageant est récolté, centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes et filtré (0,45 µm). Les lentivirus et les vecteurs Rev ont en plus été ultracentirifugés pendant 1h30 à 98 000g puis resuspendu dans du RPMI afin de les concentrer 10 fois. Les surnageants sont ensuite aliquotés et stockés à -80°C. La concentration en ng/mL de protéine virale p24 est estimée par un test ELISA (INNOTEST HIV antigen mAb, InGEN, Ref 80564) selon les instructions du kit.

IV. qPCR

Toutes les qPCR ont été réalisées avec le kit FastStart Essential DNA Probes Master (Roche, ref 06402682001) sur un LightCycler 96 Roche.

qPCR gag : la réaction a été faite avec les amorces gag Foward : 5'- TAGAGGTAAAAGACACCAAGGA, gag Reverse : 5'- ATGTCCCCCCACTGTGTTTA, sonde gag: 6[FAM]AGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCA GAAGTAAT ACCC[TAM]). Une étape de préincubation à 50°C pendant 2 minutes puis 95°C pendant 15 minutes (1 cycle) est faite, puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 secondes et une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes (40 cycles).

qPCR actine : la réaction a été faite avec les amorces Actine Foward : 5'- AACACCCCAGCCATGTACG T, Actine Reverse : 5'-CGGTGAGGATCTTCATGAGGTAGT, sonde Actine : 5'-[6FAM]CCAGCCAGGTCC AGACGCAGGA[TAM]). Une étape de préincubation à 50°C pendant 2 minutes puis 95°C pendant 15 minutes (1 cycle) est faite, puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 secondes et une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes (40 cycles).

qPCR 2 LTR : la réaction a été faite avec les amorces 2 LTR Foward : 5'AACTAGGGAACCCACTGCTT AAG ; 2 LTR Reverse : 5'TCCACAGATCAAGGATATCTTGTC ; Sonde 2 LTR : 5'[6FAM]ACACTACTTGAA GCACTCAA GGCAAGCTTT[TAM]. Une étape de préincubation à 50°C

pendant 2 minutes puis 95°C pendant 10 minutes (1 cycle) est faite, puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes et une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes (40 cycles).

qPCR des génomes intégrés (Alu) : une étape de préamplification est réalisée sur 50 000 cellules/puits avec l'enzyme Superfi (Platinium™, SuperFI™ Master Mix PCR, Thermofisher, 12358250) et les amorces Alu166 : 5'-TCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGG ; Aluλ : 5'-ATGCCACGTAA GCGAAACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGG ; Alu2 : 5'-GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG. Une étape de préincubation à 95°C pendant 2 minutes (1 cycle) est faite, puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes puis une étape d'hybridation à 60°C pendant 10 secondes et une étape d'extension à 68°C pendant 5 minutes (18 cycles) et enfin une incubation de 5 minutes à 68°C. Les produits de préamplification sont ensuite dilués au 20^{e} puis une qPCR Alu est faite avec les amorces AE3013 : 5'-ATGCCACGTAAGCGAAACTC ; Alu AE990 : 5'-CTGACTAAAAG GGTCTGAGG ; Sonde Alu : 5'- [6FAM]TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA GTGC[TAM]) Une étape de préincubation à 50°C pendant 2 minutes puis 95°C pendant 15 minutes (1 cycle) est faite, puis une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis une étape d'hybridation à 58°C pendant 30 secondes et une étape d'extension à 72°C pendant 30 secondes (45 cycles).

V. Marquages

A- Gag

200 000 cellules sont centrifugées à 900 g pendant 3 minutes et le surnageant est retiré. Les cellules sont fixées avec de la PFA1% pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont centrifugées 3 min à 900 g et la PFA est retirée. Le culot cellulaire est lavé avec une solution de PBS-BSA1% puis une solution de PBS-BSA1%-saponine1X avant d'être incubées avec un anticorps anti-Gag (KC57-RD1, Beckman, ref 6604667) dilué au 1/400 final dans la solution de PBS-BSA1%-saponine1X pendant 30 min à 4°C dans le noir. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec une solution de PBS-BSA1%-saponine 1X puis une fois avec une solution de PBS-BSA 1%. Les cellules sont ensuite resuspendues dans la solution de PBS-BSA 1%. L'intensité de fluorescence de l'anticorps est ensuite mesurée par cytomètrie en flux.

B- HSA

200 000 cellules sont centrifugées à 400 g pendant 3 minutes et le surnageant est retiré. Les cellules sont lavées 2 fois avec une solution de PBS-BSA1% puis incubées 10 minutes avec du sérum humain. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-HSA (PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD24 Clone ML5 (RUO), BD Pharmingen, ref 561647) dilué au 1/200 final dans une solution de PBS-BSA1% pendant 30 min à 4°C dans le noir. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec une solution de PBS-BSA1% puis fixées avec de la PFA 1% pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans une solution de PBS-BSA 1%. L'intensité de fluorescence de l'anticorps est ensuite mesurée par cytomètrie en flux.

VI. Analyses

Les données de cytométrie en flux ont été acquises sur Canto II et Attune. Toutes les analyses de cytométrie en flux ont été faites avec le logiciel FlowJo. Les analyses statistiques ont

été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1

VII. IFN-α

Les IFN-α utilisés proviennent du kit Human Interferon Alpha Sampler Set (pbl assay science, ref 11002-1). Le kit est conservé à -80°C. Avant les expériences, les IFN sont dilués dans du RPMI à une concentration de 1000 ng/mL, aliquotés dans 10 µL et conservés à -20°C. Chaque aliquot est utilisé pour une seule expérience.

VIII. Tests de prolifération cellulaire

Les tests de prolifération ont été effectués grâce au CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (Invitrogen™ CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen, ref C34554). 25 millions de cellules MT4R5 ou de PBMC sont prélevées et centrifugées 5 minutes à 300g. Le milieu est retiré et les cellules sont reprises en suspension avec du PBS. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 300g pendant 5 minutes et le PBS est retiré. Les cellules sont incubées à une concentration de 10^6 cellules/mL dans du PBS contenant 5% de SVF et du CFSE à une concentration de 2,5 µM/mL pendant 10 minutes à température ambiante puis ensemencées en plaques 24 puits à une concentration de 400 000 cellules/mL. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. Une partie des cellules est prélevée à J0, J1, J2 et J3, centrifugée à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et les cellules sont fixées avec de la PFA 1%. L'intensité de fluorescence du CFSE est ensuite mesurée par cytomètrie en flux sur un Canto II (excitation à 488 nm, émission à 517 nm).

IX. Tests de mortalité cellulaire

Les tests de mortalité cellulaire ont été effectués avec du Live/Dead (LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Invitrogen, Ref L34964). Des cellules MT4R5 ou PBMC sont ensemencées en plaques 24 puits à une concentration de 400 000 cellules/mL. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec 2 ng/mL pour les MT4R5 ou 0,4 ng/mL pour les PBMC de chaque sous-type d'IFN-α. Une partie des cellules est prélevée à J0, J1, J2 et J3, centrifugée à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et les cellules sont reprises en suspension avec du PBS. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 300g pendant 5 minutes et le PBS est retiré. Les cellules sont incubées à une concentration de 10^6 cellules/mL dans du PBS contenant du Live/Dead (dilué au 1000ème) pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et les cellules sont fixées avec de la PFA 1%. L'intensité de fluorescence du Live/Dead est ensuite mesurée par cytomètrie en flux sur un Canto II (excitation à 416 nm, émission à 451 nm).

X. Mesure de l'activité des IFN-α sur les cellules HL116

Des cellules HL116 sont ensemencées en plaques 96 puits noires à fond plat (20 000 cellules/puits). Le lendemain, les cellules sont traitées avec chaque sous-type d'IFN-α à des concentrations allant de 10 ng/mL à 0,032 ng/mL (dilutions de 5 en 5).
6h après l'ajout d'IFN le milieu est retiré et les cellules sont reprises en suspension avec du PBS. Les cellules sont ensuite lysées pendant 10 min à température ambiante. L'activité luciférase est

mesurée avec le kit Luciferase Assay System (Promega, Ref E4550) grâce à un appareil Varioscan, programmé pour injecter le substrat de la luciférase dans chaque puits, avec 2 secondes de délai entre l'injection et la lecture puis 10 secondes d'intégration.

XI. Réplication virale mesurée en cycles multiples

2 millions de cellules MT4R5 sont ensemencées en plaque 12 puits à une concentration de 1 million de cellules/mL. Les cellules sont traitées avec les différents sous-types d'IFN-α à une concentration finale de 2 ng/mL. 24h après, les cellules sont exposées à une faible MOI (1 ng de p24/mL) de virus NLAd8 réplicatif pendant 2 heures. Puis elles sont centrifugées à 600 g pendant 5 minutes, le surnageant est retiré et remplacé par du milieu frais contenant de l'IFN-α à une concentration finale de 2 ng/mL. Les cellules sont ensuite ensemencées à 300 000 cellules/mL. Chaque jour pendant 11 jours, une partie des cellules est prélevée, fixée avec de la PFA1%. L'infection est suivie par marquage de la protéine Gag. Tous les 2 ou 3 jours, du milieu frais contenant 2 ng/mL final d'IFN-α est ajouté.

XII. Infection en cycle unique

A- Avec un virus sauvage

200 000 cellules MT4R5 sont encemencées en plaque 96 puits à une concentration de 1 million de cellules/mL. Les cellules sont traitées avec les différents sous-types d'IFN-α à une concentration finale de 2 ng/mL. 24h après, les cellules sont exposées à un virus NLAd8 réplicatif (10 ng de p24/mL). 24h après l'infection, les cellules MT4R5 sont traitées avec 10 µM de névirapine afin de ne regarder les effets que d'un seul cycle de réplication virale. 48h après infection, l'inhibition de l'infection est mesurée par cytométrie en flux après marquage de la protéine Gag.

B- Avec un virus exprimant la luciférase

200 000 cellules MT4R5 ou PBMC sont ensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 1 million de cellules/mL. Les cellules sont traitées avec les différents sous-types d'IFN-α à une concentration finale de 2 ng/mL pour les cellules MT4R5 et de 0,4 ng/mL pour les PBMC. 24h après, les cellules sont exposées à un virus exprimant la luciférase (20 ng de p24/mL pour les cellules MT4R5 et 100 ng/mL pour les PBMC). 48h après infection, l'inhibition de l'infection est évaluée par mesure de l'activité luciférase e avec le kit Renilla Luciferase Assay System (Promega, Ref E2820) grâce à un appareil Varioscan, programmé pour injecter le substrat de la luciférase dans chaque puits, avec 2 secondes de délai entre l'injection et la lecture puis 10 secondes d'intégration.

XIII. Test de fusion (Vpr-β-Lactamase)

Les tests de fusion ont été réalisés en utilisant des virus chimères dont la protéine Vpr a été fusionnée avec la β-Lactamase. Des cellules MT4R5 sont traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après, 300 000 cellules sont prélevées et infectées avec 50 ng de p24 d'un virus Vpr-Blam portant une enveloppe CCR5 (Ad8) ou 10 ng de p24 d'un virus Vpr-Blam portant une enveloppe CXCR4 (SRα) pendant 4h à 37°C sous agitation (1200 rpm pendant 30 secondes toutes les 3 minutes). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du milieu CO_2 indépendant

complémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et des antibiotiques (pénicilline (100 UI/mL). Puis les cellules sont incubées toute la nuit dans le même milieu en présence de CCF2 (LiveBLAzer™ FRET-B/G Loading Kit with CCF2-AM, Invitrogen, Ref K1032). Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du milieu CO_2 indépendant et deux fois avec du PBS puis fixées avec de la PFA1%. Après fixation, les cellules sont lavées une fois avec du PBS-BSA 5%-Saponine 1% puis resuspendues dans du PBS-BSA 5%. L'intensité de fluorescence du CCF2 est ensuite mesurée par cytomètrie en flux sur un Canto II (excitation à 405 nm, émission du CCF2 non clivé à 518 nm et émission du CCF2 clivé à 447 nm).

XIV. Test d'efficacité de la transcription inverse

Des cellules MT4R5 sont traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, les cellules sont infectées avec un virus NLAd8 « propre » (à une concentration de 10 ng de p24/mL). Après production par transfection, le virus NLAd8 est cultivé sur des cellules MT4R5 pendant une semaine avec plusieurs lavages afin d'éliminer les restes d'ADN viral plasmidique provenant de l'ADN utilisé pour faire la transfection. 7h et 24h post-infection une partie des cellules est prélevée et l'ADN est extrait selon les instructions du kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Ref 51106). L'efficacité de la transcription inverse est mesurée par qPCR ciblant le gène *gag.* Les résultats sont normalisés par rapport au nombre de copies de gag par cellules calculées après qPCR du gène *actine*.

XV. Test d'efficacité de bourgeonnement

15 millions de cellules MT4R5 sont infectées avec un virus NLAd8 (10 ng de p24/mL) en flacon T75 cm^2 à une concentration de 1 million de cellules/mL. 16h post-infection, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis reprises à 1 million de cellules/mL dans du RPMI frais. Elles sont ensuite ensemencées en plaques 24 puits puis traitées avec les différents sous-types d'IFN-α à une concentration finale de 2 ng/mL. 24h après traitement, les surnageants et les culots cellulaires sont récoltés puis lysés. La concentration virale de l'antigène p24 des deux fractions est mesurée par test ELISA et l'efficacité de bourgeonnement est calculée selon la formule :

$$\text{Efficacité de bourgeonnement } = \frac{[\text{p24}]\text{SN}}{[\text{p24}]\text{SN} + [\text{p24}]\text{culot}}$$

Une partie des surnageants est prélevée et conservée à -80°C pour effectuer les tests d'infectivité résiduelle.

XVI. Test d'infectivité résiduelle

Des cellules TZM-bl sont ensemencées en plaque 96 puits à fonds plats (10 000 cellules/puits). Le lendemain, les cellules sont infectées avec les virus produits en présence des différents sous-types d'IFN-α (Voir section : Test d'efficacité de bourgeonnement) à une concentration de 5 ng d'antigène p24/mL. 48h post-infection, le milieu est retiré, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées. L'activité β-Galactosidase est mesurée avec selon les instructions du kit βGal Reporter Gene Assay (Roche, Ref 11758241001). La luminescence est mesurée sur un appareil Varioscan.

XVII. Analyses RNAseq

Le séquençage de l'ARN a été effectué dans des cellules MT4R5 traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α pendant 24h. L'extraction ARN, le séquençage à haut débit et l'analyse des données ont été faits par la plateforme génomique du Centre de Recherche du CHU de Québec de l'Université de Laval (Canada). Le kit NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New Englands Biolabs, Ref NEB #E7765) a été utilisé pour préparer les librairies de séquençage d'ARN total, en suivant les instructions du fabricant. Les librairies ont été préparées avec 100 ng d'ARN total. L'ARN ribosomique (ARNr) cytoplasmique et mitochondrial a été éliminé par une méthode basée sur la RNaseH (NEBNext rRNA depletion kit ; New Englands Biolabs, Ref NEB #E7400). Puis l'ARN a été purifié avec des billes (RNAClean XP beads ; Beckman Coutler, Ref A63987) et fragmenté à l'aide de cations divalents à température élevée. L'ARN fragmenté a été utilisé comme matrice pour la synthèse d'ADNc par transcriptase inverse avec des amorces aléatoires. La spécificité du brin a été obtenue en remplaçant les dTTP par des dUTP. Cet ADNc a ensuite été converti en ADN double brin et réparé en bout de brin. La ligation des adaptateurs a été suivie par une étape de purification des fragments PCR (AxyPrep Mag PCR Clean-up Kits, Axygen), par une excision des brins contenant des dUTP. Puis une étape d'enrichissement de 11 cycles a été faite pour incorporer des adaptateurs indexés spécifiques pour le multiplexage. La qualité des librairies amplifiées a été examinée par une analyse DNA screentape D1000 sur TapeStation 2200 et la quantification a été faite sur le fluorimètre QuBit 3.0 (ThermoFisher Scientific, Ref Q33216). Puis les librairies totales d'ARN indexés ont été regroupées de manière équimolaire et séquencées sur un système HiSeq 2500 V4 (Illumina) à la plateforme de séquençage Next-Generation Sequencing Plateform, Genomics Center, CHU de Québec-Université Laval Research Center, Québec City, Canada. Les lectures ont été ajustées à l'aide de Trimmomatic v0.36 avec les options suivantes : TRAILING:30, SLIDINGWINDOW:4:20 et MINLEN:30. Toutes les autres options utilisaient les valeurs par défaut. Un contrôle de qualité a été effectué sur les données brutes et ajustées pour garantir la qualité des lectures à l'aide de FastQC v0.11.5 et MultiQC v1.5. La quantification a été effectuée avec Kallisto v0.44. L'analyse d'expression différentielle a été effectuée dans R v3.5.0 en utilisant le DESeq2 v1.20.0.

Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale

XVIII. Création des lignées MT4R5

500 000 cellules MT4R5 ont été infectées avec 100 µL de chaque vecteur Rev sauvage ou mutant ultracentrifugé pendant 2h à 37°C. Puis les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 300 g et le milieu a été changé. Les cellules ont ensuite été maintenues en culture pendant deux semaines en faisant des lavages PBS réguliers avant d'être triées sur un Aria 3 afin d'obtenir une population de cellules totalement positives à la GFP.

XIX. Western Blot des proteines Rev et actine

5 millions de cellules MT4R5 ou de cellules transduites avec la protéine Rev sauvage ou mutée ont été lysées dans du tampon RIPA 1X (NaCl 150 mM, NP40 1%, Sodium deoxycholate 0,1%, SDS 0,1%, Tris-HCl pH8 50 mM). Après quantification des protéines totales par un test de Bradford (Biorad, Ref 5000001) selon le protocole fourni par le fabricant, 50 µg de chaque lysat sont resuspendus dans du tampon de Laemmli 1X (TrisHCl 0,2 M, Glycerol 40%, beta-mercaptoéthanol 10 mM, SDS 10%, bromophénol bleu 0,05%) et chauffés 5 min à 95°C. Le

mélange est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide (NUPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, Thermo-Fischer, Ref NP0329PK2) durant 1 h à 160 Volt dans un tampon adapté (MOPS SDS Running Buffer 1X, Thermo-Fischer). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane polyvynilidene difluoride (PVDF, Immobilon 0,45 µm, Millipore) préalablement activée au méthanol à 400 mA durant 1h30. La membrane est saturée avec du PBS complété avec 0,5% de tween 0 et 5% de lait en poudre écrémé (Régilait), pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire anti-Rev (HIV1 Rev antibody, Fitzgerald, Ref 20-HS73) dilué au 1/5000 dans du PBS Tween20 0,5% lait 5%, à 4°C toute la nuit, sous agitation. Après trois lavages au PBS Tween20 0,5%, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire (Rabbit anti-Sheep IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Thermofisher, Ref 31480) dilué au 1/5000. Après 3 lavages, la membrane est révélée après ajout du substrat de l'enzyme (Immobilon, Millipore). Pour normaliser avec la quantité d'actine, la membrane est ensuite incubée avec un anticorps anti-actine (Anti-β-Actin antibody, Mouse monoclonal, Sigma A1978) dilué au 1/1000 puis incubée avec un anticorps secondaire (Mouse IgG HRP Linked Whole Ab, Sigma, Ref GENA931-1ML) dilué au 1/1000. La chemoluminescence a été acquise grâce à une caméra (MyECL Imager, Thermo Fischer) et les images analysées sur le logiciel ImageJ.

XX. Mesure de la transcription inverse, de l'import et de l'intégration

1 million de cellules MT4R5 Rev sauvage ou mutant sont infectées avec un virus NL4-3-HSA « propre » (15 ng de p24/mL). Après production par transfection, le virus NL4-3-HSA est cultivé sur des cellules MT4R5 pendant une semaine avec plusieurs lavages afin d'éliminer les restes d'ADN viral plasmidique provenant de l'ADN utilisé pour faire la transfection. 24h post-infection l'ADN est extrait selon les instructions du kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Ref 51106). L'efficacité de la transcription inverse est mesurée par qPCR ciblant le gène *gag.* Les résultats sont normalisés par rapport au nombre de copies de gag par cellules calculées par qPCR de l'actine. L'efficacité de l'import nucléaire est mesurée par qPCR 2 LTR. Les résultats sont normalisés par rapport au nombre de copies gag. L'intégration est mesurée par qPCR Alu.

XXI. Mesure de l'expression protéique

200 000 cellules MT4R5 Rev sauvage ou mutant sont infectées avec un virus NL4-3-HSA, NL4-3Rev-, Bru, NL4-3-N74D, Ad17, STCOR1, HxB2, CH040 ou CH077. 24h post-infection, les cellules sont traitées avec 10 µM de névirapine. 48h post-infection, un marquage HSA extracellulaire et/ou gag intracellulaire est fait selon les conditions. Le pourcentage de cellules infectées est mesuré par cytométrie en flux.

XXII. Mesure de l'interférence d'un lentivirus

200 000 cellules MT4R5 sont infectées avec un virus NL4-3ΔenvHSA ou un lentivirus codant Tat et Rev ou juste Tat et la protéine HSA (avec 30 ng de p24 par puits). 24h post-infection, les cellules sont infectées soit avec 100 ng de p24 d'un virus NL4-3ΔenvGFP soit 200 ng de p24 d'un lentivirus exprimant seulement la GFP. 24h après la seconde infection, un marquage HSA extracellulaire est fait et le pourcentage de cellules infectées est mesuré par cytométrie en flux.

Résultats

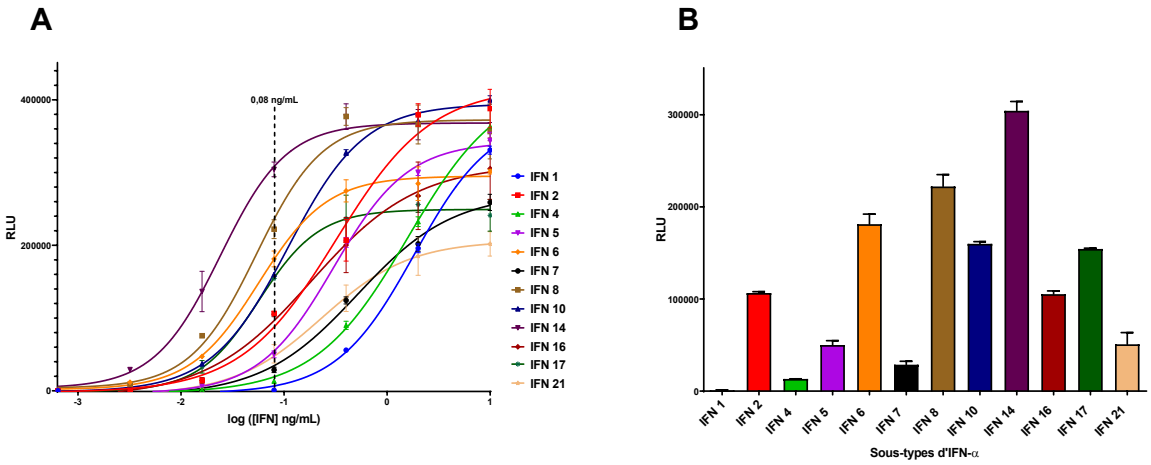


Figure 36 : Mesure de la puissance d'induction d'un ISG par les différents sous-types d'IFN- α.

Des cellules HL116 ont été traitées avec des doses croissantes d'IFN-α (de 0,0032 à 10 ng/mL). 6h après traitement, les cellules sont lysées puis mises en présence du substrat de la luciférase. L'activité de la luciférase est ensuite mesurée (A). Dans le panneau (B) sont représentées les valeurs obtenues à 0,08 ng/mL d'IFN (résultats de 3 expériences indépendantes).

Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1

Notre étude visait à approfondir nos connaissances des effets de chaque sous-type d'IFN-α sur le cycle de réplication virale du VIH-1. Pour cela, nous avons décrypté leurs effets sur différentes étapes du cycle mais également sur la mort et la prolifération cellulaire. Pour associer les effets observés au niveau des étapes virales avec les facteurs de restriction déjà connus et dans l'espoir d'en identifier de nouveaux, nous avons également effectué une analyse complète de l'expression du génome en RNAseq des cellules traitées.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des concentrations massiques d'IFN-α plutôt que des unités internationales, plus classiquement utilisées dans la littérature. Ce choix est partagé par les auteurs qui travaillent sur les sous-types d'IFN. En effet, les unités sont définies par rapport à leur effet antiviral sur un virus, généralement celui de la stomatite vésiculaire (VSV) et donc leur utilisation introduirait un biais pour une étude sur l'inhibition de la réplication du VIH-1.
Nos expériences ont été réalisées avec 0,4 ng/mL d'IFN-α sur cellules primaires et 2 ng/mL sur la lignée cellulaire ce qui correspond à environ 100 et 500 UI/ml pour l'IFN-α2, une plage de concentrations classiquement utilisée dans les études sur l'IFN-α. Ces doses ont été choisies car elles nous permettent de voir des effets antiviraux assez différents entre chaque sous-type mais n'inhibe pas totalement la réplication virale, et l'effet sur la prolifération cellulaire est mineur.
La majorité de nos expériences ont été réalisées dans une lignée lymphocytaire, les cellules MT4R5. Nous avons choisi cette lignée car elle présente l'avantage d'être susceptible à la fois à des souches VIH-1 de tropsime R5 et X4. De plus, ces cellules répondent à l'IFN-α de manière similaire à des lymphocytes primaires et n'en produisent pas suite à une infection (Lepelley et al., 2011).

I. Puissance d'induction d'un ISG générique par chaque sous-type d'IFN-α

Il a précédement été décrit que chaque sous-type d'IFN-α présentait une puissance d'induction différente des ISG due à leur affinité respective pour leur récepteur IFNAR1/IFNAR2 (Lavoie et al., 2011). Nous avons commencé notre étude en mesurant la puissance d'induction d'un ISRE par chaque sous-type d'IFN-α.
Nous avons utilisé les cellules HL116 qui portent un gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un élément ISRE du promoteur du gène 6-16, un gène non antiviral impliqué dans l'apoptose. Nous avons traité ces cellules HL116 avec des doses croissantes (3,2 pg à 10 ng/mL) de chaque sous-type d'IFN-α. 6h post-traitement, les cellules ont été lysées et l'activité de la luciférase a été mesurée (Figure 36).

Les résultats présentés dans la Figure 36A montrent que tous les IFN-α sont capables d'induire l'expression du gène rapporteur et ceci même à des doses très faibles (quelques picogrammes pour les IFN les plus puissants). De plus, cette capacité d'induction est dose-dépendante pour tous les sous-types. Ils montrent également que tous les sous-types présentent des efficacités d'induction très variables. En effet, à la concentration de 0,08 ng/mL d'IFN-α (Figure 36B), concentration à laquelle tous les IFN sont dans la phase linéaire, l'IFN-α14 est le plus puissant pour induire ce gène, suivi des sous-types 8, 6, 10 et 17. Les IFN-α2, 16, 21, 5, 7 et 4 présentent

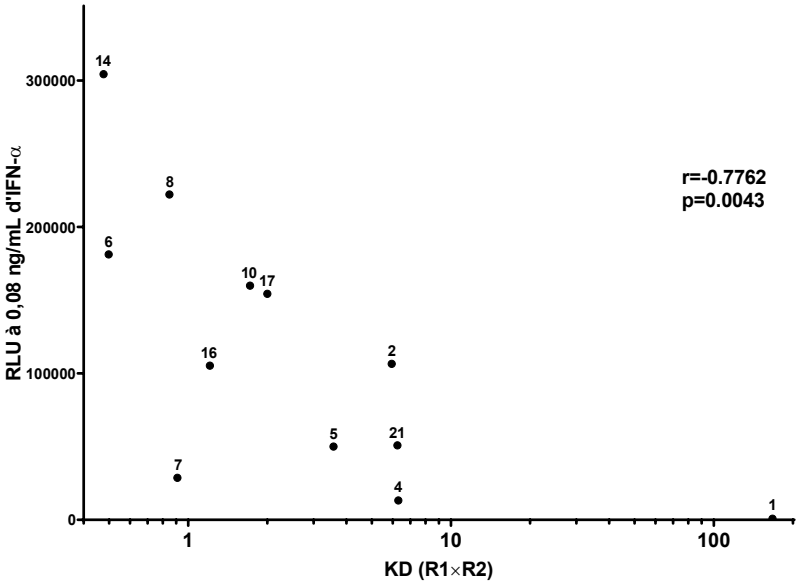


Figure 37 : Corrélation entre l'affinité des sous-types d'IFN-α pour leur récepteur et leur capacité à induire l'activation de l'élément ISRE.

Corrélation entre l'affinité de chacun des sous-types pour le récepteur IFNAR1/IFNAR2 (Lavoie et al., 2011) et l'activité luciférase mesurée dans notre laboratoire après traitement des cellules HL116 avec 0,08 ng/mL de chaque IFN-α (Spearman r=-0.7762, p (two-tailed)=0,0043 **).

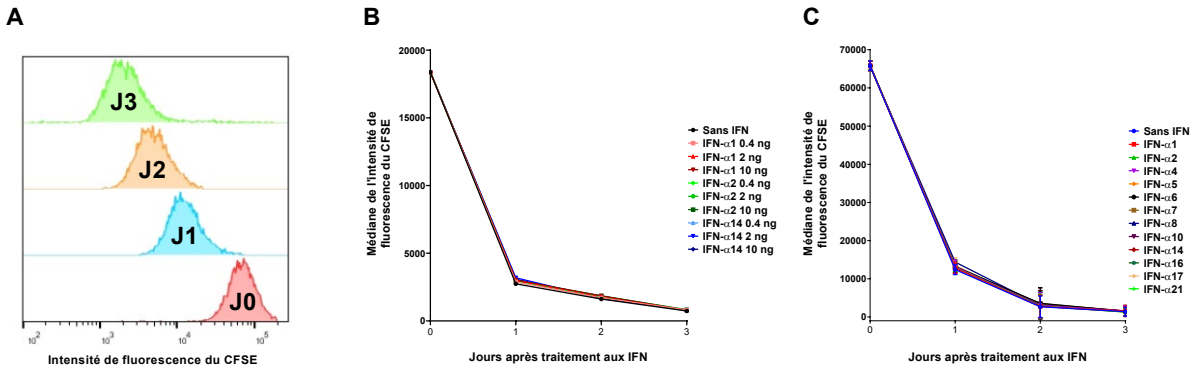


Figure 38 : Mesure de l'effet des différents sous-types d'IFN-α sur la prolifération cellulaire.

Des cellules MT4R5 ont été incubées en présence de CFSE puis la médiane de l'intensité de fluorescence a été mesurée à J0, J1, J2 et J3 (A). Médianes des intensités de fluorescence mesurées par cytométrie en flux au cours du temps de cellules MT4R5 marquées au CFSE, puis traitées avec 0,4 ou 2 ou 10 ng/mL d'IFN 1 ou 2 ou 14 (résultats d'une seule expérience) (B) ou avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α (résultats de 2 expériences indépendantes) (C).

des puissances d'activation plus modérées. Le sous-type 1 conduit à la plus faible induction de luciférase qui est quasi-nulle à cette dose.

On observe également qu'il existe une corrélation entre la puissance d'induction du gène de la luciférase que nous avons mesurée et l'affinité calculée des sous-types pour leur récepteur hétérodimérique IFNAR1/IFNAR2 (Lavoie et al., 2011). En effet, les sous-types 14, 6 et 8 qui ont la plus forte affinité, sont également les plus puissants dans l'induction de la luciférase (Figure 37). De même, l'IFN-α1 qui a l'affinité la plus faible, conduit également à l'induction la plus faible de la luciférase. Les autres sous-types qui ont des affinités intermédiaires entrainent également une activation plus modérée de l'ISRE. Nos résultats sont donc en accord avec ceux précédemment décrits dans la littérature.

II. Rôle des IFN-α dans la prolifération et la viabilité cellulaire

Les IFN-α sont connus pour avoir des effets sur la prolifération et la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Tough et al., 1996 *;* Akbar et al., 2000 *;* Dondi et al., 2004). Nous avons testé leurs effets sur la lignée cellulaire MT4R5 ainsi que sur des lymphocytes primaires pour déterminer si l'effet antiviral des IFN-α sur le VIH-1 pouvait être en partie dû à un changement dans la prolifération et la mort des cellules.

A- Effet des IFN-α sur la prolifération cellulaire des cellules MT4R5

Pour étudier la prolifération cellulaire des cellules MT4R5, celles-ci ont été marquées au CFSE, un colorant qui lie de manière covalente toutes les amines libres présentes à la surface et à l'intérieur des cellules. A chaque division cellulaire, la quantité de CFSE présente dans la cellule est divisée entre les cellules filles. La prolifération cellulaire peut alors être mesurée par cytométrie en flux en suivant la décroissance de l'émission de fluorescence des cellules. Les cellules MT4R5 étant une lignée de cellules immortalisées, les cellules se multiplient rapidement et de manière similaire entre elles, on observe alors qu'un seul pic de fluorescence chaque jour (Figure 38A).

Pour mesurer les effets des IFN-α sur la prolifération cellulaire, les cellules MT4R5 ont été marquées au CFSE puis traitées avec chaque sous-type d'IFN-α. Puis chaque jour pendant 3 jours, une partie de la culture a été prélevée, fixée et analysée par cytométrie en flux. Pour mesurer la prolifération, la médiane de l'émission de fluorescence pour chaque condition a été calculée. Lorsqu'on traite les cellules avec 3 doses (0,4, 2 et 10 ng/mL) de 3 IFN-α, l'IFN-α1 qui est le moins puissant dans l'induction de l'ISG, l'IFN-α14 qui est le plus puissant et l'IFN-α2 qui est le plus classiquement utilisé, on observe que toutes les courbes se superposent parfaitement signifiant qu'il n'y a pas de retard de prolifération cellulaire après traitement par rapport aux cellules non traitées (Figure 38B). On observe les mêmes résultats lorsqu'on traite les cellules MT4R5 avec chaque sous-type d'IFN à 2 ng/mL d'IFN-α, toutes les courbes se superposent (Figure 38C). Les 12 sous-types d'IFN-α n'ont donc pas d'impact sur la prolifération cellulaire des cellules MT4R5 à cette dose.

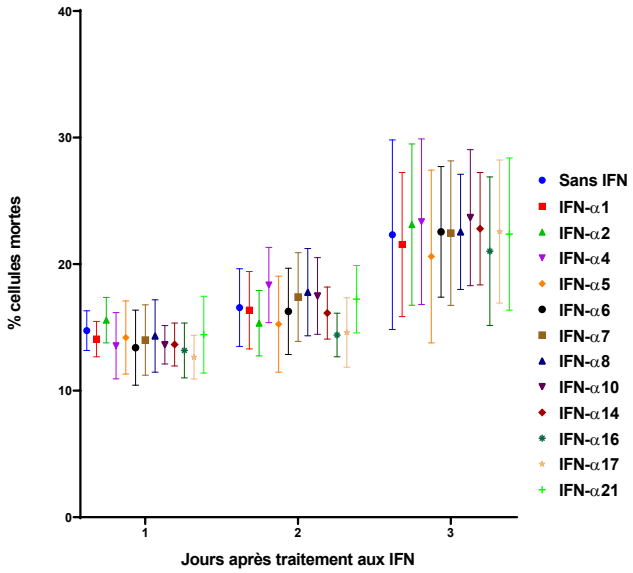


Figure 39 : Mesure de l'effet des différents sous-types d'IFN- α sur la mort cellulaire.

Des cellules MT4R5 ont été traitées avec 2 ng/mL d'IFN-α. Chaque jour pendant 3 jours après traitement, les cellules ont été incubées avec un marqueur de mort cellulaire, le Live/Dead. La mort cellulaire est ensuite mesurée par cytométrie en flux (résultats de 3 expériences indépendantes).

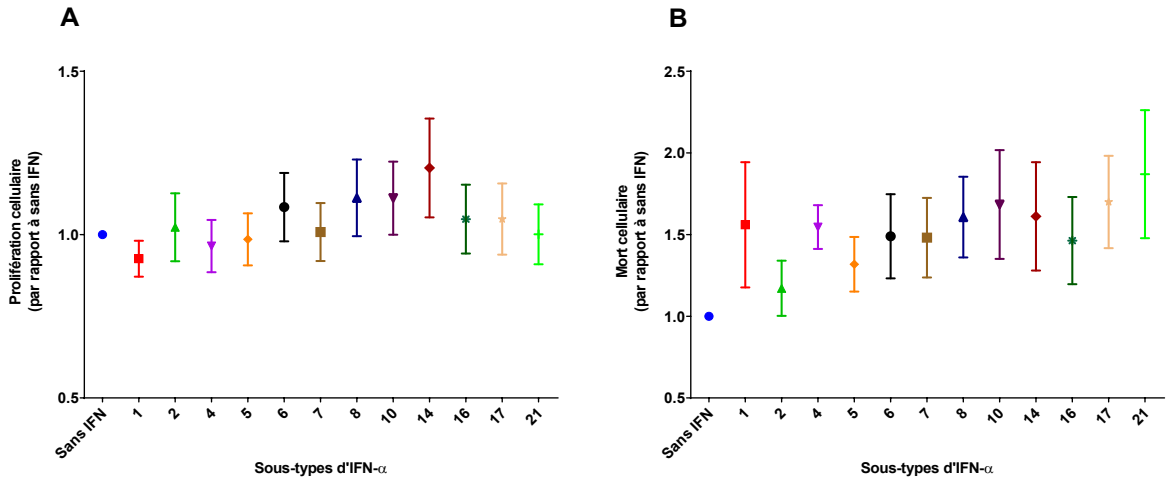


Figure 40 : Mesure de l'effet des différents sous-types d'IFN- α sur la prolifération et la mort cellulaires dans des lymphocytes primaires.

Des lymphocytes primaires ont été incubés avec du CFSE puis traités avec 0,4 ng/mL d'IFN-α. 3 jours post-traitement, la prolifération cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux. Sur le graphe est représentée la médiane de l'intensité de fluorescence du CFSE normalisée par rapport à sa valeur pour la condition sans IFN (A, résultats de 6 expériences indépendantes). Des lymphocytes primaires ont été traités avec 0,4 ng/mL d'IFN-α. 3 jours post-traitement, la mort cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux avec un marqueur de mort cellulaire, le Live/Dead. Sur le graphe est représentée la proportion de cellules mortes par rapport à sa valeur pour la condition sans IFN (B, résultats de 6 expériences indépendantes).

B- Effet des IFN-α sur la mort cellulaire des cellules MT4R5

Pour mesurer l'effet des IFN-α sur la mort cellulaire des cellules MT4R5, les cellules ont été traitées avec une concentration 2 ng/ml d'IFN-α, puis chaque jour pendant 3 jours, une partie de la culture a été prélevée et marquée avec un marqueur de mort cellulaire, le Live/Dead. Ce colorant se fixe aux amines et ne peut pas pénétrer les membranes des cellules vivantes. En revanche, il peut pénétrer les membranes des cellules mortes qui sont endommagées entrainant ainsi une coloration plus intense des cellules mortes que des cellules vivantes. Les cellules sont ensuite fixées et analysées en cytométrie en flux (Figure 39).

A J1 et J2 post-traitement, on observe environ 15% de mortalité quelque soit la condition. La mortalité augmente légèrement à J3 à environ 20%. Cependant, on observe que lorsque les cellules sont traitées avec les différents sous-types d'IFN-α, il n'y a pas de différences significatives de la mortalité par rapport aux cellules non traitées. Les IFN-α n'ont donc pas d'effet sur la mort des cellules MT4R5.

C- Effet des IFN-α sur la prolifération et la mort cellulaires de lymphocytes primaires

Nous avons également mesuré les effets des IFN-α sur la prolifération et la mort cellulaires de lymphocytes primaires. Des PBMC ont été incubés avec du CFSE puis traités avec 0,4 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 3 jours post-traitement, la prolifération a été mesurée par calcul de la médiane de l'intensité de fluorescence du CFSE. La mort cellulaire a également été mesurée après marquage avec du Live/Dead (Figure 40).

Nos résultats montrent que les différents sous-types d'IFN-α ont très peu d'impact sur la prolifération cellulaire des PBMC. On observe une légère augmentation de la valeur des médianes d'intensité de fluorescence pour certains sous-types (14, 8, 10 et 6) ce qui signifie qu'il y a eu un léger effet antiprolifératif (Figure 40A).
Cependant, cette variation est très modeste. Ce manque d'effet antiprolifératif est probablement dû à nos conditions expérimentales. En effet, nos expériences ont été réalisées après décongélation et activation des cellules avec de la PHA qui est un puissant inducteur de la prolifération des lymphocytes T (Valentine et al., 1985). En revanche, on observe que les sous-types d'IFN-α ont un effet sur la mort cellulaire des PBMC (Figure 40B). L'IFN-α21 est le plus puissant dans l'induction de la mort, il conduit à environ 2 fois plus de cellules mortes par rapport aux cellules non traitées. A l'inverse, le sous-type 2 semble avoir très peu d'effet sur la mort cellulaire. Les autres sous-types conduisent à environ 1,5 fois plus de cellules mortes par rapport aux cellules non traitées, ce qui représente environ 20 % de cellules mortes en culture après 3 jours de traitement.

L'ensemble de ces résultats montrent que les différents sous-types d'IFN-α n'ont donc pas d'effet sur la prolifération et la mort cellulaire de notre lignée cellulaire MT4R5. Les effets inhibiteurs des IFN-α sur la réplication virale du VIH-1 dans cette lignée seront donc essentiellement dus à des effets antiviraux directs. Dans les lymphocytes primaires, nous observons que les différents sous-types d'IFN-α n'ont pas d'effet sur la prolifération dans nos conditions expérimentales. En revanche, ils ont un effet plus ou moins variable sur la mort cellulaire, ce qui pourrait impacter les résultats de leurs effets sur le cycle de réplication du VIH-1.

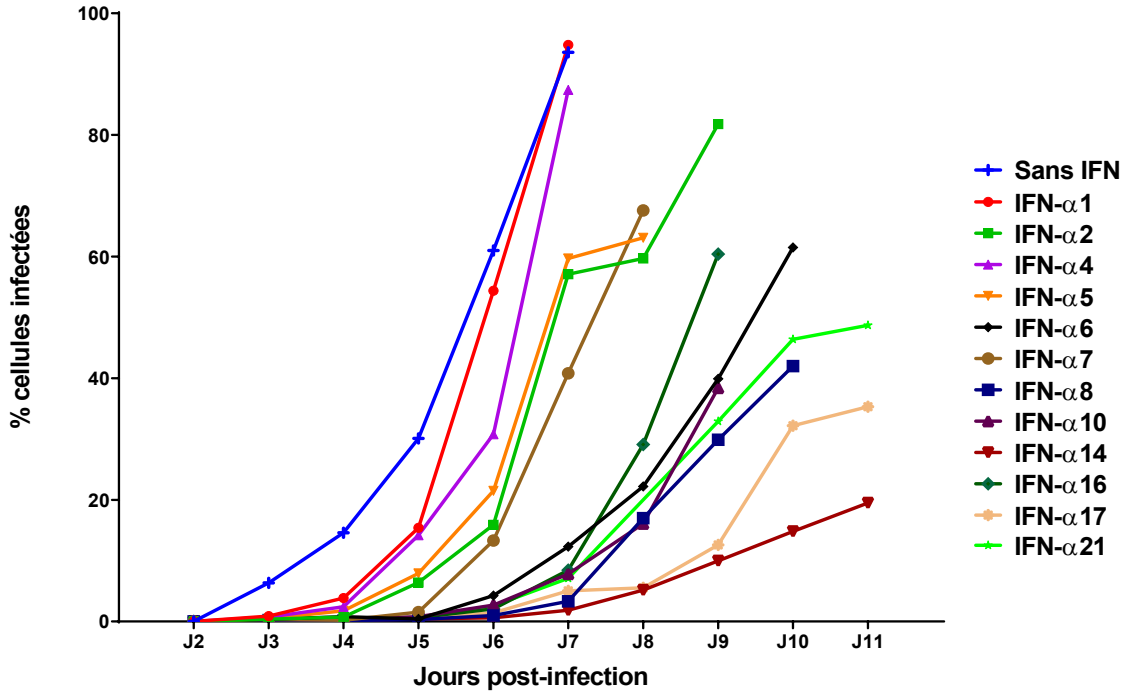


Figure 41 : Mesure de l'inhibition de la propagation du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont été traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h après traitement, les cellules ont été infectées avec la même dose de virus (1 ng de p24/mL). Chaque jour pendant 11 jours, une partie des cellules a été prélevée et le pourcentage des cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux après marquage de la protéine virale Gag (résultats d'une seule expérience).

III. Effets des IFN sur la réplication du VIH-1 à cycle multiple

Nous avons ensuite mesuré la hiérarchie des puissances d'inhibition de chaque sous-type d'IFN-α sur la réplication virale. Nous avons traité des cellules MT4R5 avec 2 ng/mL d'IFN-α. 24h après traitement, les cellules ont été infectées avec une faible dose d'un virus NLAd8 de tropisme CCR5. La propagation du virus a été suivie pendant 11 jours après infection par marquage de la protéine virale Gag intracellulaire et mesure du pourcentage de cellules infectées par cytométrie en flux (Figure 41).

En absence d'IFN, le virus se propage très rapidement. On commence à détecter l'infection dès 3 jours post-infection et au bout de 6 jours, toutes les cellules sont infectées. En présence d'IFN-α, la propagation du virus est retardée quel que soit le sous-type. En revanche, on observe des différences d'inhibition de la propagation assez importantes entre chaque sous-type. Pour certains sous-types comme les IFN-α1 et 4, le virus arrive à échapper au contrôle assez rapidement et 6 jours post-infection, les cellules sont presque toutes infectées comme en absence d'IFN-α. Pour d'autres IFN, l'échappement est plus long et peut prendre plusieurs jours. Pour l'IFN-α14 qui est le plus puissant face au VIH-1, on ne détecte l'infection qu'à partir du 7ème jour post-infection et à J11 seulement 20% des cellules sont infectées. Les IFN-α17, 8, 6, 21, 10 et 16 présentent également une forte puissance d'inhibition du virus. Les sous-types 7, 5 et 2 quant à eux induisent des effets plus modérés. On observe également que pour chaque sous-type, le virus arrive toujours à échapper au contrôle des IFN. Il arrive donc rapidement à contrecarrer les effecteurs induits par les IFN. Ceci est dû au choix de la dose de virus et la concentration d'IFN. Pour des concentrations d'IFN plus élevées ou des doses de virus plus faibles, il est possible d'empêcher la propagation du virus.

IV. Capacité des sous-types d'IFN-α à inhiber les différentes étapes du cycle viral

Afin d'approfondir notre étude, nous avons réalisé tout une série de tests permettant de mesurer plus spécifiquement les effets des IFN-α sur les différentes étapes du cycle viral.

A- Etapes précoces du cycle de réplication virale

Pour commencer, nous avons mesuré les effets des IFN-α sur les étapes précoces du cycle viral (Figure 42). Ces expériences ont été réalisées à la fois dans des lymphocytes primaires et dans les cellules MT4R5. Des lymphocytes primaires ont été traités avec 0,4 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h post-traitement, les cellules ont été infectées avec un virus codant pour le gène de la luciférase. 48h post-infection l'inhibition de l'infection a été calculée après mesure de l'activité luciférase. Pour les cellules MT4R5, nous avons mesuré l'inhibition de ces étapes précoces dans deux systèmes différents. Pour cela, les cellules ont été traitées avec 2 ng/mL d'IFN-α puis infectées avec le virus exprimant la luciférase ou un virus sauvage. 40h post-infection l'inhibition de l'infection a été calculée soit après mesure de l'activité luciférase, soit par cytométrie en flux après marquage de la protéine virale Gag. Ce système montre les effets des IFN-α sur l'ensemble des étapes précoces du cycle viral, c'est-à-dire toutes les étapes allant de l'entrée virale à l'expression des protéines virales après intégration du provirus.

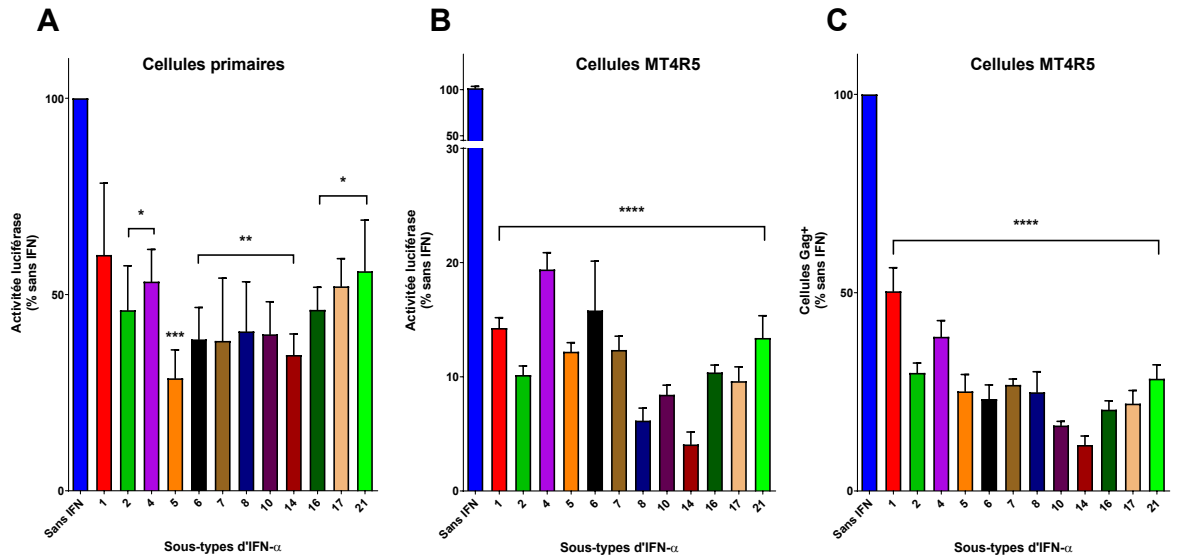


Figure 42 : Mesure de l'inhibition des étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α dans des lymphocytes primaires ou dans des cellules MT4R5.

Des PBMC (A) et des cellules MT4R5 (B et C) ont été traitées ou non avec 0,4 ou 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α respectivement. 24h après traitement, les cellules ont été infectées avec la même dose de virus codant pour le gène de la luciférase (A et B) (100 ng de p24/mL pour les PBMC et 20 ng de p24/mL pour les cellules MT4R5) ou un virus sauvage (C) (10 ng de p24/mL). 48h post-infection, l'acivité luciférase a été mesurée (A et B) ainsi que le pourcentage de cellules infectées par cytométrie en flux après marquage de la protéine virale Gag (A : (résultats de 3 expériences indépendantes) * $p < 0.05$; B : (résultats de 5 expériences indépendantes) *** $p < 0.0001$; C : (résultats de 3 expériences indépendantes) *** $p < 0.0001$ comparé au non traité, Anova).

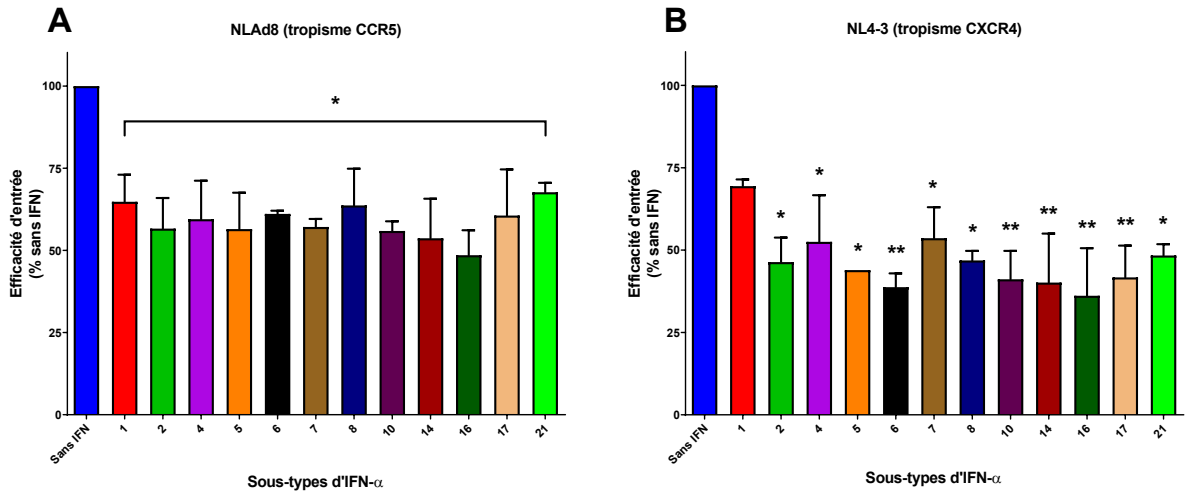


Figure 43 : Mesure de l'inhibition de l'entrée virale du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont été traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h après traitement, les cellules ont été infectées avec la même dose de virus chimères portant une protéine Blam-Vpr (50 ng de p24/puits pour le virus NLAd8 et 10 ng de p24/puits pour le virus NL4-3). L'efficacité de l'entrée virale a été déterminée par cytométrie en flux par mesure de clivage du substrat de la β-Lactamase (résultats de 2 expériences indépendantes). (* $p < 0.05$ comparé au non traité, Anova).

On observe que tous les IFN-α sont capables d'inhiber les étapes précoces du cycle viral. De

plus, ils présentent des puissances d'inhibition différentes. On observe que les hiérarchies des puissances d'inhibition sont assez conservées dans les trois systèmes expérimentaux. En effet, dans les deux systèmes sur cellules MT4R5, le sous-type 14 est le plus puissant dans l'inhibition de l'infection et dans les lymphocytes primaires c'est le deuxième plus puissant. De manière intéressante, l'IFN-α5 semble le plus puissant dans l'inhibition de l'infection dans les cellules primaires (Figure 42A). Les IFN-α1 et 4 sont également les plus faibles dans les trois systèmes expérimentaux. Les autres sous-types présentent des effets plus modérés.
Les différences observées entre les cellules primaires et la lignée MT4R5 infectées avec le virus codant pour la luciférase pourrait être dues aux doses utilisées (Figure 42A et B). En effet, nous avons choisi de traiter les cellules primaires avec une dose cinq fois plus faible d'IFN-α afin de limiter leurs effets sur la prolifération et la mort cellualre. Cependant, ces paramètres restent quand même à prendre en compte car ils ne sont pas totalement absents dans les cellules primaires.

En ce qui concerne les deux systèmes expérimentaux dans les cellules MT4R5, on observe que les hiérarchies des puissances d'inhibition sont très conservées (Figure 42B et C). Cependant, l'inhibition est beaucoup plus importante dans le système luciférase (80 à 95% d'inhibition) qu'en cytométrie en flux (50 à 90% d'inhibition). Ceci peut être expliqué par le fait que les virus codant pour la luciférase sont délétés de leur gène d'enveloppe et donc ces virus sont produits par cotransfection avec un plasmide codant juste la protéine d'enveloppe. Ces virus sont en général moins infectieux que les virus sauvages. On peut donc envisager qu'ils seront plus efficacement inhibés que les virus sauvages.

Ces résultats nous montrent donc que les différents sous-types d'IFN-α ont des puissances d'inhibition différentes contre le VIH. De plus, les hiérarchies des puissances d'inhibition sont relativement conservées entre des lymphocytes primaires et les cellules MT4R5 suggérant un profil d'induction d'ISG similaire et validant ce modèle cellulaire dans l'étude des sous-types IFN.
Ce système nous a permis d'évaluer l'effet des IFN-α sur l'ensemble des étapes précoces du cycle. Cependant, différentes étapes du cycle viral pouvent être affectées par les IFN. Dans la suite de notre étude, nous avons mesuré plus précisemment l'impact de chaque IFN-α au niveau de différentes étapes.

1. Entrée virale

Dans un premier temps, nous avons regardé les effets des différents IFN-α sur l'entrée virale, étape pouvant être affectée notamment *via* l'induction des protéines IFITM. Nous avons réalisé des tests de fusion virale en utilisant des virus chimères dont la protéine Vpr est couplée à la protéine β-lactamase. Après infection avec ces virus, les cellules sont incubées en présence du substrat de la β-lactamase qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules. L'efficacité de fusion est ensuite évaluée par cytométrie en flux par mesure de clivage du substrat de la β-lactamase. Les cellules MT4R5 ont été traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α puis infectées 24h après avec un virus chimère NLAd8 (tropisme R5) ou NL4-3 (tropisme X4) (Figure 43).

On observe que tous les sous-types d'IFN-α, sont capables d'induire une inhibition de la fusion des virus. Pour les virus ayant un tropisme R5, cette inhibition est assez comparable entre les sous-types et est d'environ 35% pour l'IFN-α21 qui est le plus faible et de 50% pour l'IFN-α16 qui est le plus puissant (Figure 43A). Pour les virus ayant un tropisme X4, on observe de plus fortes variations d'inhibition entre les sous-types. En effet, contre cette souche de virus, l'IFN-α1 ne bloque l'entrée virale que de 30% alors que l'IFN-α16 va inhiber de 65% cette étape (Figure 43B).

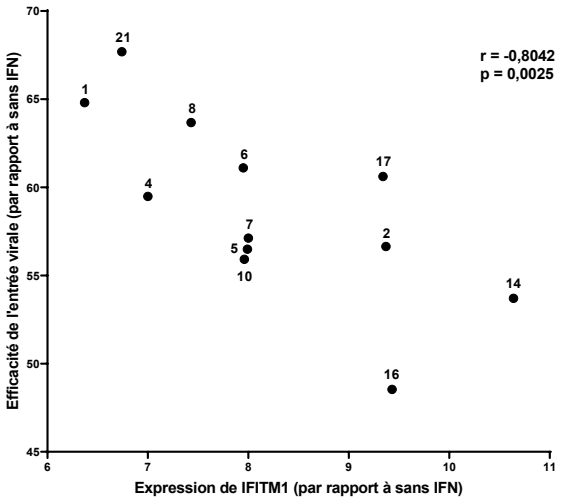


Figure 44 : Corrélation inverse entre l'induction de l'expression de la protéine IFITM1 par les sous-types d'IFN-α et l'efficacité de l'entrée virale.

Une corrélation inverse a été calculée entre la capacité d'induction de l'ISG IFITM1 de chacun des sous-types et l'efficacité de l'entrée virale après traitement avec 2 ng/mL de chaque IFN-α (Spearman r=-0,8042, p (two-tailed)=0,0025 **).

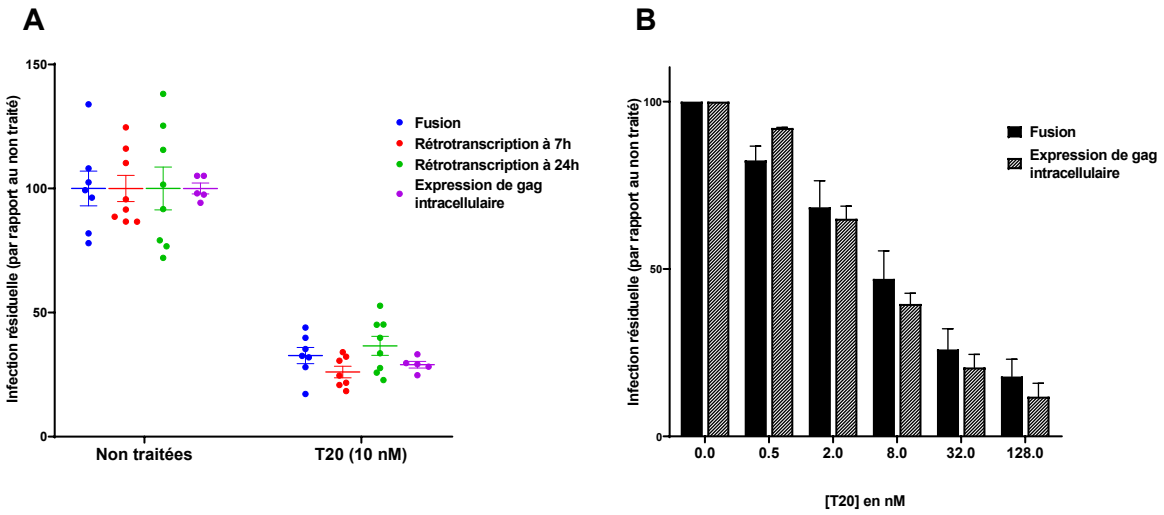


Figure 45 : Mesure de l'effet de l'inhibition de l'entrée virale sur les étapes en aval.

Des cellules MT4R5 ont été traitées avec du T20 puis infectées avec un virus NLAd8 sauvage (10 ng de p24/mL) ou un virus chimère Vpr-Blam (50 ng de p24/puits). (A) La fusion cellulaire (test β-Lactamase), la quantité de gène *gag* à 7h et 24h post-infection (qPCR) ainsi que la quantité de Gag intracellulaire (cytométrie en flux) ont été mesurées après traitement avec 10 nM de T20 (chaque point représente un puits, n=1). (B) La fusion cellulaire (test β-Lactamase) et la quantité de Gag intracellulaire (cytométrie en flux) ont été mesurées après traitement avec des doses croissantes de T20 (résultats de 3 expériences indépendantes).

Ces résultats nous montrent que l'entrée virale est affectée de manière significative par les IFN-α. De plus, on observe que l'IFN-α16 est le plus puissant pour inhiber ces deux souches virales à cette étape alors qu'en cycle multiple il ne présente pas la plus forte inhibition de la réplication virale (IFN-α14). De même, l'IFN-α1 qui a la plus faible puissance d'inhibition de la réplication virale en cycle multiple, va inhiber aussi efficacement l'entrée du virus NLAd8 que la plupart des autres sous-types.

Nos résultats de RNAseq nous ont montré que les protéines IFITM pouvaient être fortement induites par les IFN-α. De plus, nous observons une corrélation entre l'inhibition de l'entrée virale du virus NLAd8 et le niveau d'induction de la protéine IFITM1 suggérant un rôle possible de cette protéine dans l'inhibition de la fusion virale (Figure 44). Ces suppositions restent à confirmer par des expériences d'inhibition de l'expression de la protéine IFITM1 par des siRNA après traitement aux IFN.

2. Effet de l'inhibition de l'entrée virale sur les étapes en aval

Puisque les IFN agissent sur différentes étapes du cycle réplicatif du VIH-1, l'effet sur l'entrée aura une répercussion aussi sur les étapes en aval. Nous nous sommes demandés si une inhibition d'une étape du cycle viral (l'entrée) entrainait une efficacité proportionnelle d'inhibition des étapes en aval ou pouvait affecter celles-ci. Pour vérifier cela, des cellules MT4R5 ont été traitées avec du T20 (Enfurvirtide), un inhibiteur spécifique de la fusion. Puis nous avons regardé ses effets au niveau de la fusion, de la transcription inverse et de l'expression protéique de Gag.

Lorsque les cellules sont traitées avec 10 nM de T20 (Figure 45A), ceci conduit à une inhibition de 70% de l'entrée virale. On observe une inhibition un peu plus forte de la transcription inverse à 7h post-infection qui semble revenir à la valeur d'inhibition de la fusion à 24h post-infection. Lorsqu'on regarde la quantité de Gag traduit, on observe également une inhibition de 70% de celle-ci. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'inhibition de 70% de l'entrée virale donne une efficacité résiduelle de transcription inverse et d'expression de Gag comparable. Quand on mesure l'effet du T20 à différentes doses sur l'entrée et la quantité de Gag (Figure 45B), on observe une inhibition de l'expression Gag un peu plus élevée par rapport à l'inhibition de la fusion. Cependant, cette variation de l'inhibition est très faible et n'est pas significative. L'inhibition de l'entrée virale semble donc affecter de façon proportionnelle les étapes plus tardives du cycle de réplication du VIH-1.

3. Transcription inverse

Puisque les différents sous-types d'IFN inhibent l'entrée du virus R5 de façon comparable, nous avons pu étudier l'effet sur l'étape successive du cycle réplicatif, la transcription inverse, sans avoir besoin de soustraire leur effet sur l'entrée. Les cellules MT4R5 ont été traitées avec 2 ng/mL d'IFN, puis 24h après, infectées avec un virus NLAd8. 7h et 24h post-infection, l'ADN des cellules infectées a été extrait. Nous avons ensuite réalisé une qPCR du gène *gag* pour mesurer les effets des IFN sur l'efficacité de la transcription inverse (Figure 46).
Nous avons conscience que dans cette expérience, nous regardons en fait l'effet des IFN-α sur l'entrée virale ainsi que sur les étapes qui précèdent la transcription inverse du virus. Cependant, l'effet sur l'entrée virale étant très similaire quelque soit le sous-type d'IFN-α sur la souche NLAd8, nous avons considéré que les effets observés reflètaient probablement bien l'effet sur les étapes en amont de la transcription inverse.

Sachant que l'entrée est inhibée entre 30 et 50%, nous observons que chaque sous-type est capable de réduire l'efficacité de la transcription inverse mais cette fois-ci, les puissances

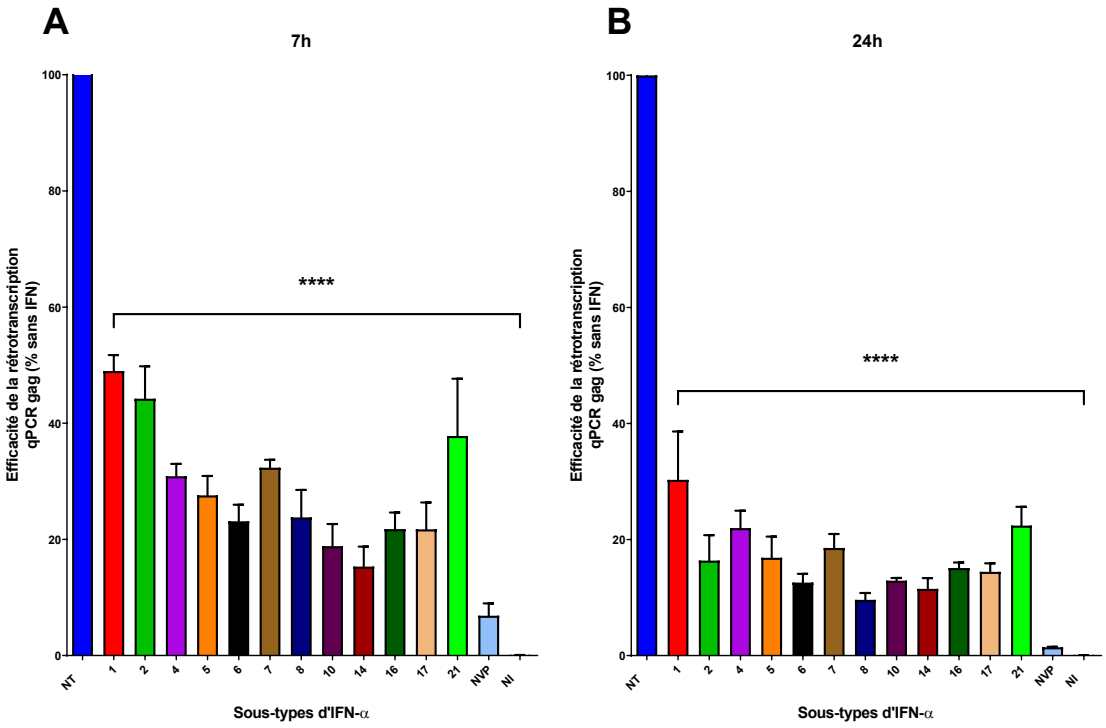


Figure 46 : Mesure de l'inhibition de la transcription inverse du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont été traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, les cellules ont été infectées avec la même dose de virus NLAd8 (10 ng de p24/mL). A 7h (A) et 24h(B) post-infection, l'ADN cellulaire a été extrait et une qPCR ciblant le gène *gag* a été effectuée (résultats de 3 expériences indépendantes). (**** $p < 0.0001$ comparé au non traité, Anova).

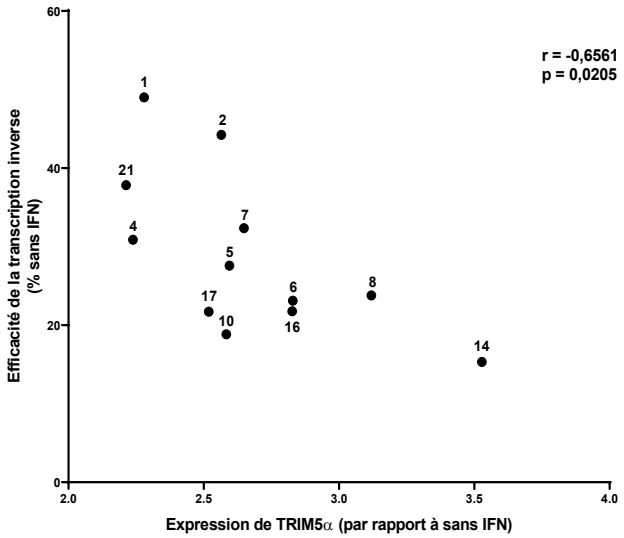


Figure 47 : Corrélation inverse entre l'induction de l'expression de la protéine TRIM5α par les sous-types d'IFN-α et l'efficacité de la transcription inverse.

Une corrélation inverse a été calculée entre la capacité d'induction de l'ISG TRIM5α de chacun des sous-types et l'efficacité de la transcription inverse après traitement avec 2 ng/mL de chaque IFN-α (Pearson r=-0,6561, p (two-tailed)=0,0205 **).

d'inhibition sont très différentes. En effet, à 7h post-infection (Figure 46A) on observe que l'IFN-α14 est le plus puissant dans l'inhibition de ces étapes (85% d'inhibition). Les IFN-α10, 6, 8, 16 et 17 sont également très puissants dans la réduction du produit de transcription inverse. En revanche, les IFN-α1, 4, et 21 montrent des effets assez faibles sur cette étape du cycle avec une inhibition de 50 à 60% sachant que l'entrée avait déjà été inhibée d'environ 30%. Les autres sous-types montrent des effets intermédiaires.

On observe une corrélation inverse entre le niveau d'induction du facteur TRIM5α dans l'étude du transcriptome et l'efficacité de la transcription inverse ce qui suggérerait que cet effecteur puisse être en partie responsable de la réduction de l'efficacité de transcription (Figure 47). Cependant, le rôle exact de TRIM5α dans l'inhibition de cette étape nécessite d'être confirmé expérimentalement.

Lorsqu'on regarde les résultats de la transcription inverse à 24h post-infection (Figure 46B), on observe que l'inhibition est plus importante qu'à 7h post-infection, probablement à cause d'une saturation atteinte en l'absence d'IFN-α à 24h. De plus, même si la hiérarchie des puissances d'inhibition des sous-types est assez similaire entre 7h et 24h, on remarque quelques différences. En effet, l'IFN-α2 semble peu efficace dans l'inhibition de la transcription inverse à 7h alors qu'à 24h post-infection, il fait partie des IFN les plus puissants. De la même façon, l'IFN-α8, bien qu'assez puissant à 7h post-infection, présente à 24h post-infection la plus forte inhibition de la transcription inverse. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait qu'à 7h post-infection, la transcription inverse n'est pas totalement achevée (phase dynamique). Par contre, à 24h il y a probablement saturation de la transcription. De plus, à 7h post-infection, seules les étapes d'entrée et de transcription inverse sont affectées par les IFN. En revanche, à 24h post-infection, le virus a également effectué l'import nucléaire et l'intégration de son génome dans celui de la cellule hôte. Ces deux étapes ont très probablement été elles aussi affectées par les IFN notamment par le facteur Mx2. L'inhibition de l'import nucléaire conduirait à une accumulation de l'ADN viral dans le cytoplasme de la cellule ce qui peut entrainer sa dégradation. De plus, une inhibition de l'intégration conduirait à la formation de génomes viraux non intégrés (linéaires ou circulaires) dans le noyau qui sont moins stables que la forme intégrée. Ces hypothèses semblent en accord avec les résultats de RNAseq obtenus qui montrent une forte induction du facteur Mx2 par les sous-types 2, 8 et 14 (Figure 48).

A cause de l'impact différentiel des IFN-α sur la transcription inverse, nous ne pouvons pas poursuivre l'analyse de l'effet sur les étapes suivantes (import nucléaire, intégration…) sans soustraire l'effet sur la transcription inverse. Au vu de la faible efficacité de la transcription inverse résiduelle, le risque de biais dans l'estimation est important et d'autres approches devraient être employées.

A- Etapes tardives du cycle de réplication virale

Pour étudier les effets des IFN-α sur les étapes tardives du cycle, les cellules MT4R5 ont été infectées avec du virus NLAd8. 16h post-infection, un délai après lequel on considère que la majorité des virus se sont intégrés dans le génome de la cellule hôte, les cellules ont été lavées puis séparées et traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h post-traitement, les surnageants ainsi que les culots cellulaires ont été récupérés, lysés et la quantité d'antigène p24 présente dans ces fractions a été mesurée par test ELISA. Ce système permet de s'affranchir des étapes précoces du cycle de réplication virale, très affectées par les IFN-α, pour ne regarder les effets des IFN-α que sur les étapes tardives (à partir de la traduction des protéines).

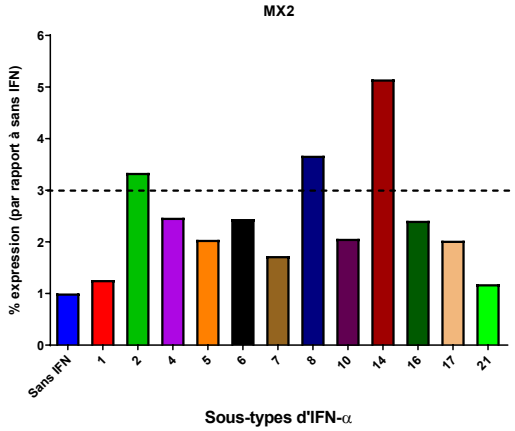


Figure 48 : Mesure de l'induction de l'expression de Mx2 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont été traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, l'ARN cellulaire a été extrait et un RNAseq a été réalisé (résultats d'une seule expérience).

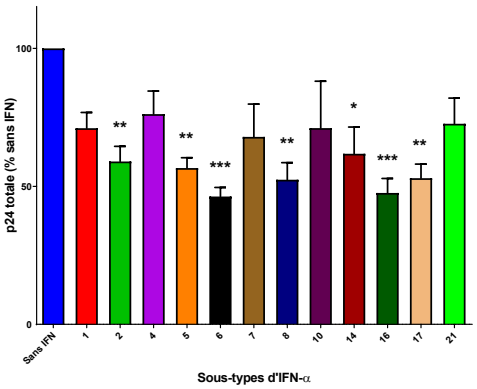


Figure 49 : Mesure de l'inhibition de l'expression protéique du VIH-1 par les différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont infectées avec 10 ng de p24/mL d'un virus NLAd8 puis 16h post-infection, lavées et traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, les surnageants ainsi que les culots cellulaires ont été récupérés, lysés et la quantité de totale p24 a été mesurée par ELISA (résultats de 5 expériences indépendantes) (** $p < 0.05$ comparé au non traité, Anova).

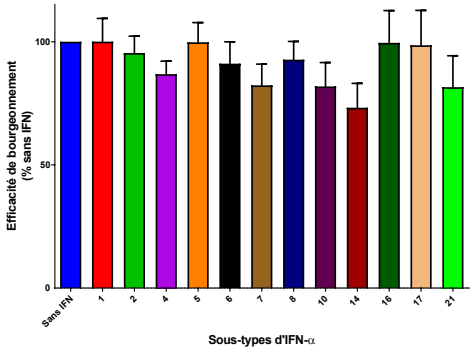


Figure 50 : Mesure de l'efficacité de bourgeonnement des virus produits en présence des différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont infectées avec un virus NLAd8 puis 16h post-infection, lavées et traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, les surnageants ainsi que les culots cellulaires ont été récupérés, lysés et la quantité de p24 à été mesurée par ELISA. Le bourgeonnement a été calculé selon la formule : Bourgeonnement = [p24 surnageant] / [p24 totale] (résultats de 5 expériences indépendantes).

1. Transcription, traduction et maturation de la protéine p24

Nous avons tout d'abord mesuré la quantité totale de protéine p24 produite en présence de chaque sous-type d'IFN-α (présente dans la fraction cellulaire et relarguée dans le milieu extracellulaire).

On observe que tous les sous-types d'IFN-α induisent une diminution de la quantité de p24 produite. Cette diminution est assez variable entre les sous-types, en effet les IFN-α6 et 16 entrainent une forte inhibition (plus de 50%) suivie des IFN-α8 et 17 (Figure 49). Les IFN-α1, 4, 7, 10 et 21 entrainent une diminution plus faible, seulement d'environ 25 à 30%. Les IFN-α2, 5 et 14 présentent des effets modérés. L'inhibition de la quantité de p24 détectée dans cette expérience peut résulter à la fois d'une inhibition de la transcription, de la traduction protéique et/ou un défaut de la maturation de celle-ci qui peut être moins bien détectée sous sa forme immature par test ELISA. Les effets des IFN-α sur ces étapes du cycle viral ont été peu étudiés. Cependant il n'est pas exclu que certains ISG soient capables de cibler ces étapes. Par exemple, le facteur Schlafen 11 a été décrit comme un ISG pouvant affecter l'étape de la traduction (Li et al., 2012). Cependant, nos résultats RNAseq nous montrent une très faible induction de Schlafen11 par les différents sous-types d'IFN qui n'est pas corrélée avec la quantité de Gag observée.

2. Bourgeonnement

L'efficacité d'inhibition des IFN-α sur l'étape de bourgeonnement a été mesurée en calculant le rapport entre la quantité de p24 relargué dans le surnageant par rapport à la quantité de p24 totale (surnageant et cellulaire).

On observe que cette étape du cycle de réplication virale est peu affectée par les différents sous-types d'IFN-α et les résultats obtenus ne sont pas significatifs (Figure 50). L'IFN-α14, qui est le plus puissant dans l'inhibition de cette étape provoque une réduction de 25% du nombre de virus relargués par rapport aux cellules non traitées. Les IFN-α4, 7, 10 et 21 présentent des effets plus modérés conduisant à une inhibition de 15 à 20% de l'efficacité de bourgeonnement. Les autres sous-types d'IFN-α montrent des effets négligeables sur cette étape (moins de 10% d'inhibition). BST2 est le facteur de restriction le plus décrit dans l'inhibition de cette étape. Nous n'avons pas observé de corrélation entre le niveau d'induction de BST2 et l'inhibition du bourgeonnement. Cependant, dans nos expériences, le virus code pour la protéine virale Vpu qui a été montrée comme pouvant contrecarrer le facteur de restriction BST2. L'effet faible des IFN-α sur l'étape de bourgeonnement est donc probablement dû à un ou plusieurs autres facteurs.

3. Infectivité résiduelle

Les effets cumulés des IFN-α sur toutes les étapes tardives du cycle viral (transcription, traduction, bourgeonnement et maturation) conduisent ensemble à une forte réduction de la quantité de virions relargués dans le milieu extracellulaire. En effet, les IFN-α6 et 14, conduisent à une diminution du nombre de virions relargués de 60% par rapport aux cellules non traitées. Les IFN les plus faibles, (les sous-types 1, 4 et 5) entrainent une inhibition de 35 à 40%. Les autres sous-types conduisent à une inhibition d'environ 50% (Figure 51A).

Nous avons également mesuré l'infectivité de ces virions produits en présence d'IFN-α. Pour cela, des cellules TZM-bl qui portent le gène de la β-Galactosidase sous le contrôle du promoteur LTR ont été infectées avec ces virions à une concentration (en ng d'antigène p24/mL) égale (Figure 51B). On observe une diminution de l'infectivité de 25 à 35% pour les sous-types 14, 10, 8 et 2.

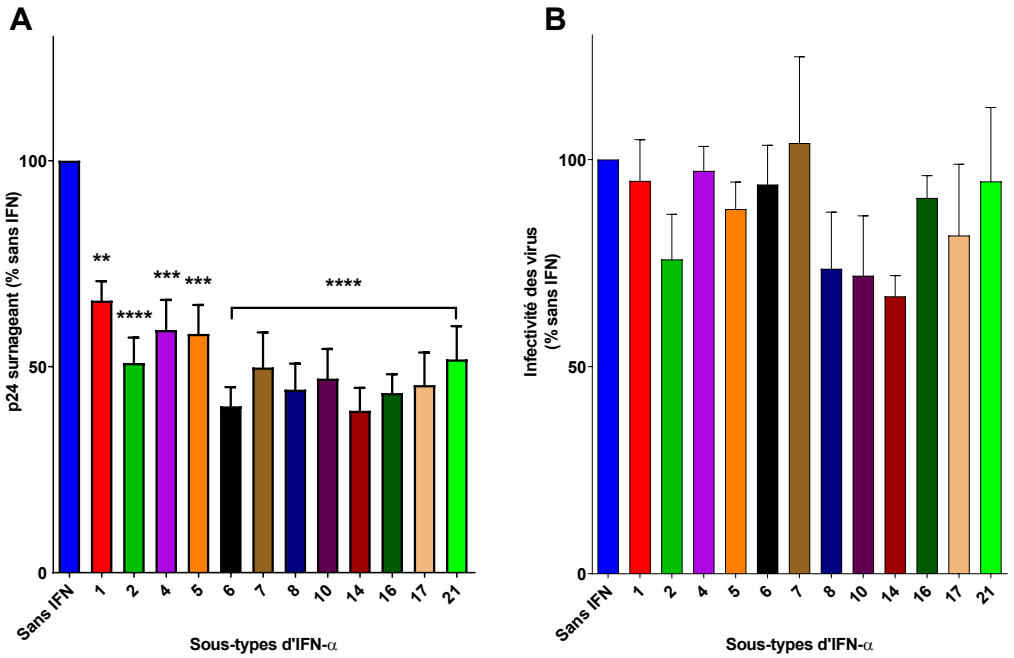


Figure 51 : Mesure de l'infectivité résiduelle des virions produits en présence des différents sous-types d'IFN-α.

Des cellules MT4R5 ont infectées avec un virus NLAd8 puis 16h post-infection, lavées et traitées ou non avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN. 24h après traitement, les surnageants ont été récupérés, lysés et la quantité de p24 à été mesurée par ELISA (A) (résultats de 5 expériences indépendantes) (**** $p < 0.0001$ comparé au non traitées, Anova). Des cellules TZM-bl ont été infectées avec 5 ng de p24/mL de chaque virus produit en présence des différents sous-types d'IFN-α. 2 jours post-infection, l'activité β-Galactosidase des cellules a été mesurée (B) (résultats de 3 expériences indépendantes).

Sous types d'IFN-α	1	2	4	5	6	7	8	10	14	16	17	21
Cycle multiple	*	**	*	**	***	**	***	***	****	***	****	***
Entrée	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Transcription inverse	*	*	**	**	***	**	***	****	****	***	***	**
Transcription, traduction et maturation	*	**	*	**	***	*	***	*	**	***	***	*
Bourgeonnement	-	*	**	-	*	**	*	**	***	-	-	**
Infectivité	-	**	-	*	-	-	**	**	**	-	*	-

Tableau 2 : Récapitulatif des effets des 12 sous-types d'IFN-α au niveau des différentes étapes du cycle de réplication de la souche NLAd8 dans des cellules MT4R5.

La puissance d'inhibition des différents sous-types d'IFN-α au niveau des étapes du cycle viral est représentée par une échelle de 1 à 4 étoiles. Ce classement a été établi en fonction des différences d'inhibition entre le sous-type le plus puissant et le moins puissant à chaque étape (- : pas d'effet, * : effets très faibles, ** : effets modérés, *** : effets puissants, **** : effets très puissants)).

Les IFN-α17 et 5 induisent également une diminution de l'infectivité de ces virions, cependant leurs effets sont plus modérés. Les autres sous-types d'IFN-α n'entrainent pas de baisse significative de l'infectivité. Cette baisse de l'infectivité des virions est probablement liée à l'incorporation de protéines dans la membrane virale telle que les protéines IFITM au moment du bourgeonnement. Ceci conduit à une diminution de l'efficacité de la fusion virale au cycle viral suivant. Elle peut également être causée par l'incorporation d'APOBEC3G dans le virion. Cependant, le virus exprime Vif qui a été montré comme pouvant contrecarrer APOBEC3G. De plus, nos résultats de RNAseq ne montrent pas d'induction significative de la protéine APOBEC3G.

B- Résumé des effets des sous-types d'IFN-α sur le cycle viral

L'ensemble des résultats des effets des différents sous types d'IFN-α sur le cycle de réplication du VIH-1 est résumé dans le Tableau 2.
L'ensemble de ces résultats nous montre que les puissances d'inhibition des sous-types d'IFN-α résultent d'une combinaison des effets sur l'ensemble des étapes du cycle viral. Aux extrêmes, on observe que l'IFN-α14 est très puissant dans l'inhibition de toutes les étapes du cycle, ce qui explique qu'il est le plus puissant pour inhiber la réplication virale. A l'inverse, l'IFN-α1 présente les plus faibles puissances d'inhibition au niveau de chaque étape et est également le plus faible dans l'inhibition de la propagation virale.

V. Analyse du transcriptome induit par les sous-types d'IFN-α

Comme précédemment dit, nous avons effectué une analyse du transcriptome des cellules après traitement aux IFN-α. Des cellules MT4R5 ont été traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h après le traitement, l'ARN des cellules a été extrait et un séquençage à haut débit du transcriptome a été effectué.

A- Expression des facteurs de restriction inhibant la réplication du VIH-1

Nous avons tout d'abord regardé le niveau d'induction des différents facteurs de restriction du VIH-1 déjà décrits dans la littérature (Figure 52). On observe que certains ISG comme APOBEC3G, SAMHD1 et Schlafen11 ne sont pas induits par les IFN-α. Cependant, l'expression de SAMHD1 et APOBEC3G a été montrée comme étant dépendante du type cellulaire (Chen et al., 2006 ; Sarkis et al., 2006 ; Wang et al., 2008 ; Refsland et al., 2010 ; Valverde-Estrella et al., 2020).
En revanche, la protéine Schlafen 11 a été montrée comme pouvant être induite dans les lymphocytes T CD4 (Abdel-Mohsen et al., 2013). Les autres ISG sont induits par les différents sous-types d'IFN-α mais de manière différentielle. On observe que la protéine IFITM1 est induite par tous les sous-types d'IFN-α, ce qui explique très probablement la forte inhibition de l'entrée virale. En effet, tous les IFN-α entrainent une augmentation de son expression d'au moins 6 fois et le sous-type 14, qui l'induit le plus fortement, de plus de 10 fois. De la même façon, la protéine IFITM3 est également induite par la plupart des sous-types d'IFN-α mais de manière différentielle. On remarque qu'elle est fortement induite par les sous-types 6, 7, 8, 14 et 16, plus modéremment par les sous-types 2, 4, 5, 17 et 21. En revanche, les sous-types 1 et 10 n'induisent pas son expression. De manière très intéressante, l'expression de la protéine IFITM2 est induite par certains sous-types, dont très fortement par le sous-type 8, alors qu'elle est fortement sous-exprimée par d'autres (IFN-α1, 5, 17 et 21). Les facteurs Mx2, TRIM5α, TRIM22

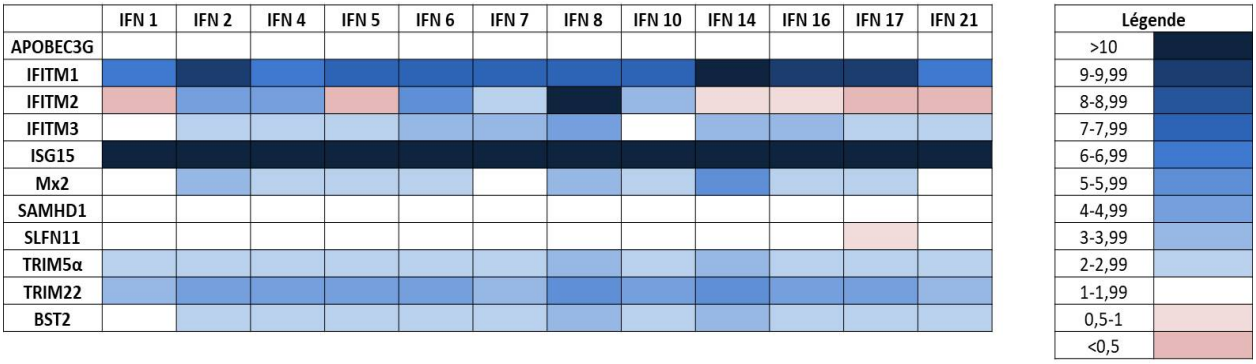


Figure 52 : Heatmap du niveau d'induction des facteurs de restriction connus du VIH-1.

Des cellules MT4R5, ont été traitées avec 2 ng/mL de chaque sous-type d'IFN-α. 24h après traitement, l'ARN cellulaire a été extrait et le transcriptome entier a été séquencé. Les valeurs correspondent au niveau d'induction des gènes par rapport aux cellules non traitées.

et BST2 sont induits par la plupart des sous-types d'IFN-α mais on observe des variations dans le niveau d'expression de ces facteurs selon le sous-type d'IFN-α. Par exemple, Mx2 est fortement induit (5 fois) par l'IFN-α14 mais quasiment pas par les IFN-α1, 7 et 21. De la même façon, BST2 est induit de manière assez similaire par la plupart des sous-types excepté les sous-types 8 et 14 qui l'induisent plus fortement et l'IFN-α1 qui n'induit pas son expression. ISG15 est induit très fortement par tous les sous-types d'IFN-α.

De manière générale, on observe que la puissance d'inhibition du VIH-1 d'un IFN-α semble associée au niveau d'induction de ces facteurs de restriction. En effet, l'IFN-α14 qui est le plus puissant pour inhiber la réplication virale est également le plus puissant dans l'induction de plusieurs facteurs de restriction (IFITM1, Mx2, TRIM5α, TRIM22 et BST2). A l'inverse, l'IFN-α1 qui est le plus faible présente également les profils d'induction les plus faibles. Par exemple, il n'induit pas l'expression des protéines IFITM3, Mx2 et BST2.

B- Analyse préliminaire du transcriptome complet

Nous avons observé qu'un très grand nombre de gènes étaient induits par le traitement aux IFN-α. Afin de simplifier notre étude, nous avons restreint nos analyses aux gènes dont l'induction est sur-exprimée ou sous-exprimée d'au moins trois fois par les IFN-α par rapport aux cellules non traitées. Ces données seront exploitées dans une étude dédiée et nous reprenons ici seulement les grandes lignes de cette analyse, pertinentes dans le contexte de nos résultats expérimentaux.

Nos résultats préliminaires montrent que seulement 305 gènes sont modulés d'au moins un facteur 3 par au moins un des sous-types d'IFN-α. La plupart de ces gènes sont transcrits à l'état basal dans les cellules et leur expression est modulée par les IFN-α. Seulement une dizaine de gènes non transcrits dans les cellules non traitées sont exprimés spécifiquement suite à l'induction des IFN-α. Parmi ces 305 gènes, la grande majorité des ISG sont sur-exprimés par les IFN-α et seulement 16 gènes sont sous-exprimés par les IFN-α. Un nombre très limité de gènes tel que celui codant pour IFITM2 sont à la fois sur-exprimés par certains sous-types et sous-exprimés par d'autres.
Nos résultats montrent également que seulement 36 gènes sont induits significativement par tous les sous-types d'IFN-α. Parmi eux, on trouve des facteurs déjà connus dans la littérature, comme la proteine IFITM1, mais également des facteurs non décrits dans la littérature du VIH-1 et des IFN. Chaque IFN-α conduit à l'expression d'environ une centaine de gènes suggérant que la puissance antivirale contre le VIH-1 des IFN-α n'est pas associée à un nombre de gènes induits plus important. En revanche, nous observons qu'un très grand nombre de gènes sont induits de manière spécifique par un ou quelques sous-types seulement, confirmant l'hypothèse que les 12 sous-types n'induisent pas le même profil d'expression de gènes. Nos résultats montrent également de très fortes disparités dans les niveaux d'induction des ISG.

Les résultats du séquençage du transcriptome, associés à l'étude des puissances d'inhibition de chaque étape du cycle viral nous permettront de mieux identifier les facteurs impliqués dans la restriction du VIH-1 et d'éventuellement découvrir de nouveaux facteurs de restriction.

Clones	Mutations	Fonction	Phosphorylation	Localisation	Transdominant	Liaison à l'ARN	Multimérisation
WT	-	++	++	N	-	+	+
-	STOP prématuré	-	-	-	-	-	-
M5	R38D R39L	-	+/-	C>N	-	-	?
M6	R41D R44L Δ42-43	-	-	C>N	-	-	?
M7	Δ54 Δ56	-	++	N>C	-	+	-
M10	L78D E79L	-	++	N	++	+	+
Δ12/14	S99D Δ100-112 G113L	++	+/-	N		+	

Tableau 3 : Description des mutants de Rev.

(Malim et al., 1989 ; Szilvay et al., 1997).

Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale

Dans une précédente étude, notre équipe avait démontré le rôle de la protéine Rev du VIH-1 dans l'interférence virale indépendante des récepteurs. Dans cette étude, des cellules MT4R5 étaient infectées par un premier virus portant un gène rapporteur (GFP ou HSA) puis, plusieurs heures après, une seconde infection était faite avec un deuxième virus portant l'autre gène rapporteur. Ce système permettait de mesurer l'interférence virale par cytométrie en flux (Remion et al., 2016).
Pour déterminer quelle protéine du premier virus était responsable de l'interférence, une série d'expériences avaient été réalisées dans lesquelles la première infection était faite avec soit un virus invalidé pour chaque gène, soit n'exprimant que certains gènes. Grâce à ces techniques, notre équipe avait montré que l'expression des protéines Tat et Rev par le premier virus était nécessaire et suffisante pour induire une interférence, mais que la protéine Tat seule n'était pas suffisante. Cette étude nous avait montré le potentiel rôle de Rev dans l'interférence virale.
Mon projet avait pour but de confirmer le rôle de la protéine Rev dans l'interférence virale et de déterminer l'étape du cycle du second virus affectée par Rev. Nous avons aussi exploré les mécanismes d'action impliqués dans l'interférence.

I. Lignées cellulaires MT4R5 Rev

A- Obtention des lignées cellulaires MT4R5 Rev

Pour cette étude, nous avons voulu nous affranchir de l'expression de la protéine Tat qui était également exprimée par le premier virus utilisé dans la précédente étude. De plus, une des difficultés dans cette étude sur l'interférence virale étant de distinguer les deux virus (le premier responsable de l'interférence et le second qui va être inhibé par Rev), nous avons décidé de créer des lignées cellulaires exprimant de manière stable la protéine virale Rev seule dans sa version sauvage ou mutée, dans le but de mimer les effets de la première infection.
Pour cela, j'ai construit des vecteurs lentiviraux capables d'exprimer la protéine Rev dans sa forme sauvage et une série de mutants, détaillés plus bas. Nous avons ensuite transduit des cellules MT4R5 avec ces vecteurs lentiviraux portant la protéine Rev sauvage ou un de ses mutants ainsi que la protéine GFP. Après transduction, les cellules exprimant la GFP (et donc la protéine Rev) ont été triées. Nous avons obtenu des lignées MT4R5 exprimant de manière stable la protéine Rev ou un de ses mutants. Afin de vérifier la stabilité de l'expression du vecteur dans les lignées, l'expression de la GFP dans les cellules est vérifiée à chaque expérience.

Nous avons sélectionné six mutants de Rev précédemment décrits dans la littérature : le mutant Rev- porte une inactivation de sa première méthionine (ATG →ACG) et un codon stop très prématuré (Y23→STOP) donnant lieu à une protéine tronquée non fonctionnelle (Zolotukhin et al., 1994). Les mutants M5 et M6 portent des mutations dans leur domaine de liaison à l'ARN et leur séquence NLS (Malim et al., 1989). Ils sont donc incapables de se lier à l'ARN et ont une localisation cytoplasmique. Le mutant M6 est également non phosphorylé. Le mutant M7 a deux délétions dans un de ses domaines de multimérisation. Il ne peut alors pas s'oligomériser. En revanche, il peut encore se lier à l'ARN viral et à une localisation principalement nucléaire. Le mutant M10 a des mutations dans sa séquence NES, le rendant strictement nucléaire (Malim et al., 1989). Il est en revanche toujours capable de se lier à l'ARN viral et de se multimériser. Il est également transdominant. L'ensemble de ces mutants sont non fonctionnels pour la réplication virale car ils ne permettent pas l'export des ARN longs non et mono-épissés. Nous avons

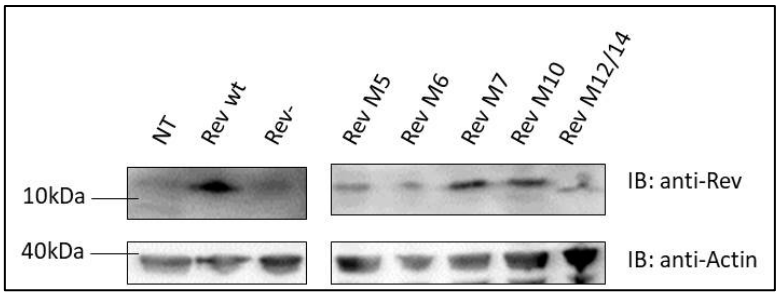


Figure 53 : Expression de Rev dans les lignées MT4R5 Rev.

Western-blot de la protéine Rev et de ses mutants ainsi que de l'actine dans les lignées MT4R5 transduites (figure représentative de 4 expériences indépendantes).

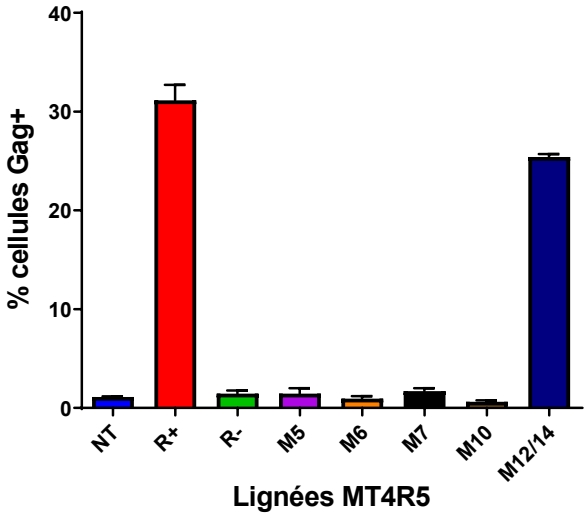


Figure 54 : Etude de la fonctionnalité de la protéine Rev dans les cellules MT4R5 transuites.

Les cellules MT4R5 non transduites ou exprimant une protéine Rev sauvage ou mutée ont été infectées avec un virus défectif pour la protéine Rev (50 ng de p24/mL). 48h post-infection, les cellules sont marquées avec un anticorps reconnaissant la protéine virale Gag. Le pourcentage de cellules infectées est mesuré par cytométrie en flux (résultats de 2 expériences indépendantes).

également séléctionné un mutant fonctionnel dans l'export des ARN, bien que tronqué dans sa partie C-terminale, le mutant M12/14 (Malim et al., 1989). Les caractéristiques des mutants de Rev sont résumées dans le Tableau 3.

B- Expression de Rev dans les lignées MT4R5 Rev

Afin de vérifier l'expression de la protéine Rev en plus de l'expression de la GFP dans nos lignées cellulaires, nous avons réalisé un Western Blot de la protéine Rev. On ne détecte pas l'expression de Rev dans les cellules non transduites ou transduites avec le vecteur Rev-. En revanche, dans les cellules exprimant la protéine Rev sauvage, ainsi que ses mutants M5, M6, M7, M10 et M12/14, on détecte une bande. Les protéines Rev sont exprimées dans toutes les lignées transduites et font environ 13 kDa, excepté le mutant M12/14 qui est de plus petite taille car il est tronqué dans sa partie C-terminale (Figure 53).

C- Fonctionnalité de Rev dans les lignées MT4R5 Rev

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine Rev et de ses mutants dans les cellules transduites, les cellules ont été infectées avec un virus délété de sa protéine Rev (NL4-3Rev-) ne pouvant pas exporter les ARN contenant des introns et donc incapable de se répliquer *in vitro* (Yi et al., 2002). 48h post-infection, les cellules ont été fixées et un marquage de la protéine Gag intracellulaire a été fait. Le pourcentage de cellules Gag+ a ensuite été mesuré par cytométrie en flux (Figure 54).

L'infection des cellules non transduites conduit à un très faible niveau d'expression de la protéine Gag, dont l'expression dépend de Rev. En revanche, dans les cellules transduites avec Rev et son mutant M12/14 qui est fonctionnel, la protéine Gag est fortement exprimée, signifiant que l'export des ARN non et mono-épissés est efficace. Comme attendu, les infections des cellules transduites avec les autres mutants ne conduisent pas à l'expression de Gag, ces mutants ayant été décrits dans la littérature comme non fonctionnels dans l'export des ARN long (Malim et al., 1989). L'ensemble de ces résultats nous montrent que les cellules transduites expriment de manière stable les protéines Rev sauvages et mutées. De plus, les protéines ont un phénotype conforme à celui attendu.

II. L'expression de Rev est suffisante pour l'interférence virale

Pour vérifier que l'expression de la protéine Rev seule dans les cellules transduites entraine une diminution de l'infection, nous avons infecté nos différentes lignées cellulaires avec un virus VIH-1 et mesuré l'interférence en regardant le pourcentage de cellules infectées par cytométrie en flux. Comme Rev est une protéine impliquée dans la régulation de l'expression des protéines virales, nous avons mesuré par cytométrie en flux à la fois l'expression de la protéine rapportrice HSA, clonée à la place de Nef, et donc exprimée dans la phase précoce d'expression protéique de manière indépendante de Rev, ainsi que la protéine Gag, dont l'expression est plus tardive et dépendante de Rev. Les cellules sont infectées, puis 24h après, traitées à la névirapine afin de ne mesurer l'infection que d'un seul cycle de réplication. 48h post-infection, les cellules sont marquées et le pourcentage de cellules infectées est mesuré par cytométrie en flux.

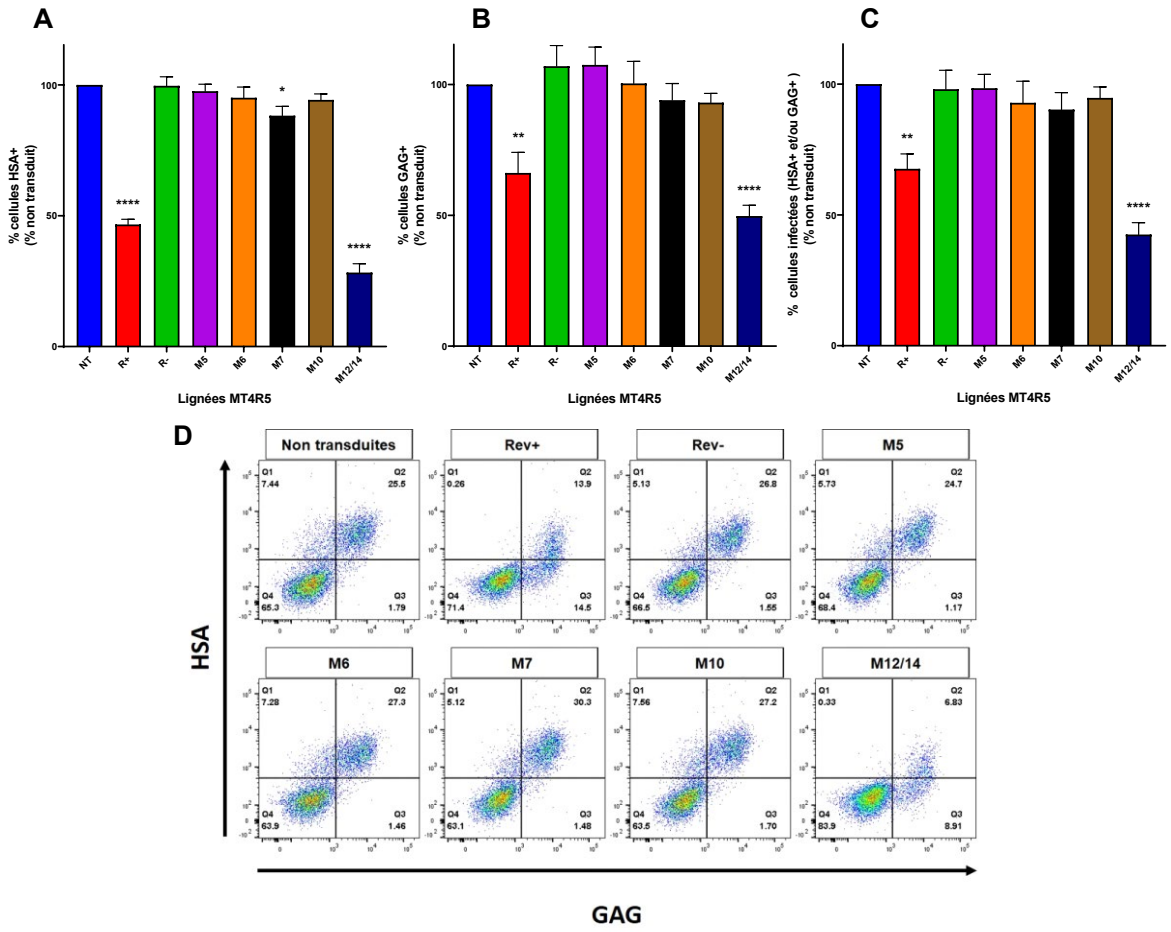


Figure 55 : Mesure de l'inhibition de l'expression de deux protéines du VIH-1 par Rev (sauvage ou mutée).

Les cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou mutée ont été infectées avec la même dose de virus NL4-3 HSA (15 ng de p24/mL). 24h post-infection, les cellules ont été traitées avec 10 µM de névirapine. 48h post-infection, des marquages de la protéine membranaire HSA (A) et intracellulaire GAG (B) ont été faits et le pourcentage de cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux (résultats de 3 expériences indépendantes). Le pourcentage de cellules exprimant les protéines HSA et/ou Gag a également été mesuré (C). Dot plot des différentes lignées cellulaires après marquage des protéines HSA et Gag (FlowJo) (**** $p < 0.05$ comparé au non transduit, Anova.).

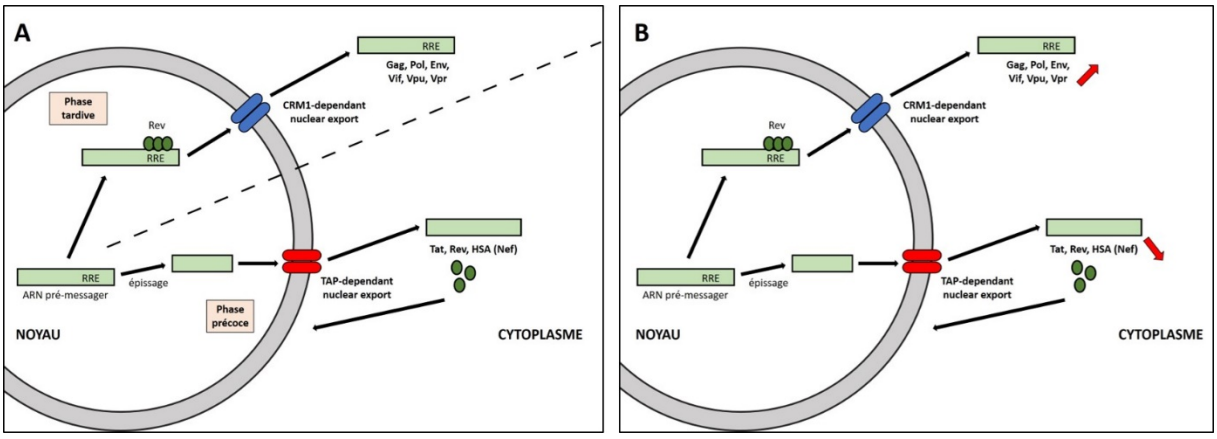


Figure 56 : Phases d'expression protéique du VIH-1 en conditions normales (A) et dans les cellules exprimant Rev (B).

On observe une diminution significative de l'expression des deux protéines HSA et Gag dans les cellules exprimant Rev sauvage ainsi que le mutant M12/14 par rapport aux cellules non tranduites (Figure 55A et B). On n'observe pas de diminution significative de l'infection dans les lignées exprimant les autres mutants non fonctionnels. Ces résultats montrent que l'expression de Rev fonctionnel est suffisante pour réduire la susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH-1. L'étude précédente de notre laboratoire avait permis d'obtenir cette conclusion de façon indirecte en comparant des cellules qui expriment Tat et Rev (interférence) à celles qui n'expriment que Tat seule (pas d'interférence). On observe également que la diminution de l'expression de la protéine HSA est plus importante que celle de Gag. En effet, Rev conduit à une réduction de 55% de l'expression de HSA contre 35% de celle de Gag. Ceci s'explique par le fait que Rev déstabilise les phases de la traduction des protéines virales.
En effet, dans les cellules non transduites ou portant une protéine virale Rev non fonctionnelle, les protéines Tat, Rev et HSA (clonée à la place de Nef) vont être exprimées en premier. Puis la protéine Rev du virus sera synthétisée et permet l'expression de Gag (Figure 56A). Dans ces conditions d'infection, on observe en cytométrie en flux que toutes les cellules exprimant Gag expriment également la protéine HSA (Figure 55D). On observe aussi qu'une partie des cellules expriment la protéine HSA seule car la protéine Gag n'a probablement pas encore été traduite (Figure 55D, panneau « non transduites »).

Au contraire, dans les cellules exprimant la protéine Rev sauvage et ou le mutant M12/14 qui sont fonctionnels, on observe un phénotype inversé. Toutes les cellules exprimant la protéine HSA expriment également Gag et certaines cellules expriment la protéine Gag seule (Figure 55D, panneaux « Rev+ » et « M12/14 »). Dans ces cellules, où la protéine Rev est déjà exprimée, elle va entrainer l'export des ARN non et mono-épissés favorisant l'expression de Gag par rapport à la HSA (Figure 56B). Ceci a pour conséquence une plus forte inhibition de l'expression de la HSA par rapport à Gag.
Pour palier à cet effet, nous avons mesuré l'inhibition de l'expression protéique « totale », en considérant comme positives les cellules qui expriment HSA, Gag ou les deux. On observe que Rev et le mutant M12/14 entrainent une réduction de l'expression des protéines d'environ 30% (Figure 55C).

Ces résultats nous confirment que l'expression de la protéine virale Rev seule est suffisante pour interférer avec une seconde infection. De plus, lorsqu'on étudie le profil des différents mutants, on observe que seul le mutant M12/14 est capable d'interférer avec le deuxième virus. C'est également le seul mutant capable de remplir son rôle d'export des ARN non et mono-épissés lors du cycle de réplication virale suggérant que la fonction d'export des ARN est impliquée dans l'interférence. On observe également que le mutant M12/14 est plus puissant à inhiber l'infection que la protéine Rev sauvage. Ces résultats nous informent également que l'interférence virale a lieu à une étape située en amont de l'expression des protéines au cours du cycle viral, car la synthèse des protéines HSA et Gag est affectée par l'interférence.

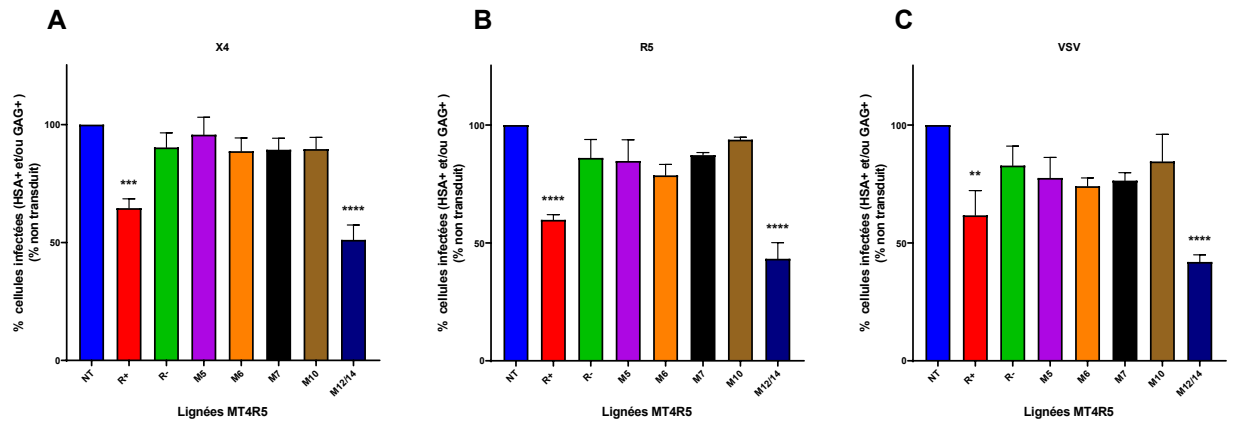


Figure 57 : Mesure de l'inhibition de l'infection en fonction de l'enveloppe portée par le virus.

Des cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou Rev muté ont été infectées avec des virus pseudotypés portant une enveloppe du VIH-1 à tropisme CXCR4 (A, 50 ng de p24/mL), ou CCR5 (B, 50 ng de p24/mL), ou du virus VSV (C, 1 ng de p24/mL). 40h post-infection, un marquage a été fait avec des anticorps reconnaissant HSA et Gag. Le pourcentage de cellules infectées a ensuite été mesuré par cytométrie (résultats de 3 expériences indépendantes). (*** $p < 0.05$ comparé au non transduit, Anova.).

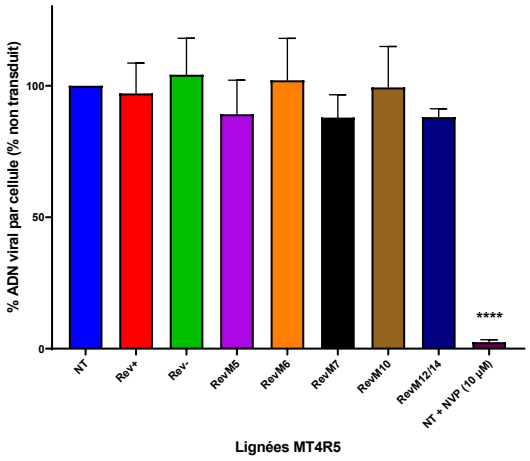


Figure 58 : Mesure de la quantité d'ADN viral rétrotranscrit dans les cellules exprimant la protéine Rev sauvage ou mutée.

Des cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou muté ont été infectées avec la même dose de virus NL4-3 propre (15 ng de p24/mL). 24h post-infection, l'ADN de ces cellules a été extrait et une qPCR du gène gag a été faite. (**** $p < 0.05$ comparé au non transduit, Anova.) (résultats de 5 expériences indépendantes).

III. Etape du cycle affectée

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier l'étape du cycle viral affectée par la restriction de la protéine Rev.

A- Entrée virale

L'entrée virale étant la principale étape du cycle viral décrite comme affectée par l'interférence, *via* la sous-expression à la surface cellulaire des récepteurs par Nef, Env et Vpu, nous avons regardé si Rev affectait également cette étape. Nous n'avons pas pu effectuer des tests de fusion virale en utilisant des virus chimères dont la protéine Vpr est couplée à la protéine β-lactamase car nos cellules expriment la GFP dont le spectre d'émission est trop proche de celui du substrat de la protéine β-lactamase non clivée. Nous avons donc utilisé des virus pseudotypés portant des enveloppes différentes qui utilisent des voies distinctes pour l'entrée. Si l'expression de Rev affecte différentiellement ces virus, cela pourrait suggérer un effet de Rev sur une voie d'entrée particulière. Nous avons utilisé une enveloppe VIH-1 de tropisme CXCR4, une enveloppe VIH-1 de tropisme CCR5, ou la glycoprotéine (g) du virus de la stomatite vésiculaire (VSVg), qui entre dans les cellules par endocytose. Les cellules ont été infectées par les différents virus, puis 40h post-infection l'interférence a été mesurée par cytométrie en flux en regardant l'expression des protéines HSA et Gag.

La protéine Rev sauvage ainsi que le mutant M12/14 entrainent une réduction importante de l'expression de Gag d'environ 30 à 50% par rapport aux cellules non transduites, quelle que soit l'enveloppe portée par le virus (Figure 57). Le mutant M12/14 est également plus puissant que la protéine Rev sauvage dans l'inhibition de l'infection des virus portant les enveloppes CCR5 et VSVg. On observe quelques fluctuations dans l'expression des protéines dans les cellules transduites avec les autres mutants, après infection avec les virus portant les enveloppes R5 et VSVg. Cependant ces variations ne sont pas significatives. De plus, elles sont également observées dans les cellules transduites avec le vecteur Rev- n'exprimant pas la protéine Rev, pouvant suggérer une légère baisse de susceptibilité de ces cellules à l'infection plutot qu'un phénomène d'interférence.
Ces résultats suggèrent donc que la protéine Rev n'interfère pas avec l'entrée virale du deuxième virus lors d'une superinfection mais à une étape plus en aval.

B- Transcription inverse

Nous avons ensuite mesuré l'effet de Rev sur l'efficacité de la transcription inverse. Les différentes lignées cellulaires MT4R5 ont été infectées avec un virus sauvage, puis 24h post-infection, l'ADN a été extrait. Une qPCR ciblant le gène *gag* a été effectuée afin de quantifier le nombre de copies d'ADN viral rétrotranscrit par cellule.

On observe quelques variations dans le niveau de transcription inverse entre les différentes lignées (Figure 58), cependant, ces différences ne sont pas significatives. De plus, on observe la même quantité d'ADN rétrotranscrit dans les cellules non transduites et celles exprimant la protéine Rev sauvage. Ces résultats suggèrent donc que Rev n'interfère pas avec les étapes précoces jusqu'à la transcription inverse du génome viral.

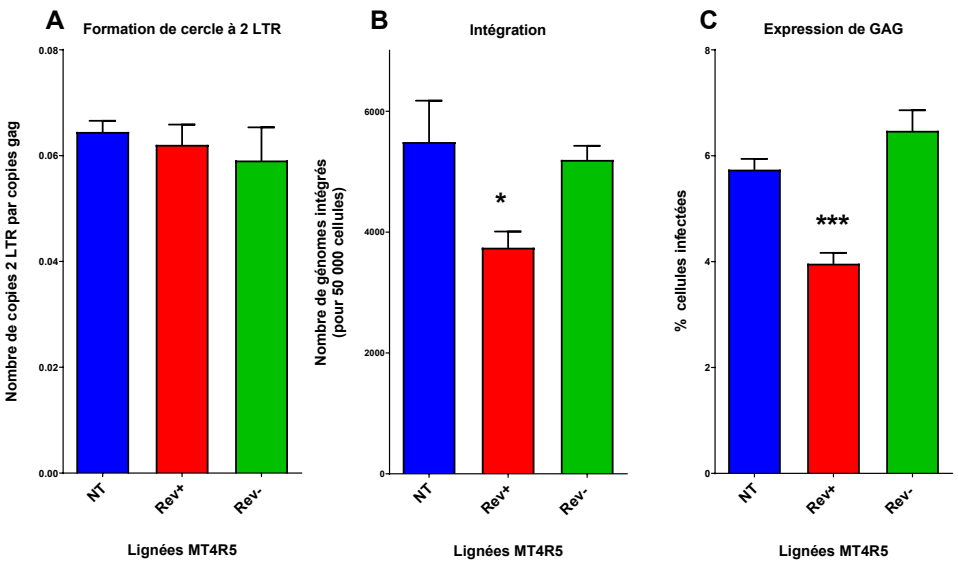


Figure 59 : Mesure du nombre de génomes intégrés par cellule et de la formation de cercles à 2 LTR.

Des cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou Rev- ont été infectées avec la même dose de virus (15 ng de p24/mL). 24h post-infection, l'ADN de ces cellules a été extrait et des qPCR 2 LTR (A) et Alu (B) ont été faites. Le pourcentage de cellules infectés a également été mesuré par cytométrie en flux après marquage de la protéine intracellulaire Gag (C). (* $p < 0.05$ comparé au non transduit, Anova.)(résultats de 2 expériences indépendantes (8 réplicats biologiques par expériences)).

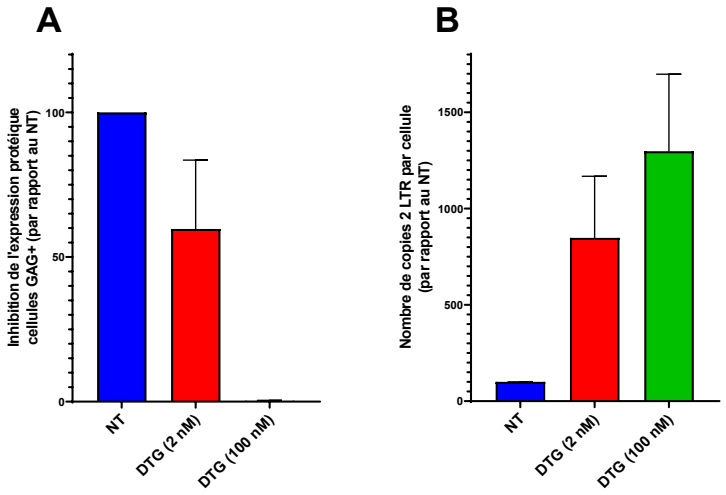


Figure 60 : Quantification de la formation de cercles à 2 LTR après traitement avec un inhibiteur de l'intégrase.

Des cellules MT4R5 non transduites ont été infectées avec 15 ng/mL de virus NL4-3 après traitement avec 2 ou 100 nM de Dolutégravir. 24h post-infection, l'ADN de ces cellules a été extrait et une qPCR 2 LTR (B) a été faite. Le pourcentage de cellules infectées a également été mesuré par cytométrie en flux après marquage de la protéine intracellulaire Gag (A)(résultats de 2 expériences indépendantes).

C- Import nucléaire et intégration

Nous avons ensuite étudié si Rev pouvait interférer avec la seconde infection au moment de l'import nucléaire et/ou de l'intégration du virus. Les cellules non transduites ou exprimant Rev sauvage ou Rev- ont été infectées avec un virus NL4-3. 24h post-infection l'ADN cellulaire a été extrait. Nous avons ensuite mesuré par qPCR la formation de cercles à 2 LTR, comme marqueur de l'import nucléaire et le nombre de génomes viraux intégrés par Alu qPCR.

Si l'import nucléaire est affecté par Rev, moins d'ADN viral devrait être importé dans le noyau et donc on s'attendrait à ce qu'il y ait moins de cercles à 2 LTR dans les cellules exprimant Rev. Nous observons des quantités équivalentes de cercles à 2 LTR dans les trois lignées cellulaires (Figure 59A) suggérant que cette étape n'est pas affectée. En revanche, on observe que dans les cellules exprimant la protéine Rev, il y a une diminution significative du nombre de génomes intégrés par rapport aux cellules non transduites et aux cellules transduites avec le vecteur Rev- (Figure 59B). De plus, cette inhibition est d'environ 30%, correspondant aux résultats obtenus sur l'inhibition de l'expression protéique de Gag en cytométrie en flux dans ces mêmes expériences (Figure 59C). La quantité d'ADN total étant similaire (Figure 58), cette diminution du nombre de génomes intégrés indique que Rev agit au niveau de l'intégration. Cependant, si l'import nucléaire n'est pas affecté et l'intégration inhibée, nous aurions dû observer une accumulation de cercles à 2 LTR, car l'ADN non intégré devrait se circulariser.

En effet, nous avons mesuré l'effet d'un inhibiteur de l'intégrase sur la formation de cercles à 2 LTR. Des cellules MT4R5 ont été traitées avec 2 ou 100 nM de dolutégravir (DTG) puis infectées avec un virus NL4-3. 24h post-infection l'ADN cellulaire de la moitié de la culture a été extrait et nous avons mesuré par qPCR la formation de cercles à 2 LTR. 48h post-infection nous avons marqué le reste des cellules avec un anticorps ciblant la protéine Gag, pour mesurer le taux d'infection en présence de DTG.

Lorsque les cellules sont traitées avec 2 nM de Dolutégravir, une dose qui entraine une réduction d'environ 40% de l'expression de Gag (similaire à l'effet observé dans les cellules exprimant Rev), on observe une très forte augmentation du nombre de cercles à 2 LTR (9 fois plus) (Figure 60A et B). Après traitement avec 100 nM de DTG, qui inhibe totalement l'intégration virale, on observe que le nombre de cercles est multiplié par 13 par rapport aux cellules non traitées.

Ces résultats nous montrent que l'inhibition directe et spécifique de l'intégrase conduit à la formation d'un très grand nombre de cercles à 2 LTR. Ces résultats suggèrent que Rev induit une restriction post-entrée dans le noyau. Ceci peut être dû à une dégradation de l'ADN ou à une inhibition de l'intégration en conduisant à la formation d'autres formes d'ADN virales (linéaires, autointégrées ou circulaires à 1 LTR) qui ne seraient alors pas détectées par la qPCR ciblant les cercles à 2 LTR. Il est également possible que les étapes d'import et d'intégration soient toutes les deux affectées par la restriction de Rev et que l'augmentation des cercles à 2 LTR soit compensée par une réduction d'import nucléaire.

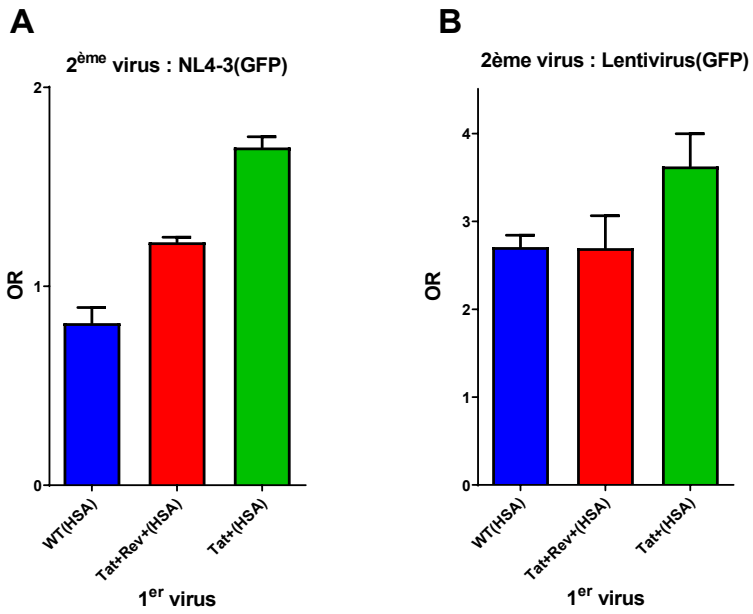


Figure 61 : Mesure de l'interférence induite par Rev contre un lentivirus.

Des cellules MT4R5 ont été infectées avec 30 ng de p24 d'un premier virus. Ce premier virus exprime la protéine HSA et : soit les protéines Tat et Rev, soit juste la protéine Tat, soit tous les gènes du VIH-1. 24h après, les cellules sont infectées avec un second virus exprimant soit : (A) tous les gènes du VIH-1 et la GFP (100 ng de p24), (B) soit uniquement la GFP (200 ng de p24). 48h après la première infection, les cellules sont marquées et le pourcentage de cellules infectées est mesuré par cytométrie en flux. L'interférence est ensuite calculée par la formule : OR=(DI/GFP+)/(HSA+/NI) (résultats de 3 expériences indépendantes).

IV. Mécanisme d'action de Rev dans l'interférence

Notre dernier objectif était de déterminer comment Rev interfère avec une seconde infection. Nous avons émis l'hypothèse que Rev devait agir soit directement, soit par l'intermédiaire de cofacteurs cellulaires contre le deuxième virus, ou alors l'expression de Rev dans les cellules pourrait induire certains facteurs cellulaires visant le virus.
Sachant que Rev interfère avec la seconde infection entre la fin de la transcription inverse et l'intégration et probablement à une étape post-entrée nucléaire, cela nous a permis de cibler plus spécifiquement certains mécanismes qui pourraient être impliqués dans l'interférence.

A- Implication des gènes accessoires

Pour comprendre comment Rev interfère avec le second virus, nous avons mesuré l'implication des gènes accessoires dans ce phénomène. Pour cela, nous avons regardé si Rev pouvait interférer avec un lentivirus, délété de tous les gènes accessoires du VIH-1. Puisque les lentivirus dont nous disposons expriment seulement la protéine GFP, nous n'avons pas pu mesurer l'interférence en infectant nos lignées MT4R5 transduites car elles expriment aussi la GFP.
Des cellules MT4R5 ont été infectées avec un premier virus exprimant soit toutes les protéines virales, soit juste la protéine Tat ou les protéines Tat et Rev (Remion et al., 2016). Ces virus expriment également la protéine HSA. 24h après, une deuxième infection a été faite soit avec un virus entier ou alors avec un vecteur lentiviral (exprimant tous les deux la GFP). Le pourcentage de cellules simplement infectées (HSA ou GFP) et doublement infectées (HSA+GFP) est ensuite mesuré par cytométrie en flux. L'interférence virale est évaluée par calcul des Odds Ratio selon la formule :

$$OR = \frac{\left(\frac{DI}{GFP}\right)}{\frac{HSA}{NI}}$$

Une réduction de la valeur de l'OR signifiant la mise en place d'un phénomène d'interférence virale (Remion et al., 2016).

Dans la Figure 61A, la deuxième infection a été faite avec un virus sauvage NL4-3 exprimant la GFP. On observe un plus faible OR lorsque les cellules ont été infectées en premier par un virus sauvage ou exprimant Tat et Rev par rapport au virus exprimant seulement Tat. Cela signifie que l'expression de Rev est requise pour interfèrer avec la seconde infection. On observe aussi que lorsque les cellules sont infectées en premier avec un virus sauvage, il y a plus d'interférence que lorsque l'infection a été faite avec le virus exprimant juste Tat Rev. Ceci est très probablement dû à l'expression par ce premier virus des protéines Env, Nef et Vpu qui entrainent la sous-expression du récepteur CD4 induisant une plus forte inhibition de la seconde infection. Lorsque la seconde infection est faite avec un lentivirus, on observe également un plus faible OR lorsque les cellules ont été infectées en premier avec le virus sauvage ou exprimant Tat et Rev par rapport au virus exprimant seulement Tat. Le lentivirus n'est pas plus inhibé lorsque la première infection est faite avec un virus sauvage qu'avec le virus Tat Rev car il porte une enveloppe du virus VSV et n'est donc pas affecté pas la sous-expression du récepteur CD4 (Figure 61B).

Ces résultats nous montrent que la protéine Rev seule est capable d'interférer avec une infection faite par un lentivirus. La particule lentivirale ne porte pas et n'encode pas Tat, Rev,

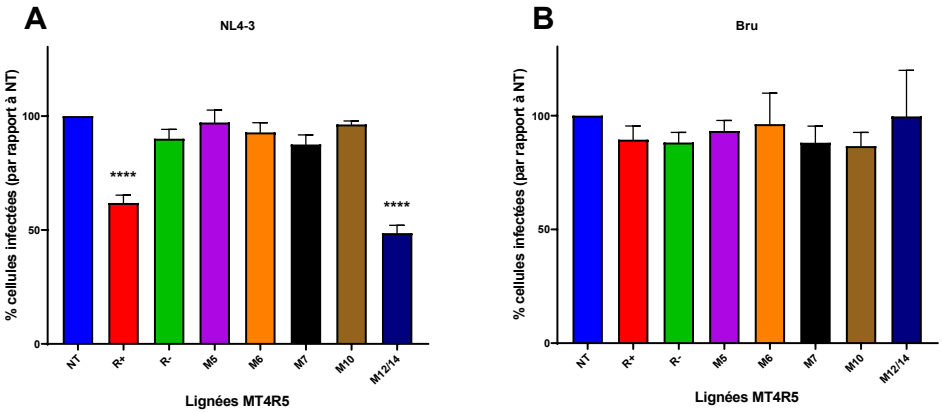


Figure 62 : Mesure de l'inhibition par Rev sauvage ou mutée de différentes souches du VIH-1.

Les cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou mutée ont été infectées avec la même dose de virus NL4-3 (A) et Bru (B). 24h post-infection, les cellules ont été traitées avec 10 µM de névirapine. Le pourcentage de cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux après marquage intracellulaire de la protéine Gag (résultats de 3 expériences indépendantes) (NL4-3 : **** $p < 0.05$ comparé au non transduit, Anova.).

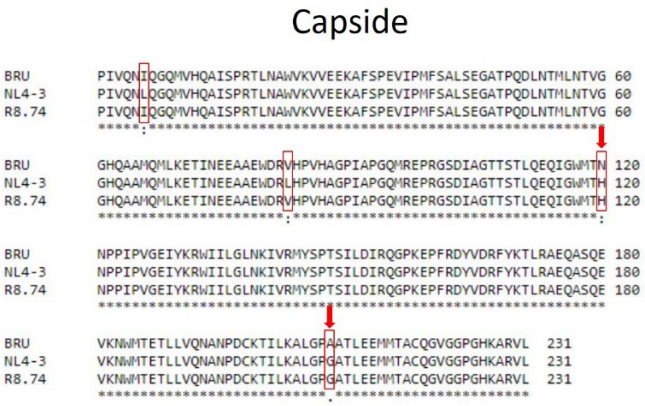


Figure 63 : Alignement des séquences de la capside des virus NL4-3, Bru et du lentivirus (R8.74).

Un alignement des séquences des capsides de ces trois souches virales a été fait sur ClustalΩ.

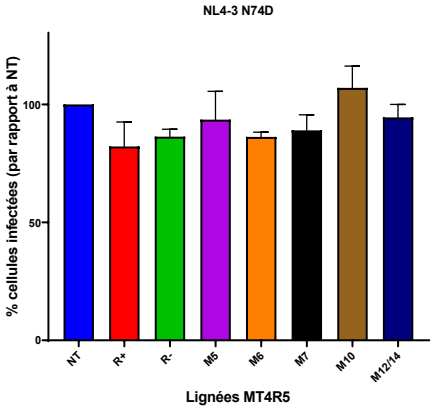


Figure 64 : Mesure de l'inhibition par Rev sauvage ou mutée d'un virus NL4-3 portant la mutation N74D dans sa capside.

Les cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage ou mutée ont été infectées avec la même dose de virus NL4-3N74D. 48h post-infection, le pourcentage de cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux après marquage intracellulaire de la protéine Gag (résultats de 3 expériences indépendantes).

Nef, Vif, Vpu ou Vpr. De plus, elle porte une enveloppe du virus VSV. Ceci nous indique qu'aucune des protéines régulatrices et accessoires n'est la cible de Rev dans l'interférence. Il est donc très probable que Rev agisse contre les protéines Gag et/ou Pol du second virus.

B- Rev interfère avec le VIH-1 de manière souche dépendante

Nous nous sommes ensuite demandé si d'autres souches du VIH-1 étaient sensibles à l'inhibition causée par Rev. Nous avons infecté les différentes lignées MT4R5 Rev avec la souche virale Bru et mesuré l'interférence par cytométrie en flux après marquage de la protéine Gag.
Alors que Rev et son mutant M12/14 entrainent une réduction d'environ 50% de l'expression de Gag pour la souche NL4-3, on n'observe pas d'inhibition de l'infection lorsque les cellules sont infectées avec la souche Bru (Figure 62A et B). En effet, on remarque exactement le même pourcentage de cellules infectées dans les cellules exprimant Rev par rapport à celles portant le vecteur Rev-. Le mutant M12/14 n'entraine pas non plus de baisse de l'expression de Gag. La souche Bru est résistante à l'interférence provoquée par Rev.

C- La capside virale est un déterminant de la susceptibilité à l'interférence médiée par Rev

Nous avons réalisé des alignements de séquences des protéines codées par Gag et Pol des virus NL4-3 avec celle de la souche Bru mais également celle du plasmide R8.74, nous ayant permis de produire le lentivirus sensible à la restriction induite par Rev. Ceci nous a permis d'identifier quelques différences dans Bru, par rapport aux deux autres virus, potentiellement impliquées dans la résistance à l'interférence (Figure 63). Etant donné que cette interférence agit au moment de l'import et/ou l'intégration, qu'elle est souche spécifique et que les cibles de Rev dans le second virus sont très probablement Gag et/ou Pol, la capside virale nous a paru être un très bon candidat comme étant la cible de Rev.
En effet, la capside est une des protéines virales essentielles lors des étapes d'import nucléaire et d'intégration car elle interagit avec différents facteurs cellulaires. De plus, c'est la cible de plusieurs facteurs de restriction bien connus. Nous avons trouvé deux mutations dans la capside de Bru qui pourraient être responsables de cette perte de restriction (H120N et G208A) (Figure 63). En effet, il a été montré que la mutation G208A conferait au virus une résistance à Mx2 (Liu et al., 2015).

Afin de confirmer le rôle de la protéine de capside dans cette interférence virale, nous avons regardé si un virus NL4-3 portant une seule mutation dans sa capside (N74D) qui le rend incapable de se fixer au facteur CPSF6 et résistante à Mx2 était sensible à la restriction de Rev. Dans ces expériences, les cellules transduites avec Rev+ et Rev- sont moins susceptibles à l'infection que les cellules non transduites. La réduction étant similaire entre les cellules Rev+ et Rev-, l'expression de la protéine Rev ne semble pas inhiber l'infection de ce virus (Figure 64). De plus, le mutant M12/14 montre le même taux d'expression de Gag que les cellules non transduites. Nos résultats suggèrent qu'une seule mutation dans la capside affectant la fixation de CPSF6, un facteur cellulaire impliqué à la fois dans l'import et l'intégration, mais également impliquée dans la résistance à Mx2 est donc suffisante pour ne plus observer d'inhibition par Rev. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la cible de l'interférence médiée par Rev soit la capside du deuxième virus.

Afin d'identifier une signature de la susceptibilité à Rev dans la capside du VIH-1, nous avons testé la capacité de Rev à interférer avec une série d'isolats viraux. Les cellules non

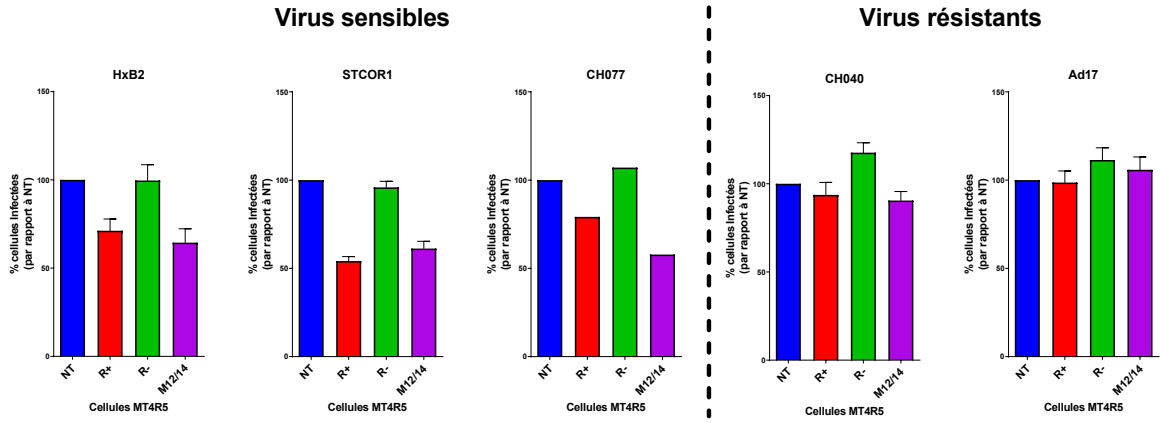


Figure 65 : Mesure de l'interférence virale médiée par Rev dans différents isolats du VIH-1.

Les cellules MT4R5 non transduites ou exprimant Rev sauvage, Rev- ou le mutant M12/14 ont été infectées avec la même dose de virus HxB2, STCOR1, CH077, CH040 ou Ad17. 24h post-infection, les cellules ont été traitées avec 10 µM de névirapine. Le pourcentage de cellules infectées a été mesuré par cytométrie en flux après marquage intracellulaire de la protéine Gag (résultats de 1, 2 ou 3 expériences indépendantes selon la souche virale).

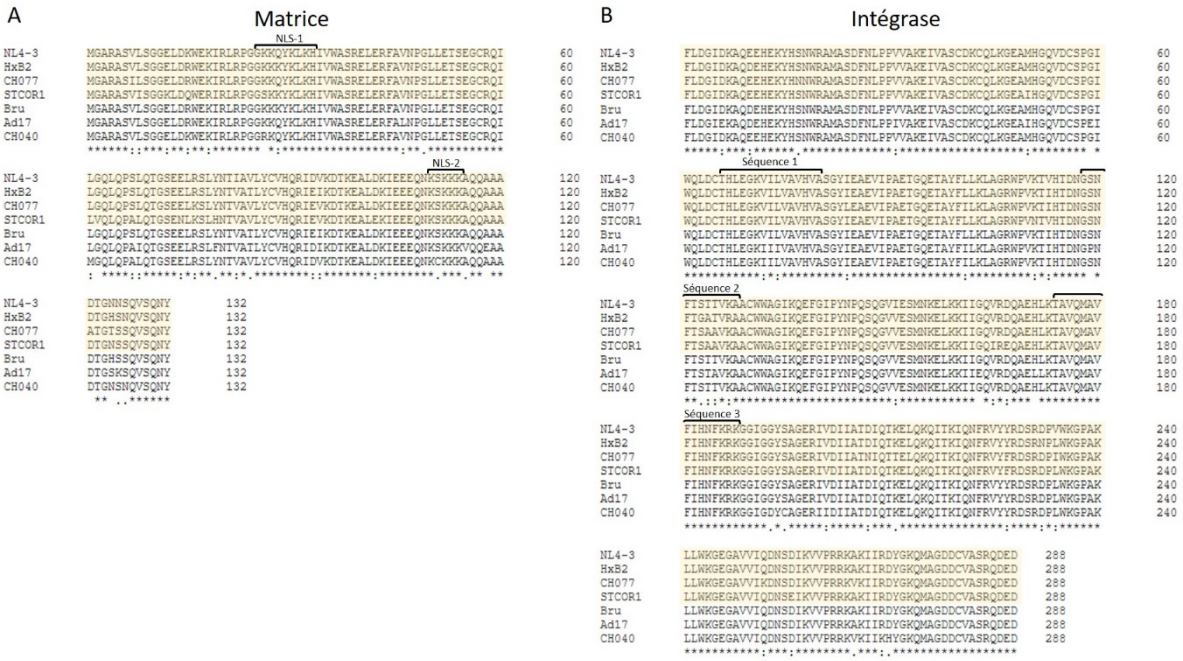


Figure 66 : Alignement des séquences de la matrice et de l'intégrase des différentes souches virales.

Un alignement des séquences des matrices (A) et des intégrases (B) des souches virales NL4-3, HxB2, CH077, STCOR1, Bru, Ad17 et CH040 a été fait sur ClustalΩ. Les virus sensibles à la restriction médiée par Rev sont surlignés en jaune.

transduites, exprimant la protéine Rev sauvage, tronquée ou le mutant M12/14 ont été infectées avec les souches virales suivantes : HxB2, STCOR1, CH040, CH077 et Ad17 (Figure 65). Puis nous avons mesuré le niveau d'expression de la protéine Gag en cytométrie en flux.

Les résultats montrent que les souches HxB2, STCOR1 et CH077 semblent sensibles à la restriction causée par Rev, avec une diminution de l'expression de Gag dans les cellules exprimant la protéine Rev sauvage et le mutant M12/14 par rapport aux cellules non transduites ou exprimant la protéine Rev défective. En revanche, les souches Ad17 et CH040 semblent résistantes à la restriction de Rev comme la souche Bru.
De manière surprenante, nous avons observé que deux virus (Bru et HxB2), dont la séquence de la capside est identique, sont l'un résistant et l'autre sensible à l'interférence médiée par Rev. Ces résultats impliquent l'existence d'autres déterminants, en plus de la capside, dont le rôle est attesté par le phénotype du virus NL4-3 présentant la mutation N74D dans sa capside.

Etant donné que nos résultats montrent que l'étape affectée est l'import nucléaire ou l'intégration, nous avons comparé les séquences des protéines virales directement impliquées dans ces étapes des différentes souches. En plus de la capside, trois protéines virales sont impliquées dans l'import nucléaire, même si leur rôle reste controversé : la matrice, Vpr et l'intégrase (Rivière et al., 2010).

Au niveau de la matrice, deux signaux de localisation nucléaire ont été identifiés dans les régions N et C-terminales (Haffar et al., 2000). A partir de l'alignement, nous avons remarqué qu'une lysine est souvent remplacée par une glutamine dans le premier NLS, mais cette mutation ne distingue pas les virus sensibles des résistants (Figure 66A). La seconde séquence NLS, située en C-terminal, est quant à elle très conservée entre les souches. L'alignement des séquences ne permet pas de mettre en évidence une ou plusieurs mutations permettant de distinguer les virus sensibles des résistants. Nous avons cependant remarqué des différences à l'extrémité C-terminale, dans laquelle le nombre et la position des sérines diffèrent entre les souches. Cette portion C-terminale de la matrice (hélice 5) ne fait pas partie de la « tête » globulaire (hélices 1 à 4) et pointe vers le core viral. Les phosphorylations des résidus sérines et de la tyrosine C-terminale de la matrice ont été montrées comme pouvant être impliquées dans l'import nucléaire du PIC, mais leur rôle respectif n'est pas totalement élucidé (Kaushik and Ratner, 2004).

Concernant la protéine Vpr, qui n'a pas de séquence NLS classique mais est une protéine nucléophile, un rôle dans l'import nucléaire a été proposé. Cependant, Vpr n'est pas strictement nécessaire pour l'import nucléaire. En effet, le vecteur lentiviral que nous avons utilisé en est dépourvu et sa sensibilité à Rev ne peut donc pas être due à Vpr. De plus, en alignant les séquences de Vpr des différentes souches, nous n'avons pas observé de mutations qui pourraient expliquer les différences de susceptibilité des différentes souches à Rev.

L'intégrase joue un rôle dans l'import nucléaire et est responsable de l'intégration. La comparaison des séquences des virus sensibles et résistants ne montre pas de différences consistantes pouvant expliquer les différences des phénotypes (Figure 66B). De même, les trois séquences de l'intégrase, proposées par l'équipe d'Abraham Loyter (Levin et al., 2009b), supposées interagir avec Rev sont strictement identiques entre les souches NL4-3 et Bru (sensible et résistante). Il est cependant possible que des cibles différentes soient affectées par Rev selon les souches virales. Seule la construction de virus chimères avec des échanges d'une protéine (ou de combinaison) entre un virus résistant et sensible permettra d'identifier les domaines impliqués. C'est dans cette direction que nous poursuivrons nos travaux.

Projets collaboratifs

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à plusieurs études réalisées dans mon laboratoire ou en collaboration avec des équipes extérieures (manuscrits en annexes).

Dans l'étude des mécanismes de coinfection dans laquelle notre laboratoire a de l'expertise, nous travaillons en collaboration avec l'équipe du Professeur Iwami de l'université de Kiushu (Japon) qui développe des modèles mathématiques s'appliquant à des phénomènes biologiques. Cette collaboration nous a permis de publier récemment deux articles dans des revues scientifiques pour lesquels j'ai réalisé des expériences de coinfection virale. Les données ont été analysées avec des modèles mathématiques développés par l'équipe du Professeur Iwami, ce qui a permis d'extrapoler des données qu'il serait très difficile de produire expérimentalement.

La première étude à laquelle j'ai participé, publiée dans la revue Scientific Reports (Ito et al., 2017), portait sur l'analyse de l'hétérogénéité de la susceptibilité des cellules lors de coinfection. En effet, il avait précédemment été démontré que les événements de coinfection cellulaire se produisent plus fréquemment qu'attendu pour des infections indépendantes et ne suivent pas une distribution aléatoire. Des approches de modélisation mathématique avaient proposé que ce caractère non aléatoire pouvait être expliqué par des différences de susceptibilité des cellules cibles (Dang et al., 2004). Notre étude a permis de développer un nouveau modèle mathématique quantitatif plus détaillé que les modèles préexistants. En particulier, les différences de susceptibilité sont prises en compte dans un continuum, au lieu de considérer des sous-populations cellulaires avec des susceptibilités données (100%, 80%, 60%...) comme dans les études précédentes.

La deuxième étude réalisée avec l'équipe du Professeur Iwami, publiée dans la revue Journal of Theoretical Biology (Ito et al., 2018) portait sur la caractérisation de l'hétérogénéité de ces cellules. Ainsi, par le développement d'un autre modèle mathématique, ces analyses ont mis en évidence que l'existence de deux sous-populations de cellules cibles de sensibilitées différentes suffirait pour expliquer les résultats expérimentaux. En effet, les coinfections virales auraient principalement lieu dans une seule de ces sous-populations cellulaires (98,3 % des cellules coinfectées proviendraient de la sous-population la plus sensible). Cette approche mathématique et expérimentale a également permis d'extrapoler la dynamique des coinfections et de montrer que celles-ci se produisent très rapidement après l'exposition au virus.

Notre équipe travaille également en collaboration avec l'équipe du Docteur Miguel Castanho de l'Institut de Médecine Moléculaire de Lisbonne (Portugal). Cette équipe a récemment développé deux peptides dérivés de la protéine de capside du virus de la Dengue ayant un pouvoir inhibiteur contre le VIH-1. Cette collaboration visait à étudier l'efficacité de ces deux peptides et identifier par quels mécanismes ils inhibaient la réplication virale. Pour cette étude, j'ai testé l'efficacité des deux peptides contre de nombreuses souches virales et j'ai ainsi pu observer qu'ils inhibaient uniquement les virus ayant un tropisme X4, suggérant un mécanisme lié à l'inhibition de l'entrée du virus. J'ai donc effectué des tests de fusion virale permettant de confirmer que ces peptides inhibent cette étape du cycle viral et seulement pour les virus X4. Par des techniques de cytométrie en flux, j'ai également montré que ces peptides se liaient de manière spécifique au corécepteur CXCR4 modifiant sa structure mais sans induire son internalisation. Ces peptides ont l'avantage de présenter une IC50 de l'ordre du nanomolaire. De plus, ces peptides possèdent une longue demi-vie dans le sérum humain (supérieure à 6h) et une faible toxicité. L'étude a également montré que l'un des peptides agissaient comme agoniste de

CXCR4 et l'autre comme antagoniste. L'article présentant les résultats de cette étude est actuellement en révision dans la revue ACS Infectious Diseases, et un brevet a été déposé pour l'un des peptides.

J'ai également participé à une étude réalisée dans mon laboratoire portant sur la caractérisation des virus compétents pour la réplication, issus du réservoir viral de personnes vivant avec le VIH-1 et traitées par cART. Grâce à une technique permettant l'expression des virus en latence dans des lymphocytes quiescents (VOA pour *Viral Outgrowth Assay*), notre laboratoire a mené une étude génotypique et phénotypique de ces virus. Nous avons ainsi pu montrer que la diversité du réservoir compétent reflète celle présente au début du traitement. Ainsi, une mise sous traitement rapide après infection permet de réduire cette diversité. De plus, la durée de traitement ne semble pas impactée la diversité du réservoir viral. Pour cette étude, j'ai participé à la mise en place des protocoles expérimentaux et à la formation des collègues impliqués dans ce projet. Cet article devrait être soumis dans une revue scientifique très prochainement.

Discussion et Perspectives

Partie 1 : Etude de l'activité antivirale des différents sous-types d'IFN-α lors d'une infection VIH-1

Les IFN-α sont une grande famille de cytokines de l'immunité innée. Il en existe 12 sous-types différents chez l'Homme. Ils ont de forte homologie (75 à 99% d'identité de séquence au niveau protéique) et sont très proches structurellement. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle antiviral de l'IFN-α *in vitro* mais aussi *in vivo* ainsi que sa participation au contrôle de la virémie dans les phases précoces de l'infection. Il a notamment été montré que bloquer la signalisation IFN-α chez des macaques rhésus en primoinfection conduisait à une diminution de l'expression de gènes antiviraux, une augmentation de la taille du réservoir et une déplétion accélérée des lymphocytes T CD4, ceci conduisant à une progression plus rapide vers le stade SIDA (Sandler et al., 2014a). Au contraire, l'administration précoce d'IFN-α2 entraine une surexpression de gènes antiviraux et limite l'infection systémique. Cependant, il a été montré chez le macaque rhésus que le traitement continu à l'IFN-α2 induit une désensibilisation à celui-ci, ce qui conduit à une diminution du nombre de lymphocytes T CD4 et une augmentation de la taille du réservoir (Sandler et al., 2014b).

Lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1, on observe une forte production d'IFN-α (Stacey et al., 2009). Cependant, il a été montré que l'infection SIV de macaques par le tractus génital conduisait à une très forte induction de cytokines proinflammatoires, ce qui favoriserait la dissémination virale, et la production d'IFN de type I arriverait trop tard pour empêcher la réplication et la dissémination virale (Abel et al., 2005). En revanche, la persistance de la production d'IFN-α pendant la phase chronique est associée à un dysfonctionnement et une déplétion des lymphocytes T CD4 et corrèle avec une progression rapide de la maladie (Harris et al., 2010). La plupart de ces études mesurent la production de la globalité des IFN-α et non la proportion de chaque sous-type spécifiquement en raison des échantillons très rares en primo-infection. De plus, les IFN-α étant très proches au niveau de leur séquence, il est difficile de les discriminer de manière spécifique. Une étude *in vitro* a montré que l'infection de cellules dendritiques plasmacytoïdes (principales cellules productrices d'IFN-α) par le VIH-1 conduisait à une forte production d'IFN-α. Cependant les sous-types qui semblent les plus induits par l'infection sont également parmi les moins puissants pour inhiber la réplication du virus. Les auteurs ont observé une corrélation inverse entre les niveaux d'induction des différents sous-types d'IFN-α par les pDC et leur puissance anti-virale contre le VIH-1 (Harper et al., 2015).

Bien que l'existence des 12 sous-types d'IFN-α soit connue depuis des années, la plupart des études sur les IFN-α se sont longtemps focalisées sur le sous-type 2 qui est toujours le seul sous-type utilisé en clinique. L'étude des 12 sous-types est assez récente et remonte aux dix dernières années. Plusieurs études sur l'inhibition du VIH-1 par les 12 sous-types ont montré qu'ils présentent des potentiels antiviraux différents face au VIH *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux. Ces études ont notamment montré que le sous-type 14 était le plus puissant à inhiber la réplication du VIH-1 (Lavender et al., 2016 ; Harper et al., 2015) et que l'IFN-α2 avait des effets plus modérés. Cependant, la plupart de ces études, après une comparaison de tous les sous-types, se sont focalisées sur un nombre limité d'IFN-α, probablement dans le but de simplifier leurs expériences. Nous avons choisi d'étudier, de façon systématique, l'effet de tous les sous-types afin de mieux évaluer leur rôle respectif. Notre étude visait à approfondir l'effet des différents sous-types sur le cycle de réplication virale et notamment au niveau de chaque étape afin de mieux décrypter leur mode de fonctionnement. De plus, nous avons réalisé une analyse du transcriptome des IFN-α afin d'évaluer le rôle des facteurs induits dans l'inhibition de ces étapes.

Nos résultats montrent que les différents sous-types d'IFN-α présentent des puissances

d'inhibition différentes du VIH-1. Comme la plupart des études sur les différents sous-types, nous avons observé que l'IFN-α14 était le plus puissant dans l'inhibition de la réplication du VIH-1. De même, nous avons également observé que l'IFN-α1, qui lie avec une faible affinité les récepteurs, était le plus faible (Harper et al., 2015 ; Lavender et al., 2016 ; Abraham et al., 2016). Nos résultats montrent aussi que les différentes étapes du cycle viral sont affectées par les IFN-α et ce de manière différente. Nous avons notamment vu que l'entrée virale était fortement inhibée par tous les sous-types d'IFN-α et avec des niveaux d'inhibition assez proches. Cette inhibition de l'entrée virale est très probablement associée à l'induction des protéines IFITM. De plus, nos résultats montrent que l'entrée virale de la souche de tropisme X4 (NL4-3) est plus sensible aux IFN-α que la souche de tropisme R5 (NLAd8). Il a été décrit dans la littérature que les virus R5 étaient plus sensibles à la protéine IFITM1, qui est exprimée à la surface de la membrane plasmique, alors que les virus X4 semblent plus sensibles aux protéines IFITM2 et 3 majoritairement exprimées dans les endosomes (Foster et al., 2016). Nous observons une corrélation entre l'inhibition de l'entrée virale du virus NLAd8 et le niveau d'induction d'IFITM1. Afin d'évaluer le rôle de la protéine IFITM1 dans l'inhibition de l'entrée virale, nous envisageons de réaliser des expériences d'inhibition de son expression après traitement aux IFN-α. Ceci nous permettrait de mesurer son impact sur l'entrée virale des souches R5 et X4.

Les étapes post-entrée sont inhibées par tous les sous-types d'IFN-α, mais cette fois-ci avec des puissances différentes. Nos résultats montrent que l'IFN-α14 est le plus puissant dans l'inhibition de ces étapes. Les IFN-α10, 6, 8, 16 et 17 présentent également un fort potentiel inhibiteur. Les autres sous-types montrent des effets plus modérés. Nous observons que le facteur de restriction SAMHD1 n'est pas induit dans les cellules traitées aux IFN-α quelque soit le sous-type utilisé. Cependant, ce facteur est principalement exprimé dans les cellules qui ne sont pas en division et a été montré comme inductible par l'IFNγ (Valverde-Estrella et al., 2020). De plus, l'activité de SAMHD1 est dépendante de son état de phosphorylation, donc son niveau d'expression n'est pas le seul marqueur de son activité antivirale (White et al., 2013). En revanche, le facteur TRIM5α est induit par les sous-types et ce de manière plus ou moins forte. Il est admis que les protéines TRIM5α de certaines espèces de primates sont beaucoup plus efficaces pour inhiber l'infection VIH-1 que la protéine TRIM5α humaine (Stremlau et al., 2006 ; Sakuma et al., 2007). Cependant, la protéine TRIM5α humaine est quand même efficace, dans une plus faible proportion, pour inhiber la réplication virale (Battivelli et al., 2010). Une étude récente a montré que le VIH-1 utilise le facteur CypA pour échapper à la reconnaissance de la capside par TRIM5α. Ainsi, en absence de CypA, Trim5α est capable d'inhiber la réplication virale (Kim et al., 2019). De plus, les IFN-α stimuleraient l'immunoprotéasome, ce qui favoriserait le renouvellement du facteur TRIM5 et augmenterait son efficacité (Jimenez-Guardeño et al., 2019). Dans nos expériences, nous observons une corrélation entre l'inhibition de la transcription inverse et le niveau d'induction de TRIM5α par les différents sous-types. Cependant, pour confirmer le rôle de cette protéine dans la restriction de cette étape nous prévoyons d'inhiber son expression après traitement aux IFN-α.

Nous avons également observé que le facteur Mx2 était très fortement induit par les IFN-α14, 8 et 2. Ce niveau d'induction semble correspondre aux résultats que nous observons lorsque nous comparons la quantité d'ADN viral présente à 7h et 24h post-infection. En effet, pour l'IFN-α2, qui semble peu efficace dans l'inhibition des étapes jusqu'à la transcription inverse, on observe une très faible quantité d'ADN viral à 24h post-infection. Cette observation suggère que Mx2 aurait bloqué l'import et/ou l'intégration de l'ADN viral, facilitant sa dégradation, notamment par le facteur TREX1 qui est fortement induit par tous les sous-types d'IFN-α et est connu pour dégrader l'ADNsb et l'ADNdb dans le cytoplasme (Yan et al., 2010). On observe des résultats similaires pour l'IFN-α8. Pour confirmer cela, nous pourrions mesurer le nombre de cercles à 2 LTR dans les cellules traitées ainsi que le nombre de génomes intégrés.

Cependant, au vu de la restriction très puissante sur les étapes en amont, la mesure des cercles à 2 LTR serait à risque d'artéfacts. De même l'inhibition du facteur Mx2 permettrait de clarifier son rôle.

L'inhibition des étapes plus tardives du cycle viral a été moins étudiée, exception faite pour les études qui portent sur l'étape de bourgeonnement. Actuellement quelques facteurs ont été montrés comme pouvant affecter la transcription et la traduction virale du VIH-1. On retrouve parmi eux TRIM22 qui empêche la liaison du facteur de transcription Sp1 au promoteur LTR et bloque la transcription des gènes viraux et SLFN11 qui modifie le pool d'ARNt et bloque la synthèse des protéines virales (Li et al., 2012 ; Turrini et al., 2015). Dans nos expériences, nous observons une baisse significative de la quantité totale de protéine p24. Cependant, la réduction de la quantité de protéine p24 peut résulter à la fois de l'inhibition de la transcription, de la traduction et probablement de la maturation virale, car le précurseur immature est moins bien reconnu par les tests ELISA. Ceci ne nous permet donc pas d'évaluer spécifiquement l'impact des IFN-α sur chacune de ces étapes précises. Nous observons que la protéine TRIM22 est induite par tous les sous-types d'IFN-α. En revanche, le niveau d'expression de Schlafen 11 ne varie pas après traitement avec les différents sous-types d'IFN-α. Des expériences complémentaires pourraient nous permettre de mieux décrypter les effets de chaque sous-type au niveau de ces étapes tardives. Par exemple, une quantification des ARN viraux transcrits après intégration permettrait de mesurer le niveau de transcription virale. De même un Western Blot de la protéine Gag pourrait nous renseigner sur le niveau d'expression de celle-ci ainsi que sur sa maturation.

Nos résultats montrent que le bourgeonnement des virions n'est que peu voire pas affecté par les IFN-α. Certains facteurs comme BST2 et ISG15 ont été montrés comme inhibant l'étape de bourgeonnement (Neil et al., 2008 ; Pincetic et al., 2010). Cependant, il a été montré que le facteur BST2 est contrecarré par la protéine virale Vpu, qui est exprimée par le virus sauvage utilisé dans nos expériences. L'ISG15 est induite par tous les sous-types d'IFN-α. En revanche, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'inhibition de l'étape de bourgeonnement et le niveau d'induction d'ISG15. Il est possible que notre test ELISA détecte moins bien les formes immatures de Gag, ce qui pourrait fausser les résultats. Cependant, on peut supposer que ce défaut de détection soit équivalent dans les deux fractions (cellulaire et extracellulaire). Nous pourrions tester l'efficacité de détection de notre test ELISA en mesurant les quantités de virions formés en présence et en absence d'un inhibiteur de protéase ou analyser par Western Blot (semi quantitatif) les deux fractions. Là encore, la reconnaissance par les anticorps pourrait être différente pour la forme mature et immature.

Nous avons également mesuré l'infectivité des virons produits en présence d'IFN-α avec un système de cellules rapportrices, les cellules TZM-bl. Avant infection, les surnageants ont été dilués afin d'obtenir la même concentration de virus pour toutes les conditions (en ng de p24). Ceci nous a également permis de diluer les IFN-α encore présents dans les surnageants à quelques picogrammes par mL, une dose négligeable pour avoir des effets sur les cellules TZM-bl. Les défauts d'infectivité des virions résultent très probablement de l'incorporation de certaines protéines, telles que les IFITM, dans la membrane virale au moment du bourgeonnement (Tartour et al., 2014 ; Compton et al., 2014). Ces protéines incorporées diminueraient l'efficacité de fusion lors du cycle de réplication suivant. Ils pourraient également résulter de modifications post-traductionnelles ou d'un défaut de maturation des virions. La protéine APOBEC3G pourrait également jouer un rôle en inhibant la transcription inverse. Cependant, nous observons qu'APOBEC3G n'est pas induite par les différents sous-types. De plus, notre virus code pour la protéine virale Vif qui est capable de la contrecarrer.

La puissance d'inhibition totale d'un IFN est donc associée à l'addition de ses puissances d'inhibition de chaque étape du cycle viral. Ainsi, l'IFN-α14 est l'IFN le plus puissant car il est

capable d'inhiber fortement chaque étape du cycle viral. En revanche, les autres IFN peuvent se montrer efficaces sur certaines étapes mais moins sur d'autres, les rendant moins puissants dans l'inhibition de la réplication virale. Par exemple, l'IFN-α16 est très puissant dans l'inhibition des étapes jusqu'à la rétrotranscription et l'expression des protéines mais n'a pas ou peu d'effet sur le bourgeonnement et l'infectiosité des virions formés. Grâce à l'étude du transcriptome, nous avons observé que la puissance d'inhibition des sous-types d'IFN-α est associée au niveau d'induction des facteurs de restriction du VIH-1. En effet, les sous-types les plus efficaces dans l'inhibition de la réplication virale sont également ceux qui induisent le plus fortement ces facteurs de restriction. Notamment, l'IFN-α14 est capable d'induire le plus puissamment les protéines IFITM1, Mx2, TRIM5α et BST2. A l'inverse, L'IFN-α1, qui est le moins puissant, n'induit moins voire pas l'expression de ces ISG.

Dans notre étude du transcriptome, nous avons observé que certains ISG n'étaient pas induits. Par exemple, SLFN11 est transcrit au même taux quelque soit le traitement. Cependant, un haut niveau d'expression de SLFN11 dans les lymphocytes T CD4 a été décrit comme corrélant avec un contrôle de la réplication chez les patients (Abdel-Mohsen et al., 2013). Une étude a montré que l'expression de SFLN11 était transitoire après traitement aux IFN (Puck et al., 2015). Notre transcriptome mesure l'expression génique 24h post-traitement, ainsi il est possible que SFLN11 ne soit plus exprimé à ce temps après traitement. Cependant, cette étude a également montré que des cellules MoDC infectées avec virus HRV14 présentaient un fort niveau de SLFN11 dés 4h post-infection, avant production d'IFN-α et que celui-ci était maintenu à 24h. En revanche, l'expression des autres protéines SLFN était faible à 4h post-infection et fortement boostée à 24h, probablement par la production d'IFN. Il est possible que le traitement aux IFN ne soit pas assez puissant pour induire son expression de manière stable et que l'infection elle-même permettrait de booster son expression. Ainsi, SLFN11 serait vraiment exprimé dans les cellules infectées car elles auraient détecté le virus mais ceci ne serait pas visible au transcriptome.

Nous n'observons pas non plus l'induction d'APOBEC3G. Cependant, il avait déjà été montré que son induction était dépendante du type cellulaire. En effet, le traitement aux IFN-α entraine l'induction d'APOBEC3G dans des lymphocytes T CD4 quiescents, dans des macrophages et des cellules dendritiques (Chen et al., 2006 ; Sarkis et al., 2006 ; Wang et al., 2008) mais pas dans des lymphocytes T CD4 activés (Refsland et al., 2010 ; Harper et al., 2015). En revanche, bien qu'APOBEC3G ne soit pas plus fortement exprimé, il a été montré que le traitement aux IFN-α (par les sous-types 1 et 8) dans des lymphocytes activés entrainait quand même une augmentation des hypermutations, suggérant que l'activité d'APOBEC3G n'est pas entièrement associée à son niveau d'induction. De manière intéressante, les auteurs ont remarqué que les mutations typiquement induites par APOBEC3G étaient aussi fréquentes après traitement par le sous-type 1 que par le sous-type 8 (Harper et al., 2015).

Nous avons réalisé la majorité de nos expériences dans une lignée lymphocytaire, les cellules MT4R5. Nous avons choisi cette lignée car elle est susceptible à l'infection par le VIH-1. De plus, elle répond aux IFN-α de manière assez similaire aux lymphocytes primaires (Lepelley et al., 2011). Cependant, nous avons conscience que ce modèle reste peu physiologique. Par exemple, nous n'avons pas observé d'effet des IFN-α sur la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules MT4R5, contrairement aux lymphocytes primaires. Nous avons néamoins observé que la hiérarchie des puissances d'inhibition des différents sous-types d'IFN-α était conservée dans les cellules MT4R5 et les lymphocytes primaires, suggérant le même profil d'induction de gènes antiviraux. Des expériences complémentaires nous permettront d'évaluer le rôle de certains facteurs dans l'inhibition d'étapes précises du cycle et seront confirmées ultérieurement dans des lymphocytes primaires. De même, l'analyse du transcriptome induit par chaque IFN-α

pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux facteurs de restriction induits spécifiquement par certains sous-types. Par exemple, le facteur Mx2 a été découvert car il est fortement induit par le sous-type 2 (et les sous-types 8 et 14) mais pas par les autres IFN-α. Il existe probablement d'autres effecteurs induits par les autres sous-types qui n'ont pas encore été identifiés. Notre analyse du transcriptome, des effets au niveau de chaque étape du cycle viral et la littérature vont nous permettre de sélectionner de bons candidats comme potentiels facteurs de restriction.

Le rôle de chaque sous-type d'IFN-α ainsi que leur mode d'induction des ISG restent encore sujets à débats. En effet, tous les sous-types d'IFN-α ainsi que les autres IFN de type I se lient au même récepteur, le dimère IFNAR1/IFNAR2 et élicitent la voie d'activation Jak/STAT. Certaines études suggèrent que l'affinité des IFN pour les deux sous-unités du récepteur ainsi que les sites d'intéraction avec le récepteur pourraitent être responsables de ces différences de potentiel. En effet, les sous-types 8, 6 et 14, qui ont la plus forte affinité pour IFNAR2, sont également parmi les IFN-α les plus puissants dans l'inhibition du VIH-1 (Harper et al., 2015). Il a été suggéré que l'affinité des IFN-α à la sous-unité IFNAR1 du récepteur serait liée à l'activité anti-prolifération et que l'affinité à la sous-unité IFNAR2 serait liée à l'activité antivirale (Lavoie et al., 2011). Il serait intéressant de vérifier si les IFN-α qui ont une plus grande affinité pour IFNAR1 induisent plus fortement l'expression d'ISG impliqués dans la prolifération cellulaire et si ceux qui présentent une plus forte affinité pour IFNAR2 induisent plus l'expression de gènes antiviraux connus.

Il a également été montré que les différents sous-types d'IFN-α ainsi que la dose administrée pouvaient conduire à l'activation de différents membres de la famille des STAT et MAPK. De plus, cette activation serait dépendante du type cellulaire et entrainerait des réponses antiprolifératives, antiapoptotiques et antivirales différentes (Fasler-Kan et al., 1998 ; Cull et al., 2003 ; Moll et al., 2011). Par exemple, dans des cellules J2E, il a été montré que tous les sous-types d'IFN-α sont capables d'activer STAT2. De faibles concentrations d'IFN-α1, 2, 4 et 5 entraînent une phoshorylation de STAT1 et de fortes doses d'IFN-α1 et 4 activent STAT5a et STAT5b (Cull et al., 2003). Ceci conduirait à une régulation différente des ISG.

Enfin, le niveau d'expression du récepteur IFNAR à la membrane plasmique régulerait les effets antiprolifératifs des IFN dans des cellules cancéreuses et des tumeurs solides (Wagner et al., 2004). Il a été montré que dans des cellules exprimant peu de récepteurs à leur surface, l'IFN-β, qui a une plus forte affinité pour le récepteur, est plus puissant que l'IFN-α2 à induire une activité antiproliférative. En revanche, dans des cellules exprimant abondamment le récepteur, l'IFN-α2 est aussi puissant voir plus puissant que l'IFN-β, suggérant que les réponses ne sont pas dictées uniquement par l'affinité au récepteur mais également par la densité de surface du récepteur (Moraga et al., 2009).

En contraste avec cette littérature, certaines études suggèrent que les différents sous-types induiraient les mêmes effecteurs et que le niveau d'induction pourrait être égalisé par une plus grande dose d'IFN-α administrée (Schlaepfer et al., 2019). Ceci est supporté par l'observation que le niveau d'induction d'un ISG était dépendant de la dose (Moll et al., 2011). De même, les auteurs ont observé que le traitement de cellules avec 3 IFN-α (1, 2 et 4) administrés à une dose saturante (400 ; 40 et 200 pg/mL respectivement) conduisait au même niveau d'induction d'ISG. Nous avons également observé que l'induction du gène de la luciférase dans les cellules HL116 était dose-dépendant et tendait vers un plateau. Cependant, ces observations sont limitées à un nombre très restreint d'ISG, et dans notre étude transcriptomique, certains sous-types « faibles » pour l'induction d'un ISG, étaient de forts inducteurs d'autres ISG. De plus, il n'a pas été vérifié si le traitement de ces cellules à cette dose saturante d'IFN-α leur conferait les mêmes effets antiviraux (Moll et al., 2011).

D'autres études suggèrent que les IFN-α induisent des effecteurs différents (Cull et al., 2003 ; Der et al., 1998). Notre étude du transcriptome nous montre également que les sous-types d'IFN-α sont capables d'induire des gènes de manière spécifique. Par exemple, nous observons que les protéines Mx2 et IFITM3 ne sont pas induits par tous les sous-types d'IFN-α. De même, nous observons que chaque sous-type conduit à l'induction d'environ une centaine de gènes, dont environ une quinzaine spécifique à chaque sous-type. Ainsi, même les sous-types les plus faibles dans l'inhibition de la réplication du VIH-1 sont capables d'induire certains gènes plus fortement que les IFN plus puissants. Ces résultats montrent aussi que les IFN les plus puissants n'induisent pas plus de gène que les IFN faibles.

En plus de ce profil d'induction différent, nous observons de grandes variabilités dans les niveaux d'induction des protéines. Il avait déjà été démontré que le traitement de cellules avec les sous-types 14 et 8 induisait une plus forte expression de Mx2 et BST2 que les sous-types 1 et 2 (Harper et al., 2015 ; Lavender et al., 2016), ce que nous avons également observé. En revanche, ces études suggèrent que ce plus fort niveau d'induction est associé à la puissance antivirale de l'IFN. Nos résultats montrent que bien que les IFN les plus puissants semblent induire plus fortement la plupart des facteurs de restriction du VIH-1, ce profil n'est pas universel. En effet, certains effecteurs sont induits plus fortement par des IFN moins efficaces. Par exemple, l'IFN-α2 induit plus fortement la protéine IFITM1 que l'IFN-α8 qui est plus puissant. A l'inverse, l'IFN-α14 n'induit pas l'expression de la protéine IFITM2 contrairement à d'autres IFN moins puissants.

L'ensemble de ces résultats nous confirme que l'expression des ISG par les différents sous-types d'IFN-α est un mécanisme très complexe comprenant différents niveaux de régulation en plus de ceux déjà décrits.

La liaison des IFN-α au récepteur va conduire à la formation d'un homodimère de STAT1 ou d'un hétérodimère STAT1-STAT2 qui recrutera la protéine IRF9 pour former le complexe ISGF3 (Ivashkiv and Donlin, 2014). Ces complexes pourront alors activer l'expression des ISG en se liant à des séquences canoniques (ISRE) présentes dans les promoteurs des ISG (Porter et al., 1988 ; Levy et al., 1988). Cependant, la séquence des promoteurs des ISG ainsi que le niveau d'accessibilité de la chromatine et la participation de facteurs de transcription restent peu étudiés et pourraient constituer une importante voie de régulation de la réponse immunitaire (Csumita et al., 2020). Il a par exemple été montré que les séquences ISRE avaient une certaine plasticité. De plus, elles ne permettent pas uniquement la fixation du complexe ISGF3. Certaines séquences ISRE peuvent également recruter le facteur IRF7 et induire l'expression d'ISG en absence d'IFN (Schmid et al., 2010 ; Andrilenas et al., 2018). Il a également été montré que l'IFN-α pouvait induire l'expression d'IRF7 ce qui ajouterait un niveau de régulation (Lu et al., 2000).

Ces dernières années, le développement du séquençage à haut débit a mis en évidence l'expression de centaines d'ARN longs non codants (ARNlnc). Les ARNlnc sont des ARN nucléaires faisant plus de 200 nucléotides et qui ne codent pas pour des protéines (Valadkhan and Gunawardane, 2016). Bien que décrits depuis longtemps dans la littérature, ils restent très peu étudiés. Des études ont montré qu'ils jouaient un rôle dans de nombreuses fonctions biologiques (épigénétiques, cancer, différenciation…) notamment en régulant l'expression de gènes environnants (Mercer et al., 2009 ; Rinn and Chang, 2012). Des études récentes suggèrent que les ARNlnc pourraient avoir un rôle très important dans la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative (Fitzgerald and Caffrey, 2014 ; Heward and Lindsay, 2014). Il a été montré que l'expression de ces ARNlnc était modulée après infection virale ou traitement à l'IFN-α2 (Carnero et al., 2014 ; Zhang et al., 2018). Dans ce contexte, les ARNlnc pourraient permettre la régulation de gènes antiviraux. Par exemple, il a été montré que l'ARNlnc NRAV est

un régulateur négatif de plusieurs ISG comme IFITM3 et MxA. En cas d'infection par le virus de la grippe A, il est largement sous-exprimé ce qui permet une inhibition de la réplication virale. Au contraire, lorsqu'il est exprimé de manière ectopique, NRAV favorise la réplication du virus (Ouyang et al., 2014). De la même façon, il a été montré que l'ARNlnc BISPR était un régulateur positif du facteur de restriction BST2 (Barriocanal et al., 2015). Nous avons observé que les différents sous-types étaient capables d'induire ou de réprimer l'expression de dizaines d'ARNlnc. De plus, le profil d'expression, à la fois quantitatif et qualitatif de ces ARNlnc est dépendant du sous-type d'IFN-α. Le profil d'expression de ces ARNlnc pourrait jouer un rôle important dans l'induction des ISG par les différents sous-types.

Dans le cadre de l'inhibition du VIH-1, l'utilisation d'un autre IFN-α que le sous-type 2 pourrait être envisagée. Plusieurs études réalisées chez les souris ont suggéré que le traitement précoce avec l'IFN-α14 limitait la taille du réservoir viral et permettait un bien meilleur contrôle de la virémie (Lavender et al., 2016 ; Abraham et al., 2016). De plus, il semblerait que l'IFN-α14 induirait moins d'activation immunitaire et une meilleure préservation des lymphocytes T CD4. Les IFN-α pourraient également être envisagés dans le cadre de l'élimination du réservoir après interruption de traitement. Cependant, une étude récente, qui a testé directement cette hypothèse, a montré que le traitement par de l'IFN-α14 en complément de cART de souris humanisées infectées chroniquement ne réduisait pas significativement la taille du réservoir. De plus, dans cette étude, l'IFN-α14 n'a pas d'effet bénéfique sur le délai du rebond viral ni sur le niveau d'expression des marqueurs viraux (Sutter et al., 2019).

Les IFN-α induisent l'expression de facteurs de restriction qui ne sont pas spécifiques mais qui sont efficaces contre un large spectre de virus. En effet, il a été montré que les protéines IFITM étaient efficaces contre un grand nombre de virus enveloppés dont des filovirus (virus Ebola et Marburg), des flavivirus (virus de la Dengue et West Nile Virus) et un coronavirus (le SARS-CoV) ainsi que le virus de la grippe A (Diamond and Farzan, 2013). Le facteur Mx2 est également efficace pour inhiber la réplication du virus de l'hépatite B et plusieurs virus de la famille des Herpesvirus (Staeheli and Haller, 2018 ; Wang et al., 2020). De même, BST2 est efficace dans la restriction de plusieurs familles de virus dont des filovirus, arenavirus, paramyxovirus, herpesvirus, rhabdovirus et différents rétrovirus (Arias et al., 2011) etc…

Récemment, le virus SARS-CoV-2, appartenant à la famille des Coronavirus a émergé en Chine et s'est rapidement propagé dans le monde entier. C'est l'agent éthiologique de la COVID-19. Bien que son taux de mortalité soit relativement faible, sa forte capacité de dissémination est responsable d'un très grand nombre de morts dans le monde entier. Il n'y a pas de traitement et pas de vaccin. Il a été montré que le SARS Cov-2 induit une très faible expression d'IFN (type I, II et III) dans les cellules infectées dans le poumon contrairement aux Coronavirus non pathogènes (Chu et al.). Cette faible production d'IFN défavorise probablement la réponse immunitaire innée (O'Brien et al., 2020). L'efficacité des IFN de type I a été étudiée dans le traitement des infections aux SARS-CoV et MERS-CoV, deux autres Coronavirus hautement pathogènes, qui ont émergé en 2002 et 2012 respectivement. Ces études ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*, avec administration de l'IFN seul ou en combinaison avec d'autres traitements. Les IFN-α et β étaient en général efficace *in vitro* et chez certains modèles animaux mais se sont révélées peu efficaces chez l'homme (Stockman et al., 2006 ; Sallard et al., 2020). La voie d'administration ainsi que le sous-type utilisé pourraient avoir une grande importance. Les IFN-λ conduisent également à l'induction d'ISG et de facteurs antiviraux similaires aux IFNα. Cependant, les IFN-λ agissent *via* leur récepteur, le complexe IFNL, qui est exprimé par les cellules épithéliales et seulement certaines cellules immunitaires dont les neutrophiles. Il a été montré que les IFN-λ constituaient la première ligne de défense antivirale dans le tractus

respiratoire avant la réponse IFN de type I (Galani et al., 2017). Chez les souris, les IFN-λ sont les premiers IFN induits en réponse à une infection à la grippe et permettent de limiter la réplication virale. De plus, le traitement intranasal de souris empêche l'infection de souris (Galani et al., 2017 ; Klinkhammer et al., 2018).

L'amélioration des connaissances sur le mode de fonctionnement et l'efficacité des différents sous-types d'IFN-α pourrait promouvoir leur utilisation en clinique. En effet, le décryptage des facteurs antiviraux induits par les différents sous-types ainsi que leurs effets antiprolifératifs et proapoptotiques pourraient permettre une utilisation plus spécifique contre une infection ou une maladie. De même, l'utilisation d'IFN plus puissants permettrait d'administrer des doses plus faibles, ce qui pourrait limiter les effets secondaires. Grâce à leur capacité d'inhibition d'un très large éventail de virus, les IFN pourraient constituer une arme de défense dans le traitement de certaines pathologies notamment des maladies infectieuses émergentes.

Partie 2 : Rôle de la protéine virale Rev dans l'interférence virale

Rev est une des protéines régulatrices du VIH-1. Elle reconnait la séquence RRE présente dans les ARN viraux contenant des introns et permet leur export. Notre laboratoire avait précédemment mis en évidence le rôle potentiel de Rev dans l'interférence virale en cas de superinfection (Remion et al., 2016). Cependant, dans cette précédente étude, la protéine Tat était également exprimée avec Rev et son possible rôle dans ce mécanisme d'interférence n'avait pas totalement été exclu. Nous avions observé que cette interférence commençait à s'établir dès 18h après la première infection et était indépendante des récepteurs cellulaires.

Dans mon travail de thèse, j'ai créé des lignées cellulaires exprimant de manière stable la protéine Rev sauvage ou un de ses mutants, permettant de mimer les effets de la première infection avec un système plus reproductible. Nous avons également sélectionné des mutants de Rev défectifs pour chacune de ses fonctions déjà décrits dans la littérature (séquence NLS, séquence NES, domaine de multimérisation, phosphorylation et trans-dominant négatif) ainsi qu'un mutant fonctionnel (Malim et al., 1989 **;** Szilvay et al., 1997). Grâce à ces lignées cellulaires, nous avons confirmé que la protéine Rev seule est capable d'inhiber la réplication virale d'environ 30%. Nous avons observé que ni l'entrée virale, ni l'étape de transcription inverse ne sont affectées par Rev. En revanche, nous observons une baisse significative du nombre de génomes intégrés. Ces résultats nous indiquent que l'étape affectée par Rev est l'import nucléaire et/ou l'intégration du provirus. Cependant, nous avons également observé que Rev n'influait pas sur le nombre de cercles à 2 LTR formés dans les cellules, suggérant un défaut d'intégration. Or, si l'ADNv pénètre dans le noyau mais s'intègre de façon moins efficace, nous nous attendions à une augmentation du nombre de cercles à 2 LTR.

Il a été montré que les cercles à 2 LTR sont formés uniquement dans le noyau (Munir et al., 2013). Ils représentent une faible proportion de l'ADN viral total (2 à 5%). Les cercles à 1 LTR se forment majoritairement dans le noyau, cela dit une petite fraction (10%) peut aussi se former dans le cytoplasme. La formation des cercles à 1 LTR est assez courante car elle représente 20 à 30% de l'ADNv total.

Pour évaluer le niveau de formation des cercles à 2 LTR après inhibition de l'intégration, nous avons traité les cellules avec une dose de DTG conduisant à une inhibition de 40% de l'intégration (équivalente à celle induite par Rev). On observe une très forte augmentation du nombre de cercles à 2 LTR dans les cellules traitées (9 fois plus). Cependant, les inhibiteurs d'intégration fonctionnent de façon à cibler spécifiquement cette étape et le traitement des cellules avec un inhibiteur de transfert de brin comme le DTG, conduit à forte accumulation du nombre de cercles à 2 LTR (Munir et al., 2013). Le traitement au DTG conduit également à une accumulation de cercles à 1 LTR mais plus modérée que la forme à 2 LTR (Munir et al., 2013). Si l'inhibition de l'infection se fait au moment de l'intégration, il est envisageable que celle-ci se fasse de manière moins spécifique que par les inhibiteurs d'intégrase, ce qui favoriserait la formation de formes linéaires ou à 1 LTR qui ne seraient alors pas détectées par notre test et pourraient être dégradées. Pour confirmer quelle étape est inhibée par Rev, nous pourrions mesurer les quantités d'ADNv totales présentes dans les fractions cytoplasmique et nucléaire.

De la même façon, nous pourrions mesurer la formation de cercles à 2 LTR après inhibition de l'import nucléaire de 40% pour voir s'il induit des variations dans le niveau de cercles. Cela dit, comme les cercles à 2 LTR représentent une très faible proportion de l'ADN viral total (2 à 5%), il est possible que notre technique de détection par qPCR ne soit pas assez sensible pour détecter de faibles variations. De plus, les cellules MT4R5 prolifèrent très rapidement et les cercles à 2 LTR n'étant pas répliqués par la machinerie cellulaire, il est possible que le nombre de cercles soit rapidement dilué.

L'équipe d'Abraham Loyter avait également observé dans une série d'articles que la surexpression de la protéine Rev dans des cellules conduisait à une inhibition de l'infection virale. Ils avaient également proposé que cette inhibition avait lieu au moment de l'import nucléaire et de l'intégration. Cependant, dans leurs expériences, ils observaient que la surexpression de Rev conduisait à une inhibition totale de l'intégration virale alors que nous observons que Rev entraine seulement une réduction de l'intégration d'environ 30% quelque soit la MOI. De plus, ils ne détectaient pas de cercles à 2 LTR dans les cellules exprimant Rev alors que nous n'observons pas de variation du nombre de cercles dans nos expériences (Levin et al., 2010a ; Levin et al., 2010b). Ces différences peuvent être dues aux conditions expérimentales, mais elles suggèrent l'implication de mécanismes différents.

Ils ont proposé que cette interférence était due à une interaction directe de la protéine Rev avec l'intégrase présente dans le virion lors de la seconde infection. Ils ont suggéré que cette interaction pouvait se faire à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule. De plus, cette équipe a montré que le traitement des cellules avec des peptides dérivés de Rev (les peptides 13-23 et 53-67) inhibaient l'interférence en empêchant la liaison de Rev à l'intégrase, supposant que ces régions de Rev interagissent avec l'intégrase (Levin et al., 2010a).

Dans notre étude, nous avons testé différents mutants de Rev pour leur capacité à interférer avec une seconde infection virale. Nous avons vu que seul le mutant M12/14 (qui reste fonctionnel) est capable d'interférer avec le deuxième virus et aussi fortement que la protéine Rev sauvage. Les séquences des peptides utilisés par l'équipe d'Abraham Loyter (13-23 et 53-67) étant exactement les mêmes dans tous les mutants de Rev de notre étude, excepté pour le mutant M7 qui a deux délétions dans sa séquence 53-67, on devrait s'attendre en cas d'intéraction de l'intégrase avec ces séquences, à une interférence également avec les mutants M5, M6 (qui ont une localisation cytoplasmique), M10 et possiblement M7 (localisation nucléaire), ce que nous n'avons jamais observé. Par ailleurs, les séquences de l'intégrase sensées intergir avec Rev sont identiques entre la souche NL4-3 (sensible) et la souche Bru (résistante). De plus, une interaction de Rev avec l'intégrase n'a jamais été observée par une autre étude.
L'étude des effets des mutants de Rev nous a également informés que tous ses domaines fonctionnels pour l'export des ARN viraux semblent nécessaires à l'interférence, suggèrant que l'interférence médiée par la protéine Rev est plus liée à sa fonctionnalité dans l'export des ARN qu'à une de ses séquences. Nos données ne sont donc pas en faveur d'une intéraction directe entre Rev et l'intégrase.

Dans notre étude, nous avons observé que la restriction médiée par Rev était dépendante de la souche virale. En effet, la souche NL4-3 ainsi qu'un vecteur lentiviral (R8.74) sont sensibles à Rev alors que la souche Bru est résistante. De même, la seule mutation N74D dans la capside du virus NL4-3 lui confère une résistance à Rev.

Au vu de ces résultats nous avons formulé plusieurs hypothèses pouvant expliquer le mode de fonctionnement de Rev dans l'interférence virale :

Récemment, deux études ont montré que l'export d'ARN long non et mono-épissés par Rev *via* la voie CRM1 pouvait être détecté par un senseur encore non identifié de la voie des MAVS. Cette détection conduit à l'activation de certains ISG et l'induction de nombreuses molécules pro-inflammatoires dans les macrophages et cellules dendritiques de manière indépendante de l'induction des IFN de type I (Akiyama et al., 2018 ; McCauley et al., 2018). Les cellules MT4R5 utilisées dans notre étude ont été transduites de manière stable par deux vecteurs portant une séquence RRE : un vecteur permettant l'expression du récepteur CCR5 (Amara et al., 2003) et l'autre permettant l'expression de Rev. Bien que les vecteurs intégrés expriment

majoritairement la protéine d'intérêt *via* un promoteur fort, inséré juste en amont du gène, il n'est pas exclu que le vecteur soit transcrit sous une forme plus longue *via* le LTR. De plus, les cellules MT4R5 ont été transformées avec le virus HTLV-1 et expriment sa protéine transactivatrive Tax (Liang et al., 2002) qui a été montrée comme pouvant transactiver l'expression du LTR du VIH-1 (Zimmermann et al., 1991). Si les vecteurs intégrés donnent lieu à des transcrits longs, ces ARN pourraient alors être exportés sous forme non épissée dans les cellules exprimant Rev, car ils possèdent une séquence RRE. On peut alors supposer qu'ils seraient détectés par ce senseur, ce qui pourrait conduire à l'induction de certains ISG responsables de l'interférence.

Avant d'élargir notre analyse à d'autres souches virales, le facteur Mx2 nous semblait être un bon candidat effecteur car il peut être induit dans les cellules MT4R5 (par l'IFN) et la souche NL4-3 y est sensible (Liu et al., 2015). De plus, il interfère avec la réplication virale au moment de l'import ou l'intégration en se liant à la capside virale (Kane et al., 2013 ; Goujon et al., 2013). Il a également été montré que certaines souches virales étaient résistantes à Mx2. Cette résistance est conférée par des mutations dans leur capside. Parmi ces mutations, on retrouve la mutation G208A, qui est présente dans la souche Bru (Liu et al., 2015). De plus, la mutation N74D de la capside confère également une résistance à Mx2 (Bulli et al., 2016). Nous avons donc analysé le niveau d'expression de Mx2 par RT-qPCR dans les cellules MT4R5, Rev+ et Rev-. Des résultats préliminaires ne montrent pas d'induction dans les deux lignées, alors que le traitement de cellules MT4R5 avec une faible dose d'IFN-α2 (0,08 ng/mL) induit une forte expression du gène. De plus, l'implication de Mx2 dans l'interférence virale médiée par Rev semble peu probable étant donné que nos résultats obtenus avec un panel plus large de souches virales montrent que deux virus qui partagent la même séquence de la capside sont l'un sensible (HxB2) et l'autre résistant (Bru). L'implication de la capside dans l'interférence repose en grande partie sur le phénotype du mutant N74D. Cette mutation dans la capside de la souche NL4-3 suffit pour transformer un virus sensible en virus résistant à Rev. Cependant, cette mutation semble affecter plusieurs phénotypes viraux et il a été proposé qu'elle modifie le mécanisme de l'import nucléaire. Il est possible qu'il existe plusieurs déterminants de la susceptibilité à Rev et la capside en fait partie, ou alors le déterminant est une autre protéine virale qui joue un rôle dans une étape affectée par la mutation N74D.

Ces observations excluent la possibilité que Mx2 soit responsable de la restriction médiée par Rev. Cependant, d'autres facteurs induits par la présence d'ARN long pourraient être impliqués. Pour le vérifier, nous pourrions bloquer la voie d'export des ARN avec de la leptomycine B, un inhibiteur de CRM1 pour voir si Rev est toujours capable d'interférer avec une nouvelle infection. Nous pouvons également envisager d'inhiber l'expression du facteur MAVS qui a été montré comme étant impliqué dans cette reconnaissance et activation des ISG (Akiyama et al., 2018). Dans ce cas là, les cellules MT4R5 Rev constitueraient un très bon modèle pour identifier le senseur responsable de cette activation immunitaire.

Une autre possibilité est que la protéine Rev agisse par des mécanismes plus directs pour induire cette interférence, et non par l'induction de facteurs antiviraux.

Par exemple, il a été montré que Rev pouvait interagir avec la cyclophiline B (CypB) (Naji et al., 2012). CypB est un membre de la famille des immunophilines et est une protéine chaperonne. Cette protéine a une localisation à la fois cytoplasmique, nucléaire, dans le réticulum endoplasmique/Golgi et aussi à la membrane plasmique (Price et al., 1994). CypB a été montré comme interagissant avec Gag (Luban et al., 1993 ; Braaten et al., 1997). Cependant, le site d'intéraction de CypB à Gag n'a pas été identifié précisemment. Quelques études ont montré que ce facteur pouvait être impliqué dans la réplication du VIH-1. Notamment, une

étude a récemment montré que CypB favorisait l'infection virale en augmentant l'efficacité de l'import nucléaire (DeBoer et al., 2016). En effet, lorsque CypB est surexprimé dans des cellules, les auteurs observent une augmentation du nombre de génomes intégrés ainsi que du nombre de cercles à 2 LTR. Ils ont également montré que la région N-terminale de CypB était nécessaire, région avec une possible séquence NLS, qui favoriserait l'import nucléaire en se liant au complexe de pré-intégration. L'intéraction de Rev avec CypB pourrait ainsi réduire l'efficacité d'import. De plus, il a été montré que l'interaction de CypB avec Rev était dépendante de la liaison de Rev à son RRE (Naji et al., 2012) concordant avec notre observation que Rev n'est efficace dans l'interférence seulement si sa fonction d'export d'ARN est fonctionnelle.

Il a également été montré que Rev pouvait se lier au facteur CPSF6 et que cette liaison était dépendante de la liaison de Rev à la séquence RRE (Naji et al., 2012). CPSF6 est une protéine majoritairement nucléaire qui peut se lier à la capside virale. Il a été suggéré que CPSF6 permettait la liaison de la capside à TNPO3, ce qui faciliterait l'entrée nucléaire (Yamashita and Engelman, 2017). Des études ont montré que lorsque la protéine CPSF6 était mutée et que sa localisation était strictement cytoplasmique, elle se liait à la capside virale ce qui la stabiliserait et retarderait la décapsidation conduisant à l'inhibition de l'infection virale (Lee et al., 2010 ; De Iaco et al., 2013 ; Hulme et al., 2015). CPSF6 aurait aussi un rôle dans l'intégration du virus et permettrait de cibler les zones transcriptionnellement actives du génome (Sowd et al., 2016). Plusieurs substitutions d'acides aminés dans la capside virale réduisent l'affinité de CPSF6 pour celle-ci (Saito et al., 2016). Notamment, il a été montré que la mutation N74D ne permet pas la liaison de CPSF6 à la capside. De plus, il a été montré que cette mutation rendait la réplication de ce virus insensible à la déplétion des facteurs TNPO3, NUP358 et NUP153, suggérant qu'il emprunterait une « autre voie » d'import nucléaire (Yamashita and Engelman, 2017). Ainsi la liaison de Rev à CPSF6 pourrait déstabiliser à la fois l'import nucléaire et l'intégration virale.

Nos derniers résultats ont montré que la restriction médiée par Rev dépendait de la souche virale cible. Cependant, en analysant les séquences des protéines virales impliquées dans l'import nucléaire et l'intégration, nous n'avons pas été en mesure d'identifier une ou plusieurs mutations pouvant expliquer la susceptibilité à Rev de certaines souches. Le phénotype observé avec le virus NL4-3 N74D nous montre que la capside est un déterminant de cette restriction. Cependant, l'observation que les séquences de la capside d'un virus résistant (Bru) et celle d'un sensible (HxB2) sont identiques suggère l'existence d'autres déterminants impliqués dans la restriction. Ainsi, la construction de virus chimères avec des échanges d'une protéine (ou de combinaison) entre un virus résistant et sensible nous permettra d'identifier plus précisément les domaines impliqués.

L'interférence virale a longtemps été décrite comme un mécanisme associé à la sous-expression des récepteurs à la membrane plasmique. En effet, les protéines virales Nef, Env et Vpu ont largement été décrites comme pouvant entrainer une diminution de l'expression du récepteur CD4 par différents mécanismes (Wildum et al., 2006). Certaines études ont montré que les corécepteurs CCR5 et CXCR4 pouvaient également être sous exprimés (Venzke et al., 2006 ; Michel et al., 2005). Cependant, cette interférence due aux récepteurs n'est pas immédiate et met environ 24h à se mettre en place. Très tôt, il a été établi qu'un autre mécanisme d'interférence pouvait se mettre en place plus précocément et de manière indépendante des récepteurs (Volsky et al., 1996). Notre étude a démontré que la protéine virale Rev est en grande partie responsable de cette interférence et peut s'établir plus précocément, car contrairement à l'interférence médiée par les récepteurs qui inhibent l'entrée virale, Rev agit sur une étape plus tardive du cycle (Figure 67).

Au cours de ma thèse, j'ai exploré deus situations dans lesquelles la susceptibilité cellulaire à l'infection par le VIH-1 est modulée soit par l'utilisation de molécules de l'immunité innée, soit par une protéine du virus lui-même. Ces deux projets, initialement distincts, pourraient présenter des similitudes importantes si notre hypothèse que des effecteurs antiviraux sont induits par la détection des ARN longs, exportés par Rev, est validée.

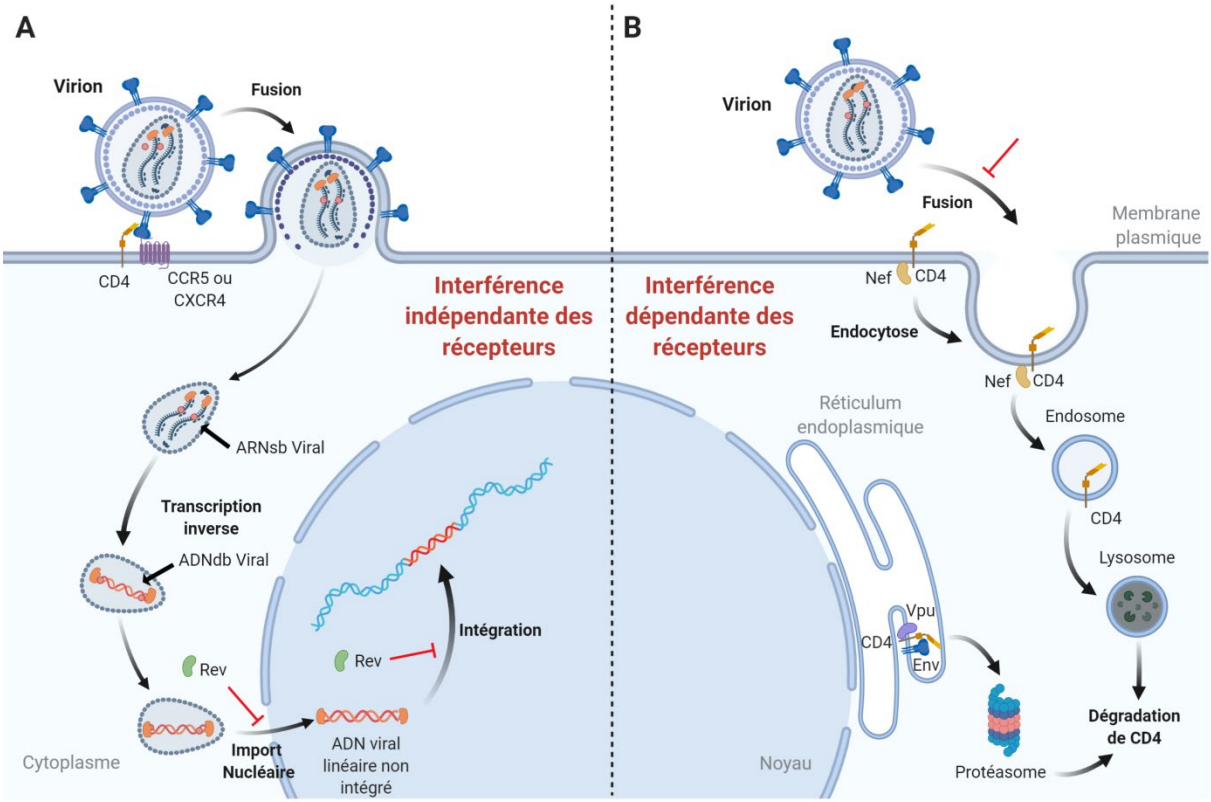


Figure 67 : Schéma décrivant les mécanismes impliqués dans l'interférence virale intrinsèque du VIH-1.

Lorsqu'un virus VIH-1 infecte une cellule, il met en place plusieurs mécanismes afin de prévenir une seconde infection. La protéine Rev du premier virus inhibe la réplication du second virus au moment de l'import nucléaire et/ou l'intégration virale (A). La protéine Nef se lie aux récepteurs CD4 présents à la membrane plasmique entrainant leur internalisation et leur adressage à la voie de dégradation des lysosomes. La gp160 se lie aux récepteurs CD4 néosynthétisés dans le RE empêchant leur transport à la membrane plasmique. La protéine Vpu adresse ensuite ces récepteurs CD4 au protéasome où ils seront dégradés. Ceci conduit à une réduction du nombre de récepteurs CD4 à la surface de la membranaire, empêchant la fusion virale d'un deuxième virus (schéma réalisé sur BioRender.com).

Références bibliographiques

A. Kaspar, A., and M. Reichert, J. (2013). Future directions for peptide therapeutics development. Drug Discovery Today *18*, 807–817.

Abdel-Mohsen, M., Raposo, R.A.S., Deng, X., Li, M., Liegler, T., Sinclair, E., Salama, M.S., Ghanem, H.E.A., Hoh, R., Wong, J.K., et al. (2013). Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers. Retrovirology *10*, 106.

Abel, K., Rocke, D.M., Chohan, B., Fritts, L., and Miller, C.J. (2005). Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. J. Virol. *79*, 12164–12172.

Abraham, S., Choi, J.-G., Ortega, N.M., Zhang, J., Shankar, P., and Swamy, N.M. (2016). Gene therapy with plasmids encoding IFN-β or IFN-α14 confers long-term resistance to HIV-1 in humanized mice. Oncotarget *7*, 78412–78420.

Agopian, A., Gros, E., Aldrian-Herrada, G., Bosquet, N., Clayette, P., and Divita, G. (2009). A new generation of peptide-based inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase conformational flexibility. Journal of Biological Chemistry *284*, 254–264.

Akbar, A.N., Lord, J.M., and Salmon, M. (2000). IFN-α and IFN-β: a link between immune memory and chronic inflammation. Immunology Today *21*, 337–342.

Akiyama, H., Miller, C.M., Ettinger, C.R., Belkina, A.C., Snyder-Cappione, J.E., and Gummuluru, S. (2018). HIV-1 intron-containing RNA expression induces innate immune activation and T cell dysfunction. Nat Commun *9*.

Amara, A., Vidy, A., Boulla, G., Mollier, K., Garcia-Perez, J., Alcamí, J., Blanpain, C., Parmentier, M., Virelizier, J.-L., Charneau, P., et al. (2003). G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. J. Virol. *77*, 2550–2558.

Anderson, E.M., and Maldarelli, F. (2018). The role of integration and clonal expansion in HIV infection: live long and prosper. Retrovirology *15*, 71.

Andrilenas, K.K., Ramlall, V., Kurland, J., Leung, B., Harbaugh, A.G., and Siggers, T. (2018). DNA-binding landscape of IRF3, IRF5 and IRF7 dimers: implications for dimer-specific gene regulation. Nucleic Acids Res *46*, 2509–2520.

Argañaraz, E.R., Schindler, M., Kirchhoff, F., Cortes, M.J., and Lama, J. (2003). Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. J. Biol. Chem. *278*, 33912–33919.

Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.-C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. EMBO J. *26*, 3025–3037.

Arias, J.F., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. (2011). Structural Basis for the Antiviral Activity of BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonism. Front Microbiol *2*.

Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., et al. (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through

integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. Nat. Immunol. *9*, 301–309.

Ashkenazi, A., Wexler-Cohen, Y., and Shai, Y. (2011). Multifaceted action of Fuzeon as virus-cell membrane fusion inhibitor. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes *1808*, 2352–2358.

Balabanian, K., Harriague, J., Decrion, C., Lagane, B., Shorte, S., Baleux, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Chakrabarti, L.A. (2004). CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) *173*, 7150–7160.

Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. Nat. Med. *18*, 1682–1687.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science *220*, 868–871.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 877–883.

Barriocanal, M., Carnero, E., Segura, V., and Fortes, P. (2015). Long Non-Coding RNA BST2/BISPR is Induced by IFN and Regulates the Expression of the Antiviral Factor Tetherin. Front Immunol *5*.

Basu, V.P., Song, M., Gao, L., Rigby, S.T., Hanson, M.N., and Bambara, R.A. (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. Virus Res. *134*, 19–38.

Battivelli, E., Lecossier, D., Matsuoka, S., Migraine, J., Clavel, F., and Hance, A.J. (2010). Strain-Specific Differences in the Impact of Human TRIM5α, Different TRIM5α Alleles, and the Inhibition of Capsid-Cyclophilin A Interactions on the Infectivity of HIV-1. Journal of Virology *84*, 11010–11019.

Bergantz, L., Subra, F., Deprez, E., Delelis, O., and Richetta, C. (2019). Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. Cells *8*.

Bhargava, A., Lahaye, X., and Manel, N. (2018). Let me in: Control of HIV nuclear entry at the nuclear envelope. Cytokine Growth Factor Rev. *40*, 59–67.

Blanco-Rodriguez, G., Gazi, A., Monel, B., Frabetti, S., Scoca, V., Mueller, F., Schwartz, O., Krijnse-Locker, J., Charneau, P., and Di Nunzio, F. (2020). Remodeling of the Core Leads HIV-1 Preintegration Complex into the Nucleus of Human Lymphocytes. J. Virol. *94*.

Blissenbach, M., Grewe, B., Hoffmann, B., Brandt, S., and Überla, K. (2010). Nuclear RNA Export and Packaging Functions of HIV-1 Rev Revisited. Journal of Virology *84*, 6598–6604.

Bosinger, S.E., Li, Q., Gordon, S.N., Klatt, N.R., Duan, L., Xu, L., Francella, N., Sidahmed, A., Smith, A.J., Cramer, E.M., et al. (2009). Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. J. Clin. Invest. *119*, 3556–3572.

Bottger, R., Hoffmann, R., and Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides

with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. PloS One *12*, e0178943.

Bour, S., Boulerice, F., and Wainberg, M.A. (1991). Inhibition of gpl60 and CD4 Maturation in U937 Cells after both Defective and Productive Infections by Human Immunodeficiency Virus Type. J. VIROL. *65*, 10.

Bour, S., Perrin, C., Akari, H., and Strebel, K. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. J. Biol. Chem. *276*, 15920–15928.

Braaten, D., Ansari, H., and Luban, J. (1997). The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. Journal of Virology *71*, 2107–2113.

Brandt, S., Blißenbach, M., Grewe, B., Konietzny, R., Grunwald, T., and Überla, K. (2007). Rev Proteins of Human and Simian Immunodeficiency Virus Enhance RNA Encapsidation. PLoS Pathog *3*.

Bulli, L., Apolonia, L., Kutzner, J., Pollpeter, D., Goujon, C., Herold, N., Schwarz, S.-M., Giernat, Y., Keppler, O.T., Malim, M.H., et al. (2016). Complex Interplay between HIV-1 Capsid and MX2-Independent Alpha Interferon-Induced Antiviral Factors. J Virol *90*, 7469–7480.

Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2020). HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. Proc Natl Acad Sci USA *117*, 5486–5493.

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

Campillo-Gimenez, L., Laforge, M., Fay, M., Brussel, A., Cumont, M.-C., Monceaux, V., Diop, O., Lévy, Y., Hurtrel, B., Zaunders, J., et al. (2010). Nonpathogenesis of Simian Immunodeficiency Virus Infection Is Associated with Reduced Inflammation and Recruitment of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes, Not to Lack of an Interferon Type I Response, during the Acute Phase. Journal of Virology *84*, 1838–1846.

Caputi, M. (2011). The Regulation of HIV-1 mRNA Biogenesis. RNA Processing.

Carnec, X., Quan, L., Olson, W.C., Hazan, U., and Dragic, T. (2005). Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1. Journal of Virology *79*, 1930–1933.

Carnero, E., Barriocanal, M., Segura, V., Guruceaga, E., Prior, C., Börner, K., Grimm, D., and Fortes, P. (2014). Type I Interferon Regulates the Expression of Long Non-Coding RNAs. Front Immunol *5*, 548.

Castel, G., Chtéoui, M., Heyd, B., and Tordo, N. (2011). Phage display of combinatorial peptide libraries: Application to antiviral research. Molecules *16*, 3499–3518.

Cavrois, M., De Noronha, C., and Greene, W.C. (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. Nature Biotechnology *20*, 1151–1154.

Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. J. Virol. *66*, 2814–2820.

Chaudhuri, R., Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. (2007). Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. J. Virol. *81*, 3877–3890.

Checkley, M.A., Luttge, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. J Mol Biol *410*, 582–608.

Chen, K., Huang, J., Zhang, C., Huang, S., Nunnari, G., Wang, F., Tong, X., Gao, L., Nikisher, K., and Zhang, H. (2006). Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. J. Virol. *80*, 7645–7657.

Cheng, L., Ma, J., Li, J., Li, D., Li, G., Li, F., Zhang, Q., Yu, H., Yasui, F., Ye, C., et al. (2016). Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. Journal of Clinical Investigation *127*, 269–279.

Chenine, A.L., Sattentau, Q., and Moulard, M. (2000). Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors. Arch. Virol. *145*, 455–471.

Chin, C.R., Perreira, J.M., Savidis, G., Portmann, J.M., Aker, A.M., Feeley, E.M., Smith, M.C., and Brass, A.L. (2015). Direct Visualization of HIV-1 Replication Intermediates Shows that Capsid and CPSF6 Modulate HIV-1 Intra-nuclear Invasion and Integration. Cell Rep *13*, 1717–1731.

Choi, J., Ryoo, J., Oh, C., Hwang, S., and Ahn, K. (2015). SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity. Retrovirology *12*, 46.

Christ, F., Thys, W., De Rijck, J., Gijsbers, R., Albanese, A., Arosio, D., Emiliani, S., Rain, J.-C., Benarous, R., Cereseto, A., et al. (2008). Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. Curr. Biol. *18*, 1192–1202.

Chu, H., Chan, J.F.-W., Wang, Y., Yuen, T.T.-T., Chai, Y., Hou, Y., Shuai, H., Yang, D., Hu, B., Huang, X., et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. Clin Infect Dis.

Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R.F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. Nat. Med. *1*, 1284–1290.

Churchill, M.J., Cowley, D.J., Wesselingh, S.L., Gorry, P.R., and Gray, L.R. (2015). HIV-1 transcriptional regulation in the central nervous system and implications for HIV cure research. J. Neurovirol. *21*, 290–300.

Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. Nat. Med. *11*, 1287–1289.

De Clercq, E., Yamamoto, N., Pauwels, R., Balzarini, J., Witvrouw, M., De Vreese, K., Debyser, Z., Rosenwirth, B., Peichl, P., and Datema, R. (1994). Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. Antimicrobial Agents and

Chemotherapy *38*, 668–674.

Compton, A.A., Bruel, T., Porrot, F., Mallet, A., Sachse, M., Euvrard, M., Liang, C., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2014). IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. Cell Host Microbe *16*, 736–747.

Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N.R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. The Journal of Experimental Medicine *185*, 621–628.

Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, P., Darlix, J.-L., and Muriaux, D. (2008). Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1. Revisiting HIV-1 assembly.

Craigie, R., and Bushman, F.D. (2012). HIV DNA integration. Cold Spring Harb Perspect Med *2*, a006890.

Cribier, A., Ségéral, E., Delelis, O., Parissi, V., Simon, A., Ruff, M., Benarous, R., and Emiliani, S. (2011). Mutations affecting interaction of integrase with TNPO3 do not prevent HIV-1 cDNA nuclear import. Retrovirology *8*, 104.

Crise, B., Buonocore, L., and Rose, J.K. (1990). CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. J. Virol. *64*, 5585–5593.

Csumita, M., Csermely, A., Horvath, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H.-A., Reith, W., and Széles, L. (2020). Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5′ and 3′ flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion. Nucleic Acids Res *48*, 589–604.

Cull, V.S., Tilbrook, P.A., Bartlett, E.J., Brekalo, N.L., and James, C.M. (2003). Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. Blood *101*, 2727–2735.

Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., and Krausslich, H.-G. (2005). Involvement of Clathrin-Mediated Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. Journal of Virology *79*, 1581–1594.

Daelemans, D., Pauwels, R., De Clercq, E., and Pannecouque, C. (2011). A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds. Nature Protocols *6*, 925–933.

D'Agostino, D.M., Felber, B.K., Harrison, J.E., and Pavlakis, G.N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. Mol. Cell. Biol. *12*, 1375–1386.

D'Aloja, P., Olivetta, E., Bona, R., Nappi, F., Pedacchia, D., Pugliese, K., Ferrari, G., Verani, P., and Federico, M. (1998). gag, vif, and nef genes contribute to the homologous viral interference induced by a nonproducer human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variant: identification of novel HIV-1-inhibiting viral protein mutants. J. Virol. *72*, 4308–4319.

Dang, Q., Chen, J., Unutmaz, D., Coffin, J.M., Pathak, V.K., Powell, D., KewalRamani, V.N., Maldarelli, F., and Hu, W.-S. (2004). Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. PNAS *101*, 632–637.

De Iaco, A., and Luban, J. (2011). Inhibition of HIV-1 infection by TNPO3 depletion is determined by capsid and detectable after viral cDNA enters the nucleus. Retrovirology *8*, 98.

De Iaco, A., Santoni, F., Vannier, A., Guipponi, M., Antonarakis, S., and Luban, J. (2013). TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm. Retrovirology *10*, 20.

DeBoer, J., Madson, C.J., and Belshan, M. (2016). Cyclophilin B enhances HIV-1 Infection. Virology *489*, 282–291.

Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α, β, or γ using oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 15623–15628.

Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwikelmaier, V., and Campbell, E.M. (2020). Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. Nat Microbiol *5*, 1088–1095.

Di Nunzio, F., Fricke, T., Miccio, A., Valle-Casuso, J.C., Perez, P., Souque, P., Rizzi, E., Severgnini, M., Mavilio, F., Charneau, P., et al. (2013). Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. Virology *440*, 8–18.

Diamond, M.S., and Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. Nat Rev Immunol *13*, 46–57.

Dietz, J., Koch, J., Kaur, A., Raja, C., Stein, S., Grez, M., Pustowka, A., Mensch, S., Ferner, J., Möller, L., et al. (2008). Inhibition of HIV-1 by a peptide ligand of the genomic RNA packaging signal Psi. ChemMedChem *3*, 749–755.

Doehle, B.P., Chang, K., Rustagi, A., McNevin, J., McElrath, M.J., and Gale, M. (2012). Vpu mediates depletion of interferon regulatory factor 3 during HIV infection by a lysosome-dependent mechanism. J. Virol. *86*, 8367–8374.

Doms, R.W., and Trono, D. (2000). The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. Genes & Development *14*, 2677–2688.

Dondi, E., Roué, G., Yuste, V.J., Susin, S.A., and Pellegrini, S. (2004). A Dual Role of IFN-α in the Balance between Proliferation and Death of Human CD4+ T Lymphocytes during Primary Response. The Journal of Immunology *173*, 3740–3747.

Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., et al. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. Nature Medicine *4*, 72–77.

Doyle, T., Goujon, C., and Malim, M.H. (2015). HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? Nature Reviews Microbiology *13*, 403–413.

Dragin, L., Nguyen, L.A., Lahouassa, H., Sourisce, A., Kim, B., Ramirez, B.C., and Margottin-Goguet, F. (2013). Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply. Retrovirology *10*, 30.

Dutrieux, J., Fabre-Mersseman, V., Charmeteau-De Muylder, B., Rancez, M., Ponte, R., Rozlan, S., Figueiredo-Morgado, S., Bernard, A., Beq, S., Couëdel-Courteille, A., et al. (2014). Modified interferon-α subtypes production and chemokine networks in the thymus during acute simian immunodeficiency virus infection, impact on thymopoiesis. AIDS *28*, 1101–1113.

Dutrieux, J., Maarifi, G., Portilho, D.M., Arhel, N.J., Chelbi-Alix, M.K., and Nisole, S. (2015). PML/TRIM19-Dependent Inhibition of Retroviral Reverse-Transcription by Daxx. PLOS Pathogens *11*, e1005280.

Dyda, F., Louis, J.M., Nashed, N.T., Davies, D.R., and Kimmel, A.R. (1998). Hydrophilic Peptides Derived from the Transframe Region of Gag-Pol Inhibit the HIV-1 Protease †. Biochemistry *37*, 2105–2110.

Easlick, J., Szubin, R., Lantz, S., Baumgarth, N., and Abel, K. (2010). The early interferon alpha subtype response in infant macaques infected orally with SIV. J Acquir Immune Defic Syndr *55*, 14–28.

Fang, J., Kubota, S., Yang, B., Zhou, N., Zhang, H., Godbout, R., and Pomerantz, R.J. (2004). A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. Virology *330*, 471–480.

Fasler-Kan, E., Pansky, A., Wiederkehr, M., Battegay, M., and Heim, M.H. (1998). Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells. Eur. J. Biochem. *254*, 514–519.

Fernandes, J., Jayaraman, B., and Frankel, A. (2012). The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. RNA Biol *9*, 6–11.

Fernandez, J., Machado, A.K., Lyonnais, S., Chamontin, C., Gärtner, K., Léger, T., Henriquet, C., Garcia, C., Portilho, D.M., Pugnière, M., et al. (2019). Transportin-1 binds to the HIV-1 capsid via a nuclear localization signal and triggers uncoating. Nature Microbiology *4*, 1840–1850.

Fitzgerald, K.A., and Caffrey, D.R. (2014). Long noncoding RNAs in Innate and Adaptive Immunity. Curr Opin Immunol *0*, 140–146.

Foster, T.L., Wilson, H., Iyer, S.S., Coss, K., Doores, K., Smith, S., Kellam, P., Finzi, A., Borrow, P., Hahn, B.H., et al. (2016). Resistance of Transmitted Founder HIV-1 to IFITM-Mediated Restriction. Cell Host Microbe *20*, 429–442.

Francis, A.C., Marin, M., Singh, P.K., Achuthan, V., Prellberg, M.J., Palermino-Rowland, K., Lan, S., Tedbury, P.R., Sarafianos, S.G., Engelman, A.N., et al. (2020). HIV-1 replication complexes accumulate in nuclear speckles and integrate into speckle-associated genomic domains. Nat Commun *11*, 3505.

Francis, J.N., Whitby, F.G., Hill, C.P., Eckert, D.M., Lie, Y.S., Root, M.J., Reeves, J.D., Welch, B.D., Paul, S., Redman, J.S., et al. (2010). Design of a Potent D-Peptide HIV-1 Entry Inhibitor with a Strong Barrier to Resistance. Journal of Virology *84*, 11235–11244.

Frankel, A.D., and Young, J.A.T. (1998a). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. Annu. Rev. Biochem. *67*, 1–25.

Frankel, A.D., and Young, J.A.T. (1998b). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. Annual Review of Biochemistry *67*, 1–25.

Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 484–496.

Freire, J.M., Veiga, A.S., Conceição, T.M., Kowalczyk, W., Mohana-Borges, R., Andreu, D., Santos, N.C., Da Poian, A.T., and Castanho, M.A.R.B. (2013). Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein. PLoS ONE *8*.

Freire, J.M., Veiga, A.S., Rego de Figueiredo, I., de la Torre, B.G., Santos, N.C., Andreu, D., Da Poian, A.T., and Castanho, M.A.R.B. (2014). Nucleic acid delivery by cell penetrating peptides derived from dengue virus capsid protein: design and mechanism of action. The FEBS Journal *281*, 191–215.

Freire, J.M., Almeida Dias, S., Flores, L., Veiga, A.S., and Castanho, M.A.R.B. (2015). Mining viral proteins for antimicrobial and cell-penetrating drug delivery peptides. Bioinformatics (Oxford, England) *31*, 2252–2256.

Fricke, T., White, T.E., Schulte, B., de Souza Aranha Vieira, D.A., Dharan, A., Campbell, E.M., Brandariz-Nuñez, A., and Diaz-Griffero, F. (2014). MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. Retrovirology *11*, 68.

Galani, I.E., Triantafyllia, V., Eleminiadou, E.-E., Koltsida, O., Stavropoulos, A., Manioudaki, M., Thanos, D., Doyle, S.E., Kotenko, S.V., Thanopoulou, K., et al. (2017). Interferon-λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. Immunity *46*, 875-890.e6.

Galetto, R., and Negroni, M. (2005). Mechanistic features of recombination in HIV. AIDS Rev *7*, 92–102.

Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. Science *341*, 903–906.

Gavegnano, C., Detorio, M., Montero, C., Bosque, A., Planelles, V., and Schinazi, R.F. (2014). Ruxolitinib and Tofacitinib Are Potent and Selective Inhibitors of HIV-1 Replication and Virus Reactivation *In Vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 1977–1986.

Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell *100*, 587–597.

Gibbert, K., Schlaak, J., Yang, D., and Dittmer, U. (2013). IFN-α subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. Br J Pharmacol *168*, 1048–1058.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat. Rev. Immunol. *8*, 594–606.

Gleenberg, I.O., Avidant, O., Goldgur, Y., Herschhorn, A., and Hizi, A. (2005). Peptides derived from the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 as novel inhibitors of the viral integrase. Journal of Biological Chemistry *280*, 21987–21996.

Gleenberg, I.O., Herschhorn, A., and Hizi, A. (2007). Inhibition of the Activities of Reverse Transcriptase and Integrase of Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Peptides Derived from the Homologous Viral Protein R (Vpr). Journal of Molecular Biology *369*, 1230–1243.

González-Navajas, J.M., Lee, J., David, M., and Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. Nat. Rev. Immunol. *12*, 125–135.

Gonzalez-Ortega, E., Mena, M.-P., Permanyer, M., Ballana, E., Clotet, B., and Este, J.A. (2010). ADS-J1 inhibits HIV-1 entry by interacting with gp120 and does not block fusion-active gp41 core formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *54*, 4487–4492.

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

Goujon, C., Schaller, T., Galão, R.P., Amie, S.M., Kim, B., Olivieri, K., Neil, S.J., and Malim, M.H. (2013b). Evidence for IFNα-induced, SAMHD1-independent inhibitors of early HIV-1 infection. Retrovirology *10*, 23.

Greatorex, J., Gallego, J., Varani, G., and Lever, A. (2002). Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. J. Mol. Biol. *322*, 543–557.

Greatorex, J.S., Palmer, E.A., Pomerantz, R.J., Dangerfield, J.A., and Lever, A.M.L. (2006). Mutation of the Rev-binding loop in the human immunodeficiency virus 1 leader causes a replication defect characterized by altered RNA trafficking and packaging. J. Gen. Virol. *87*, 3039–3044.

Groom, H.C.T., Anderson, E.C., and Lever, A.M.L. (2009a). Rev: beyond nuclear export. J. Gen. Virol. *90*, 1303–1318.

Groom, H.C.T., Anderson, E.C., Dangerfield, J.A., and Lever, A.M.L. (2009b). Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. J. Gen. Virol. *90*, 1141–1147.

Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., and Picker, L.J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. Nat. Med. *12*, 289–295.

Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.-D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. Journal of Experimental Medicine *203*, 1999–2008.

Gunthard, H.F., Aberg, J.A., Eron, J.J., Hoy, J.F., Telenti, A., Benson, C.A., Burger, D.M., Cahn, P., Gallant, J.E., Glesby, M.J., et al. (2014). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. JAMA *312*, 410–425.

Gustin, J.K., and Douglas, J.L. (2013). BST-2/tetherin: viral tether, viral sensor or both? Future Virol *8*.

Haffar, O.K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S.G., and Bukrinsky, M. (2000). Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex11Edited by M. Gottesman. Journal of

Molecular Biology *299*, 359–368.

Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science *287*, 607–614.

Hamid, F.B., Kim, J., and Shin, C.-G. (2017). Distribution and fate of HIV-1 unintegrated DNA species: a comprehensive update. AIDS Res Ther *14*, 9.

Hardy, G.A.D., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., et al. (2013). Interferon-α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. PLoS ONE *8*, e56527.

Harper, M.S., Guo, K., Gibbert, K., Lee, E.J., Dillon, S.M., Barrett, B.S., McCarter, M.D., Hasenkrug, K.J., Dittmer, U., Wilson, C.C., et al. (2015). Interferon-α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. PLoS Pathog. *11*, e1005254.

Harris, L.D., Tabb, B., Sodora, D.L., Paiardini, M., Klatt, N.R., Douek, D.C., Silvestri, G., Müller-Trutwin, M., Vasile-Pandrea, I., Apetrei, C., et al. (2010). Downregulation of Robust Acute Type I Interferon Responses Distinguishes Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Natural Hosts from Pathogenic SIV Infection of Rhesus Macaques. J Virol *84*, 7886–7891.

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

Hemann, E.A., Gale, M.J., and Savan, R. (2017). Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. Front. Immunol. *8*.

Hendrix, C.W., Collier, A.C., Lederman, M.M., Schols, D., Pollard, R.B., Brown, S., Jackson, J.B., Coombs, R.W., Glesby, M.J., Flexner, C.W., et al. (2004). Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) *37*, 1253–1262.

Henrich, T.J., and Kuritzkes, D.R. (2013). HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. Current Opinion in Virology *3*, 51–57.

Heward, J.A., and Lindsay, M.A. (2014). Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. Trends Immunol *35*, 408–419.

Hill, M., Tachedjian, G., and Mak, J. (2005). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. Curr. HIV Res. *3*, 73–85.

Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature *373*, 123–126.

Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012a). HIV-1 reverse transcription. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012b). HIV-1 reverse transcription. Cold Spring Harb Perspect Med

2.

Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012c). HIV-1 Reverse Transcription. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Huang, Z.B., Potash, M.J., Simm, M., Shahabuddin, M., Chao, W., Gendelman, H.E., Eden, E., and Volsky, D.J. (1993). Infection of macrophages with lymphotropic human immunodeficiency virus type 1 can be arrested after viral DNA synthesis. J. Virol. *67*, 6893–6896.

Hulme, A.E., Perez, O., and Hope, T.J. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 9975–9980.

Hulme, A.E., Kelley, Z., Okocha, E.A., and Hope, T.J. (2015). Identification of capsid mutations that alter the rate of HIV-1 uncoating in infected cells. J. Virol. *89*, 643–651.

Iglesias, C., Ringeard, M., Di Nunzio, F., Fernandez, J., Gaudin, R., Souque, P., Charneau, P., and Arhel, N. (2011). Residual HIV-1 DNA Flap-independent nuclear import of cPPT/CTS double mutant viruses does not support spreading infection. Retrovirology *8*, 92.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. *147*, 258–267.

Ito, M., Baba, M., Sato, A., Pauwels, R., De Clercq, E., and Shigeta, S. (1987). Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. Antiviral Research *7*, 361–367.

Ito, Y., Remion, A., Tauzin, A., Ejima, K., Nakaoka, S., Iwasa, Y., Iwami, S., and Mammano, F. (2017). Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection. Sci Rep *7*, 6559.

Ito, Y., Tauzin, A., Remion, A., Ejima, K., Mammano, F., and Iwami, S. (2018). Dynamics of HIV-1 coinfection in different susceptible target cell populations during cell-free infection. Journal of Theoretical Biology *455*, 39–46.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. Nature Reviews Immunology *14*, 36–49.

Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.-S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.-A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., et al. (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. J. Clin. Invest. *119*, 3544–3555.

Jakobsen, M.R., Bak, R.O., Andersen, A., Berg, R.K., Jensen, S.B., Tengchuan, J., Jin, T., Laustsen, A., Hansen, K., Ostergaard, L., et al. (2013). IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, E4571-4580.

Jaks, E., Gavutis, M., Uzé, G., Martal, J., and Piehler, J. (2007). Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. J. Mol. Biol. *366*, 525–539.

Jalalirad, M., and Laughrea, M. (2010). Formation of immature and mature genomic RNA dimers in wild-type and protease-inactive HIV-1: differential roles of the Gag polyprotein, nucleocapsid proteins NCp15, NCp9, NCp7, and the dimerization initiation site. Virology *407*, 225–236.

Jimenez-Guardeño, J.M., Apolonia, L., Betancor, G., and Malim, M.H. (2019).

Immunoproteasome activation enables human TRIM5α restriction of HIV-1. Nature Microbiology *4*, 933–940.

Jin, B.S., Ryu, J.R., Ahn, K., and Yu, Y.G. (2000). Design of a peptide inhibitor that blocks the cell fusion mediated by glycoprotein 41 of human immunodeficiency virus type 1. AIDS Research and Human Retroviruses *16*, 1797–1804.

Josefsson, L., King, M.S., Makitalo, B., Brännström, J., Shao, W., Maldarelli, F., Kearney, M.F., Hu, W.-S., Chen, J., Gaines, H., et al. (2011). Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1–infected individuals contain only one HIV DNA molecule. PNAS *108*, 11199–11204.

Kajaste-Rudnitski, A., Marelli, S.S., Pultrone, C., Pertel, T., Uchil, P.D., Mechti, N., Mothes, W., Poli, G., Luban, J., and Vicenzi, E. (2011). TRIM22 Inhibits HIV-1 Transcription Independently of Its E3 Ubiquitin Ligase Activity, Tat, and NF-κB-Responsive Long Terminal Repeat Elements ▿ . J Virol *85*, 5183–5196.

Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatziioannou, T., et al. (2013a). Mx2 is an interferon induced inhibitor of HIV-1 infection. Nature *502*, 563–566.

Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatziioannou, T., et al. (2013b). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. Nature *502*, 563–566.

Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. Immunity *27*, 549–559.

Karn, J., and Stoltzfus, C.M. (2012a). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. Cold Spring Harb Perspect Med *2*, a006916.

Karn, J., and Stoltzfus, C.M. (2012b). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Kaushik, N., and Pandey, V.N. (2002). PNA targeting the PBS and A-loop sequences of HIV-1 genome destabilizes packaged tRNA3(Lys) in the virions and inhibits HIV-1 replication. Virology *303*, 297–308.

Kaushik, R., and Ratner, L. (2004). Role of human immunodeficiency virus type 1 matrix phosphorylation in an early postentry step of virus replication. J. Virol. *78*, 2319–2326.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. *11*, 373–384.

Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., DiMassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., et al. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. Nature Medicine *4*, 1302–1307.

Kim, K., Dauphin, A., Komurlu, S., McCauley, S.M., Yurkovetskiy, L., Carbone, C., Diehl, W.E., Strambio-De-Castillia, C., Campbell, E.M., and Luban, J. (2019). Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5α. Nature Microbiology *4*, 2044–2051.

Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M., and Fujisawa, J.I. (1996). A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. Biochimie *78*, 1075–1080.

Klasse, P.J. (2012). The molecular basis of HIV entry. Cell. Microbiol. *14*, 1183–1192.

Klinkhammer, J., Schnepf, D., Ye, L., Schwaderlapp, M., Gad, H.H., Hartmann, R., Garcin, D., Mahlakõiv, T., and Staeheli, P. (2018). IFN-λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. Elife *7*.

Kopitar-Jerala, N. (2017). The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. Front Immunol *8*.

Kosmidis, C., Sapalidis, K., Koletsa, T., Kosmidou, M., Efthimiadis, C., Anthimidis, G., Varsamis, N., Michalopoulos, N., Koulouris, C., Atmatzidis, S., et al. (2018). Interferon-γ and Colorectal Cancer: an up-to date. J Cancer *9*, 232–238.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. Int. Rev. Immunol. *30*, 16–34.

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

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013). The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. Immunity *39*, 1132–1142.

Lalezari, J.P., Henry, K., O'Hearn, M., Montaner, J.S.G., Piliero, P.J., Trottier, B., Walmsley, S., Cohen, C., Kuritzkes, D.R., Eron, J.J., et al. (2003). Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America. New England Journal of Medicine *348*, 2175–2185.

Larue, R., Gupta, K., Wuensch, C., Shkriabai, N., Kessl, J.J., Danhart, E., Feng, L., Taltynov, O., Christ, F., Van Duyne, G.D., et al. (2012). Interaction of the HIV-1 intasome with transportin 3 protein (TNPO3 or TRN-SR2). J. Biol. Chem. *287*, 34044–34058.

Lavender, K.J., Gibbert, K., Peterson, K.E., Van Dis, E., Francois, S., Woods, T., Messer, R.J., Gawanbacht, A., Müller, J.A., Münch, J., et al. (2016). Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. J. Virol. *90*, 6001–6013.

Lavoie, T.B., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., Pestka, S., and Schreiber, G. (2011). Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. Cytokine *56*, 282–289.

Lazzarin, A., Clotet, B., Cooper, D., Reynes, J., Arasteh, K., Nelson, M., Katlama, C., Stellbrink, H.-J., Delfraissy, J.-F., Lange, J., et al. (2003). Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. The New England Journal of Medicine *348*, 2186–2195.

Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A.J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in

the absence of the Vif protein. Science *300*, 1112.

Lee, K., Ambrose, Z., Martin, T.D., Oztop, I., Mulky, A., Julias, J.G., Vandegraaff, N., Baumann, J.G., Wang, R., Yuen, W., et al. (2010). Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1. Cell Host Microbe *7*, 221–233.

Lehmann, C., Taubert, D., Jung, N., Fätkenheuer, G., van Lunzen, J., Hartmann, P., and Romerio, F. (2009). Preferential upregulation of interferon-alpha subtype 2 expression in HIV-1 patients. AIDS Res. Hum. Retroviruses *25*, 577–581.

Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K.W., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate Sensing of HIV-Infected Cells. PLOS Pathogens *7*, e1001284.

Levin, A., Hayouka, Z., Brack-Werner, R., Volsky, D.J., Friedler, A., and Loyter, A. (2009a). Novel regulation of HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. Protein Eng. Des. Sel. *22*, 753–763.

Levin, A., Hayouka, Z., Helfer, M., Brack-Werner, R., Friedler, A., and Loyter, A. (2009b). Peptides derived from HIV-1 integrase that bind Rev stimulate viral genome integration. PLoS ONE *4*, e4155.

Levin, A., Hayouka, Z., Friedler, A., and Loyter, A. (2010a). Nucleocytoplasmic shuttling of HIV-1 integrase is controlled by the viral Rev protein. Nucleus *1*, 190–201.

Levin, A., Hayouka, Z., Friedler, A., Brack-Werner, R., Volsky, D.J., and Loyter, A. (2010b). A novel role for the viral Rev protein in promoting resistance to superinfection by human immunodeficiency virus type 1. J. Gen. Virol. *91*, 1503–1513.

Levin, A., Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Friedler, A., and Loyter, A. (2010c). Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins. Mol. Med. *16*, 34–44.

Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J.E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. Genes Dev. *2*, 383–393.

Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. EMBO J. *11*, 3053–3058.

Li, G., Cheng, M., Nunoya, J., Cheng, L., Guo, H., Yu, H., Liu, Y., Su, L., and Zhang, L. (2014). Plasmacytoid Dendritic Cells Suppress HIV-1 Replication but Contribute to HIV-1 Induced Immunopathogenesis in Humanized Mice. PLoS Pathog *10*.

Li, H.Y., Zawahir, Z., Song, L.D., Long, Y.Q., and Neamati, N. (2006). Sequence-based design and discovery of peptide inhibitors of HIV-1 integrase: Insight into the binding mode of the enzyme. Journal of Medicinal Chemistry *49*, 4477–4486.

Li, K., Markosyan, R.M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J.C., et al. (2013). IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. PLoS Pathog. *9*, e1003124.

Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., and Zhao, R.Y. (2005). Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. Cell Res. *15*, 923–934.

Li, M., Kao, E., Gao, X., Sandig, H., Limmer, K., Pavon-Eternod, M., Jones, T.E., Landry, S., Pan, T., Weitzman, M.D., et al. (2012). Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. Nature *491*, 125–128.

Li, Y., Sun, B., Esser, S., Jessen, H., Streeck, H., Widera, M., Yang, R., Dittmer, U., and Sutter, K. (2017). Expression Pattern of Individual IFNA Subtypes in Chronic HIV Infection. J. Interferon Cytokine Res. *37*, 541–549.

Li, Z., Strunk, J.J., Lamken, P., Piehler, J., and Walz, T. (2008). The EM structure of a type I interferon-receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling. J. Mol. Biol. *377*, 715–724.

Liang, M.-H., Geisbert, T., Yao, Y., Hinrichs, S.H., and Giam, C.-Z. (2002). Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Oncoprotein Tax Promotes S-Phase Entry but Blocks Mitosis. J Virol *76*, 4022–4033.

Lin, R.S., Rodriguez, C., Veillette, A., and Lodish, H.F. (1998). Zinc is essential for binding of p56(lck) to CD4 and CD8alpha. J. Biol. Chem. *273*, 32878–32882.

Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., and He, J.J. (2011). Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. J Neuroimmune Pharmacol *6*, 308–321.

Liu, Z., Pan, Q., Ding, S., Qian, J., Xu, F., Zhou, J., Cen, S., Guo, F., and Liang, C. (2013). The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. Cell Host Microbe *14*, 398–410.

Liu, Z., Pan, Q., Liang, Z., Qiao, W., Cen, S., and Liang, C. (2015). The highly polymorphic cyclophilin A-binding loop in HIV-1 capsid modulates viral resistance to MxB. Retrovirology *12*, 1.

Logue, E.C., Taylor, K.T., Goff, P.H., and Landau, N.R. (2011). The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. J. Virol. *85*, 12950–12961.

Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. Immunity *34*, 680–692.

Lu, J., Pan, Q., Rong, L., He, W., Liu, S.-L., and Liang, C. (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. J. Virol. *85*, 2126–2137.

Lu, R., Au, W.C., Yeow, W.S., Hageman, N., and Pitha, P.M. (2000). Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon snd silencing by hypermethylation. J. Biol. Chem. *275*, 31805–31812.

Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V., and Goff, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. Cell *73*, 1067–1078.

Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z., and Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. J. Biol. Chem. *278*, 33528–33539.

Magadán, J.G., Pérez-Victoria, F.J., Sougrat, R., Ye, Y., Strebel, K., and Bonifacino, J.S. (2010).

Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. PLoS Pathog. *6*, e1000869.

Mahboobi, S.H., Javanpour, A.A., and Mofrad, M.R.K. (2015). The interaction of RNA helicase DDX3 with HIV-1 Rev-CRM1-RanGTP complex during the HIV replication cycle. PLoS ONE *10*, e0112969.

Maillet, S., Fernandez, J., Decourcelle, M., El Koulali, K., Blanchet, F.P., Arhel, N.J., Maarifi, G., and Nisole, S. (2020). Daxx Inhibits HIV-1 Reverse Transcription and Uncoating in a SUMO-Dependent Manner. Viruses *12*.

Malim, M.H., Böhnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B.R. (1989). Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator—Derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. Cell *58*, 205–214.

Marcus, P.I., and Carver, D.H. (1967). Intrinsic interference: a new type of viral interference. J. Virol. *1*, 334–343.

Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D.J., Macleod, K., Arthos, J., and Fauci, A.S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-{alpha} secretion in plasmacytoid dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 3396–3401.

Matreyek, K.A., Yücel, S.S., Li, X., and Engelman, A. (2013). Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity. PLoS Pathog. *9*, e1003693.

Matreyek, K.A., Wang, W., Serrao, E., Singh, P.K., Levin, H.L., and Engelman, A. (2014). Host and viral determinants for MxB restriction of HIV-1 infection. Retrovirology *11*, 90.

McCauley, S.M., Kim, K., Nowosielska, A., Dauphin, A., Yurkovetskiy, L., Diehl, W.E., and Luban, J. (2018). Intron-containing RNA from the HIV-1 provirus activates type I interferon and inflammatory cytokines. Nat Commun *9*, 5305.

Melby, T., Despirito, M., Demasi, R., Heilek-Snyder, G., Greenberg, M.L., and Graham, N. (2006). HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response. The Journal of Infectious Diseases *194*, 238–246.

Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat. Rev. Genet. *10*, 155–159.

Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. (2005). The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. Curr. Biol. *15*, 714–723.

Mikheeva, A., and Ghendon, Y.Z. (1982). Intrinsic interference between influenza A and B viruses. Arch. Virol. *73*, 287–294.

Mishra, R.K., Shum, A.K., Platanias, L.C., Miller, R.J., and Schiltz, G.E. (2016). Discovery and characterization of novel small-molecule CXCR4 receptor agonists and antagonists. Scientific Reports *6*, 1–9.

Missé, D., Cerutti, M., Noraz, N., Jourdan, P., Favero, J., Devauchelle, G., Yssel, H., Taylor, N., and Veas, F. (1999). A CD4-Independent Interaction of Human Immunodeficiency Virus-1 gp120 With CXCR4 Induces Their Cointernalization, Cell Signaling, and T-Cell Chemotaxis. Blood *93*, 2454 LP – 2462.

Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease *6*, 223–248.

Moll, H.P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., and Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon-α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. Cytokine *53*, 52–59.

Moraga, I., Harari, D., Schreiber, G., Uzé, G., and Pellegrini, S. (2009). Receptor Density Is Key to the Alpha2/Beta Interferon Differential Activities. Mol Cell Biol *29*, 4778–4787.

Mundigala, H., Michaux, J.B., Feig, A.L., Ennifar, E., and Rueda, D. (2014). HIV-1 DIS stem loop forms an obligatory bent kissing intermediate in the dimerization pathway. Nucleic Acids Res. *42*, 7281–7289.

Munir, S., Thierry, S., Subra, F., Deprez, E., and Delelis, O. (2013). Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. Retrovirology *10*, 87.

Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., and Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 5246–5251.

Naif, H.M. (2013). Pathogenesis of HIV Infection. Infect Dis Rep *5*.

Naji, S., Ambrus, G., Cimermančič, P., Reyes, J.R., Johnson, J.R., Filbrandt, R., Huber, M.D., Vesely, P., Krogan, N.J., Yates, J.R., et al. (2012). Host Cell Interactome of HIV-1 Rev Includes RNA Helicases Involved in Multiple Facets of Virus Production. Mol Cell Proteomics *11*.

Nasr, N., Alshehri, A.A., Wright, T.K., Shahid, M., Heiner, B.M., Harman, A.N., Botting, R.A., Helbig, K.J., Beard, M.R., Suzuki, K., et al. (2017). Mechanism of Interferon-Stimulated Gene Induction in HIV-1-Infected Macrophages. J. Virol. *91*.

Nazli, A., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B.J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M.F., Ouellet, M., et al. (2013). HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. J. Immunol. *191*, 4246–4258.

Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature *451*, 425–430.

Neri, F., Giolo, G., Potestà, M., Petrini, S., and Doria, M. (2011). CD4 downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is dispensable for optimal output and functionality of viral particles in primary T cells. J. Gen. Virol. *92*, 141–150.

Nilson, K.A., and Price, D.H. (2011). The Role of RNA Polymerase II Elongation Control in HIV-1 Gene Expression, Replication, and Latency. Genet Res Int *2011*, 726901.

Noël, N., Jacquelin, B., Huot, N., Goujard, C., Lambotte, O., and Müller-Trutwin, M. (2018). Interferon-associated therapies toward HIV control: The back and forth. Cytokine & Growth

Factor Reviews *40*, 99–112.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature *382*, 833–835.

O'Brien, T.R., Thomas, D.L., Jackson, S.S., Prokunina-Olsson, L., Donnelly, R.P., and Hartmann, R. (2020). Weak Induction of Interferon Expression by SARS-CoV-2 Supports Clinical Trials of Interferon Lambda to Treat Early COVID-19. Clin. Infect. Dis.

Ohlmann, T., Mengardi, C., and López-Lastra, M. (2014). Translation initiation of the HIV-1 mRNA. Translation (Austin) *2*, e960242.

Okada, A., and Iwatani, Y. (2016). APOBEC3G-Mediated G-to-A Hypermutation of the HIV-1 Genome: The Missing Link in Antiviral Molecular Mechanisms. Front Microbiol *7*, 2027.

Oldridge, J., and Marsh, M. (1998). Nef--an adaptor adaptor? Trends Cell Biol. *8*, 302–305.

Ouyang, J., Zhu, X., Chen, Y., Wei, H., Chen, Q., Chi, X., Qi, B., Zhang, L., Zhao, Y., Gao, G.F., et al. (2014). NRAV, a Long Noncoding RNA, Modulates Antiviral Responses through Suppression of Interferon-Stimulated Gene Transcription. Cell Host Microbe *16*, 616–626.

Panté, N., and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. Mol. Biol. Cell *13*, 425–434.

Passos, V., Zillinger, T., Casartelli, N., Wachs, A.S., Xu, S., Malassa, A., Steppich, K., Schilling, H., Franz, S., Todt, D., et al. (2019). Characterization of Endogenous SERINC5 Protein as Anti-HIV-1 Factor. J Virol *93*.

Perales, C., Carrasco, L., and González, M.E. (2005). Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. Biochim. Biophys. Acta *1743*, 169–175.

Pestka, S. (2007). The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn. J. Biol. Chem. *282*, 20047–20051.

Pincetic, A., Kuang, Z., Seo, E.J., and Leis, J. (2010). The Interferon-Induced Gene ISG15 Blocks Retrovirus Release from Cells Late in the Budding Process. J Virol *84*, 4725–4736.

Porter, A.C., Chernajovsky, Y., Dale, T.C., Gilbert, C.S., Stark, G.R., and Kerr, I.M. (1988). Interferon response element of the human gene 6-16. EMBO J. *7*, 85–92.

Potash, null, and Volsky, null (1998). Viral interference in HIV-1 infected cells. Rev. Med. Virol. *8*, 203–211.

Price, A.J., Fletcher, A.J., Schaller, T., Elliott, T., Lee, K., KewalRamani, V.N., Chin, J.W., Towers, G.J., and James, L.C. (2012). CPSF6 defines a conserved capsid interface that modulates HIV-1 replication. PLoS Pathog. *8*, e1002896.

Price, E.R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T., and McKeon, F.D. (1994). Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *91*, 3931–3935.

Puck, A., Aigner, R., Modak, M., Cejka, P., Blaas, D., and Stöckl, J. (2015). Expression and regulation of Schlafen (SLFN) family members in primary human monocytes, monocyte-derived dendritic cells and T cells. Results in Immunology *5*, 23–32.

Puhl, A.C., Garzino Demo, A., Makarov, V.A., and Ekins, S. (2019). New targets for HIV drug discovery. Drug Discov. Today *24*, 1139–1147.

Pulliam, A.C., Hobson, M.J., Ciccone, S.L., Li, Y., Chen, S., Srour, E.F., Yang, F.-C., Broxmeyer, H.E., and Clapp, D.W. (2008). AMD3100 synergizes with G-CSF to mobilize repopulating stem cells in Fanconi anemia knockout mice. Experimental Hematology *36*, 1084–1090.

Qureshi, A., Thakur, N., and Kumar, M. (2013). HIPdb: A Database of Experimentally Validated HIV Inhibiting Peptides. PLoS ONE *8*.

Rasaiyaah, J., Tan, C.P., Fletcher, A.J., Price, A.J., Blondeau, C., Hilditch, L., Jacques, D.A., Selwood, D.L., James, L.C., Noursadeghi, M., et al. (2013). HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. Nature *503*, 402–405.

Rausch, D.M., Hwang, K.M., Padgett, M., Voltz, A.H., Rivas, A., Engleman, E., Gaston, I., McGrath, M., Fraser, B., and Kalyanaraman, V.S. (1990). Peptides derived from the CDR3-homologous domain of the CD4 molecule are specific inhibitors of HIV-1 and SIV infection, virus-induced cell fusion, and postinfection viral transmission in vitro. Implications for the design of small peptide anti-HIV therap. Annals of the New York Academy of Sciences *616*, 125–148.

Refsland, E.W., Stenglein, M.D., Shindo, K., Albin, J.S., Brown, W.L., and Harris, R.S. (2010). Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. Nucleic Acids Research *38*, 4274–4284.

Remion, A., Delord, M., Hance, A.J., Saragosti, S., and Mammano, F. (2016). Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes. Virology *487*, 59–67.

Reuven, E.M., Ali, M., Rotem, E., Schwarzer, R., Schwarzter, R., Gramatica, A., Futerman, A.H., and Shai, Y. (2014). The HIV-1 envelope transmembrane domain binds TLR2 through a distinct dimerization motif and inhibits TLR2-mediated responses. PLoS Pathog. *10*, e1004248.

Rimsky, L.T., Shugars, D.C., and Matthews, T.J. (1998). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. Journal of Virology *72*, 986–993.

Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. Annu. Rev. Biochem. *81*, 145–166.

Rivière, L., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2010). Analysis of the Viral Elements Required in the Nuclear Import of HIV-1 DNA. JVI *84*, 729–739.

Roberts, J.D., Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science *242*, 1171–1173.

Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., et al. (2015). HIV-1 Nef promotes infection by

excluding SERINC5 from virion incorporation. Nature *526*, 212–217.

Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Loya, S., Levin, A., Armon-Omer, A., Britan, E., Hizi, A., Kotler, M., Friedler, A., and Loyter, A. (2007a). Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. J. Biol. Chem. *282*, 15743–15753.

Rosenbluh, J., Hayouka, Z., Loya, S., Levin, A., Armon-Omer, A., Britan, E., Hizi, A., Kotler, M., Friedler, A., and Loyter, A. (2007b). Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. J. Biol. Chem. *282*, 15743–15753.

Rotger, M., Dang, K.K., Fellay, J., Heinzen, E.L., Feng, S., Descombes, P., Shianna, K.V., Ge, D., Günthard, H.F., Goldstein, D.B., et al. (2010). Genome-wide mRNA expression correlates of viral control in CD4+ T-cells from HIV-1-infected individuals. PLoS Pathog. *6*, e1000781.

Rott, R., Scholtissek, C., Klenk, H.D., and Kaluza, G. (1972). Intrinsic interference between different enveloped RNA viruses. J. Gen. Virol. *17*, 255–264.

Rott, R., Orlich, M., and Scholtissek, C. (1981). Intrinsic interference between swine influenza and fowl plague virus. Arch. Virol. *69*, 25–32.

Saito, A., Henning, M.S., Serrao, E., Dubose, B.N., Teng, S., Huang, J., Li, X., Saito, N., Roy, S.P., Siddiqui, M.A., et al. (2016). Capsid-CPSF6 Interaction Is Dispensable for HIV-1 Replication in Primary Cells but Is Selected during Virus Passage In Vivo. J. Virol. *90*, 6918–6935.

Sakuma, R., Noser, J.A., Ohmine, S., and Ikeda, Y. (2007). Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. Nat. Med. *13*, 631–635.

Sallard, E., Lescure, F.-X., Yazdanpanah, Y., Mentre, F., and Peiffer-Smadja, N. (2020). Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. Antiviral Res *178*, 104791.

Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014a). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. Nature *511*, 601–605.

Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014b). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. Nature *511*, 601–605.

Saphire, A.C., Bobardt, M.D., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P.A. (2001). Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. J. Virol. *75*, 9187–9200.

Sarkis, P.T.N., Ying, S., Xu, R., and Yu, X.-F. (2006). STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN-α. The Journal of Immunology *177*, 4530–4540.

Sauter, D., and Kirchhoff, F. (2016). HIV replication: a game of hide and sense. Curr Opin HIV AIDS *11*, 173–181.

Schacker, T., Collier, A.C., Hughes, J., Shea, T., and Corey, L. (1996). Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. Ann. Intern. Med. *125*, 257–264.

Schaller, T., Ocwieja, K.E., Rasaiyaah, J., Price, A.J., Brady, T.L., Roth, S.L., Hué, S., Fletcher, A.J.,

Lee, K., KewalRamani, V.N., et al. (2011). HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. PLoS Pathog. *7*, e1002439.

Schlaepfer, E., Fahrny, A., Gruenbach, M., Kuster, S.P., Simon, V., Schreiber, G., and Speck, R.F. (2019). Dose-Dependent Differences in HIV Inhibition by Different Interferon Alpha Subtypes While Having Overall Similar Biologic Effects. MSphere *4*.

Schmid, S., Mordstein, M., Kochs, G., García-Sastre, A., and tenOever, B.R. (2010). Transcription Factor Redundancy Ensures Induction of the Antiviral State. J Biol Chem *285*, 42013–42022.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. Annu Rev Immunol *32*, 513–545.

Schoggins, J.W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? Annu. Rev. Virol. *6*, 567–584.

Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997). Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. The Journal of Experimental Medicine *186*, 1383–1388.

Schramm, H.J., Boetzel, J., Buttner, J., Fritsche, E., Gohring, W., Jaeger, E., Konig, S., Thumfart, O., Wenger, T., Nagel, N.E., et al. (1996). The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by “interface peptides”. Antiviral Research *30*, 155–170.

Sedaghat, A.R., German, J., Teslovich, T.M., Cofrancesco, J., Jie, C.C., Talbot, C.C., and Siliciano, R.F. (2008). Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. J. Virol. *82*, 1870–1883.

Seissler, T., Marquet, R., and Paillart, J.-C. (2017). Hijacking of the Ubiquitin/Proteasome Pathway by the HIV Auxiliary Proteins. Viruses *9*.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. Nat. Med. *9*, 1404–1407.

Sigrid, H., Katrien, P., Gary, B., Erik, D.C., and Dominique, S. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. FEBS Letters *527*, 255–262.

Singh, R., Gaiha, G., Werner, L., McKim, K., Mlisana, K., Luban, J., Walker, B.D., Karim, S.S.A., Brass, A.L., and Ndung’u, T. (2011). Association of TRIM22 with the Type 1 Interferon Response and Viral Control during Primary HIV-1 Infection. J Virol *85*, 208–216.

Skrabal, K., Saragosti, S., Labernardiere, J.-L., Barin, F., Clavel, F., and Mammano, F. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from single plasma samples display a wide spectrum of neutralization sensitivity. Journal of Virology *79*, 11848–11857.

Sleijfer, S., Bannink, M., Van Gool, A.R., Kruit, W.H.J., and Stoter, G. (2005). Side Effects of Interferon-α Therapy. Pharm World Sci *27*, 423.

Sloan, R.D., and Wainberg, M.A. (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. Retrovirology *8*, 52.

Solis, M., Nakhaei, P., Jalalirad, M., Lacoste, J., Douville, R., Arguello, M., Zhao, T., Laughrea, M.,

Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (2011). RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. J. Virol. *85*, 1224–1236.

Sowd, G.A., Serrao, E., Wang, H., Wang, W., Fadel, H.J., Poeschla, E.M., and Engelman, A.N. (2016). A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *113*, E1054-1063.

Spivak, A.M., Larragoite, E.T., Coletti, M.L., Macedo, A.B., Martins, L.J., Bosque, A., and Planelles, V. (2016). Janus kinase inhibition suppresses PKC-induced cytokine release without affecting HIV-1 latency reversal ex vivo. Retrovirology *13*, 88.

St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S.M., Coleman, C.M., Hoy, H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., and Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4+ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. Retrovirology *9*, 105.

Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. J Virol *83*, 3719–3733.

Staeheli, P., and Haller, O. (2018). Human MX2/MxB: a Potent Interferon-Induced Postentry Inhibitor of Herpesviruses and HIV-1. Journal of Virology *92*.

Stockman, L.J., Bellamy, R., and Garner, P. (2006). SARS: systematic review of treatment effects. PLoS Med. *3*, e343.

Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. Nature *427*, 848–853.

Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 5514–5519.

Suhasini, M., and Reddy, T.R. (2009). Cellular proteins and HIV-1 Rev function. Curr. HIV Res. *7*, 91–100.

Sundquist, W.I., and Kräusslich, H.-G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. Cold Spring Harb Perspect Med *2*, a006924.

Sutter, K., Dickow, J., and Dittmer, U. (2018). Interferon α subtypes in HIV infection. Cytokine & Growth Factor Reviews *40*, 13–18.

Sutter, K., Lavender, K.J., Messer, R.J., Widera, M., Williams, K., Race, B., Hasenkrug, K.J., and Dittmer, U. (2019). Concurrent administration of IFNα14 and cART in TKO-BLT mice enhances suppression of HIV-1 viremia but does not eliminate the latent reservoir. Sci Rep *9*, 18089.

Szilvay, A.M., Brokstad, K.A., Bøe, S.-O., Haukenes, G., and Kalland, K.-H. (1997). Oligomerization of HIV-1 Rev Mutants in the Cytoplasm and during Nuclear Import. Virology *235*, 73–81.

Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K. (2015). MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. Nat. Med. *21*, 1502–1507.

Taddeo, B., Federico, M., Titti, F., Rossi, G.B., and Verani, P. (1993). Homologous superinfection of both producer and nonproducer HIV-infected cells is blocked at a late retrotranscription step. Virology *194*, 441–452.

Tartour, K., Appourchaux, R., Gaillard, J., Nguyen, X.-N., Durand, S., Turpin, J., Beaumont, E., Roch, E., Berger, G., Mahieux, R., et al. (2014). IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. Retrovirology *11*, 103.

Tartour, K., Nguyen, X.-N., Appourchaux, R., Assil, S., Barateau, V., Bloyet, L.-M., Burlaud Gaillard, J., Confort, M.-P., Escudero-Perez, B., Gruffat, H., et al. (2017). Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. PLoS Pathog *13*.

Tavares, L.A., da Silva, E.M.L., da Silva-Januário, M.E., Januário, Y.C., de Cavalho, J.V., Czernisz, É.S., Mardones, G.A., and daSilva, L.L.P. (2017). CD4 downregulation by the HIV-1 protein Nef reveals distinct roles for the γ1 and γ2 subunits of the AP-1 complex in protein trafficking. J. Cell. Sci. *130*, 429–443.

Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P.O., Podoplelova, Y., Trejo, A., Lee, C., Yarden, G., Vleck, S.E., Glenn, J.S., et al. (2011). Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. Cell *146*, 621–632.

Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. Viruses *3*, 920–940.

Tough, D.F., Borrow, P., and Sprent, J. (1996). Induction of Bystander T Cell Proliferation by Viruses and Type I Interferon in Vivo. Science *272*, 1947–1950.

Turrini, F., Marelli, S., Kajaste-Rudnitski, A., Lusic, M., Van Lint, C., Das, A.T., Harwig, A., Berkhout, B., and Vicenzi, E. (2015). HIV-1 transcriptional silencing caused by TRIM22 inhibition of Sp1 binding to the viral promoter. Retrovirology *12*.

UNAIDS, F.A.C.T.S.H.E.E.T.– G.L.O.B.A.L.A.I.D.S.U.P.D.A.T.E. 201 9 (2019). 2018 GLOBAL HIV STATISTICS.

Usami, Y., Wu, Y., and Göttlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. Nature *526*, 218–223.

Valadkhan, S., and Gunawardane, L.S. (2016). lncRNA-mediated regulation of the interferon response. Virus Res *212*, 127–136.

Valentine, M.A., Tsoukas, C.D., Rhodes, G., Vaughan, J.H., and Carson, D.A. (1985). Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex. European Journal of Immunology *15*, 851–854.

Valle-Casuso, J.C., Di Nunzio, F., Yang, Y., Reszka, N., Lienlaf, M., Arhel, N., Perez, P., Brass, A.L., and Diaz-Griffero, F. (2012). TNPO3 is required for HIV-1 replication after nuclear import but

prior to integration and binds the HIV-1 core. J. Virol. *86*, 5931–5936.

Valverde-Estrella, L., López-Serrat, M., Sánchez-Sànchez, G., Vico, T., Lloberas, J., and Celada, A. (2020). Induction of Samhd1 by interferon gamma and lipopolysaccharide in murine macrophages requires IRF1. Eur. J. Immunol.

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. Cell Host Microbe *3*, 245–252.

Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. Trends in Biochemical Sciences *31*, 98–105.

Venzke, S., Michel, N., Allespach, I., Fackler, O.T., and Keppler, O.T. (2006). Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. J. Virol. *80*, 11141–11152.

Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., and Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today *15*, 40–56.

Volsky, D.J., Simm, M., Shahabuddin, M., Li, G., Chao, W., and Potash, M.J. (1996). Interference to human immunodeficiency virus type 1 infection in the absence of downmodulation of the principal virus receptor, CD4. J. Virol. *70*, 3823–3833.

Wagner, T.A., and Frenkel, L.M. (2008). Potential limitation of CCR5 antagonists: drug resistance more often linked to CXCR4-utilizing than to CCR5-utilizing HIV-1. AIDS (London, England) *22*, 2393–2395.

Wagner, T.C., Velichko, S., Chesney, S.K., Biroc, S., Harde, D., Vogel, D., and Croze, E. (2004). Interferon receptor expression regulates the antiproliferative effects of interferons on cancer cells and solid tumors. Int. J. Cancer *111*, 32–42.

Wang, G. (2012). Natural antimicrobial peptides as promising anti-HIV candidates. Current Topics in Peptide & Protein Research *13*, 93–110.

Wang, F., Huang, J., Zhang, H., Ma, X., and Zhang, H. (2008). APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. Journal of General Virology, *89*, 722–730.

Wang, Y.-X., Niklasch, M., Liu, T., Wang, Y., Shi, B., Yuan, W., Baumert, T.F., Yuan, Z., Tong, S., Nassal, M., et al. (2020). Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication. J. Hepatol. *72*, 865–876.

Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R., and Malim, M.H. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. J. Exp. Med. *174*, 1477–1482.

White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013). The Retroviral Restriction Ability of SAMHD1, but Not Its Deoxynucleotide Triphosphohydrolase Activity, Is Regulated by Phosphorylation. Cell Host

Microbe *13*.

Wildum, S., Schindler, M., Münch, J., and Kirchhoff, F. (2006). Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. J. Virol. *80*, 8047–8059.

Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Wilkin, T.J., Lalama, C.M., McKinnon, J., Gandhi, R.T., Lin, N., Landay, A., Ribaudo, H., Fox, L., Currier, J.S., Mellors, J.W., et al. (2012). A pilot trial of adding maraviroc to suppressive antiretroviral therapy for suboptimal CD4(+) T-cell recovery despite sustained virologic suppression: ACTG A5256. The Journal of Infectious Diseases *206*, 534–542.

Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. J. Virol. *66*, 7193–7200.

Woelk, C.H., Frost, S.D.W., Richman, D.D., Higley, P.E., and Kosakovsky Pond, S.L. (2007). Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals. Gene *397*, 38–50.

Wyma, D.J., Kotov, A., and Aiken, C. (2000). Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. J. Virol. *74*, 9381–9387.

X, W., JM, D., H, L., Z, Z., RB, A., JM, K., MS, S., X, W., GM, S., and JC, K. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *46*, 1896--1905.

Xu, H., Franks, T., Gibson, G., Huber, K., Rahm, N., Strambio De Castillia, C., Luban, J., Aiken, C., Watkins, S., Sluis-Cremer, N., et al. (2013). Evidence for biphasic uncoating during HIV-1 infection from a novel imaging assay. Retrovirology *10*, 70.

Yamashita, M., and Engelman, A.N. (2017). Capsid-dependent host factors in HIV-1 infection. Trends Microbiol *25*, 741–755.

Yan, N., Regalado-Magdos, A.D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M.A., and Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. Nat. Immunol. *11*, 1005–1013.

Yang, R., Shi, J., Byeon, I.-J.L., Ahn, J., Sheehan, J.H., Meiler, J., Gronenborn, A.M., and Aiken, C. (2012). Second-site suppressors of HIV-1 capsid mutations: restoration of intracellular activities without correction of intrinsic capsid stability defects. Retrovirology *9*, 30.

Yedavalli, V.S.R.K., Neuveut, C., Chi, Y.-H., Kleiman, L., and Jeang, K.-T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. Cell *119*, 381–392.

Yi, R., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (2002). Recruitment of the Crm1 Nuclear Export Factor Is Sufficient To Induce Cytoplasmic Expression of Incompletely Spliced Human Immunodeficiency Virus mRNAs. Journal of Virology *76*, 2036–2042.

Yoh, S.M., Schneider, M., Seifried, J., Soonthornvacharin, S., Akleh, R.E., Olivieri, K.C., De Jesus, P.D., Ruan, C., de Castro, E., Ruiz, P.A., et al. (2015). PQBP1 Is a Proximal Sensor of the cGAS-

Dependent Innate Response to HIV-1. Cell *161*, 1293–1305.

Zaritsky, L.A., Dery, A., Leong, W.Y., Gama, L., and Clements, J.E. (2013). Tissue-Specific Interferon Alpha Subtype Response to SIV Infection in Brain, Spleen, and Lung. J Interferon Cytokine Res *33*, 24–33.

Zennou, V., Perez-Caballero, D., Göttlinger, H., and Bieniasz, P.D. (2004). APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. J. Virol. *78*, 12058–12061.

Zhang, H.W., Meng, X.Y., Li, A.F., Yang, Y.Y., and Qiu, H.J. (2018). [Long non-coding RNAs: Emerging regulators of antiviral innate immune responses]. Yi Chuan *40*, 525–533.

Zhen, A., Rezek, V., Youn, C., Lam, B., Chang, N., Rick, J., Carrillo, M., Martin, H., Kasparian, S., Syed, P., et al. (2016). Targeting type I interferon–mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. Journal of Clinical Investigation *127*, 260–268.

Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S.A., and Fassati, A. (2011). Transportin 3 promotes a nuclear maturation step required for efficient HIV-1 integration. PLoS Pathog. *7*, e1002194.

Zhou, X., Luo, J., Mills, L., Wu, S., Pan, T., Geng, G., Zhang, J., Luo, H., Liu, C., and Zhang, H. (2013). DDX5 facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. PLoS ONE *8*, e65040.

Zimmermann, K., Dobrovnik, M., Ballaun, C., Bevec, D., Hauber, J., and Böhnlein, E. (1991). trans-activation of the HIV-1 LTR by the HIV-1 Tat and HTLV-I Tax proteins is mediated by different cis-acting sequences. Virology *182*, 874–878.

Zirafi, O., Kim, K.-A., Standker, L., Mohr, K.B., Sauter, D., Heigele, A., Kluge, S.F., Wiercinska, E., Chudziak, D., Richter, R., et al. (2015). Discovery and characterization of an endogenous CXCR4 antagonist. Cell Reports *11*, 737–747.

Zolotukhin, A.S., Valentin, A., Pavlakis, G.N., and Felber, B.K. (1994). Continuous propagation of RRE(-) and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes. Journal of Virology *68*, 7944–7952.

Annexes

Article 1 : Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection (publié)

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection

Yusuke Ito[1], Azaria Remion[2,3,4], Alexandra Tauzin[2,3,4], Keisuke Ejima[5], Shinji Nakaoka[6,7], Yoh Iwasa[1], Shingo Iwami[1,6,8] & Fabrizio Mammano[2,3,4]

Received: 18 October 2016
Accepted: 9 May 2017
Published online: 26 July 2017

HIV-1 accumulates changes in its genome through both recombination and mutation during the course of infection. For recombination to occur, a single cell must be infected by two HIV strains. These coinfection events were experimentally demonstrated to occur more frequently than would be expected for independent infection events and do not follow a random distribution. Previous mathematical modeling approaches demonstrated that differences in target cell susceptibility can explain the non-randomness, both in the context of direct cell-to-cell transmission, and in the context of free virus transmission (Q. Dang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:632-7, 2004: K. M. Law *et al.*, Cell reports 15:2711-83, 2016). Here, we build on these notions and provide a more detailed and extensive quantitative framework. We developed a novel mathematical model explicitly considering the heterogeneity of target cells and analysed datasets of cell-free HIV-1 single and double infection experiments in cell culture. Particularly, in contrast to the previous studies, we took into account the different susceptibility of the target cells as a continuous distribution. Interestingly, we showed that the number of infection events per cell during cell-free HIV-1 infection follows a negative-binomial distribution, and our model reproduces these datasets.

The Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) population in an infected individual is characterized by high genetic diversity that allows rapid adaptation to the changing environment, such as the development of an immune response or the initiation of an antiretroviral therapy. Genetic recombination events participate in the continuous production of these viral variants. For recombination to take place, distinct viruses must infect the same cell, and then different genomes must be packaged into a single virion so that the reverse transcription process can generate a chimeric viral genome by template switching (reviewed in ref. 1). By mixing the viral genomes, in one step, recombination creates new variants whose adaptation to the environment may exceed those of the parental viruses[2,3]. This process could participate in the unfavourable prognosis of patients infected by two strains of HIV, known as double infection[4]. Although the majority of HIV-infected lymphocytes in the peripheral blood of patients carry only one viral genome copy[5,6], the epidemiologic spread of circulating recombinant forms (CRF) of HIV-1 demonstrates that recombination, and thus double infections, take place in infected patients[7]. It was also shown that recombination in HIV-infected patients may rescue defective viral genomes that carry drug resistance mutations[8,9].

The frequency of cells carrying multiple viral genomes is influenced by the virus transmission route. HIV-1 infection can spread either by cell-free virus particles or by a cell-associated process, in which viral particles and cellular receptors converge at the donor- and target-cell contact sites[10,11]. Previous work has established that cell-associated HIV-1 transmission leads to frequent multiple infection events, while the majority of cells infected by free virions carry a single genome[12]. The genomes transmitted by one infected cell via the cell-mediated pathway, however, are expected to be very similar, thus reducing the likelihood that recombination will produce chimeric variants with new properties following this transmission method. Interestingly, despite the difference in efficacy, both virus transmission pathways result in a higher frequency of double-infected cells than would be expected for independent transmission events, showing that these infections do not follow a random distribution[13–17]. Two previous studies proposed that differences in cell susceptibilities could justify the experimental

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 819-0395, Japan. [2]INSERM, U941, 75010, Paris, France. [3]Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IUH, 75010, Paris, France. [4]Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, 75010, Paris, France. [5]School of Public Health, University of Alabama at Birmingham, Alabama, 35294-0011, USA. [6]PRESTO, JST, Saitama, 332-0012, Japan. [7]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Meguro-ku, Tokyo, 153-8505, Japan. [8]CREST, JST, Saitama, 332-0012, Japan. Yusuke Ito, Azaria Remion, Shingo Iwami and Fabrizio Mammano contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.I. (email: siwami@kyushu-u.org) or F.M. (email: fabrizio.mammano@inserm.fr)

observation of double infection frequencies that are higher than expected for independent infection events[13,18]. In one study, the authors considered only either "susceptible" or "unsusceptible" cell populations, and using a mathematical model found that heterogeneity in target cell susceptibility could account for the observation that more double infections occur *in vivo* than predicted by random models[18]. In that report, the percentage of susceptible cells in a target cell population was estimated to be 2.76%. In the other study, the cell population was considered as composed of a discrete number of subpopulations characterized by distinct susceptibility levels, and for simplicity 5 subpopulations of the same size were considered[13]. Here, by considering susceptibility as a continuous variable, we expand on those original reports, and provide a more detailed quantitative framework. We describe a novel mathematical model that explicitly considers the heterogeneity of target cells as a continuous variable. By fitting the model to experimental datasets of cell-free HIV-1 single and double infections, we show that the number of infection events per cell follows a negative-binomial distribution. We also quantified the increase in the double and multiple infection events as a function of the amount of inoculated virus, and we found that a significant proportion of cells can be infected by multiple genomes following cell-free HIV-1 exposure. Together, our results re-evaluate the potential impact of cell-free HIV-1 infection on HIV-1 genetic recombination.

Materials and Methods

Cells and proviral plasmids. HEK293T cells were maintained in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). MT4R5 cells[19] were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, and 0.25 µg/ml of amphotericin B. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2.

The proviral constructs used here were derived from previously published plasmids based on the pNL4-3 construct and each carried a sequence coding for either green fluorescent protein (GFP) or heat stable antigen (HSA) reporter proteins cloned before the *nef* gene, with an IRES sequence allowing concomitant expression of the viral and reporter proteins[20,21]. To prevent virus spread in culture, we have modified these constructs by deleting 1.3 kb of the *env* gene (between the *Kpn*I and *Bgl*II sites[15]. To complement these proviral constructs, we used an HIV-1 Env-expresser plasmid in which HIV-1 (pNL4-3) Env, (as well as Tat and Rev) expression is under the control of a chimeric SRα promoter (SV40-early promoter and LTR from HTLV-I)[15].

Preparation of virus stocks, infection, and datasets. Stocks of viruses expressing either GFP or HSA were prepared by transfecting sub-confluent 293-T cells in T75 flasks by JetPei (Polyplus Inc. Illkrich, France), following the manufacturer's instructions. Medium was changed 16 h later, and the virus-containing supernatant was collected 40 h post-transfection and overlaid on a 20% sucrose cushion in a Beckman SW32 tube, after which particles were pelleted by centrifugation (98,000 g, 4 °C) for 90 min. Viral pellets were re-suspended in RPMI medium with FCS to obtain a 10-fold concentration as compared with the initial amount present in the culture supernatant, separated into several aliquots, and frozen at −80 °C. One day before infection, 2.0×10^5 MT4R5 cells per well were seeded in a 96-well plate. Cells were then exposed to two-fold dilutions of one virus (single infection) or of both viruses at the same time (coinfection), using the indicated combinations of each virus input amount. Two hours after infection, cells were washed to eliminate excess virus and cultured for a total of 48 h. The percentage of GFP-positive cells was measured after cell fixation with 2% para-formaldehyde (PFA). HSA expression on the surface of infected cells was detected using a rat anti-HSA PerpCy5.5 antibody (Pharmingen, Le Pont-de Claix, France) before fixation in PFA. Flow-cytometry data were acquired using a FACSCalibur instrument (Becton Dickinson, Le Pont-de Claix, France) with CellQuest software and were analysed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA). Cell viability was measured in parallel and found to be stable for at least 72 h post-infection (data not shown).

Calculation of the frequencies in different FACS quadrants. Cells in a FACS graph can be divided into four quadrants, A, B, C, and D, based on their expression of GFP and/or HSA (Fig. 1). Cells in quadrant A express HSA only, those in quadrant B are positive both for HSA and GFP, cells in quadrant C are uninfected (i.e., negative both for HSA and GFP), and cells in quadrant D are positive for GFP only. Note that multiple infection events by viruses expressing the same reporter gene in quadrants A and D cannot be distinguished using FACS. Since for a given susceptibility parameter, s, the probability of a target cell being uninfected (i.e., no virus) is $e^{-\beta s V}$, the probability of a target cell being infected is $1-e^{-\beta s V}$[16]. We assumed that the susceptibility parameter, s, obeys the Gamma distribution with the scale parameter, p, and the rate parameter, q (see Results for detailed calculations). Because two fluorescent proteins (i.e., HSA and GFP) are used, the term V is divided into $\overline{V}_{\mathrm{HSA}}$ and $\overline{V}_{\mathrm{GFP}}$, which represent the amount of effective HIV-1 expressing HSA and GFP, respectively. Additionally, to consider the case of each inoculated HIV-1 dataset (see Preparation of virus stocks and infection), we assumed $\overline{V}_{\mathrm{HSA}} = V_{\mathrm{HSA}}$ and $\overline{V}_{\mathrm{GFP}} = V_{\mathrm{GFP}}$ for 3.12 µl of inoculated HIV-1 expressing HSA and GFP, respectively, and $\overline{V}_{\mathrm{HSA}} = V_{\mathrm{HSA}} \times r_*$, and $\overline{V}_{\mathrm{GFP}} = V_{\mathrm{GFP}} \times r_*$, for the other amounts of inoculated HIV-1. We estimated the distribution of the following 11 parameters (θ): the shape parameter, p, the composed parameters, $\beta V_{\mathrm{HSA}}/q$ and $\beta V_{\mathrm{GFP}}/q$, for single HSA and GFP HIV-1 experiments, respectively, and the scaling parameters r_* for 6.25, 12.5, 25, 37, 50, 75, 100, and 200 µl of the inoculated HIV-1 (Table 1) (i.e., $\theta = \{p, \beta V_{HSA}/q, \beta V_{GFP}/q, r_{6.25}, r_{12.5}, r_{25}, r_{37}, r_{50}, r_{75}, r_{100}, r_{200}\}$). Therefore, under the assumptions, the theoretically predicted frequency of quadrant A, B, C, and D, respectively, in double HIV-1 infection experiments is calculated as follows:

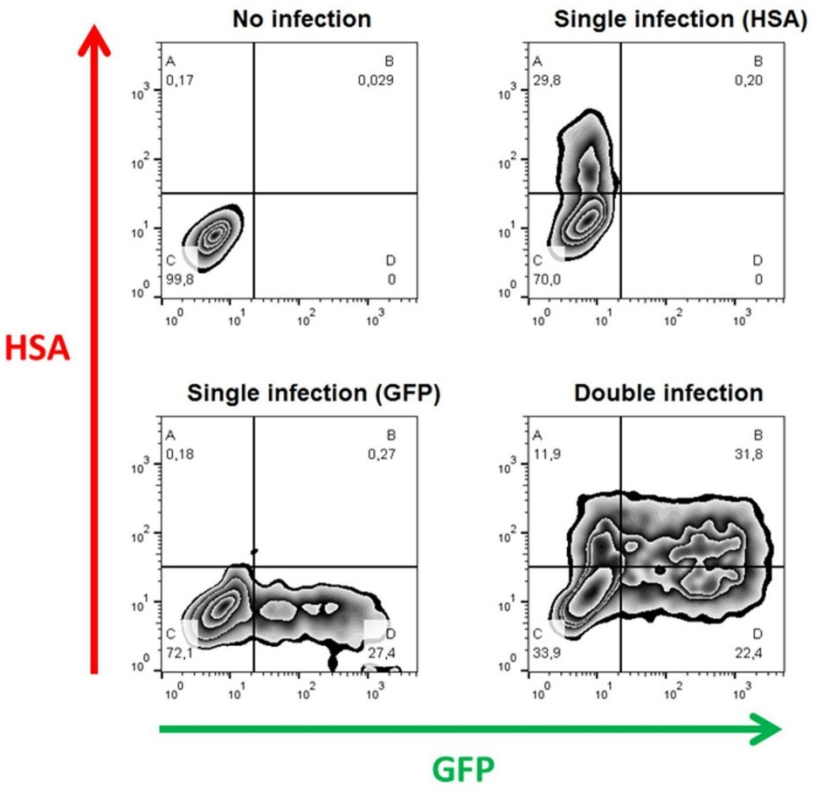


Figure 1. Flow cytometry analysis of single and double HIV-1 infection. Panels represent the following conditions, clockwise starting from the upper left panel: no infection; infection by the HSA virus; coinfection with HSA and GFP viruses, infection by the GFP virus. In each panel, the quadrants correspond to HSA^+ (**A**); HSA^+GFP^+ (**B**); uninfected cells (**C**); and GFP^+ (**D**). The percentage of cells in each quadrant is indicated under the letter identifying the quadrant.

Parameters	Estimated values (mean)	95% CI
p	1.176	0.878–1.512
$\beta\overline{V}_{HSA}/q$	1.484×10^{-2}	1.034×10^{-2}–1.963×10^{-2}
$\beta\overline{V}_{GFP}/q$	2.115×10^{-2}	1.486×10^{-2}–2.796×10^{-2}
$r_{6.25}$	2.417	1.487–3.344
$r_{12.5}$	4.231	2.588–5.812
r_{25}	4.352	2.683–6.026
r_{37}	11.09	7.100–15.16
r_{50}	8.115	5.322–10.97
r_{75}	12.79	8.485–17.42
r_{100}	16.75	11.82–22.16
r_{200}	26.87	17.49–36.81

Table 1. Estimated parameters in the mathematical model of cell-free infection.

$$F_{A,co}(\theta) = \int_0^\infty (1 - e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{HSA}}}) e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{GFP}}} \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds,$$

$$F_{B,co}(\theta) = \int_0^\infty (1 - e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{HSA}}})(1 - e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{GFP}}}) \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds,$$

$$F_{C,co}(\theta) = \int_0^\infty e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{HSA}}} e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{GFP}}} \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds,$$

$$F_{D,co}(\theta) = \int_0^\infty e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{HSA}}} (1 - e^{-\beta s \overline{V}_{\mathrm{GFP}}}) \frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds.$$

We further calculated and simplified those equations as follows:

$$F_{A,co}(\theta) = \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} \overline{V}_{\mathrm{GFP}}\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (\overline{V}_{\mathrm{GFP}} + \overline{V}_{\mathrm{HSA}})\right)^p}, \tag{1}$$

$$F_{B,co}(\theta) = 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} \overline{V}_{\mathrm{HSA}}\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} \overline{V}_{\mathrm{GFP}}\right)^p} + \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (\overline{V}_{\mathrm{HSA}} + \overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p}, \tag{2}$$

$$F_{C,co}(\theta) = \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (\overline{V}_{\mathrm{HSA}} + \overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p}, \tag{3}$$

$$F_{D,co}(\theta) = \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} \overline{V}_{\mathrm{HSA}}\right)^p} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\beta}{q} (\overline{V}_{\mathrm{HSA}} + \overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p}. \tag{4}$$

Notably, in the experiments with only HSA-expressing HIV-1 (i.e., single HSA HIV-1 experiments), we derived $F_{A,r}(\theta) = 1 - 1/(1 + \beta \overline{V}_{\mathrm{HSA}}/q)^p$, $F_{B,r}(\theta) = 0$, $F_{C,r}(\theta) = 1/(1 + \beta \overline{V}_{\mathrm{HSA}}/q)^p$, and $F_{D,r}(\theta) = 0$. Furthermore, in the single GFP HIV-1 experiments, we derived $F_{A,g}(\theta) = 0$, $F_{B,g}(\theta) = 0$, $F_{C,g}(\theta) = 1/(1 + \beta \overline{V}_{\mathrm{GFP}}/q)^p$, and $F_{D,g}(\theta) = 1 - 1/(1 + \beta \overline{V}_{\mathrm{GFP}}/q)^p$ (see Data fitting, concerning the meaning of the index *r*, *g*, *co*).

Data fitting. To fit the predicted frequency of each quadrant (i.e., Eqs (1–4)) with the experimental measurements by FACS analyses, we employed likelihood estimation to obtain an optimal set of parameter values. If we assume that the datasets used follow the Gaussian distribution with the mean μ_i and the variance σ^2 (i.e., $N(\mu_i, \sigma^2)$), the corresponding likelihood function is given as follows:

$$L(\rho; x) = \prod \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(\mu - x)^2}{2\sigma^2}} = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{1}{2\sigma^2} \sum (\mu - x)^2}.$$

Note that ρ and x represent the set of parameters and the measurements, respectively. The specific form of sum of squared residuals (SSR) is given by

$$\begin{aligned} SSR(\theta) = & \sum_{r=1}^{10} \{(F_{A,r} - \widetilde{F}_{A,r})^2 + (F_{C,r} - \widetilde{F}_{C,r})^2\} + \sum_{g=1}^{10} \left\{(F_{C,g} - \widetilde{F}_{C,g})^2 + (F_{D,g} - \widetilde{F}_{D,g})^2\right\} \\ & + \sum_{co=1}^{18} \{(F_{A,co} - \widetilde{F}_{A,co})^2 + (F_{B,co} - \widetilde{F}_{B,co})^2 + (F_{C,co} - \widetilde{F}_{C,co})^2 \\ & + (F_{D,co} - \widetilde{F}_{D,co})^2\}. \end{aligned}$$

Here, θ is the set of parameters needed to estimate. $F_{quadrant,r,g,co}$ and $\widetilde{F}_{quadrant,r,g,co}$ ($quadrant = \{\mathrm{A, B, C, D}\}$) represent the predicted frequencies and the measurements by FACS analyses, respectively. The index *r*, *g*, *co* represent experiments with different amounts of inoculated HIV-1 (i.e., $r = 1, \ldots, 10$ correspond to 3.12, 6.25, 12.5, 25, 37, 50, 75, 100, 100 and 200 µl, respectively, of single HSA HIV-1 experiments; $g = 1, \ldots, 10$ correspond to 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 50, 75, 100, 100 and 200 µl, respectively, of single GFP HIV-1 experiments; $co = 1, \ldots, 18$ correspond to 25 and 25, 25 and 50, 50 and 25, 37 and 50, 50 and 50, 37 and 75, 75 and 50, 75 and 75, 25 and 100, 100 and 25, 37 and 100, 50 and 100, 100 and 50, 100 and 50, 75 and 100, 100 and 75, 100 and 100 µl and 100 and 100 µl, respectively, of double HSA and GFP HIV-1 experiments). If the variance σ^2 is constant, then likelihood estimation is completely determined by the SSR between theoretical values and measurements (i.e., $\sum(\mu - x)^2$). However, to take into account for possible variations, we assume that the variance is not constant, and employed Bayesian inference approach with the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method to estimate distribution of parameters.

Bayesian inference method for the parameter estimation. The R package FME enables one to perform MCMC sampling by "delayed rejection and adaptive Metropolis algorithm"[22]. In the framework of the FME package to perform Bayesian inference, the error between observations and model predictions is assumed to follow Gaussian distribution with the mean 0 and the variance σ^2. Moreover, the reciprocal of the variance (i.e., $1/\sigma^2$) follows a Gamma distribution, while the prior distribution of all parameters is a Gaussian distribution[22]. In this study, 120,000 MCMC samples were generated, and the first 20,000 chains were discarded as burn-in samples. Convergence of the Markov chain was manually checked by the output of the 'traceplot' and the histogram of the posterior distribution. As shown in Table 1, the 95% CI (credible interval) represents the range from 2.5% to 97.5% in each estimated distribution, and the mean value represents the one of each posterior distribution, and also the estimated posterior distributions are obtained by using the same random seed. The fits of Eqs (1–4) to the experimental data with different amounts of inoculated HIV-1 are shown in Fig. 2 and Fig. S1. Our estimated parameter values are summarized in Table 1.

Results

The number of infection events during cell-free infection follows a negative-binomial distribution. It was previously demonstrated that cells infected by more than one virus occur at a frequency higher than that expected by Poisson distribution[12,13,15–17]. Here, we developed a novel mathematical model explicitly considering the heterogeneity of target cells susceptibility to infection. In our model, we define the following parameters: V is the amount of effective virus for infection events, β is the infection rate of HIV-1, and s is the susceptibility of the target cells to HIV-1 infection. The probability of a target cell being infected (i.e., carrying and expressing an integrated HIV genome) by n viruses can be determined by Poisson distribution as previously described[12,16,17]:

$$f(X = n;\ \beta sV) = \frac{(\beta sV)^n\ e^{-\beta sV}}{n!}. \tag{5}$$

Additionally, to consider the heterogeneity of target cell susceptibility[13,15], we assumed that the susceptibility parameter, s, obeys the following Gamma distribution[23]:

$$g(s;\ p,\ q) = \frac{q^p\ s^{p-1}e^{-sq}}{\Gamma(p)}. \tag{6}$$

It is well known that Gamma distribution can approximate any one-peak distribution and reproduce a variety of biological phenomena[23–25]. Here $p > 0$ and $q > 0$ are the shape and rate parameters, and $\Gamma(*)$ is the gamma function. In a previous study[13], it was artificially assumed that there are a finite number of subpopulations of cells with different susceptibilities to infection (i.e., five discrete susceptible populations). We extended that assumption to a continuous range of susceptible populations allowing our model to reflect, for example, the level of expression of CD4 and/or co-receptors on target cells, which are widely but continuously distributed[14,26,27]. Using Eqs (5, 6), we calculated the probability density function for a cell being infected by n HIV-1 in a heterogeneous target cell population:

$$\begin{aligned} Pr\left(X = n;\ p,\ 1/\left(1 + \frac{\beta V}{q}\right)\right) &= \int_0^\infty \frac{(\beta sV)^n e^{-(\beta sV)}}{n!}\frac{q^p s^{p-1}}{\Gamma(p)}e^{-qs}ds, \\ &= (\beta V)^n q^p \frac{1}{n!\Gamma(p)}\int_0^\infty s^{n+p-1}\ e^{-(\beta V+q)s}\ ds, \\ &= \frac{\Gamma(n+p)}{n!\Gamma(p)}\left(\frac{q}{\beta V+q}\right)^p\left(\frac{\beta V}{\beta V+q}\right)^n, \\ &= \binom{n+p-1}{n}\left(\frac{1}{1+\frac{\beta V}{q}}\right)^p\left(\frac{\frac{\beta V}{q}}{1+\frac{\beta V}{q}}\right)^n. \end{aligned} \tag{7}$$

Therefore, the number of HIV-1 infection events per cell during cell-free HIV-1 infection (i.e., $Pr(X = n)$) follows a negative-binomial distribution of mean $\beta pV/q$ and variance $\beta pV/q(1 + \beta V/q)$.

We estimated the parameters in Eq. (7) by fitting Eqs (1–4) to the experimental measured frequencies of quadrants A, B, C, and D in our FACS analyses (see MATERIALS AND METHODS), and these values are summarized in Table 1. A set of representative analyses is shown in Fig. 2. In these panels, the coloured and white bars represent experimental measurements and theoretical predictions, respectively. In both single (Fig. 2a,b) and double HIV-1 infection experiments (Fig. 2c), our mathematical model reproduces all experimental datasets well. An independent set of data and the corresponding analysis are shown in Supplemental Figure 1, both for single and double infection experiments.

The expected negative-binomial distributions of the number of infection events per cell in 200 μl for GFP and HSA HIV-1 single experiments are shown in green and red curves, respectively, as examples in Fig. 3a. The black curves represent the expected Poisson distribution with the mean of the Gamma distributed susceptibility parameter, s (i.e., the target cell population is assumed to have homogeneous susceptibility). While the mean and variance of a Poisson distribution are the same, the variance of a negative-binomial distribution is larger than its mean. This property of negative-binomial distribution explains that the more susceptible one cell is, the more effectively it will be infected by HIV-1[13,14].

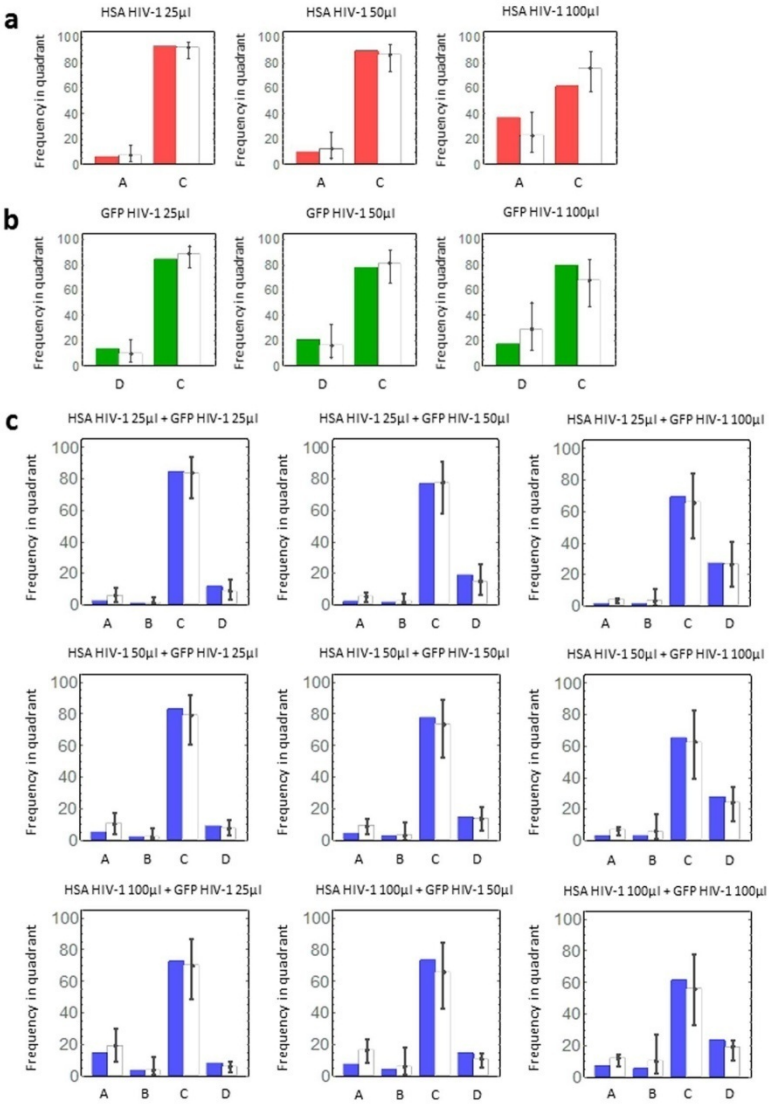


Figure 2. Frequency of single infection and coinfection: (**a**) The experimental and theoretical frequencies of quadrants A (i.e., HSA-positive) and C (i.e., HSA-negative) in three independent experiments using only HSA HIV-1 are shown by red and white bars, respectively. **(b)** The experimental and theoretical frequencies of quadrants D (i.e., GFP-positive) and C (i.e., GFP-negative) in single GFP HIV-1 experiments are shown by green and white bars, respectively. **(c)** The experimental and theoretical frequencies of quadrants A (i.e., HSA-positive), B (i.e., positive both for HSA and GFP), C (i.e., negative both for HSA and GFP), and D (i.e., GFP-positive) in double HIV-1 experiments are shown by blue and white bars, respectively. Two independent experiments were run with the nine indicated combinations of HSA and GFP HIV-1 corresponding to all possible combinations of the three different amounts of each virus used in single experiments. Note that each error bar represents the 95% credible interval obtained from Markov Chain Monte Carlo (MCMC) parameter inferences (Table 1).

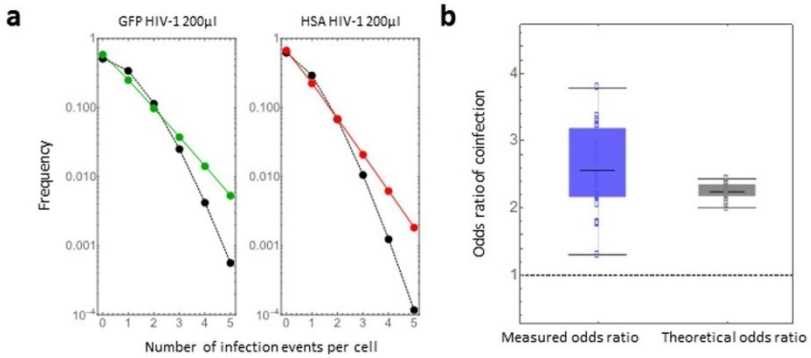


Figure 3. Frequency of multiple infection events per cell: (**a**) The expected negative-binomial distributions of the number of infection events per cell in 200 µl in GFP and HSA HIV-1 single experiments are shown in green and red curves, respectively. These curves were drawn using the mean derived from MCMC parameter inferences (Table 1). The black curves represent the expected Poisson distribution with the mean of the Gamma-distributed susceptibility parameter, s (i.e., the target cell population is assumed to have homogeneous susceptibility). **(b)** The experimental odds ratio (OR_E) and theoretical odds ratio (OR_M, calculated by our estimated parameters) are shown in blue and black box plots, respectively. The dotted line corresponds to the odds ratio of 1 predicted by a Poisson distribution (i.e., $OR_M = 1$: random HIV-1 infection).

Calculation of the odds ratio in a cell-free HIV-1 infection. The frequency of co-infected cells with HIV-1 expressing HSA and GFP has previously been quantified by calculating the odds ratios[13–15]. The odds of HSA-positive cells being GFP-positive can be calculated by

$$[\widetilde{F}_B/(\widetilde{F}_A + \widetilde{F}_B)]/\{1 - [\widetilde{F}_B/(\widetilde{F}_A + \widetilde{F}_B)]\} = \widetilde{F}_B/\widetilde{F}_A,$$

while the odds of HSA-negative cells being GFP-positive can be calculated by $\widetilde{F}_D/\widetilde{F}_C$. If the coinfection were random (i.e., independent events), then the $\widetilde{F}_B/\widetilde{F}_A$ and $\widetilde{F}_D/\widetilde{F}_C$. would be expected to be equal to 1, that is, the experimental odds ratio

$$OR_E = (\widetilde{F}_B/\widetilde{F}_A)/(\widetilde{F}_D/\widetilde{F}_C) = \widetilde{F}_B\widetilde{F}_C/\widetilde{F}_A\widetilde{F}_D = 1.$$

If coinfection occurred more or less frequently than that expected from random events, then the expected odds ratio would be $OR_E > 1$ and $OR_E < 1$, respectively. A higher frequency of coinfection has been experimentally confirmed in independent reports[13–15]. To study whether or not our novel model quantitatively reproduces this important property of HIV-1 coinfection, we derived the theoretical odds ratio, OR_M, from Eqs (1–4) as follows:

$$OR_M = \frac{F_B(\boldsymbol{\theta})F_C(\boldsymbol{\theta})}{F_A(\boldsymbol{\theta})F_D(\boldsymbol{\theta})} = 1 + \frac{\dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}(\overline{V}_{\mathrm{HSA}}+\overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p} - \dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}\overline{V}_{\mathrm{HSA}}\right)^p\left(1+\frac{\beta}{q}\overline{V}_{\mathrm{GFP}}\right)^p}}{\left\{\dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}\overline{V}_{\mathrm{GFP}}\right)^p} - \dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}(\overline{V}_{\mathrm{HSA}}+\overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p}\right\}\left\{\dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}\overline{V}_{\mathrm{HSA}}\right)^p} - \dfrac{1}{\left(1+\frac{\beta}{q}(\overline{V}_{\mathrm{HSA}}+\overline{V}_{\mathrm{GFP}})\right)^p}\right\}}.$$

The second term is always positive (see Supplementary Note), which implies that $OR_M > 1$ for all arbitrary parameter values. Therefore, under the condition of heterogeneous target cell susceptibility, our model always predicts that non-random HIV-1 coinfection occurs more frequently than would be expected for independent infection events (i.e., $OR_M > 1$). Notably, if the target cells have homogeneous susceptibilities (that is, the susceptibility parameter, s, is not distributed but fixed), then our model converges to a Poisson distribution and $OR_M = 1$. In Fig. 3b, we compared the odds ratio measured by our experiments, OR_E, with the theoretical odds ratio, OR_M, which was calculated by our estimated parameters(Table 1). Thus, our novel model quantitatively reproduces the odds ratio and captures the known property of coinfection during cell-free HIV-1 infection *in vitro*.

Quantification of infection events during cell-free HIV-1 infection. As discussed in previous work[12,16], some multiple infection events cannot be detected by FACS analyses because cells that are infected with one copy of HIV-1 expressing HSA and those carrying two copies of the same viral genome are similarly

HSA-positive. Therefore, FACS analysis usually underestimates the true frequency of multiple infection[12]. As we derived $F_{quadrant,r,g,co}(r = 1, \ldots, 10)(g = 1, \ldots, 10)(co = 1, \ldots, 18)$ in the MATERIALS AND METHODS, we calculated the number of infection events during cell-free HIV-1 infection, using Eqs (1–4) and our estimated parameters in Table 1. The frequency of cells infected by multiple HSA or GFP virions was calculated by the following equation, in which n_{HSA} and n_{GFP} are the number of infection events with HSA and GFP virions, respectively:

$$\int_0^\infty \frac{(\beta s V_{HSA})^{n_{HSA}}\, e^{-\beta s V_{HSA}}}{n_{HSA}!} \frac{(\beta s V_{GFP})^{n_{GFP}}\, e^{-\beta s V_{GFP}}}{n_{GFP}!} \frac{q^p\, s^{p-1}}{\Gamma(p)} e^{-qs} ds.$$

The estimated multiple infection frequencies in double HIV-1 infection experiments are shown in Fig. 4a (for other combinations of multiple infection, the frequency is less than 0.001). For example, in the experiment with 100 µl each of HSA and GFP HIV-1, although the experimentally measured frequency of coinfection was 5.47% (Fig. 2c, lower right panel, blue bar in **B**), our model revealed that 18.0% of the target cells were multiply infected (i.e., 1−(0.57 + 0.10 + 0.15)=0.18). Our estimated value during cell-free infection is smaller than the values previously estimated (21% in ref. 12) during cell-to-cell HIV-1 infection in cell culture. This analysis further supports that cell-to-cell infection enhances multiple infection events as compared with cell-free infection. In Fig. 4b, we calculated the mean frequency of multiple infection events following incubation with different amounts of HIV-1 in both single and double infection experiments. The marks ▲, ◆, ●, and ■ show the mean frequencies of zero, one, two, and three infection events per cell, respectively (data not shown for four or more infections events). As the amount of inoculated virus increases, the frequencies of multiple events consistently increase, and those of uninfected cells decrease. Interestingly, for these numbers of infection events, the frequencies reach steady state values around 150 µl of inoculated HIV-1. Thus, our quantitative analyses reveal the true frequency of multiple infection events and demonstrate that cell-free HIV-1 infection by itself induces multiple infection events. Furthermore, taking advantage of our modelling approach, we could estimate the mean number of infection events per infected cell during cell-free HIV-1 infection. In Fig. 4c, we found that the number increases from 1.02 to 1.65 as the amount of inoculated HIV-1 increases. Our estimated range is consistent with the previous observation of proviral copy number in infected cells measured by fluorescence *in situ* hybridization[12].

Discussion

In this study, we modelled the distribution of HIV infection events during cell-free infection *in vitro*, taking into account differences in susceptibility within the target cell population. Our model fits well with our collected experimental data for both single and double infections, indicating that the assumptions and the mathematical formulation successfully capture the biological processes underlying the distribution of HIV-1 infection events. More importantly, our mathematical model describes the hypothesis that variation in target cell susceptibility could account for non-random co-infection more accurately than previous work.

Two previous reports suggested that differences in cell susceptibilities could be responsible for the observed higher frequency of double infections, as compared to predictions based on the assumption of independent infection events[13,18]. In those reports, cell susceptibility was either considered as a binary feature (cells were either susceptible or non-susceptible)[18], or a limited number of subpopulations characterized by distinct susceptibility levels were considered[13]. Here, by considering susceptibility as a continuous variable, we expand on those original reports. The idea that the susceptibility of target cells is continuously distributed is intuitive because, even in cultured cells, it should be slightly different due to, for example, the change in the expression of (co-)receptors on each cell membrane over time. Employing this condition, we showed that the theoretical odds ratio (OR_M) is always greater than 1 (see Fig. 3 and Supplementary Note). This result is consistent with the findings of previous work[13–15]. Hence, considering susceptibility as a continuous variable seems to be a more appropriate assumption for describing the cooperative nature of the HIV-1 infection process, for which several quantitative and qualitative parameters (number of receptors, availability of nucleotide pool, phase of the cell cycle, etc.) participate in defining the susceptibility of each cell within a population.

The approach described here may also be customized to describe other biological situations that display similar properties, for instance a distribution of eclipse period of virus-infected cells[24,28]. Note that our model does not restrict the analysis to a situation in which the two events (infection by the GFP and the HSA virus, in our study) have the same efficiency. Indeed, for each virus we estimated a composed parameter ($\beta\overline{V}_{HSA}/q$ or $\beta\overline{V}_{GFP}/q$ in Table 1) to express the effective virus dose for a given volume of different viruses (e.g., 3.12 µl of inoculated HIV-1 expressing HSA or GFP). This choice increases the flexibility of our approach and allows an extension of its range of potential applications. Furthermore, we performed the experiments under conditions compatible with a large proportion of cells remaining uninfected to prevent saturation of the system and the potential associated biases. Of note, MT4 cells and their derivatives are highly susceptible to HIV infection. A gradual increase in the percentage of infected cells is observed when they are exposed to increasing virus doses, including conditions in which the majority of cells are infected. This feature allowed testing a wide range of experimental conditions, assisting the development of our model. Additionally, the model can be customized to work with less susceptible cells by experimentally determining the values of the parameters, p and q, because these two parameters are strongly associated with the susceptibility in a target cell population.

Our model allows estimation of the frequency of single and multiple infection events for individual virus inputs. As shown in Fig. 3a (for 200 µl of each virus), our model predicts values that differ from the Poisson distribution; in particular, it predicts higher frequencies of multiple infection events. Also, our model predicts an OR_M of coinfection that is always >1, reproducing the experimental observations from different groups[13–17], while the Poisson distribution predicts an $OR_M = 1$. Finally, having derived the values of the relevant parameters,

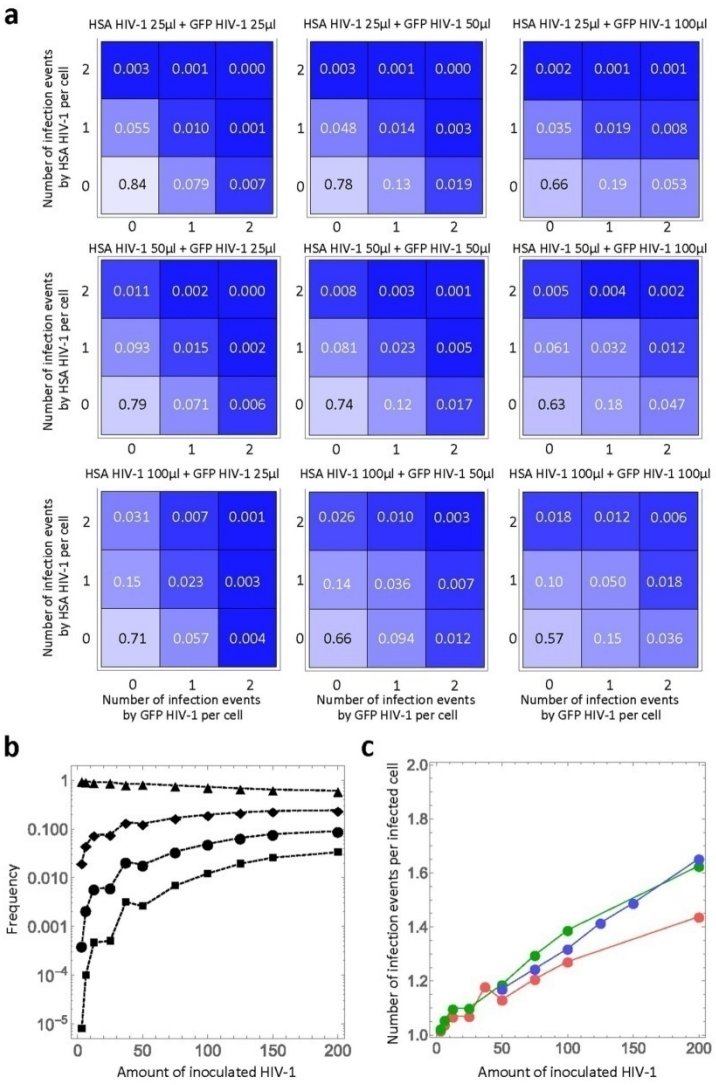


Figure 4. Quantitative analyses of multiple infection: (**a**) The distribution of the number of infection events per cell in double HIV-1 infection experiments with nine different combinations of virus amounts are shown. The number in each square is the estimated frequency of the corresponding infection events. **(b)** The mean frequency of the multiple infection events per cell inoculated with each different amount of HIV-1 is calculated. For double infection experiments, the amount is defined as the total inoculation of HSA and GFP HIV-1. The marks ▲, ♦, ●, and ■ show the mean frequencies of zero, one, two, and three infection events per cell, respectively. **(c)** The estimated mean number of infection events per infected cell with different amounts of HIV-1 is calculated. The red, green, and blue curves correspond to the experiments with HSA and GFP HIV-1 single infections, and double infections, respectively. In (**a**), (**b**), and (**c**), these calculations were all performed using the mean value obtained from MCMC parameter inferences (Table 1).

our model allows the estimation of the frequency of multiple infections with the same virus, which are events that could not be experimentally determined in our system. Indeed, infection with one or more viruses carrying the same tag will produce similar distributions in the resulting FACS plots, preventing their experimental discrimination. In Fig. 4b, we quantified the frequency of multiple infection events for different amounts of inoculated HIV-1. As the inoculated amount increases, a significant proportion of cells can be infected by multiple viruses (e.g. ●/■). This demonstrates that cell-free HIV-1 infection by itself may have an important impact on driving the recombination of viruses. The range of infection events per infected cell predicted by our model in Fig. 4c fits the range of previously experimentally measured multiple infection events produced by cell-free HIV-1 infection using *in situ* hybridization[12]. Taken together, our findings and predictions lead to a more detailed understanding of the link between co-infection events and recombination.

An alternative mechanism was previously proposed to explain the disproportionate frequency of double-infected cells observed during co-infection experiments. The authors proposed that otherwise silent infection events were detected as a consequence of the additional Tat expression induced by the second virus[17]. We have previously demonstrated that in our experimental system this potential artefact did not play a role, since the use of lentiviral vectors that only expressed GFP resulted in similarly high frequencies of double-infected cells as those obtained using vectors that also encode Tat[15].

In addition to these *in vitro* experimental and theoretical analyses, other mathematical models and computer simulations have been proposed to explain the observation of multiple infections *in vivo*. For instance, it was described that $CD4^+$ T cells from the spleen of HIV-infected individuals carry on average 3.2 HIV proviral copies[29,30]. Also, the number of multiply infected cells was found to correlate with the square of the overall number of infected cells[21,31,32] in homogeneous target cell populations.

In agreement with previous reports[12], we show here that multiple infection events take place with measurable frequencies following incubation with cell-free HIV-1 particles in a heterogeneous target cell population. Although the alternative pathway of infection that relies on cell contact-mediated infection is a more powerful transmission means, the impact of cell-free virus coinfection on HIV-1 genetic diversity may be expected to be more substantial because of the likelihood that spatially separated cells harbour genetically distinct variants. The impact on HIV-1 diversity, and consequently on the potential to adapt to a changing environment, are expected to correlate with the genetic distance between the parental variants. In the absence of antiretroviral treatment, the recurrent exposure of cells to infectious virions over the course of several years during this chronic infection creates numerous occasions for coinfections to happen. In view of these considerations, infection by cell-free virions emerges as a relevant means of HIV-1 diversification.

References

1. Burke, D. S. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis* **3**, 253–259, doi:10.3201/eid0303.970301 (1997).
2. Charpentier, C., Nora, T., Tenaillon, O., Clavel, F. & Hance, A. J. Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasispecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol* **80**, 2472–2482, doi:10.1128/jvi.80.5.2472-2482.2006 (2006).
3. Nora, T. *et al.* Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* **81**, 7620–7628, doi:10.1128/jvi.00083-07 (2007).
4. Sagar, M. *et al.* Infection with multiple human immunodeficiency virus type 1 variants is associated with faster disease progression. *J Virol* **77**, 12921–12926 (2003).
5. Josefsson, L. *et al.* Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 11199–11204, doi:10.1073/pnas.1107729108 (2011).
6. Josefsson, L. *et al.* Single cell analysis of lymph node tissue from HIV-1 infected patients reveals that the majority of CD4+ T-cells contain one HIV-1 DNA molecule. *PLoS Pathog* **9**, e1003432, doi:10.1371/journal.ppat.1003432 (2013).
7. Allen, T. M. & Altfeld, M. HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 829-835, quiz 836, 10.1016/j.jaci.2003.08.037 (2003).
8. Donahue, D. A., Bastarache, S. M., Sloan, R. D. & Wainberg, M. A. Latent HIV-1 can be reactivated by cellular superinfection in a Tat-dependent manner, which can lead to the emergence of multidrug-resistant recombinant viruses. *J Virol* **87**, 9620–9632, doi:10.1128/jvi.01165-13 (2013).
9. Quan, Y., Liang, C., Brenner, B. G. & Wainberg, M. A. Multidrug-resistant variants of HIV type 1 (HIV-1) can exist in cells as defective quasispecies and be rescued by superinfection with other defective HIV-1 variants. *J Infect Dis* **200**, 1479–1483, doi:10.1086/606117 (2009).
10. Jolly, C. & Sattentau, Q. J. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* **5**, 643–650, doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00209.x (2004).
11. Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M. A. & Chen, B. K. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol* **81**, 12582–12595, doi:10.1128/jvi.00381-07 (2007).
12. Del Portillo, A. *et al.* Multiploid inheritance of HIV-1 during cell-to-cell infection. *J Virol* **85**, 7169–7176, doi:10.1128/jvi.00231-11 (2011).
13. Dang, Q. *et al.* Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 632–637, doi:10.1073/pnas.0307636100 (2004).
14. Chen, J. *et al.* Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J Virol* **79**, 4140–4149, doi:10.1128/jvi.79.7.4140-4149.2005 (2005).
15. Remion, A., Delord, M., Hance, A. J., Saragosti, S. & Mammano, F. Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes. *Virology* **487**, 59–67, doi:10.1016/j.virol.2015.09.028 (2016).
16. Haqqani, A. A. *et al.* Central memory CD4+ T cells are preferential targets of double infection by HIV-1. *Virol J* **12**, 184, doi:10.1186/s12985-015-0415-0 (2015).
17. Bregnard, C., Pacini, G., Danos, O. & Basmaciogullari, S. Suboptimal provirus expression explains apparent nonrandom cell coinfection with HIV-1. *J Virol* **86**, 8810–8820, doi:10.1128/jvi.00831-12 (2012).
18. Law, K. M. *et al. In Vivo* HIV-1 Cell-to-Cell Transmission Promotes Multicopy Micro-compartmentalized Infection. *Cell reports* **15**, 2771–2783, doi:10.1016/j.celrep.2016.05.059 (2016).
19. Amara, A. *et al.* G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **77**, 2550–2558 (2003).

20. Imbeault, M., Lodge, R., Ouellet, M. & Tremblay, M. J. Efficient magnetic bead-based separation of HIV-1-infected cells using an improved reporter virus system reveals that p53 up-regulation occurs exclusively in the virus-expressing cell population. *Virology* **393**, 160–167, doi:10.1016/j.virol.2009.07.009 (2009).
21. Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O. & Shaw, G. M. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4204–4209, doi:10.1073/pnas.0306764101 (2004).
22. Soetaert, K. & Petzoldt, T. Inverse modelling, sensitivity and monte carlo analysis in R using package FME. *Journal of Statistical Software* **33**, 1–28 (2010).
23. MacDonald, N., Cannings, C. & Hoppensteadt, F. C. *Biological delay systems: linear stability theory*. (Cambridge University Press, 2008).
24. Kakizoe, Y. *et al.* A method to determine the duration of the eclipse phase for *in vitro* infection with a highly pathogenic SHIV strain. *Sci Rep* **5**, 10371, doi:10.1038/srep10371 (2015).
25. Bliss, C. I. & Fisher, R. A. Fitting the negative binomial distribution to biological data. *Biometrics* **9**, 176–200 (1953).
26. Kabat, D., Kozak, S. L., Wehrly, K. & Chesebro, B. Differences in CD4 dependence for infectivity of laboratory-adapted and primary patient isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 2570–2577 (1994).
27. Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B. & Kabat, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 2855–2864 (1998).
28. Pinilla, L. T., Holder, B. P., Abed, Y., Boivin, G. & Beauchemin, C. A. The H275Y neuraminidase mutation of the pandemic A/H1N1 influenza virus lengthens the eclipse phase and reduces viral output of infected cells, potentially compromising fitness in ferrets. *J Virol* **86**, 10651–10660, doi:10.1128/jvi.07244-11 (2012).
29. Jung, A. *et al.* Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**, 144, doi:10.1038/418144a (2002).
30. Dixit, N. M. & Perelson, A. S. Multiplicity of human immunodeficiency virus infections in lymphoid tissue. *J Virol* **78**, 8942–8945, doi:10.1128/jvi.78.16.8942-8945.2004 (2004).
31. Wodarz, D. & Levy, D. N. Effect of different modes of viral spread on the dynamics of multiply infected cells in human immunodeficiency virus infection. *J R Soc Interface* **8**, 289–300, doi:10.1098/rsif.2010.0266 (2011).
32. Dixit, N. M. & Perelson, A. S. HIV dynamics with multiple infections of target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8198–8203, doi:10.1073/pnas.0407498102 (2005).

Acknowledgements

We thank Michel Tremblay and David Levy for providing the HIV-1 proviral plasmids expressing HSA and GFP, respectively. This work was supported in part by the Japan Science and Technology Agency (JST) PRESTO program (to S.I.); JST RISTEX program (to S.I.); JST CREST program (to S.I.); the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant Numbers 15KT0107, 26287025, 16KT0111, 16H04845, and 16K13777 (to S.I.); the Japan Agency for Medical Research and Development, AMED (to S.I.); Mitsui Life Social Welfare Foundation (to. S.I.); The Shin-Nihon of Advanced Medical Research (to S.I.); GSK Japan Research Grant 2016 (to S.I.); a grant from Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) (to F.M.); A.R. was supported by a doctoral fellowship from "Région Martinique". Finally, we are grateful to the editor and reviewers for their valuable comments and suggestions that improved the presentation of this paper.

Author Contributions

S.I. and F.M. designed the experiments. A.R. and A.T. conducted the experiments. Y.I., S.N., K.E., Y.I., and S.I. carried out the computational analysis. S.I. and F.M. supervised the project. Y.I., Y.I., S.I., and F.M. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-03954-9

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Article 2 : Dynamics of HIV-1 coinfection in different susceptible target cell populations during cell-free infection (publié)

Journal of Theoretical Biology 455 (2018) 39–46

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Theoretical Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtbi

Dynamics of HIV-1 coinfection in different susceptible target cell populations during cell-free infection

Yusuke Ito[a], Alexandra Tauzin[b,c,d], Azaria Remion[b,c,d], Keisuke Ejima[e,f], Fabrizio Mammano[b,c,d,1,*], Shingo Iwami[a,g,h,1,*]

[a] Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 819-0395, Japan
[b] INSERM, U941, Paris 75010, France
[c] Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IUH, Paris 75010, France
[d] Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris 75010, France
[e] Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Indiana University Bloomington, IN, USA
[f] Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
[g] PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan
[h] CREST, JST, Saitama 332-0012, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 March 2018
Revised 24 May 2018
Accepted 28 June 2018
Available online 7 July 2018

Keywords:
HIV-1 infection
Mathematical model
Coinfection
Non-random infection

ABSTRACT

HIV-1 mutations rapidly accumulate through genetic recombination events, which require the infection of a single cell by two virions (coinfection). Accumulation of mutations in the viral population may lead to immune escape and high-level drug resistance. The existence of cell subpopulations characterized by different susceptibility to HIV-1 infection has been proposed as an important parameter driving coinfection (Dang et al., 2004). While the mechanism and the quantification of HIV-1 coinfection have been recently investigated by mathematical models, the detailed dynamics of this process during cell-free infection remains elusive. In this study, we constructed ordinary differential equations considering the heterogeneity of target cell populations during cell-free infection in cell culture, and reproduced the cell culture experimental data. Our mathematical analyses showed that the presence of two differently susceptible target cell subpopulations could explain our experimental datasets, while increasing the number of subpopulations did not improve the fitting. In addition, we quantitatively demonstrated that cells infected by multiple viruses mainly accumulated from one cell subpopulation under cell-free infection conditions. In particular, the frequency of infection events in the more susceptible subpopulation was 6.11-higher than that from the other subpopulation, and 98.3% of coinfected cells emerged from the more susceptible subpopulation. Our mathematical-experimental approach is able to extract such a quantitative information, and can be easily applied to other virus infections.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human Immunodeficiency Virus type-I (HIV-1) infection remains one of the leading public-health concerns since the early 1980s (Barre-Sinoussi et al., 2013; Fauci, 2003). The major hurdles to the control of HIV-1 infection are viral escape from immune responses and high-level drug resistance to antiretroviral therapy (Chang et al., 2013). These phenomena are caused by the rapid production and accumulations of HIV-1 mutations over time in HIV-1 patients, driving viral evolution and escape (Gottlieb et al., 2004; Nora et al., 2007). One of the most efficient mechanisms favoring the accumulations of mutation consists in the recombination events, which allow to combine in a single step portions of the viral genomes that evolved independently (Burke, 1997; Jung et al., 2002). Recombination events require the infection of a single cell by two virions. Double infections can take place within a short time frame (coinfection) or with variable delay (super-infection) (Law et al., 2016; Remion et al., 2016). Double-infected cells produce virus particles that may carry two different RNA molecules, which can recombine during reverse transcription and produce a chimeric genome (Redd et al., 2013).

Genetic recombination is a relevant phenomenon in infected patients, and several reports have described patients infected by multiple HIV-1 variants (Allen and Altfeld, 2003; Powell et al., 2009; Ronen et al., 2013; Smith et al., 2005). Although most in-

* Corresponding authors.
E-mail addresses: fabrizio.mammano@inserm.fr (F. Mammano), siwami@kyushu-u.org (S. Iwami).
[1] These authors contributed equally to this study.

https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.06.025
0022-5193/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

fected circulating cells in patients harbor a single viral genome, double-infected cells are consistently detected (Josefsson et al., 2013; Josefsson et al., 2011). Genetic recombination in coinfected cells constantly happens over time (Fraser, 2005; Simon-Loriere and Holmes, 2011), and double infections by HIV-1 was shown to lead to the emergence of multidrug resistant viruses (Donahue et al., 2013; Quan et al., 2009).

Interestingly, it was previously shown in tissue culture that HIV-1 coinfection is not a random event, and it takes place with higher frequency than expected for independent events (Dang et al., 2004). Dang et al., suggested that the heterogeneity of target cells in terms of susceptibility to infection, is largely responsible for the nonrandom distribution of coinfection events in vitro (Dang et al., 2004). In their study, for simplicity, five subpopulations with a gradient of susceptibility to the infection were considered (Dang et al., 2004). The concept of heterogeneity of target cells has been widely supported by subsequent publications (Chen et al., 2005; Ito et al., 2017; Remion et al., 2016; van der Kuyl and Cornelissen, 2007). One aspect that has not been sufficiently investigated, is the time-evolution of coinfection. To understand such non-random multiple infection events from the point of view of "virus dynamics", the kinetics of HIV-1 coinfection during the course of the infection should be quantified. In a recent report by Law et al., (Law et al., 2016), a simple ordinary differential equation model has been proposed and the frequency of HIV-1 coinfection in vivo was investigated. Their mathematical analysis showed that HIV-1 coinfection is indeed non-random, and target cell population must have different susceptibilities to explain their experimental data in vivo. Here, to further expand their approach, considering target cell heterogeneity and number of infection events, and to investigate the time-evolution of HIV-1 coinfection in detail, we developed a novel mathematical model, which captures a large dataset from in vitro experiments, and characterized HIV-1 cell-free infection dynamics.

2. Results

2.1. Mathematical model considering target cell heterogeneity and number of infection events

Our model extended the well-parameterized basic model of viral dynamics (e.g., (Perelson, 2002)) by incorporating both target cell heterogeneity and number of infection events.N target cell subpopulations with different susceptibility were assumed. Dynamics of the target cell subpopulation $i(\in\{1,\ldots,N\})$ and the viral dynamics in cell culture were modelled as follows:

$$
\begin{aligned}
\frac{dT_i}{dt} &= -\beta s_i V_R T_i - \beta s_i V_G T_i\\
\frac{dI_i^{R_1}}{dt} &= \beta s_i V_R T_i - \beta s_i V_R I_i^{R_1} - \beta s_i V_G I_i^{R_1},\\
\frac{dI_i^{R_2}}{dt} &= \beta s_i V_R I_i^{R_1} - \beta s_i V_G I_i^{R_2},\\
\frac{dI_i^{G_1}}{dt} &= \beta s_i V_G T_i - \beta s_i V_R I_i^{G_1} - \beta s_i V_G I_i^{G_1},\\
\frac{dI_i^{G_2}}{dt} &= \beta s_i V_G I_i^{G_1} - \beta s_i V_R I_i^{G_2},\\
\frac{dI_i^{R_1G_1}}{dt} &= \beta s_i V_R I_i^{G_1} + \beta s_i V_G I_i^{R_1} - \beta s_i V_R I_i^{R_1G_1} - \beta s_i V_G I_i^{R_1G_1},\\
\frac{dI_i^{R_2G_1}}{dt} &= \beta s_i V_G I_i^{R_2} + \beta s_i V_R I_i^{R_1G_1} - \beta s_i V_G I_i^{R_2G_1},\\
\frac{dI_i^{R_1G_2}}{dt} &= \beta s_i V_R I_i^{G_2} + \beta s_i V_G I_i^{R_1G_1} - \beta s_i V_R I_i^{R_1G_2},\\
\frac{dI_i^{R_2G_2}}{dt} &= \beta s_i V_R I_i^{R_1G_2} + \beta s_i V_G I_i^{R_2G_1},\\
\frac{dV_R}{dt} &= -cV_R,\\
\frac{dV_G}{dt} &= -cV_G.
\end{aligned}
\tag{1}
$$

Here T_i is the number of uninfected (i.e., susceptible) target cell subpopulation i. The subpopulation i was further divided into 9 sub-groups by the state of infection: $I_i^{R_j}$ and $I_i^{G_k}$ are the numbers of infected cells either by HSA HIV-1 (symbolized by R) or GFP HIV-1 (symbolized by G), $I_i^{R_jG_k}$ is coinfected cells, where the subscripts j and $k\in\{1, 2\}$ correspond to the number of infection events either by HSA or by GFP HIV-1 respectively (see Fig. 1). V_R and V_G are the amount of HSA and GFP HIV-1, respectively. The *de novo* infection, $\beta s_i V_R + \beta s_i V_G$, is assumed linearly dependent on the number of viral populations, V_R and V_G. β is the infection rate and s_i is the relative susceptibility for subpopulation i. For simplicity, we ordered the target cell subpopulations by susceptibility (i.e., $1 = s_1 > s_2 > \ldots > s_i$ for $i \geq 2$). That is, $\beta(=\beta s_1)$ is the net infection rate of the most susceptible target cell population T_1 for HIV-1 and, for example, βs_2 is the reduced infection rate of the 2nd susceptible populations T_2. Since these HSA and GFP HIV-1 could not infect their target cells multiple times (i.e., single cycle experiments), we only considered a viral clearance rate c but not virus production. As we previously estimated in Ito et al. (2017), more than 99.9% of infection events were largely occupied by 1 and/or 2 infections by either HSA or GFP HIV-1 even in the 100 and 100 µl of double HSA and GFP HIV-1 experiment. Therefore, we neglected the case which $j, k > 3$ in Eq. (1) for analysing our experimental datasets, and assumed that more than one infection events did not occur simultaneously. Based on our previous findings, the death rate of HIV-1 infected cell is negligible because cells were exposed to the virus only during 2 hours in our experiments (Ito et al., 2017; Remion et al., 2016).

2.2. Heterogeneity of target cell populations

To characterize the heterogeneity of target cell population we quantified the goodness-of-fit between the candidate models with different number of cell subpopulations, and the experimental data (see Section 4 for our data fitting). To this end, we calculated the Akaike Information Criteria (AIC) for each fit using

$$
AIC = N_{pts} \ln\left(\frac{SSR\left(\hat{\boldsymbol{\theta}}\right)}{N_{pts}}\right) + 2N_{par},
$$

and compared them for the different number of susceptible subpopulations in Fig. 2. Here N_{pts} and N_{par} represent the number of data points and the number of parameters, respectively. The sum of the residuals, $SSR(\hat{\boldsymbol{\theta}})$ is explained in Section 4. Interestingly, complete homogeneity of target cells (i.e., the number of susceptible target cell population is equal to "1″) yields a very poor fit (high AIC) to our cell culture experimental datasets (see Fig. 2). Although the very best fit (smallest AIC) was obtained with two susceptible subpopulations (i.e., $N = 2$), higher dimensional models having more than three subpopulations provide an adequate description of the data. We summarized our best-fitted parameter values (i.e., estimated parameter values for $N = 2$) in Table 1. A set of representative data fitting is shown in Fig. 3. In these panels, the colored and white bars represent experimental and predicted frequencies for each quadrant, respectively. In both single (Fig. 3a and b) and double (Fig. 3c) HIV-1 infection experiments, our mathematical model reproduces all experimental datasets well. An independent set of data and the corresponding analysis is shown in

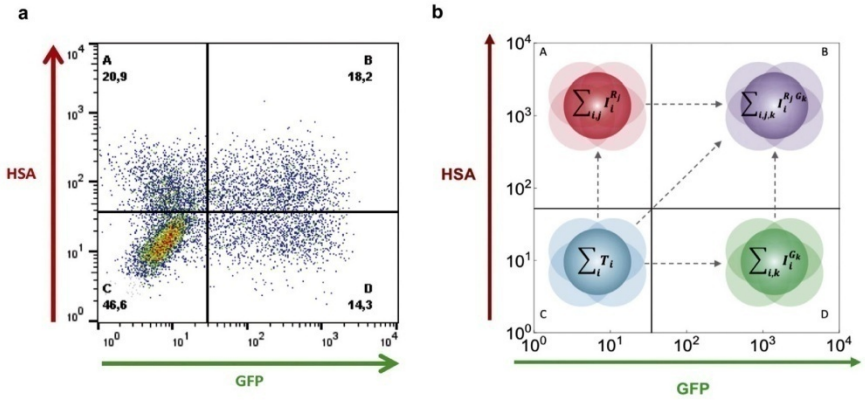


Fig. 1. Flow cytometry analysis of HIV-1 double infection and its mathematical modelling. (a) The panel shows a representative flow cytometry result of double infection with HSA and GFP viruses. The colors of dots represent the density of cells in the following quadrants: HSA$^+$ cells (A); HSA$^+$GFP$^+$ cells (B); uninfected susceptible target cells (C); and GFP$^+$ cells (D). The percentage of cells in each quadrant is indicated under the letter identifying the quadrant. **(b)** Each quadrant, i.e., (A), (B), (C) and (D) is defined as $\sum_{i,j} I_i^{R_j}$, $\sum_i T_i$, $\sum_{i,k} I_i^{G_k}$ and $\sum_{i,j,k} I_i^{R_j G_k}$, respectively, in our mathematical model. Here the indices i represents the class of target cell susceptibility, and j,k correspond to the number of infection events either by HSA virus or by GFP virus, respectively.

Table 1
Estimated parameters in the mathematical model of cell-free infection.

Parameter name	Parameters	Unit	Estimated mean values	95% credible interval
Number of target cell subpopulations with differently susceptible	N	–	2	–
Infection rate	β	(virion/μl)$^{-1}$ · h^{-1}	2.709×10^{-5}	$(1.818 - 3.836) \times 10^{-5}$
Viral clearance rate	c	h^{-1}	0.3060	0.08060 – 0.5347
Reduction rate on target cell susceptibility	s_2	–	0.1304	0.1075 – 0.1566
Initial HSA HIV-1 viral amount	$\overline{V_R}(0)$	(RNA copies/μl)	0.8505×10^3	$(0.5967 - 1.200) \times 10^3$
Initial GFP HIV-1 viral amount	$\overline{V_G}(0)$	(RNA copies/μl)	1.205×10^3	$(0.8383 - 1.704) \times 10^3$
Increase rate at 6.12 μl of inoculated virus	$r_{6.25}$	–	2.311	1.735 – 2.958
Increase rate at 12.5 μl of inoculated virus	$r_{12.5}$	–	4.011	3.138 – 4.913
Increase rate at 25 μl of inoculated virus	r_{25}	–	4.040	3.247 – 4.874
Increase rate at 37 μl of inoculated virus	r_{37}	–	10.27	8.195 – 12.43
Increase rate at 50 μl of inoculated virus	r_{50}	–	7.425	6.005 – 8.938
Increase rate at 75 μl of inoculated virus	r_{75}	–	11.86	9.512 – 14.26
Increase rate at 100 μl of inoculated virus	r_{100}	–	15.03	12.13 – 18.08
Increase rate at 200 μl of inoculated virus	r_{200}	–	24.24	19.59 – 29.11

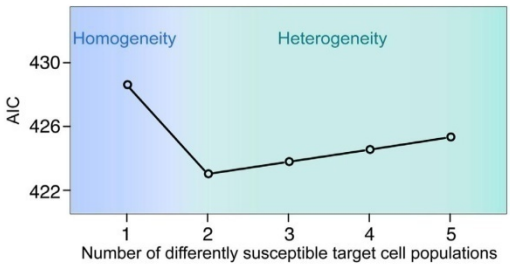


Fig. 2. Target cell heterogeneity based on AIC calculation. For each number of different susceptible target cell populations, AIC values were calculated in Eq. (1), and compared. The mean value of SSR derived from Markov Chain Monte Carlo (MCMC) inferences was used to calculate the AIC value.

Fig. S1 in Appendix A, both for single and double infection experiments. In addition, our mathematical model with estimated parameters successfully reproduces an important index on non-randomness of HIV-1 coinfection, i.e., odd ratio (Dang et al., 2004; Del Portillo et al., 2011; Ito et al., 2017; Remion et al., 2016), as well (see Fig. S2 in Appendix B).

2.3. Dynamics of HIV-1 coinfection during cell-free infection

The FACS analysis itself could not extract a time-evolution of HIV-1 coinfection (see Section 4). This is because conventional FACS analysis cannot distinguish infected cells having different number of infection events by the same virus (e.g., $I_i^{R_1}$ and $I_i^{R_2}$; $I_i^{R_1G_1}$ and $I_i^{R_2G_2}$). In this study, using the mathematical model with our estimated parameter values, we reconstructed the frequency of HIV-1 coinfection dynamics during the cell-free infection in cell culture. For example, as described in Fig. 4a–d, we calculated the frequency dynamics of HSA HIV-1 infected (i.e., quadrant A), double infected (quadrant B), uninfected susceptible target cells (quadrant C) and GFP HIV-1 infected (quadrant D) cells in the 100 and 100 µl of double HSA and GFP HIV-1 experiment, respectively. We found that the frequency of infection in the 1st susceptible target cell population was 6.11-fold higher than that of the 2nd susceptible cell population, when cells were exposed to the virus inoculum for 2 h. In other words, cells from the more susceptible population were almost selectively infected among the total target cell population (c.f., (Ito et al., 2017)). Furthermore, in Fig. 4e, we calculated the time-evolution of the number of infection events. Interestingly, multiple infection events rapidly occur upon exposure of cells to the virus, and they accumulate in up to 10% of all target cells within hours.

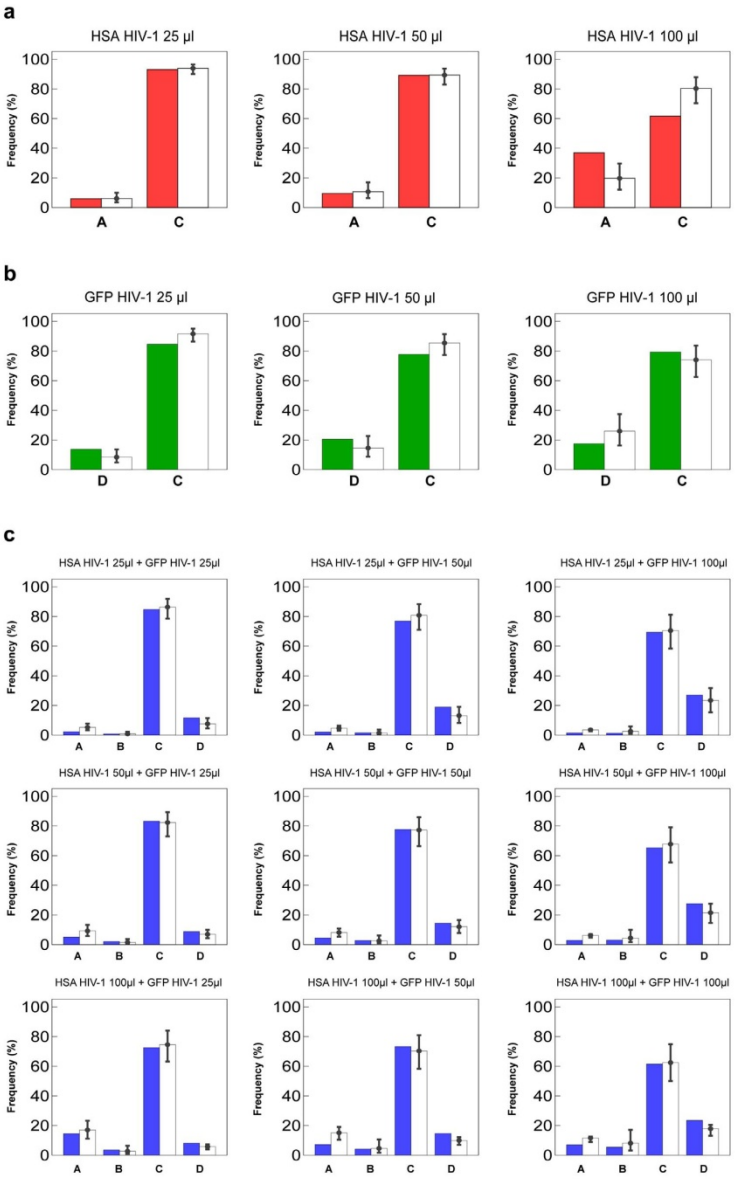


Fig. 3. Frequency of single infection and double infection. (a) The experimental and predicted frequencies of quadrants A (i.e., HSA^+) and C (i.e., HSA^-) at 2 hours post exposure to the virus in three independent experiments using only HSA HIV-1 are shown by red and white bars, respectively. **(b)** The experimental and predicted frequencies of quadrants D (i.e., GFP^+) and C (i.e., GFP^-) in single GFP HIV-1 experiments are shown by green and white bars, respectively. **(c)** The experimental and predicted frequencies of quadrants A (i.e., HSA^+), B (i.e., HSA^+GFP^+), C (i.e., HSA^-GFP^-), and D (i.e., GFP^+) in double HIV-1 experiments are shown by blue and white bars, respectively. Two independent experiments were performed with the nine indicated combinations of HSA and GFP HIV-1 using the three different amounts of each virus used in single experiments. Note that each error bar represents the 95% credible interval obtained from MCMC inferences (Table 1).

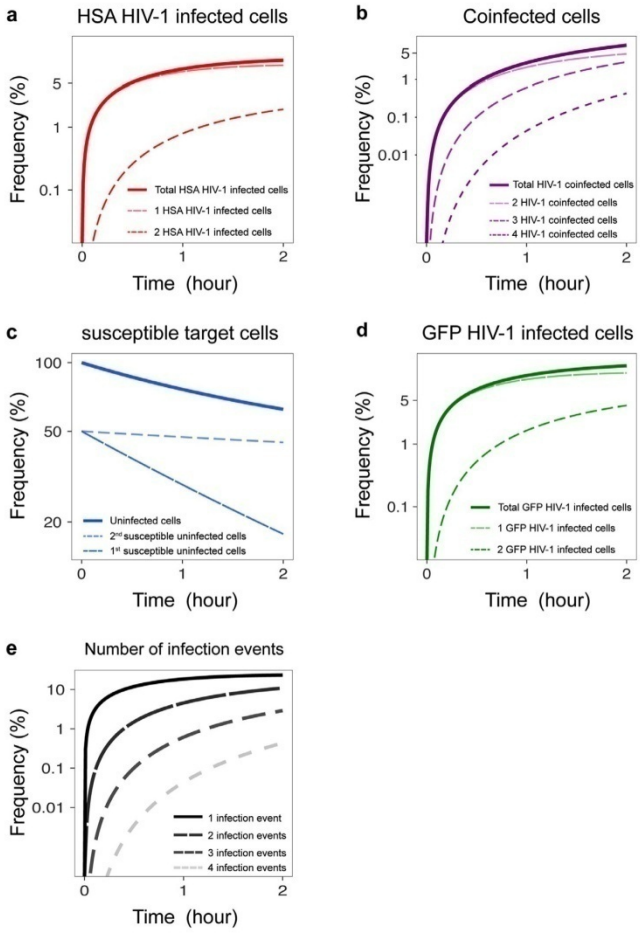


Fig. 4. Dynamics of HIV-1 coinfection during cell-free infection. The predicted frequency dynamics of HSA-infected (i.e., quadrant A), double infected (quadrant B), uninfected susceptible target (quadrant C) and GFP-infected (quadrant D) cells were calculated in **(a), (b), (c)** and **(d)**, respectively, using the mean estimated parameter values derived from MCMC inferences in 100 and 100 µl of double HSA and GFP HIV-1 experiment. The solid and dashed lines in **(a), (b)** and **(d)** correspond to the dynamics of total HIV-1 infection and each dynamics of 1, 2, 3 and 4 (co)infection event(s) denoted as in panels, respectively. In **(c)**, the solid and dashed lines represent the dynamics of total and each uninfected susceptible cell population, respectively. In **(e)**, the dynamics of 1, 2, 3 and 4 infection event(s) were separately calculated.

2.4. Contribution of differently susceptible target cell populations to coinfection

The more susceptible a target cell is, the more likely it will be infected by HIV-1. To investigate how target cell heterogeneity affects the HIV-1 coinfection frequency, we quantified the contribution of different target cell subpopulation to the event. The contribution of T_i at 2 h post exposure to the virus is defined as follows:

$$\frac{I_i^{R_2}(2) + I_i^{G_2}(2) + \sum_{j=1}^{2}\sum_{k=1}^{2} I_i^{R_jG_k}(2)}{\sum_{i=1}^{N} I_i^{R_2}(2) + \sum_{i=1}^{N} I_i^{G_2}(2) + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{2}\sum_{k=1}^{2} I_i^{R_jG_k}(2)}.$$

Interestingly, in Fig. 5, we revealed that 98.3% of coinfection events emerged within the most susceptible target cell subpopulation (i.e., 1st susceptible target cell population: T_1) on average based on the mathematical model with our estimated parameter values. This demonstrates that certain susceptible target cell subpopulations might be a driving force of HIV-1 recombination which may lead to drug resistance and immune escape.

3. Discussion

HIV mutation and recombination are driving forces of HIV evolution, especially for immune evasion and drug resistance in vivo (Gottlieb et al., 2004; Nora et al., 2007; Price et al., 1997). HIV recombination has been well studied both in vitro and in vivo (Cromer et al., 2016; Law et al., 2016; Levy et al., 2004; Schlub et al., 2010). An essential factor for viral recombination is coin-

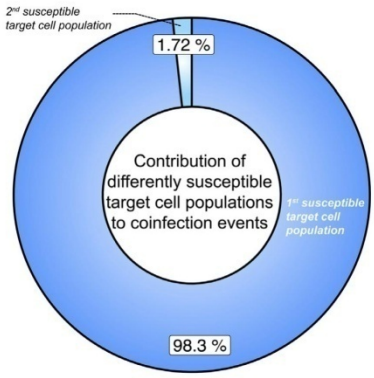


Fig. 5. Contribution of differently susceptible target cell populations to coinfection events. In 18 double HSA and GFP HIV-1 experiments, 98.28% and 1.72% of coinfected cells, on average, were generated from 1st and 2nd susceptible target cell population at 2 hours post exposure to the virus, respectively.

fection, and therefore it has been investigated extensively (Dang et al., 2004; Del Portillo et al., 2011; Dixit and Perelson, 2005; Ito et al., 2017; Remion et al., 2016). Taking advantage of mathematical modeling and its computational simulations, the dynamics of viral recombination and coinfection has been gradually revealed (Dixit and Perelson, 2005; Giorgi et al., 2013; Keele et al., 2008), although those studies did not take into account the heterogeneity of the target cell population.

To further our understanding of the coinfection (and multiple infection) dynamics for HIV-1 infection, in particular, in the context of different susceptible target cell populations, we propose the novel mathematical model including target cell heterogeneity (i.e., described as i) and explicitly counting the number of infection events in infected cells (i.e., j and k) (Fig. 1). By our experimental-theoretical approach, we characterized the heterogeneity of target cell population, and found that the presence of two different susceptible subpopulations is enough to reproduce our cell culture experimental datasets for multiple infections, although models having three or more subpopulations also might be acceptable (Figs. 2 and 3). For example, in Dang et al. (2004), it was reported that a simulation model considering 5 different susceptible subpopulations explained the nonrandom HIV-1 infection in cell culture. They did not estimate the number of subpopulations from experimental datasets, but our results further support their simple assumption.

In addition, based on our estimated parameter values, we were able to extract the dynamics of HIV-1 coinfection during cell-free infection in cell culture (Fig. 4). Our simulation explained that multiple infection events rapidly occur and accumulate in up to 10% of all target cells within hours. This implies that there might be massive multiple infection events, which enhance viral recombination, during an exponential viral growth phase in patients. In fact, it has been reported that in vivo the estimated template switching rate is close to in vitro estimated rate found in primary T lymphocytes (Cromer et al., 2016). Furthermore, our important finding is that around 98% of the infection by more than 1 virus has emerged from the most susceptible target cell subpopulation (Fig. 5). This demonstrates that certain target cell populations play a dominant role as major coinfection source, as compared to the whole target cell population. Since highly susceptible target cells are selectively infected and removed from the population due to apoptosis or virus lysis, one can hypothesize that the coinfection rate and its associated viral recombination rate reach a maximum during the exponential viral growth phase, a possibility that it will be worth examining in future studies. This is indeed a testable hypothesis both experimentally and mathematically.

HIV-1 coinfection is an important strategy to promote the genetic recombination followed by viral evolution, with consequences for viral escape from the immune or pharmacological pressures. As we previously estimated in Iwami et al. (2015), the cell-to-cell infection accounts for approximately 60% of HIV-1 infection events in cell culture and therefore this is a major infection mode. Despite its lower infection efficiency, we show here that cell-free HIV transmission results in frequent coinfection events. In the context of genetic recombination, cell-free infection may have an advantage over cell-to-cell transmission, in that it is more likely to bring together viruses that have different genotypic and phenotypic properties. Indeed, cell-free viruses produced by different cells, may carry advantageous traits due to their exposure to different selective forces. Our study, by exploring the conditions that favor coinfection and its kinetics, help elucidating this process that participates in virus escape.

4. Methods

4.1. HIV-1 coinfection experiment

The proviral constructs were derived from previously published plasmids based on the pNL4-3 construct and each carried a sequence coding for either green fluorescent protein (GFP) or heat stable antigen (HSA) reporter proteins cloned before the *nef* gene, with an IRES sequence allowing concomitant expression of the viral and reporter proteins. To limit infections to a single cycle, we used Env-defective constructs, pseudotyped by HIV Env glycoproteins expressed in trans. Stocks of viruses expressing either GFP or HSA were prepared by transfecting sub-confluent 293-T cells in T75 flasks by JetPei (Polyplus Inc. Illkrich, France), following the manufacturer's instructions. Subsequently, MT4R5 cells in a 96-well plate were exposed to two-fold dilutions of one virus (single infection) or of both viruses at the same time (coinfection), using different ratios of the two viruses (as detailed in the results). Finally, flow cytometry data were acquired using a FACS-Calibur instrument (Becton Dickinson, Le Pont-de Claix, France) with CellQuest software and were analysed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA). Note that the detailed description of our experiment can be found in our previous publications (Ito et al., 2017; Remion et al., 2016).

4.2. Data fitting

In coinfection experiments, the expression of the two reporter proteins (GFP and HSA) allows to separate infected cells in different quadrants of the FACS analysis: A: HSA-positive (HSA^+), B: both HSA-positive and GFP-positive (HSA^+GFP^+), C: both HSA-negative and GFP-negative (HSA^-GFP^-), and D: GFP-positive (GFP^+) (Fig. 1a). Since these data are measured as frequencies, we normalized the total cell number (i.e., $\sum_{i=1}^{N} T_i + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{2} I_i^{R_j}(t) + \sum_{i=1}^{N}\sum_{k=1}^{2} I_i^{G_k}(t) + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{2}\sum_{k=1}^{2} I_i^{R_jG_k}(t) = 1$) and calculated the expected values corresponding to each quadrant using Eq. (1) at 2 h post exposure to the virus. Note that FACS analysis does not allow to identify the number of infection events per cell, as cells infected by one or multiple virions carrying the same reporter gene will be indistinguishable. Here, for considering the different amounts of inoculated virus, we assumed that $\overline{V_R}(0) = V_R(0)$ and $\overline{V_G}(0) = V_G(0)$ for 3.12 μl of HIV-1 supernatant (our smallest inoculum), while $\overline{V_R}(0) = V_R(0) \times r_*$ and $\overline{V_G}(0) = V_G(0) \times r_*$ for the other inoculated amounts in Eq. (1). Therefore, the set of param-

eters in Eq. (1), $\boldsymbol{\theta} = (\beta, c, s_i, V_R(0), V_G(0), r_*)$ was estimated by fitting: infection rate β, viral clearance rate c, reduction rate on the target cell susceptibility s_i, HSA-positive initial value $V_R(0)$, GFP-positive initial value $V_G(0)$, the scaling parameters r_* for 6.25, 12.5, 25, 37, 50, 75, 100, and 200 μl of the inoculated HIV-1 (see Table 1). Note that $s_1 = 1$ and number of target cell subpopulations, N, is determined by the AIC values (see Section 2).

To estimate those parameters in Eq. (1), we assumed the dataset follows the Gaussian distribution with mean μ_i and common variance σ^2, and used the following likelihood function:

$$L(\boldsymbol{\mu}, \sigma^2; \boldsymbol{x}) = \prod \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(\mu - x)^2}{2\sigma^2}} = \left(\prod \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \right) e^{-\frac{SSR(\boldsymbol{\theta})}{2\sigma^2}} .$$

Here, $\boldsymbol{\mu}$ and $\boldsymbol{x}$ represent the set of the expected values by Eq. (1) and the corresponding experimental measurements, respectively. The sum of the residuals, $SSR(\boldsymbol{\theta})$, is defined as

$$\begin{aligned} SSR(\boldsymbol{\theta}) = & \sum_{r=1}^{10} \left\{ \left(F_{A,\ r} - \tilde{F}_{A,r}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 + \left(F_{C,r} - \tilde{F}_{C,r}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 \right\} \\ & + \sum_{g=1}^{10} \left\{ \left(F_{C,g} - \tilde{F}_{C,g}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 + \left(F_{D,g} - \tilde{F}_{D,g}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 \right\} \\ & + \sum_{co=1}^{18} \left\{ \left(F_{A,co} - \tilde{F}_{A,co}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 + \left(F_{B,co} - \tilde{F}_{B,co}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 \right. \\ & \left. + \left(F_{C,co} - \tilde{F}_{C,co}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 + \left(F_{D,co} - \tilde{F}_{D,co}(\boldsymbol{\theta})\right)^2 \right\}, \end{aligned}$$

where $F_{*,\#}$ and $\tilde{F}_{*,\ \#}$ are the expected values by Eq. (1) and the experimental measurements at 2 hours post exposure to the virus, respectively. Here $*$ and # correspond to one of the quadrants (i.e., A, B, C, D) and one of the experiments with different amounts of inoculated HIV-1 (i.e., $r = 1, \ldots, 10$ correspond to 3.12, 6.25, 12.5, 25, 37, 50, 75, 100, 100 and 200 µl, respectively, of single HSA HIV-1 experiments; $g = 1, \ldots, 10$ correspond to 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 50, 75, 100, 100 and 200 µl, respectively, of single GFP HIV-1 experiments; $co = 1, \ldots, 18$ correspond to 25 and 25, 25 and 50, 50 and 25, 37 and 50, 50 and 50, 37 and 75, 75 and 50, 75 and 75, 25 and 100, 100 and 25, 37 and 100, 50 and 100, 100 and 50, 100 and 50, 75 and 100, 100 and 75, 100 and 100 µl and 100 and 100 µl, respectively of double HSA and GFP HIV-1 experiments).

To consider the uncertainty of the variance as well as parameters in Eq. (1), we employed a bayesian inference approach to estimate the parameters. We applied MCMC method sampling by "delayed rejection and adaptive Metropolis algorithm" to the parameter estimation using the R FME package (R version 3.4.1) (Soetaert and Petzoldt, 2010). In this package, the error between experimental values and predicted values is assumed to follow a Gaussian distribution with mean 0 and the variance σ^2. The additional assumption is that the inverse of the variance (i.e., $1/\sigma^2$) follows a Gamma distribution, and the prior distribution of the parameters follows a Gaussian distribution. We set 300,000 iterations, while the first 200,000 chains are discarded as burn-in-sample. Finally, the convergence of the posterior distributions of the all parameters is confirmed by checking the "traceplot" and "histgram". The 95% credible interval is the range from 2.5% to 97.5%, and each mean represents one of the posterior distribution (Table 1).

Author contributions

SI and FM designed the experiment. AT and AR carried out the experiments. YI, SN, KE and SI performed the mathematical and computational analyses. SI and FM supervised this study. YI, SI and FM wrote the paper.

Competing interests

We declare that we have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) and from Sidaction (to F.M.); the JST PRESTO and CREST program (to S.I.); the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant Numbers 16H04845, 16K13777, 15KT0107 and 26287025 (to S.I.); a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas from Ministry of Education, Culture, Science, Sports, and Technology (MEXT) of Japan 16H06429, 16K21723, 17H05819 and 18H05103 (to S.I.); J-PRIDE 17fm0208006h0001, 17fm0208019h0101, 17fm0208014h0001 and Program on the Innovative Development and the Application of New Drugs for Hepatitis B 17fk0310114h0101 and 18fk0210036j0001, AMED (to S.I.); Mitsui Life Social Welfare Foundation (to S.I.); The Shin-Nihon of Advanced Medical Research (to S.I.); GSK Japan Research Grant 2016 (to S.I.); The Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research (to S.I.); Suzuken Memorial Foundation (to S.I.); SEI Group CSR Foundation (to S.I.); Life Science Foundation of Japan (to S.I.); SECOM Science and Technology Foundation (to S.I.): Center for Clinical and Translational Research of Kyushu University Hospital (to S.I.); Kyushu University-initiated venture business seed development program (GAP Fund) (to S.I.); The Japan Prize Foundation (to S.I.).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jtbi.2018.06.025.

Appendix A

In addition to the representative experimental datasets in Fig. 3, we used the other datasets from 7 single HSA HIV-1 infection, 7 single GFP HIV-1 infection and 9 double HIV-1 infection in our simultaneous fitting for our parameter estimation. As described in Fig. S1, our mathematical model fits well to datasets independent of inoculated viral amounts.

Appendix B

HIV-1 coinfection events were demonstrated to occur more frequently than would be expected for independent infection events and do not follow a random distribution (Chen et al., 2005; Dang et al., 2004; Ito et al., 2017; Remion et al., 2016). If the coinfection occurred more frequently than that expected from random events, then the expected odds ratio would be more than 1. As we reported in (Ito et al., 2017), the experimental odds ratio, $F_{B,\#}F_{C,\#}/F_{A,\#}F_{D,\#}$, was estimated to be more than 1 independent of inoculated viral amount. To quantitatively further support our model prediction, we calculated the theoretical odds ratio, $\tilde{F}_{B,\#}\tilde{F}_{C,\#}/\tilde{F}_{A,\#}\tilde{F}_{D,\#}$, from our mathematical model with our estimated parameters in Table 1. In Fig. S2, we compared the odds ratio measured by our experiments with the theoretical odds ratio. Thus, our novel model quantitatively reproduces the odds ratio and captures the known property of coinfection during cell-free HIV-1 infection in cell culture.

References

Allen, T.M., Altfeld, M., 2003. HIV-1 superinfection. J. Allergy Clin. Immunol. 112, 829–835. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.037, quiz 836.

Barre-Sinoussi, F., Ross, A.L., Delfraissy, J.F., 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. Nat. Rev. Microbiol. 11, 877–883. doi:10.1038/nrmicro3132.

Burke, D.S., 1997. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. Emerg. Infect. Dis. 3, 253–259.

Chang, C.C., Crane, M., Zhou, J.L., Mina, M., Post, J.J., Cameron, B.A., Lloyd, A.R., Jaworowski, A., French, M.A., Lewin, S.R., 2013. HIV and co-infections. Immunol. Rev. 254, 114–142. doi:10.1111/imr.12063.

Chen, J.B., Dang, Q., Unutmaz, D., Pathak, V.K., Maldarelli, F., Powell, D., Hu, W.S., 2005. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. J. Virol. 79, 4140–4149. doi:10.1128/Jvi.79.7.4140-4149.2005.

Cromer, D., Grimm, A.J., Schlub, T.E., Mak, J., Davenport, M.P., 2016. Estimating the in-vivo HIV template switching and recombination rate. Aids 30, 185–192. doi:10.1097/qad.0000000000000936.

Dang, Q., Chen, J.B., Unutmaz, D., Coffin, J.M., Pathak, V.K., Powell, D., KewalRamani, V.N., Maldarelli, F., Hu, W.S., 2004. Nonrandom HIV-1 infection and double infection via direct and cell-mediated pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 632–637. doi:10.1073/pnas.0307636100.

Del Portillo, A., Tripodi, J., Najfeld, V., Wodarz, D., Levy, D.N., Chen, B.K., 2011. Multiploid inheritance of HIV-1 during cell-to-cell infection. J. Virol. 85, 7169–7176. doi:10.1128/Jvi.00231-11.

Dixit, N.M., Perelson, A.S., 2005. HIV dynamics with multiple infections of target cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 8198–8203. doi:10.1073/pnas.0407498102.

Donahue, D.A., Bastarache, S.M., Sloan, R.D., Wainberg, M.A., 2013. Latent HIV-1 can be reactivated by cellular superinfection in a Tat-dependent manner, which can lead to the emergence of multidrug-resistant recombinant viruses. J. Virol. 87, 9620–9632. doi:10.1128/jvi.01165-13.

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

Fraser, C., 2005. HIV recombination: what is the impact on antiretroviral therapy? J. R. Soc. Interface 2, 489–503. doi:10.1098/rsif.2005.0064.

Giorgi, E.E., Korber, B.T., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., 2013. Modeling sequence evolution in HIV-1 infection with recombination. J. Theor. Biol. 329, 82–93. doi:10.1016/j.jtbi.2013.03.026.

Gottlieb, G.S., Nickle, D.C., Jensen, M.A., Wong, K.G., Grobler, J., Li, F.S., Liu, S.L., Rademeyer, C., Learn, G.H., Karim, S.S.A., Williamson, C., Corey, L., Margolick, J.B., Mullins, J.I., 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. Lancet 363, 619–622. doi:10.1016/S0140-6736(04)15596-7.

Ito, Y., Remion, A., Tauzin, A., Ejima, K., Nakaoka, S., Iwasa, Y., Iwami, S., Mammano, F., 2017. Number of infection events per cell during HIV-1 cell-free infection. Scientific Reports 7, doi:ARTN655910.1038/s41598-017-03954-9.

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

Josefsson, L., Palmer, S., Faria, N.R., Lemey, P., Casazza, J., Ambrozak, D., Kearney, M., Shao, W., Kottilil, S., Sneller, M., Mellors, J., Coffin, J.M., Maldarelli, F., 2013. Single cell analysis of lymph node tissue from HIV-1 infected patients reveals that the majority of CD4+ T-cells contain one HIV-1 DNA molecule. PLoS Pathog. 9, e1003432. doi:10.1371/journal.ppat.1003432.

Josefsson, L., King, M.S., Makitalo, B., Brannstrom, J., Shao, W., Maldarelli, F., Kearney, M.F., Hu, W.S., Chen, J., Gaines, H., Mellors, J.W., Albert, J., Coffin, J.M., Palmer, S.E., 2011. Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 11199–11204. doi:10.1073/pnas.1107729108.

Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., Meyerhans, A., 2002. Recombination - multiply infected spleen cells in HIV patients. Nature 418, 144. doi:10.1038/nature418144a.

Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner, W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 7552–7557. doi:10.1073/pnas.0802203105.

Law, K.M., Komarova, N.L., Yewdall, A.W., Lee, R.K., Herrera, O.L., Wodarz, D., Chen, B.K., 2016. In vivo HIV-1 cell-to-cell transmission promotes multicopy micro-compartmentalized Infection. Cell Rep. 15, 2771–2783. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.059.

Levy, D.N., Aldrovandi, G.M., Kutsch, O., Shaw, G.M., 2004. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4204–4209. doi:10.1073/pnas.0306764101.

Nora, T., Charpentier, C., Tenaillon, O., Hoede, C., Clavel, F., Hance, A.J., 2007. Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. J. Virol. 81, 7620–7628. doi:10.1128/Jvi.00083-07.

Perelson, A.S., 2002. Modelling viral and immune system dynamics. Nat. Rev. Immunol. 2, 28–36. doi:10.1038/nri700.

Powell, R.L., Urbanski, M.M., Burda, S., Kinge, T., Nyambi, P.N., 2009. High frequency of HIV-1 dual infections among HIV-positive individuals in Cameroon, West Central Africa. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 50, 84–92. doi:10.1097/QAI.0b013e31818d5a40.

Price, D.A., Goulder, P.J., Klenerman, P., Sewell, A.K., Easterbrook, P.J., Troop, M., Bangham, C.R., Phillips, R.E., 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1890–1895.

Quan, Y., Liang, C., Brenner, B.G., Wainberg, M.A., 2009. Multidrug-resistant variants of HIV type 1 (HIV-1) can exist in cells as defective quasispecies and be rescued by superinfection with other defective HIV-1 variants. J. Infect. Dis. 200, 1479–1483. doi:10.1086/606117.

Redd, A.D., Quinn, T.C., Tobian, A.A.R., 2013. Frequency and implications of HIV superinfection. Lancet Infect. Dis. 13, 622–628. doi:10.1016/S1473-3099(13)70066-5.

Remion, A., Delord, M., Hance, A.J., Saragosti, S., Mammano, F., 2016. Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes. Virol. 487, 59–67. doi:10.1016/j.virol.2015.09.028.

Ronen, K., McCoy, C.O., Matsen, F.A., Boyd, D.F., Emery, S., Odem-Davis, K., Jaoko, W., Mandaliya, K., McClelland, R.S., Richardson, B.A., Overbaugh, J., 2013. HIV-1 superinfection occurs less frequently than initial infection in a cohort of high-risk Kenyan women. PLoS Pathog. 9, e1003593. doi:10.1371/journal.ppat.1003593.

Schlub, T.E., Smyth, R.P., Grimm, A.J., Mak, J., Davenport, M.P., 2010. Accurately measuring recombination between closely related HIV-1 genomes. PLoS Comput. Biol. 6, e1000766. doi:10.1371/journal.pcbi.1000766.

Simon-Loriere, E., Holmes, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine. Nat. Rev. Microbiol. 9, 617–626. doi:10.1038/nrmicro2614.

Smith, D.M., Richman, D.D., Little, S.J., 2005. HIV superinfection. J. Infect. Dis. 192, 438–444. doi:10.1086/431682.

Soetaert, K., Petzoldt, T., 2010. Inverse modelling, sensitivity and Monte Carlo analysis in R using package FME. J. Stat. Softw. 33.

van der Kuyl, A.C., Cornelissen, M., 2007. Identifying HIV-1 dual infections. Retrovirol. 4. doi:10.1186/1742-4690-4-67, Artn 67.

Article 3 : Anti-HIV-1 activity of pepRF1, a proteolysis-resistant CXCR4 antagonist derived from Dengue virus capsid protein (en révision)

Anti-HIV-1 activity of pepRF1, a proteolysis-resistant CXCR4 antagonist derived from Dengue virus capsid protein

Iris Cadima-Couto[1], Alexandra Tauzin[2], João M. Freire[1], Tiago N. Figueira[1], Clara Pérez-Peinado[3], Catarina Cunha-Santos[4], Inês Bártolo[4], Nuno Taveira[4,5], Joao Goncalves[4], Fabrizio Mammano[2*], David Andreu[3*], Miguel A.R.B Castanho[1*], Ana Salomé Veiga[1*]

[1]*Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal*

[2]*INSERM UMR 1124, Université de Paris, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris, France*

[3]*Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona Biomedical Research Park, 08003 Barcelona, Spain*

[4]*Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Avenida Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal*

[5]*Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM), Instituto Universitário Egas Moniz, Monte de Caparica, Portugal*

*Correspondence to: Fabrizio Mammano, fabrizio.mammano@inserm.fr; David Andreu, david.andreu@upf.edu; Miguel Castanho, macastanho@medicina.ulisboa.pt; Ana Salomé Veiga, aveiga@medicina.ulisboa.pt

There is an urgent need for the development of new anti-HIV drugs that can complement existing medicines to be used against resistant strains. Here, we report the anti-HIV-1 peptide pepRF1, a human serum-resistant peptide derived from the Dengue virus capsid protein. In vitro, pepRF1 shows a 50% inhibitory concentration of 1.5 nM with a potential therapeutic window higher than 53,000. This peptide is specific for CXCR4-tropic strains, preventing viral entry into target cells by binding to the viral co-receptor CXCR4, acting as an antagonist of this receptor. pepRF1 is more effective than T20, the only peptide-based HIV-1 entry inhibitor approved, and excels in inhibiting a HIV-1 strain resistant to T20. Potentially, pepRF1 can be used alone or in combination with other anti-HIV drugs. Furthermore, one can also envisage its use as a novel therapeutic strategy for other CXCR4-related diseases.

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) is responsible for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), a condition characterized by $CD4^+$ T cell depletion and consequent susceptibility to opportunistic infections.(Moir et al., 2011) In 2018 there were 37.9 million people globally living with HIV, with nearly one-half of this population being treated with a combined antiretroviral therapy (cART).(UNAIDS, 2019) cART, which generally consists in a triple drug regimen directed towards at least two distinct molecular targets, is broadly accepted as the most efficient way to control viraemia.(Gunthard et al., 2014) However, this therapy does not lead to complete virus elimination and the potential acquisition and transmission of HIV drug resistant strains remains a therapeutical challenge.

The steady development of peptide-based drugs over the last decade is one of the most promising fields in drug discovery.(Vlieghe et al., 2010)(A. Kaspar and M. Reichert, 2013) The specificity and high affinity of peptides towards their molecular targets is one of their main advantages, together with a low toxicity.(Castel et al., 2011) Several peptides have shown anti-HIV activity, targeting different steps of the HIV replication cycle such as fusion with the host cell(Rausch et al., 1990)(Jin et al., 2000) reverse transcription,(Gleenberg et al., 2007)(Agopian et al., 2009) integration,(Gleenberg et al., 2005)(Li et al., 2006) and maturation.(Schramm et al., 1996)(Dyda et al., 1998) T20 (enfuvirtide, Fuzeon®) is emblematic of fusion inhibitor peptides used in the clinical management of HIV infection, preventing the merging of viral and cellular membranes, thus precluding

virus entry.(Kilby et al., 1998)-(Lazzarin et al., 2003) HIV entry is a multistep process mediated by the viral envelope glycoprotein complex (env), which consists of a trimer of heterodimers, each formed by a gp120 surface glycoprotein and a gp41 transmembrane protein.(Doms and Trono, 2000) Binding of gp120 to CD4 and to one of the chemokine receptors that serve as HIV coreceptor (CCR5 or CXCR4) triggers conformational changes, leading to the exposure of a hydrophobic peptide at the N-terminus of gp41, which inserts into the cellular membrane.(Doms and Trono, 2000) Then, two alpha helices (HR1 and HR2) on gp41 fold onto each other, forming a six-helix bundle for each env trimer.(Doms and Trono, 2000) This rearrangement brings together the viral and cellular membranes, leading to their fusion.(Doms and Trono, 2000) T20, the only clinically approved fusion inhibitor, is a 36 amino acid HR2-derived sequence that, by binding to HR1, prevents the formation of the six-helix bundle.(Kilby et al., 1998)-(Lazzarin et al., 2003) T20 has been shown to suppress replication of HIV variants with multidrug resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors.(Lalezari et al., 2003)-(Lazzarin et al., 2003) However, its administration by high-dosage injection and its short *in vivo* half-life result in low efficacy and have limited its clinical application to "salvage" treatment.(Rimsky et al., 1998)-(Francis et al., 2010) As with any antiretroviral, the emergence of T20-resistant viral variants has been observed both *in vitro*(Rimsky et al., 1998) and in the clinic.(X et al., 2002)-(Ashkenazi et al., 2011)

Antimicrobial peptides (AMPs) are a group of molecules known for their broad-spectrum activity against bacteria, fungi and viruses. Despite the considerable number of AMPs described, and the fact that some have been shown to directly inhibit one or more steps in the HIV replication cycle,(Wang, 2012)-(Qureshi et al., 2013) in-depth studies of their anti-HIV potential are scarce. We have previously discovered a peptide,(Freire et al., 2013)-(Freire et al., 2014) pepR, that is derived from the Dengue virus capsid protein and displays antibacterial activity against both Gram-positive and -negative bacteria.(Freire et al., 2015) Here, we investigate the anti-HIV-1 activity of pepR and showed that the peptide is able to inhibit HIV-1 infection. Since one of the major limitations in the development of peptide-based drugs is their vulnerability to proteolytic degradation,(Bottger et al., 2017) we searched for an active, human serum-resistant fragment of pepR. We discovered a resistant fragment, hereafter pepRF1, that shows remarkably potent activity against lab-adapted HIV-1 strains, patient-derived viruses, and a T20-resistant virus. Mechanistic studies on its anti-HIV-1 activity additionally show that pepRF1 is a potent CXCR4 antagonist that prevents CXCR4-tropic HIV-1 entry at nanomolar level, which demonstrate its potential as a drug lead.

Results

pepR anti-HIV-1 activity and serum stability

The antiviral activity of pepR against the HIV-1 laboratory-adapted strain NL4.3 (HIV-$1_{NL4.3}$) was evaluated using a single-cycle infectivity assay. As shown in Figure 1a, pepR inhibited infection of TZM-bl cells with an IC_{50} of 37 nM.

The susceptibility of pepR to human serum was investigated by HPLC-MS (Figure S1). pepR underwent relatively fast decay (Figure S1A), with >90 % of the initial product consumed after 90 min. A $t_{1/2}$ of 3.7 min was determined by fitting of an exponential function to experimental data. The HPLC profile of the digest (Figure S1B) shows a main peak (fragment I) reaching maximum intensity at ~20 min and remaining constant henceforth. Based on MS data, a primary structure (LKRWGTIKKSKAINVLR, Table S1 and Figure S2) could be unequivocally proposed for fragment I, which could plausibly result from trypsin-like cleavage of pepR at Arg^{17}-Gly^{18}. An alternative, more complex pathway would entail chymotrypsin-like cleavage at Phe^{19}-Arg^{20} to

give intermediate LKRWGTIKKSKAINVLRGF (one among possible fragment V candidates, Table S1), which would then undergo stepwise carboxypeptidase clipping of C-terminal Phe and Gly.

Aside from fragment I, the other five peaks (II-VI) observed by HPLC (Figure S1B) are of much lower intensity. For fragment III, an unequivocal sequence can be assigned from MS data while, for fragments II and IV-VI, two or more quasi-isobaric sequences can be proposed (Table S1), suggesting degradation pathways of minor importance compared to those leading to fragment I accumulation. It was obvious at this point that, given its superior serum stability and predictable reduction in cost of production, as a result of pepR's >50% size reduction, fragment I (henceforth pepRF1) should be explored as an alternative antiviral candidate over pepR. Accordingly, a synthetic replica (in C-terminal carboxamide version) was also prepared and evaluated (Table 1).

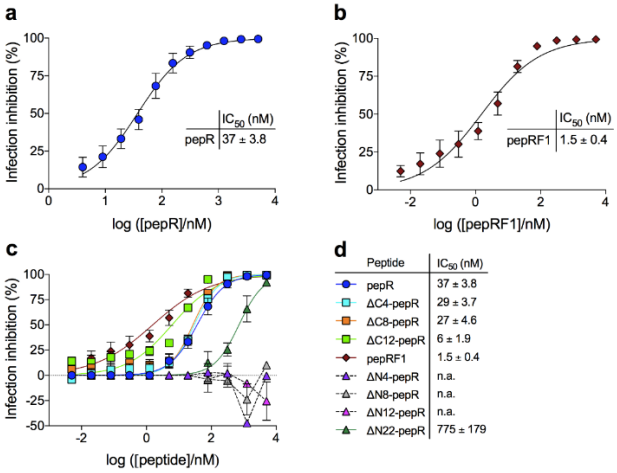


Figure 1. *In vitro* evaluation of peptides' activity against HIV-$1_{NL4.3}$ infection of TZM-bl cells. Inhibition of viral infection was assessed against the laboratory-adapted strain HIV-$1_{NL4.3}$ (100 $TCID_{50}$) in the presence of increasing concentrations of pepR **(a)**, pepRF1 **(b)** and pepR-derivatives **(c)**. A sequence-activity relationship analysis of pepR-derivatives was performed and dose-response curves (**c**) and corresponding mean IC_{50} values (**d**) were compared to the ones obtained for pepR and pepRF1. In all assays, viral infectivity was quantified 48 h post-infection through luciferase reporter-enzyme activity and converted to percentage of viral infection inhibition.

Table 1. Fragment I (pepRF1), an abridged version of pepR

Peptide	Sequence	Length (residues)	Molecular mass (Da)	Net charge
pepR	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR-amide	35	4278.19	+13
pepRF1	LKRWGTIKKSKAINVLR-amide	17	2010.48	+7

The antiviral activity of pepRF1 against HIV-$1_{NL4.3}$ was assessed, and the IC_{50} value obtained, 1.5 nM, revealed it as even more potent than its parent pepR, on the inhibition of infection of TZM-bl cells (Figure 1b). Importantly, pepRF1 has no cytotoxic effects on TZM-bl cells for concentrations up to 80 µM (Figure S3), the highest concentration tested. This corresponds to a potential therapeutic window of > 53,000.

The N-terminal domain of pepR is responsible for its anti-HIV-1 activity

A sequence-activity relationship analysis was carried out to unveil the domain of pepR responsible for its anti-HIV-1 activity. pepR analogs were obtained by stepwise residue deletions at both N- and C-termini (Table S2). As shown in Figure 1c and d, assays against HIV-$1_{NL4.3}$ revealed that the domain responsible for the antiviral activity of pepR is located in the N-terminal region. The results clearly show that the sequential deletion of

amino acid residues towards the N-terminal region of the peptide resulted in an increase of the anti-HIV-1 activity: IC_{50}= 29 nM for ΔC4-pepR, IC_{50}= 27 nM for ΔC8-pepR, and IC_{50}= 6 nM for ΔC12-pepR. These results are in agreement with the IC_{50} value of 1.5 nM obtained for pepRF1, which would correspond to ΔC18-pepR. On the other hand, the peptides generated by the sequential deletion of amino acid residues of the peptide N-terminal region (ΔN4-, ΔN8-, ΔN12-pepR) resulted in peptides not active against HIV-$1_{NL4.3}$.

pepRF1 targets an early step in HIV-1 entry

The HIV replication cycle consist of different stages that occur in a well-established chronological order.(Frankel and Young, 1998b) Time-of-addition (TOA) experiments are a commonly used approach to study the mode of action of HIV inhibitors,(Daelemans et al., 2011) namely which replication step is being targeted. First, we determined if pepRF1 targets HIV-1 before, during, or after viral entry into cells. pepRF1 was incubated with HIV-$1_{NL4.3}$ before addition to cells (*t*= -1 h), added to cells at different time-points during infection (*t*= 0, 1, 2 h), or added to cells after infection (*t*= 3, 4 h). The inhibitory effect of pepRF1 was only observed when the peptide was added before or during, but not after the virus infection period, indicating that it acts during viral entry into cells (Figure 2 a and b). This effect was more pronounced when the peptide was pre-incubated with virions (*t*= -1 h) (IC_{50}= 1.2 nM), or added to the cells together with virions (*t*= 0 h) (IC_{50}= 2.5 nM), suggesting that the peptide targets an early event during viral entry. The results also showed that pepRF1 was more potent than pepR at inhibiting HIV-1 infection at all the time-points tested.

To better discriminate which step(s) of HIV-1 replication are inhibited by pepRF1, we studied its activity against HIV-$1_{NL4.3}$ over time relative to reference drugs.(Daelemans et al., 2011) HIV-$1_{NL4.3}$ virions were added to cells and incubated for 1 h at 37ºC. pepRF1 and the well-characterized inhibitors dextran sulphate, AMD3100, T20, and zidovudine (AZT) were added to cells together with HIV-$1_{NL4.3}$ virions (*t*= 0 h), or at different time-points during the early phase of the virus replication cycle (*t*= 1, 2, 3, 4 h). As expected, dextran sulphate, an inhibitor of viral adsorption to the host cell,(Daelemans et al., 2011)(Ito et al., 1987) became ineffective if added 1 h after infection. In this case the calculated time-of-drug-addition that maintains 50% inhibition (t_{50}) was 0.8 h (t_{50} = 0.8 h) (Figure 2c). The bicyclam AMD3100, a CXCR4 antagonist that prevents HIV-1 attachment to the coreceptor,(De Clercq et al., 1994)(Donzella et al., 1998) became ineffective soon after infection (t_{50} = 1.4 h for AMD3100). The viral fusion inhibitor T20 remained effective up to a slightly later time (t_{50} = 1.8 h), which is consistent with its inhibition of the fusion event, occurring after receptor binding.(Kilby et al., 1998)(Lazzarin et al., 2003) Finally, AZT blocked HIV-1 replication even if added with significant delay (t_{50} = 3.1 h), which is in accordance with its intracellular targeting of the reverse transctiption process.(Daelemans et al., 2011)(Gonzalez-Ortega et al., 2010) pepRF1 inhibited infection with a t_{50} of 1.3 h, similar to AMD3100. This suggests that pepRF1 blocked HIV entry into cells by interfering with a process in between virus adsorption and fusion, possibly by blocking attachment of viral glycoproteins to cell receptors.

To test this hypothesis, a viral inhibition assay was performed using HIV-1 virions pseudotyped with the envelope glycoprotein G from the vesicular stomatitis virus (VSV-G), HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G. This modified virus enters the cells via endocytosis and later fusion within acidified endosomes, without the requirement for HIV glycoproteins (gp120 and gp41) and cell membrane HIV receptor (CD4) and co-receptors (CCR5 and CXCR4). As shown in Figure 2d, pepRF1 was not able to inhibit infection of HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G. The same was observed for pepR (Figure S4) and T20. This clearly shows that viral inhibition by pepRF1 targets the HIV Env-mediated entry process.

pepRF1 inhibits HIV-1 entry by targeting the host cell

HIV-1 entry is a multistep process that progresses through viral gp120 binding to CD4 cell receptor, coreceptor engagement (CCR5 or CXCR4), and fusion with the host cell membrane.(Doms and Trono, 2000) Several peptides have been shown to block HIV infection by interfering with any of these steps in the viral entry process.(Rausch et al., 1990)(Dyda et al., 1998)(Qureshi et al., 2013) The above results showed that pepRF1 blocks HIV-1 entry into the host cell but the specific molecular target of this drug remained elusive. To investigate if pepRF1 targets the virion, the cell, or both, TZM-bl cells were pre-incubated with increasing concentrations of the peptide. T20 was used as a control since it is known to target the viral gp41. After incubation, HIV-$1_{NL4.3}$ was added to cells and infection was allowed to proceed for 3 h in the presence of pepRF1 or T20. In a different set of experiments, after pre-incubation with the peptides, cells were washed to remove the peptides, and HIV-$1_{NL4.3}$ was added to cells for 3 h. As shown in Figure 2e, both pepRF1 and T20 were able to inhibit infection by HIV-$1_{NL4.3}$ when present at the time that viruses were added to the cells. However, when the viruses were added after washing the cells for peptide removal, the ability of T20 to inhibit infection was completely abrogated (Figure 2f). This was expected because exposure of T20 target (the HR1 domain in gp41) only takes place after the virus has interacted with its receptors. On the other hand, pepRF1 was able to inhibit infection in spite of cell washing. This shows that during the incubation period with cells, the peptide was able to establish a durable interaction with a cellular component.

To further exclude a possible direct action of pepRF1 at the level of the viral membrane, the impact of pepRF1 on HIV-1 structural integrity was studied and the result showed that the peptide does not cause viral particle disruption (Figure S5).

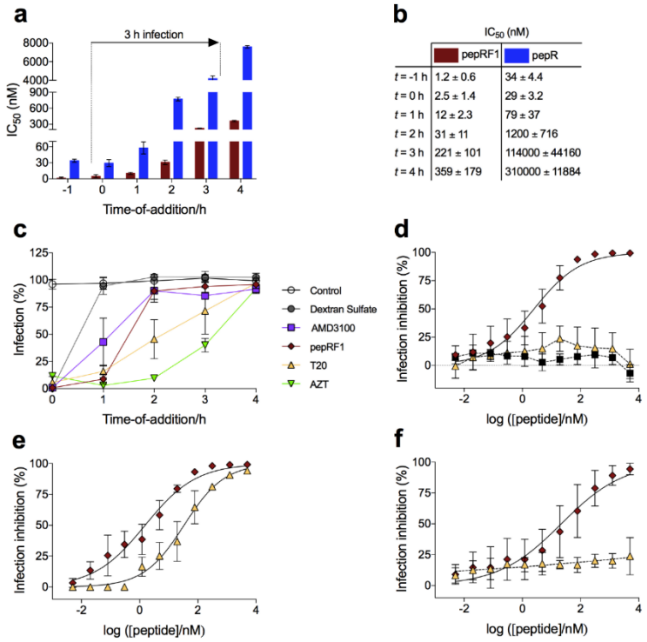


Figure 2. *In vitro* evaluation of pepRF1 time-of-action and efficacy against HIV-$1_{NL4.3}$ entry into TZM-bl cells. a, IC_{50} values were determined for pepR and pepRF1 by treating cells with increasing concentrations of each peptide at -1 h, 0 h, +1 h, +2 h, +3h, or +4 h relatively to the moment of HIV-$1_{NL4.3}$ addition (100 $TCID_{50}$). **b**, IC_{50} values represent mean values obtained from three independent experiments. **c**, Anti-HIV-1 activity of pepRF1 over-time relative to reference anti-HIV inhibitors. HIV-$1_{NL4.3}$ (100 $TCID_{50}$) was incubated with cells for 1 h and unbound virus was subsequently removed by repeated washing to synchronize infection. Cells were treated with 1 µM of pepRF1 and reference inhibitors (Dextran Sulphate, AMD3100, T20, and AZT) at 0 h, + 1

h, + 2 h, + 3 h, or + 4 h relatively to the moment of virus addition. The percentage of infection was taken relatively to the control (viruses in the absence of inhibitors). **d**, The antiviral activity of pepRF1 against HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G was determined by infecting TZM-bl cells in the presence of increasing concentrations of the peptide. T20, which targets HIV-1 gp41, was tested against HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G, as a control. The effect of pepRF1 on HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G infection was compared to HIV-$1_{NL4.3}$: HIV-$1_{NL4.3\ wt}$ + pepRF1 (IC_{50}= 1.5 ± 0.4 nM); HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G + pepRF1 (IC_{50}= n.a.); HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G + T20 (IC_{50}= n.a.). **e**, **f**, The effect of pepRF1 on the target cell was studied by pre-incubating cells for 1 h with increasing concentrations of pepRF1 or T20 (control). After incubation, HIV-$1_{NL4.3}$ (100 $TCID_{50}$) was added to cells and infection was allowed for proceed for 3 h in the presence of peptides (**e**): pepRF1 IC_{50}= 1.5 ± 0.4 nM; T20 IC_{50}= 33 ± 9.1 nM; or cells were washed to remove peptides, HIV-$1_{NL4.3}$ (100 $TCID_{50}$) was added to cells, and infection was allowed to proceed for 3 h in the absence of peptides (**f**): pepRF1 IC_{50}= 22 ± 12 nM; T20 IC_{50}= n.a.

In all assays, viral infectivity was quantified 48 h post-infection through luciferase reporter-enzyme activity and converted to percentage of viral infection inhibition.

pepRF1 inhibits HIV-1 cell entry in a coreceptor specific manner

The above reported results show that pepRF1 specifically inhibits HIV entry (Figure 2) by interacting with a cellular factor (Figure 2 e and f). To study the target used by pepRF1 to block HIV-1 entry, a direct virus-cell fusion assay was performed based on the incorporation of Vpr-β-lactamase chimeric proteins (Vpr-BlaM) into HIV-1 virions and their subsequent delivery into the cytoplasm of target cells as a result of virion fusion. This transfer was then detected by enzymatic cleavage of the CCF2 dye, a fluorescent substrate of β-lactamase (BlaM), loaded into the target cells. This is the validated assay to assess the extent and the kinetics of HIV-1 fusion with target cells.(Cavrois et al., 2002)·(Daecke et al., 2005) HIV-1 pseudoviruses bearing the Vpr-β-lactamase chimera (Vpr-BlaM) with a CXCR4-tropic envelope (NL4-3) (PMID: 3016298) were produced and used to infect MT4R5 cells in the absence and in the presence of increasing concentrations of pepRF1. The ability of pepRF1 to inhibit viral fusion was compared to pepR and T20. The results showed that pepRF1 was the most efficient inhibitor (IC_{50}= 4.3 nM) as compared to pepR (IC_{50}= 32.9 nM) and T20 (IC_{50}= 48.9 nM) (Figure 3a). In addition, pepRF1 was able to inhibit the HIV-1 strain resistant to T20 (HIV-$1_{NL4.3}$ DIM) with an IC_{50} of 2.8 nM (Figure 3b). Interestingly, in contrast to T20, neither pepRF1 nor pepR were able to inhibit infection by the CCR5-tropic virus, Blam NLAd8 (Figure 3c), showing specificity towards CXCR4-tropic viral strains.

pepRF1 inhibits CXCR4-tropic HIV-1 clones carrying patient-derived envelope glycoproteins

We also investigated the ability of pepRF1 to inhibit infection of four different HIV-1 strains carrying primary CXCR4 or CCR5-specific HIV-1 envelope glycoproteins. These strains carry gp120 and the extracellular part of gp41 issued from variants present in one patient, as described elsewhere.(Skrabal et al., 2005) As shown in Figure 3d, pepRF1 potently inhibited the two CXCR4-tropic viruses, X4-1 and X4-2, in addition to the CXCR4 reference strain used in the previous assays (HIV-$1_{NL4.3}$). In contrast, it was not able to inhibit the two CCR5-tropic viruses, R5-1 and R5-2, and the CCR5 reference strain (NLAD8). The same was observed for pepR (Figure S6). These results clearly reinforce the specificity of pepRF1 towards CXCR4-tropic HIV strains.

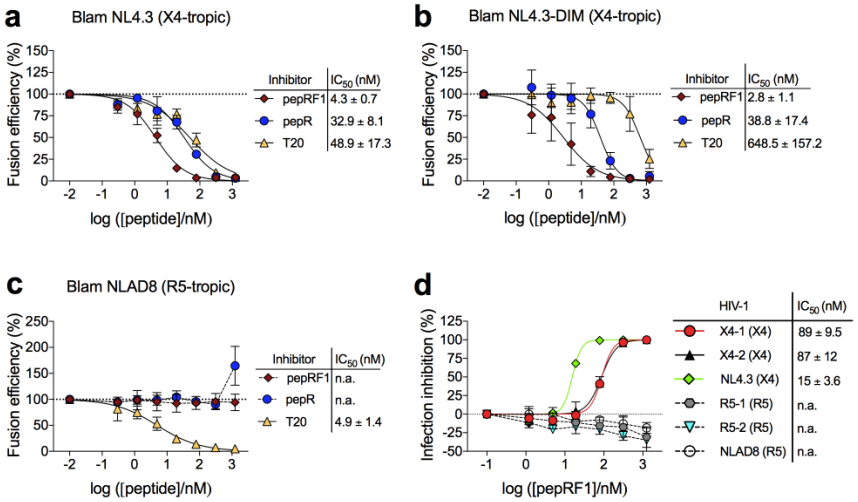


Figure 3. A virus-cell fusion assay based on the use of virions containing the β-lactamase-Vpr chimeric protein was performed using the CXCR4-tropic HIV-1 strains: Blam NL4.3 (**a**) and Blam NL4.3DIM (T20 resistant) (**b**); and the CCR5-tropic HIV-1 strain: Blam NLAD8 (**c**). MT4R5 cells treated with increasing concentrations of pepRF1, pepR or T20 (control) were exposed to the different HIV-1 strains. Viral fusion and its inhibition was quantified by measuring the percentage of cells in which a fluorescent substrate of β-lactamase (CCF2) was cleaved, as compared to untreated controls. **d**, Dose-response curves, and corresponding mean IC_{50} values for inhibition of viral infection of pepRF1 against viruses carrying primary CXCR4-tropic envelopes (clones X4-1 and X4-2) and CCR5-tropic envelopes (clones R5-1 and R5-2) isolated from a patient, and against the reference strains NL4.3 (CXCR4-tropic) and NLAD8 (CCR5-tropic). Infection inhibition was evaluated by infecting TZM-bl cells in the presence of increasing concentrations of pepRF1. Viral infectivity was measured 40 h post-infection through β-galactosidase reporter-gene expression and converted to percentage of viral infection inhibition. Data points represent the average of results obtained from two independent experiments.

pepRF1 prevents viral fusion without inducing CXCR4 internalization

Based on the above observations, the most likely target of pepRF1appeared to be the coreceptor CXCR4. To unravel the mechanism underlying peptide action, the effect of pepRF1 on CXCR4 expression at the surface of the cell membrane was studied by flow cytometry on primary $CD4^+$ T-lymphocytes. T20,(Kilby et al., 1998)- (Lazzarin et al., 2003) AMD3100,(De Clercq et al., 1994)-(Donzella et al., 1998) and the chemokine CXCL12 (C-X-C motif ligand 12), the natural ligand of CXCR4, also known as SDF-1 (stromal cell-derived factor 1),(Oberlin et al., 1996)-(Mishra et al., 2016) were used as controls. To determine whether pepRF1 and pepR interact directly with CXCR4, we first used mAb 12G5, which is directed against a bridging epitope spanning the first and second extracellular loops of CXCR4.(Schols et al., 1997)-(Zirafi et al., 2015) As shown in Figure 4a, CXCR4 detection at the surface of the cell was reduced in a dose dependent fashion, to undetectable levels, by both pepRF1 and pepR. The same was observed for AMD3100, in accordance with previous studies.(Schols et al., 1997)-(Zirafi et al., 2015) As expected, T20 had no effect on CXCR4 detection. These results suggest that pepRF1 and pepR interact directly with CXCR4, inhibiting CXCR4-epitope recognition by mAb 12G5, which could ensue by competitive binding, by changing the conformation of the coreceptor, or by inducing its internalization.

We next explored if the loss of CXCR4 detection from the surface of the cell was due to coreceptor internalization rather than competitive binding or conformational change. A different antibody, 1D9, that targets the N-terminal domain of CXCR4,(Zirafi et al., 2015) was used. The binding of this mAb will not be perturbed by changes in the conformation of the coreceptor at the ligand binding site.(Zirafi et al., 2015)-(Carnec et al., 2005) In this way, loss of detection of 1D9 from the surface of the cells would be strongly indicative of CXCR4 internalization. As shown in Figure 4, 1D9 binds equally well to CXCR4 in the presence and absence of pepRF1

and pepR, showing that the coreceptor is still on the cell surface, but is occupied/modified by the peptides, which prevented 12G5 binding. The same was observed for AMD3100, which does not induce CXCR4 internalization.(Sigrid et al., 2002) The same experiments were performed using CXCL12, which upon interaction with the coreceptor induces its internalization and activates a complex cascade of intracellular signaling pathways.(Schols et al., 1997)(Donzella et al., 1998)(Oberlin et al., 1996)(Zirafi et al., 2015)(Sigrid et al., 2002) At the surface level, pepRF1, pepR, AMD3100, and CXCL12, reduced the recognition of CXCR4 by 12G5 (Figure 4a). In contrast, only CXCL12 decreased recognition of CXCR4 by mAb 1D9 (Figure 4b), as described in previous studies.(Zirafi et al., 2015) To exclude a possible effect of pepRF1 and pepR on CCR5 expression on the surface of cells, primary cells were also labelled with an anti-CCR5 antibody. Results show that the surface expression level was unaffected by pepRF1, pepR, AMD3100, and T20 (Figure S7), in agreement with the infection data showing an effect only on CXCR4-mediated HIV entry. Overall the data show that pepRF1 binds to CXCR4 co-receptor, preventing its use by HIV, but without inducing its internalization.

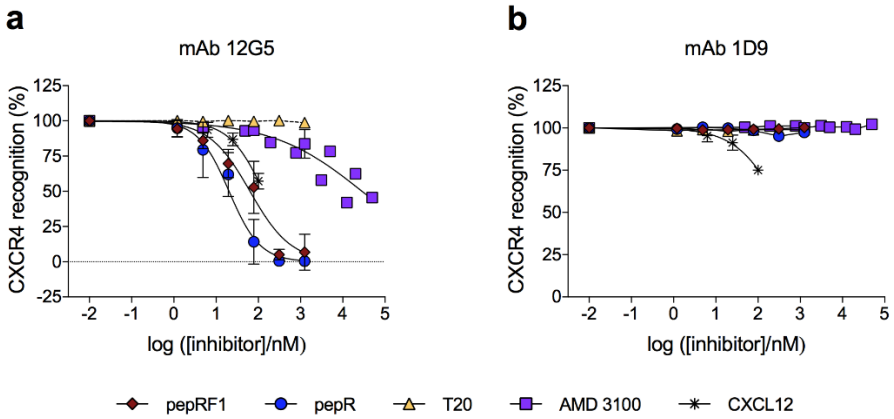


Figure 4. Effect of pepRF1 and pepR on CXCR4 expression on cell surface. Primary $CD4^+$ T-lymphocytes were pre-incubated for 90 min with different concentrations of pepRF1 and pepR at 37°C. The cells were then stained with the mAb 12G5 (**a**) or 1D9 (**b**), and analyzed by flow cytometry. T20, AMD3100 and CXCL12 were used as controls. The results are expressed as percent of cells positive for the surface expression of CXCR4, as compared to untreated controls.

pepRF1 is an antagonist of CXCR4

The transient increase in cytosolic Ca^{2+} concentration is an essential signaling pathway that is activated upon CXCR4 stimulation.(Schols et al., 1997)(Donzella et al., 1998)(Oberlin et al., 1996)(Zirafi et al., 2015)(Sigrid et al., 2002) The binding of the natural ligand, CXCL12, to CXCR4 elicits a transient increase in intracellular Ca^{2+} concentration, classifying the ligand as a CXCR4 agonist.(Schols et al., 1997)(Donzella et al., 1998)(Oberlin et al., 1996)(Zirafi et al., 2015)(Sigrid et al., 2002) On the other hand, the compound AMD3100 by itself does not induce intracellular Ca^{2+} signaling and when both are present, AMD3100 antagonizes the action of CXCL12.(Schols et al., 1997)(Donzella et al., 1998)(Oberlin et al., 1996)(Zirafi et al., 2015)(Sigrid et al., 2002) For this reason, AMD3100 has been defined as a pure and specific CXCR4 antagonist.(Schols et al., 1997)(Donzella et al., 1998)(Oberlin et al., 1996)(Zirafi et al., 2015)(Sigrid et al., 2002) In this study, we used a cell-based fluorescence assay to measure intracellular Ca^{2+} levels and determined the agonist or antagonist nature of the pepRF1 and pepR. CXCL12 and AMD3100 were used as controls. THP-1 monocytes were first loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM and incubated for 1 h. The agonist or antagonist effect of the compounds on the intracellular Ca^{2+} influx was then determined by adding the compounds to cells (alone or in combination), followed by immediate detection of variations in cytosolic Ca^{2+} levels. Treatment of cells with

CXCL12 alone elicited a transient increase in Ca^{2+} influx, which is in accordance with its expected agonist function.(Schols et al., 1997)·(Donzella et al., 1998)·(Oberlin et al., 1996)·(Zirafi et al., 2015)·(Sigrid et al., 2002) In contrast, same as with AMD3100, pepRF1 had no effect on cytosolic Ca^{2+} levels (Figure 5a). Surprisingly, pepR showed strong agonistic activity that lasted for the entire duration of the assay. Like AMD3100, pepRF1 was able to antagonize CXCL12 action (Figure 5b), showing that it acts as CXCR4 antagonist. Interestingly, when compared to AMD3100, pepRF1 was more efficient at counteracting the strong agonist activity of pepR (Figure 5c).

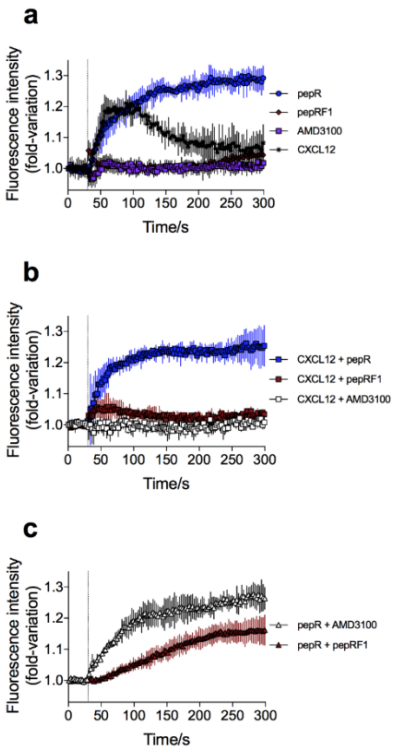


Figure 5. Impact of pepRF1 and pepR on CXCR4-associated Ca^{2+} intracellular mobilization. Time-resolved fluorescence emission intensity profiles of Fluo-4 within THP-1 cells upon treatment with pepRF1 (1.25 µM), pepR (1.25 µM), AMD3100 (50 µM), and CXCL12 (50 nM), alone (**a**) or in combination (**b**, **c**). Fluo-4 basal fluorescence emission intensity was collected for 30 s prior to addition of individual compounds and combinations, and followed for an additional 270 s. A mark was added to the *t* horizontal axis, at 30 s, for clarity. Data was normalized to the basal Fluo-4 fluorescence emission intensity values, measured at $t = 0$ s.

Discussion

In the present study, we have developed a new potent CXCR4-targeted inhibitor of HIV-1 entry, pepRF1, derived from the Dengue virus capsid protein. This highly stable peptide is the serum-resistant fraction of pepR, a peptide previously developed by us with antibacterial activity and cell-penetrating properties.(Freire et al., 2013)·(Freire et al., 2015) Remarkably, pepRF1 shows impressive anti-HIV-1 activity when compared to T20, the only peptide-based HIV-1 fusion inhibitor approved by FDA for clinical use. In addition, pepRF1 is able to inhibit a T20-resistant strain, HIV-$1_{NL4.3}$ DIM, at a low nanomolar concentration. Our detailed studies on the mechanism of action reveal that pepRF1 inhibitory activity is specific for CXCR4-tropic HIV-1 strains, preventing viral entry into target cells by binding to CXCR4 coreceptor without inducing its internalization. Like AMD3100, a small molecule inhibitor that strongly restricts CXCR4 HIV-1 infection, pepRF1 does not elicit intracellular Ca^{2+} influx indicating that the peptide does not act as a CXCR4 agonist.(De Clercq et al., 1994)·

(Donzella et al., 1998)·(Oberlin et al., 1996)·(Zirafi et al., 2015)·(Sigrid et al., 2002) Moreover, pepRF1, as opposed to pepR, potently inhibited the intracellular Ca^{2+} signaling elicited by the CXCR4 natural ligand CXCL12, acting as an antagonist. Despite these differences both peptides are strong inhibitors of HIV-1 infection.

Inhibition of CXCR4 as a strategy to fight HIV-1 infection is important, because CXCR4-tropic HIV strains are considered to be more pathogenic than CCR5-tropic strains. Indeed, their appearance during an extended time course of infection correlates with a decline in the $CD4^+$ T-cell count leading to a more rapid progression to AIDS symptoms.(Connor et al., 1997) Furthermore, drug resistance is also more often linked to CXCR4-tropic strains,(Wagner and Frenkel, 2008) posing an urgent need for the development of effective drugs that block CXCR4-mediated HIV infection. In such a scenario, the use of CXCR4 antagonists may be useful in delaying the onset of disease. In combination with CCR5 inhibitors, such as Maraviroc (Selzentry®), the only coreceptor-targeted drug in clinical use, pepRF1 would be a potent complement to improve the options available for patients predominantly infected with X4 or dual-tropic HIV-1 strains. Indeed, in more than 50% of HIV-1 infected individuals, CCR5 viruses are usually present as mixtures together with CXCR4 viruses.(Melby et al., 2006)·(Wilkin et al., 2012) A combination of CCR5 and CXCR4 inhibitors would also eliminate the current need to verify the tropism of the virus population, a factor that limits the prescription of CCR5 inhibitors. Moreover, some reports have shown that HIV gp120 can trigger signaling and chemotactic events specifically through CCR5 and CXCR4, and in a CD4-independent manner.(Missé et al., 1999)·(Balabanian et al., 2004) Such effects induced by the viral envelope, could also be effectively blocked by CCR5/CXCR4 antagonists, showing an additional advantage of pepRF1.

Despite the growing interest in CXCR4 as a druggable target, the development of CXCR4 inhibitors has been challenging. In fact, to date no CXCR4 inhibitor has been approved for clinical use as an anti-HIV-1 agent. AMD3100 (Plerixafor, Mozobil®), one of the most potent CXCR4 antagonist described, was initially developed to be used as an anti-HIV-1 drug(De Clercq et al., 1994)·(Donzella et al., 1998) but clinical trials were interrupted due to undesired effects.(Hendrix et al., 2004)·(Henrich and Kuritzkes, 2013) This molecule is now being used to mobilize hematopoietic stem cells from the bone marrow to the bloodstream.(Hendrix et al., 2004)· (Pulliam et al., 2008) Thus, the quest for druggable CXCR4-targeting compounds for the treatment of HIV-1 infection continues.

Like AMD3100, the selective antiviral activity of pepRF1 against CXCR4-tropic HIV strains is based on the specific inhibition of CXCR4-mediated virus entry via direct interaction with CXCR4, counteracting the effects of CXCL12, without triggering any response by itself upon binding to CXCR4.(De Clercq et al., 1994)·(Donzella et al., 1998)·(Oberlin et al., 1996)·(Zirafi et al., 2015)·(Sigrid et al., 2002) In addition, the fact that pepRF1 is resistant to proteolytic degradation, is also indicative of its potential use at low doses by oral administration.

Conclusion remarks – beyond HIV

Taken together, our findings point towards a promising role of pepRF1 as an anti-HIV-1 lead that could be used in the future, alone or in combination with other entry inhibitors in order to block infection of CXCR4- and dual tropic (CXCR4 and CCR5) - HIV strains, and achieve measurable declines in overall plasma viremia delaying the progression of the disease. It is also worth stressing that pepRF1 could also be used in the future as a novel therapeutic strategy for CXCR4-related diseases.

CXCR4 is a G-protein-coupled receptor (GPCR) that upon interaction with its cognate ligand, the chemokine CXCL12, activates a complex cascade of intracellular signaling pathways, which regulate a large number of physiological processes including HIV-1 infectivity,(Schols et al., 1997)·(Donzella et al., 1998)·(Oberlin et al., 1996)·(Zirafi et al., 2015) tumorigenesis,[57-63] stem cell migration,[64] autoimmune diseases,[65] and inflammation.[63] CXCR4 expression has been implicated in a variety of other diseases, such as rheumatoid arthritis,[66,67] atherosclerosis,[68] neurodegenerative diseases,[69] and various types of cancers, playing a pivotal role in tumor development and metastasis.[57-63] This has been demonstrated for a variety of cancer entities, including breast,[62] prostate,[70] lung,[58,71] and colorectal cancer,[72] as well as primary brain tumors such as glioblastoma.[73] Hence, the disruption of the CXCR4-CXCL12 axis by using a CXCR4-antagonist provides a promising molecular target for future specific therapies in areas beyond HIV-1 infection.

Methods

Peptide synthesis

Peptides were synthesized in C-terminal carboxamide form on a Liberty BlueTM automated microwave peptide synthesizer (CEM Corporation, Matthews, NC) using Fmoc protocols. Peptides were assembled at 0.05 mmol scale on a H-Rink Amide-ChemMatrix resin of 0.50 mmol/g substitution (PCAS BioMatrix, Montreal, Canada). Couplings were performed at 90 ºC with five-fold excess of Fmoc-amino acid/N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC)/Oxyma (1:2.5:5 molar ratio) in N,N-dimethylformamide (DMF), and deprotection with piperidine (20% v/v in DMF), followed by extensive DMF washes. After chain assembly, peptides were fully deprotected and cleaved from the resin by acidolysis with trifluoroacetic acid (TFA)/H_2O/3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (DODT)/triisopropylsilane (TIS) (94:2.5:2.5:1 v/v) for 90 min. Peptides were precipitated by cold diethyl ether followed by 3×5 min centrifugation at 4800 rpm, 4 ºC; the pellet was taken up in water and lyophilized. Crude peptides were inspected by analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and purified by preparative RP-HPLC (Figure S8) as described below. Fractions with the expected mass and with HPLC purity > 95% were pooled and lyophilized.

RP-HPLC and LC-MS analysis

Analytical RP-HPLC was performed on a LC-20AD instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Luna C18 column (4.6 mm × 50 mm, 3 µm; Phenomenex, Torrance, CA) using linear gradients of solvent B (0.036% TFA in acetonitrile (ACN)) into A (0.045% TFA in H_2O) over 15 min, with 1 mL/min flow rate and UV detection at 220 nm. Preparative RP-HPLC separations were performed on a LC-8A instrument (Shimadzu) fitted with a Luna C18 column (21.2 mm × 250 mm, 10 µm; Phenomenex), using linear gradients of solvent D (0.1% TFA in ACN) into C (0.1% TFA in H2O) over 30 min, at a 25 mL/min flow rate. Mass spectrometry analysis was performed on an LC-MS 2010EV instrument (Shimadzu) fitted with an XBridge C18 column (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm, Waters, Cerdanyola del Vallès, Spain), eluting with linear gradients of F (0.08% formic acid in ACN) into E (0.1% formic acid in H_2O) over 15 min at a 1 mL/min flow rate.

pepR stability assay

To evaluate pepR stability in vitro, 100 µL aliquots containing 25% (v/v) pre-warmed human serum (Sigma) and 250 µM pepR were incubated at 37 ºC with gentle agitation. At different time points (0.1, 5, 20, 30, 60, 90, 120, 180 and 360 min), the incubation was stopped by 20 µL trichloroacetic acid (15% v/v in H_2O). Samples were cooled in ice for 15 min, centrifuged at 13000 rpm for 10 min and the supernatant was collected and analyzed by analytical RP-HPLC and LC-MS as described above. Peak area corresponding to the intact peptide was

estimated by integration of chromatograms and the percentage of peptide was calculated relative to t_0. Kinetic data were fitted to an exponential decay model to determine the half-life ($t_{1/2}$).

Cell culture

Human embryonic kidney 293T (HEK293T) and HeLa-derived TZM-bl cell lines, were purchased from the American Tissue Cell Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in complete medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Pen-Strep). THP-1 cells were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (Bethesda, MD, USA). Cells were cultured in complete medium composed of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) supplemented with 10% (v/v) FBS and 100 U/mL Pen-Strep. MT4R5 cells (PMID: 12551993) were grown in complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS and 100 U/mL Pen-Strep. Primary $CD4^+$ T were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a donor and were activated with 1 µg/mL of phytohemagglutinin (PHA). One day after activation, they were grown in complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS, 100 U/mL Pen-Strep and IL-2 (100 IU/mL). DMEM, RPMI-1640, FBS, and Pen-Strep were purchased from Gibco (Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). All cell cultures were maintained at 37ºC in a humidified atmosphere with 5% CO_2.

Virus production

The full-length molecular clone pNL4.3, the env-defective molecular clone pNL4.3Δenv, and the pHEF-VSVG vector were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Infectious HIV-$1_{NL4.3}$ viruses and env-defective HIV-$1_{NL4.3}$ viruses pseudotyped with VSVG (HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G) were produced by transfecting HEK293T cells with pNL4.3 and pNL4.3Δenv clones, respectively, through the calcium phosphate co-precipitation method.[74,75] Briefly, a total of 3.5 µg/well of plasmid DNA was used to transfect HEK293T cells (5×10^5 cells/well) in tissue culture-treated 6-well microplates from TPP (Trasadingen, Switzerland). Calcium-phosphate-DNA transfection mixtures were prepared by diluting plasmid DNA in 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 250 mM $CaCl_2$, pH 7.6. The DNA mixture was then added to an equal volume of 50 mM HEPES (Merck, Darmstadt, Germany), 280 mM NaCl (Merck), 1.5 mM Na_2HPO_4 (Merck), pH 7.05, under gentle agitation. Transfection mixtures were allowed to incubate at room temperature, for 20 min, before addition to cells. After 18 h, transfection mixtures were replaced with fresh complete medium. Viral supernatants were collected 48 h post-transfection, centrifuged at 315 *g* for 5 min to remove cell debris, and stored at -80 ºC until used.

Viral supernatants were titered by the Reed-Muench method[76] in a single-cycle viral infectivity assay on TZM-bl cells. TZM-bl cells contain a HIV long terminal repeat (LTR)-driven β-galactosidase and luciferase reporter cassettes that are activated by HIV-1 Tat expression. Briefly, TZM-bl cells were seeded at 2×10^4 cells/well in tissue culture-treated 96-well flat-bottomed polystyrene microplates (Corning, NY, USA), and incubated for 24 h. Cells were then incubated with two-fold serial dilutions of viral supernatants for 3 h, after which the supernatant was replaced with fresh complete medium. After 45 h, infection of TZM-bl cells was quantified through luciferase reporter-gene expression levels[77,78] using the Luc-Screen® luciferase chemiluminescence detection system (Thermo-Fisher), according to manufacturer instructions. Luminescence intensity, *L*, was measured in an Infinite M200 microplate reader from Tecan (Männedorf, Switzerland). Cells were considered

infected if the respective luminescence intensity was five-fold higher than the intensity of control cells (in the absence of viruses). Titration was performed with at least four replicates to allow accurate estimation of HIV-1_{NL4-3} and HIV-$1_{NL4.3\Delta env}$ 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$) of viral supernatants.

To measure the inhibition potency on patient-derived viruses, we used four previously described full-length HIV-1 molecular clones carrying envelope sequences with different coreceptor tropism isolated from one patient plasma (patient T28) (PMID: 16140761). Isolates X4-1 and X4-2 are CXCR4-tropic, while isolates R5-1 and R5-2 are CCR5-tropic. Viral particles were produced by transfecting sub-confluent HEK293T cells in T75 with 20 µg of each plasmid. DNA was diluted in 588 µL of H_2O with 195 µL of $CaCl_2$, and added to an equal volume of HEPES (Sigma Aldrich, France) under agitation. Transfection mixtures were incubated at room temperature for 30 min, before addition to cells. After 16 h, transfection mixtures were replaced with fresh complete medium. Viral supernatants were collected 40 h post-transfection, centrifuged at 600 *g* for 5 min to remove cell debris, filtered with 0.45 µm filter and stored at -80 ºC until used. Viral supernatants were titered in a viral infection assay on TZM-bl cells. 24 h before infection, 1×10^4 TZM-bl cells/well were seeded in tissue culture-treated 96-well flat-bottom microplates. Cells were then incubated with several dilutions of viral supernatants. After 48 h, infection of TZM-bl cells was quantified using a chemiluminescent β-galactosidase reporter-gene expression assay (Roche, France), according to manufacturer instructions. *L* was measured in a Varioskan Flash device (Thermo Fisher Scientific).

The efficiency of viral entry into target cells was evaluated by the β-lactamase-Vpr assay (PMID: 12355096). Virus stocks for this assay were produced by transfection of sub-confluent HEK293T cells in T75 flasks by Jet Pei (Polyplus Inc. Illkrich, France) following the manufacturer instructions. 12 µg of pNL4.3 or pNLAd8 (PMID: 7745752) or pNL4.3DIM (PMID: 15078945) and 4 µg of a plasmid coding the Vpr gene fused to the β-lactamase gene (a kind gift from Michael D. Miller) were co-transfected. Medium was changed 16 h later, and the virus-containing supernatant was collected 40 h post-transfection, filtered with 0.45 µm filter and overlaid on a 20% (w/v) sucrose cushion in a Beckman SW32 tube, after which particles were pelleted by centrifugation (98000 g, 4 °C) for 90 min. Viral pellets were re-suspended in RPMI medium to obtain a 10-fold concentration as compared with the initial culture supernatant, separated into several aliquots, and frozen at −80 °C.

Viral inhibition assays

The anti-HIV activity of the peptides was evaluated through single-cycle viral infectivity assays using TZM-bl reporter cells, as previously described.[78,79] TZM-bl cells were seeded at 2×10^4 cells/well in tissue culture-treated 96-well flat-bottomed polystyrene microplates (Corning) and incubated for 24 h at 37 ºC with 5% CO_2. Cells were then incubated for 3 h with 100 $TCID_{50}$/well of HIV-$1_{NL4.3}$ or HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G in the presence of two-fold serial dilutions of pepR, covering the 0.004 - 5 µM range, and four-fold serial dilutions of pepRF1 and pepR-derivatives, covering the 0.000005 - 5 µM range.

For time-of-addition experiments, serial dilutions of pepR (0.004 - 5 µM) and pepRF1 (0.000005 - 5 µM) were instead added to cells at -1 h, 0 h, +1 h, +2 h, +3 h or +4 h relatively to the moment of infection with HIV-1_{NL4-3}. After a 3 h incubation period, cells were washed with PBS and fresh complete medium was added. To compare the antiviral activity of pepRF1 with known HIV-1 inhibitors, cells were incubated with HIV-$1_{NL4.3}$ alone or in combination to 1 µM of pepRF1, dextran sulfate, AMD3100 (> 97% purity), T20 (> 99% purity), and AZT (> 90% purity). Dextran sulfate and AMD3100 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); T20 and AZT were obtained through the NIH AIDS Reagent Program). After 1 h, cells were washed with PBS to

remove all unbound viruses and synchronize the infection, as described elsewhere.[33] 1 µM of pepRF1, dextran sulfate, AMD3100, T20, and AZT were then added to cells at +1 h, +2 h, +3 h, +4 h, relatively to the moment of the virus addition to cells. The concentration used corresponds to at least 100-fold the IC_{50} of each inhibitor, as established in a TZM-bl single-cycle infectivity assay (data not shown). Untreated cells were used as a control. Infection of TZM-bl cells was quantified 45 h later through luciferase reporter-gene expression levels as described above. *L* measurements were performed in an Infinite M200 microplate reader, converted to the fraction of inhibited viruses, f_a, and analyzed through a non-linear regression with the classical dose-response relationship (median-effects model based on mass action):[80]

$$f_a = 1 - \frac{L}{L_0} \quad (1)$$

$$f_a = \frac{1}{1+\left(\frac{IC_{50}}{[I]}\right)^m} \quad (2)$$

where L_0 is the luminescence intensity in the absence of the inhibitor, IC_{50} is the concentration that inhibits 50% of viral infection, *m* is a slope parameter equivalent to the Hill slope, and [I] is the inhibitor concentration. At least three independent experiments were performed for each assay.

Susceptibility to pepR and pepRF1 of viruses carrying patient-derived envelope glycoproteins

24 h before infection, 1×10^4 TZM-bl cells/well were seeded in tissue culture-treated 96-well flat-bottom microplates. TZM-bl cells were treated prior to infection with four-fold serial dilutions of pepR and pepRF1, covering the 0.0012 – 1.25 µM range. Cells were then incubated with the supernatant of cells transfected with the molecular clones expressing patient-derived envelope glycoproteins (R5-1, R5-2, X4-1 and X4-2) or the laboratory strains NL4.3 (CXCR4-tropic) or NLAd8 (CCR5-tropic). After 40 h, infection of TZM-bl cells was quantified through β-galactosidase reporter-gene assay (Roche), according to manufacturer's instructions. *L*, was measured in a Varioskan Flash instrument (Thermo Fisher Scientific).

Cell viability studies

The cytotoxic effect of pepR and pepRF1 on TZM-bl cells was studied using a resazurin reduction fluorometric assay (alamarBlue® cell viability reagent, Invitrogen, Thermo-Fisher). Resazurin, the active compound in alamarBlue®, is a blue dye that can be reduced to a pink fluorescent intermediate, resorufin, as a result of cell metabolic activity. TZM-bl cells (2×10^4 cells/well) were seeded in tissue culture-treated 96-well black flat-bottomed polystyrene plates (Corning) and incubated for 24 h at 37 ºC with 5% CO_2. Cells were then incubated for 3 h with four-fold serial dilutions of pepR and pepRF1 covering the 0.07 - 80 µM range. After incubation, cells were washed with PBS, alamarBlue® was added at a final concentration of 10% (v/v) and incubated for 3 h. In a complementary assay performed at the same time, after washing the cells with PBS, fresh complete DMEM medium was added and after 45 h, alamarBlue® (10% v/v) was added to cells and incubated for 3 h. Untreated cells were used as a control. After the 3 h incubation of cells with alamarBlue®, resorufin production was monitored by measuring the fluorescent emission intensity (excitation 560 nm, emission 590 nm) in an Infinite M200 microplate reader. The percentage of metabolic active cells was expressed as the percentage of resazurin reduction relative to the reduction measured for the untreated sample after correcting the data with background

fluorescence emission intensity from resazurin in cell-free medium, according to the following expression:

$$\% \text{ of metabolic active cells} = \frac{I - I_{background}}{I_{control} - I_{background}} \times 100\% \quad (3)$$

where I corresponds to the resorufin fluorescence emission intensity in the presence of peptide, $I_{control}$ to the fluorescence emission intensity in the absence of peptides and $I_{background}$ to the background fluorescence emission from the non-reduced alamarBlue® reagent. At least three independent experiments were performed for each assay.

Viral particle integrity studies

The effect of the peptides on the integrity of the viral particles was first evaluated using a Western blot-based assay. 100 $TCID_{50}$ of HIV-$1_{NL4.3}$ were incubated with 5 µM of pepR or pepRF1, for 1 h at 37 ºC. Untreated HIV-$1_{NL4.3}$ virions (in the absence of peptides), which will remain intact and be able to cross a 20% (w/v) sucrose cushion, were used as positive control for viral integrity. HIV-$1_{NL4.3}$ virions treated with 0.5% (v/v) Triton X-100 for 1 h, were used as negative controls for viral integrity (positive controls for viral disruption). Samples were then centrifuged through a 20% (w/v) sucrose cushion for 2 h at 40,000 rpm and 4 ºC. The viral pellet was resuspended and lysed directly in Laemmli buffer composed of sodium dodecyl sulfate (SDS, 4% w/v), 125 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2-mercaptoethanol (10% v/v), glycerol (20% v/v), and bromophenol blue (0.02% w/v). Viral proteins were denatured by boiling for 10 min at 95 °C. Proteins were then separated by 12% (w/v) SDS-PAGE (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA), transferred to nylon membranes (Hybond, Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), and reacted with anti-HIV p24 mAb (NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID). Membranes were then incubated with goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad, Milan, Italy) and visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences, GE Healthcare, BM, UK) using the Chemidoc XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A complementary assay was also performed to investigate the integrity of viral particles using the QuickTiter™Lentivirus Titer Kit from Cell Biolabs (San Diego, CA, USA), which is an enzyme immunoassay developed for the specific detection and quantification of HIV-1 capsid (CA) protein (p24) associated to intact viral particles only. This can be achieved through the use of viral bind lentivirus reagents (ViraBind™, patented technology) that form complexes with the intact virions while free p24 remain in the supernatant. Briefly, HIV-$1_{NL4.3}$ virions (100 $TCID_{50}$) were incubated with 5 µM of pepR or pepRF1 for 1 h at 37 ºC. After incubation, a virus pulldown (using the ViraBind™ lentivirus reagents in the QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit) was performed to recover intact viral particles from viral supernatants. Virions were disrupted using sample diluent (QuickTiter™Lentivirus Titer Kit) and then added to an anti-p24 antibody-coated plate, and incubated for 4 h at 37 ºC. Detection of viral-associated p24 protein was performed using FITC-conjugated anti-p24 mAb followed by HRP-conjugated anti-FITC mAb (QuickTiter™Lentivirus Titer Kit) following manufacturer instructions. Quantification of HIV-$1_{NL4.3}$ p24 protein was determined by adding HRP-substrate solution to each sample followed by measuring absorbance at 450 nm. Untreated HIV-$1_{NL4.3}$ virions (in the absence of peptides) were used as positive control for viral integrity. HIV-$1_{NL4.3}$ virions treated with 70% (v/v) ethanol or 0.5% (v/v) Triton X-100 for 1 h, were used as negative controls for viral integrity (positive controls for viral disruption). At least three independent experiments were performed for each assay.

β-Lactamase viral fusion assay

To measure the efficiency of virus entry into target cells, and the impact of peptides on this process, we used a

previously described Vpr-BlaM assay.[39] In this assay, the β-lactamase enzyme fused to the viral protein Vpr is incorporated into virions and delivered into the cytosol of target cells, where β-lactamase activity can be quantified by the cleavage of a fluorescent substrate (CCF2). To this end, 2.0×10^5 MT4R5 cells treated with a four-fold serial dilution of pepR, pepRF1 and T20 covering the 0.0003 – 1.25 µM concentration range were exposed to the virus preparation of Blam NL4.3, Blam NLAD8 or Blam NL4-3DIM for 4 h at 37 °C, using a virus concentration that leads to on approximately 30% of positive cells in the absence of treatment.

Cells were then washed and loaded with the CCF2 substrate (CCF2-AM loading kit, Invitrogen) in the presence of 1.8 mM probenecid (Sigma-Aldrich). Cells were incubated overnight at 15 °C with CO_2 independent medium (Invitrogen), washed with PBS containing 1% (w/v) BSA and 0.05% (w/v) saponin (Sigma-Aldrich) and fixed with paraformaldehyde (PFA). The cleaved CCF2 fluorescence emission intensity was measured by flow cytometry with excitation at 405 nm and emissions at 448 nm (cleaved CCF2-AM) and 525 nm (uncleaved CCF2-AM), on a FacsCanto II system with FACSDiva software (BD Bioscience). FlowJo, version 10 (Tree Star), was used to analyze and quantify the data.

Expression of HIV coreceptors

The level of expression of CXCR4 on the cell surface was studied by flow cytometry using two different anti-CXCR4 mAbs, targeting two distinct epitopes: 12G5 (PE mouse anti-human CD184 clone 12G5 (RUO), BD Biosciences) and 1D9 (PE rat anti-human CD184 clone 1D9 (RUO), BD Biosciences). Activated primary $CD4^+$ T-lymphocytes were incubated for 90 min at 37 °C with a four-fold serial dilution of pepR, pepRF1 and T20 covering the 0.0012 – 1.25 µM range, or a four-fold serial dilution of the CXCR4-antagonist AMD3100 covering the 0.049 – 50 µM range, or a four-fold serial dilution of CXCL12 covering the 0.098 – 100 nM range. Then, each sample was split into two aliquots and the cells were separately stained with the two mAbs in the presence of PBS-BSA 1% (w/v) 45 min at room temperature in the dark.

The expression of CCR5 on the cell surface was studied using human CCR5 fluorescein mAb (clone 45502) (R&D Systems). Activated primary $CD4^+$ T lymphocytes were incubated 10 min at room temperature with three dilutions (1250 nM, 78 nM, 5 nM) of pepR, pepRF1, T20 and AMD3100. Then, the cells were stained with the mAb in presence of PBS-BSA 1% (w/v) 45 min at 4°C in the dark. Fluorescence emission intensity was measured by flow cytometry on a FacsCanto II system with FACSDiva software (BD Bioscience). FlowJo, version 10 (Tree Star), was used to analyze and quantify the data.

Intracellular Ca^{2+} mobilization assay

CXCR4-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization was assessed using a Fluo-4-based fluorescence assay.[81] Fluo-4 is a fluorescently labelled probe that exhibits an increase in fluorescence emission intensity upon binding to Ca^{2+}. [82] Fluo-4 AM ester (Invitrogen, Thermo-Fisher) was dissolved in pure DMSO (Merck) to a final concentration of 4 mM. Fluo-4 stock solutions were diluted to final working concentrations in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, Thermo-Fisher). DMSO content was kept below 0.25 % (v/v) to prevent cell death.

THP-1 monocytes were cultured in complete RPMI medium. Cells were washed with HBBS, resuspended in HBBS with 5 µM Fluo-4, at a density of 2.5×10^6 cells/mL, and incubated for 1 h at 37 ºC, to allow Fluo-4 probe internalization into the cytosol. To remove the extracellular probe, cells were washed and resuspended in fresh HBSS and allowed to stabilize for 10 min at 37 ºC, before starting fluorescence measurements.

Variations in cytosolic Ca^{2+} levels were followed by time-resolved Fluo-4 fluorescence emission intensity measurements. Measurements were carried out in a FLS920 spectrofluorometer (Edinburgh Instruments,

Livingston, UK) at 37 ºC. The excitation and emission wavelengths were 491 nm and 519 nm, respectively. Excitation and emission slits were 3 nm and 8 nm, respectively. Fluorescence emission intensity of labeled cells (1.25×10^6 cells/mL) was collected for 30 s, before addition of CXCL12 (Sigma, 50 nM), pepR (1.25 μM), pepR-F (1.25 μM) or AMD3100 (50 μM), individually or in combination, after which the signal was collected for an additional 270 s. Data was corrected for dilution and background noise. CXCL12 and inhibitors solutions were prepared in HBSS. At least three independent experiments were performed for each assay.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 7.0 for Macintosh (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Data are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments performed, unless indicated otherwise.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT-MCTES, Portugal) project PTDC/QEQ-MED/4412/2014, and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). I.C.C., J.M.F., T.N.F., and I.B. acknowledge fellowships SFRH/BPD/65531/2009, SFRH/BD/70423/2010, SFRH/BD/5283/2013, and SFRH/BPD/76225/2011, respectively, funded by FCT-MCTES. A.T. is the recipient of a fellowship from Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). A.S.V. acknowledges funding under the Investigator Programme (IF/00803/2012) from FCT-MCTES. Work at Pompeu Fabra University was supported by grants AGL2014-52395-C2 and AGL2017-84097-C2-2-R and by the "María de Maeztu" Program for Units of Excellence in R&D from the Spanish Ministry of Innovation and Competitiveness (MINECO).

The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4-3 from Dr. Malcolm Martin (Cat# 114);[83] pNL(AD8) from Eric O. Freed (Cat# 11346);[84] pNL4.3Δenv from Dr. Haili Zhang, Dr. Yan Zhou, and Dr. Robert Siliciano (Cat# 11100);[85] pHEF-VSVG vector from Dr. Lung-Ji Chang (Cat# 4693);[86] T-20 (Enfuvirtide) (Cat# 12732); Zidovudine (AZT) (Cat# 3485); Anti-HIV-1 p24 Monoclonal (183-H12-5C) from Dr. Bruce Chesebro and Kathy Wehrly (Cat# 3537).[87,88] THP-1 NCI Cells from Drs. Li Wu and Vineet N. Kewal Ramani (Cat# 9940).[89]

References

(1) Moir, S.; Chun, T.-W.; Fauci, A. S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2011, 6 (1), 223–248.

(2) UNAIDS, Fact Sheet – Global AIDS Update 2019, 2018 GLOBAL HIV STATISTICS. https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet (acessed Nov 21, 2019).

(3) Gunthard, H. F.; Aberg, J. A.; Eron, J. J.; Hoy, J. F.; Telenti, A.; Benson, C. A.; Burger, D. M.; Cahn, P.; Gallant, J. E.; Glesby, M. J.; Reiss, P.; Saag, M. S.; Thomas, D. L.; Jacobsen, D. M.; Volberding, P. A.; International Antiviral Society-USA Panel. Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2014 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. JAMA 2014, 312 (4), 410–425.

(4) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. Drug Discov. Today 2010, 15 (1–2), 40–56.

(5) A. Kaspar, A.; M. Reichert, J. Future Directions for Peptide Therapeutics Development. Drug Discov. Today 2013, 18 (17–18), 807–817.

(6) Castel, G.; Chtéoui, M.; Heyd, B.; Tordo, N. Phage Display of Combinatorial Peptide Libraries:

Application to Antiviral Research. Molecules 2011, 16 (5), 3499–3518.

(7) Rausch, D. M.; Hwang, K. M.; Padgett, M.; Voltz, A. H.; Rivas, A.; Engleman, E.; Gaston, I.; McGrath, M.; Fraser, B.; Kalyanaraman, V. S. Peptides Derived from the CDR3-Homologous Domain of the CD4 Molecule Are Specific Inhibitors of HIV-1 and SIV Infection, Virus-Induced Cell Fusion, and Postinfection Viral Transmission in Vitro. Implications for the Design of Small Peptide Anti-HIV Therapeutic Agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990, 616, 125–148.

(8) Jin, B. S.; Ryu, J. R.; Ahn, K.; Yu, Y. G. Design of a Peptide Inhibitor That Blocks the Cell Fusion Mediated by Glycoprotein 41 of Human Immunodeficiency Virus Type 1. AIDS Res. Hum. Retroviruses 2000, 16 (17), 1797–1804.

(9) Gleenberg, I. O.; Herschhorn, A.; Hizi, A. Inhibition of the Activities of Reverse Transcriptase and Integrase of Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Peptides Derived from the Homologous Viral Protein R (Vpr). J. Mol. Biol. 2007, 369 (5), 1230–1243.

(10) Agopian, A.; Gros, E.; Aldrian-Herrada, G.; Bosquet, N.; Clayette, P.; Divita, G. A New Generation of Peptide-Based Inhibitors Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase Conformational Flexibility. J. Biol. Chem. 2009, 284 (1), 254–264.

(11) Gleenberg, I. O.; Avidant, O.; Goldgur, Y.; Herschhorn, A.; Hizi, A. Peptides Derived from the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 as Novel Inhibitors of the Viral Integrase. J. Biol. Chem. 2005, 280 (23), 21987–21996.

(12) Li, H. Y.; Zawahir, Z.; Song, L. D.; Long, Y. Q.; Neamati, N. Sequence-Based Design and Discovery of Peptide Inhibitors of HIV-1 Integrase: Insight into the Binding Mode of the Enzyme. J. Med. Chem. 2006, 49 (15), 4477–4486.

(13) Schramm, H. J.; Boetzel, J.; Biittner, J.; Fritsche, E.; Ghring, W.; Jaeger, E.; Knig, S.; Thumfart, O.; Wenger, T.; Nagel, N. E.; et al. The Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Proteases by “Interface Peptides.” Antiviral Res. 1996, 30, 155–170.

(14) Louis, J. M.; Dyda, F.; Nashed, N. T.; Kimmel, A. R.; Davies, D. R. Hydrophilic Peptides Derived from the Transframe Region of Gag-Pol Inhibit the HIV-1 Protease. Biochemistry 1998, 37 (8), 2105–2110.

(15) Kilby, J. M.; Hopkins, S.; Venetta, T. M.; DiMassimo, B.; Cloud, G. A.; Lee, J. Y.; Alldredge, L.; Hunter, E.; Lambert, D.; Bolognesi, D.; et al. Potent Suppression of HIV-1 Replication in Humans by T-20, a Peptide Inhibitor of Gp41-Mediated Virus Entry. Nat. Med. 1998, 4 (11), 1302–1307.

(16) Lalezari, J. P.; Henry, K.; O’Hearn, M.; Montaner, J. S. G.; Piliero, P. J.; Trottier, B.; Walmsley, S.; Cohen, C.; Kuritzkes, D. R.; Eron, J. J.; et al. Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America. N. Engl. J. Med. 2003, 348 (22), 2175–2185.

(17) Lazzarin, A.; Clotet, B.; Cooper, D.; Reynes, J.; Arasteh, K.; Nelson, M.; Katlama, C.; Stellbrink, H.-J.; Delfraissy, J.-F.; Lange, J.; et al. Efficacy of Enfuvirtide in Patients Infected with Drug-Resistant HIV-1 in Europe and Australia. N. Engl. J. Med. 2003, 348 (22), 2186–2195.

(18) Doms, R. W.; Trono, D. The Plasma Membrane as a Combat Zone in the HIV Battlefield. Genes Dev. 2000, 14 (21), 2677–2688.

(19) Rimsky, L. T.; Shugars, D. C.; Matthews, T. J. Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Gp41-Derived Inhibitory Peptides. J. Virol. 1998, 72 (2), 986–993.

(20) Golding, H.; Zaitseva, M.; de Rosny, E.; King, L. R.; Manischewitz, J.; Sidorov, I.; Gorny, M. K.; Zolla-Pazner, S.; Dimitrov, D. S.; Weiss, C. D. Dissection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry with Neutralizing Antibodies to Gp41 Fusion Intermediates. J. Virol. 2002, 76 (13), 6780–6790.

(21) Francis, J. N.; Whitby, F. G.; Hill, C. P.; Eckert, D. M.; Lie, Y. S.; Root, M. J.; Reeves, J. D.; Welch, B. D.; Paul, S.; Redman, J. S.; et al. Design of a Potent D-Peptide HIV-1 Entry Inhibitor with a Strong Barrier to Resistance. J. Virol. 2010, 84 (21), 11235–11244.

(22) Wei, X.; Decker, J. M.; Liu, H.; Zhang, Z.; Arani, R. B.; Kilby, J. M.; Saag, M. S.; Wu, X.; Shaw, G. M.; Kappes, J. C. Emergence of Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Patients Receiving Fusion Inhibitor (T-20) Monotherapy. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46 (6), 1896–1905.

(23) Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R.; Bolognesi, D. Enfuvirtide: The First Therapy to Inhibit the Entry of HIV-1 into Host CD4 Lymphocytes. Nat. Rev. Drug Discov. 2004, 3 (3), 215–225.

(24) Naider, F.; Anglister, J. Peptides in the Treatment of AIDS. Curr. Opin. Struct. Biol. 2009, 19 (4), 473–482.

(25) Ashkenazi, A.; Wexler-Cohen, Y.; Shai, Y. Multifaceted Action of Fuzeon as Virus-Cell Membrane Fusion Inhibitor. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2011, 1808 (10), 2352–2358.

(26) Wang, G. Natural Antimicrobial Peptides as Promising Anti-HIV Candidates. Curr. Top. Pept. protein Res. 2012, 13, 93–110.

(27) Qureshi, A.; Thakur, N.; Kumar, M. HIPdb: A Database of Experimentally Validated HIV Inhibiting Peptides. PLoS One 2013, 8 (1).

(28) Freire, J. M.; Veiga, A. S.; Conceição, T. M.; Kowalczyk, W.; Mohana-Borges, R.; Andreu, D.; Santos, N. C.; Da Poian, A. T.; Castanho, M. A. R. B. Intracellular Nucleic Acid Delivery by the Supercharged Dengue Virus Capsid Protein. PLoS One 2013, 8 (12).

(29) Freire, J. M.; Veiga, A. S.; Rego de Figueiredo, I.; de la Torre, B. G.; Santos, N. C.; Andreu, D.; Da Poian, A. T.; Castanho, M. A. R. B. Nucleic Acid Delivery by Cell Penetrating Peptides Derived from Dengue Virus Capsid Protein: Design and Mechanism of Action. FEBS J. 2014, 281 (1), 191–215.

(30) Freire, J. M.; Almeida Dias, S.; Flores, L.; Veiga, A. S.; Castanho, M. A. R. B. Mining Viral Proteins for Antimicrobial and Cell-Penetrating Drug Delivery Peptides. Bioinformatics 2015, 31 (14), 2252–2256.

(31) Bottger, R., Hoffmann, R. & Knappe, D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. PLoS One 2017, 12, e0178943.

(32) Frankel, A. D.; Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. Annu. Rev. Biochem. 1998, 67 (1), 1–25.

(33) Daelemans, D.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Pannecouque, C. A Time-of-Drug Addition Approach to Target Identification of Antiviral Compounds. Nat. Protoc. 2011, 6 (6), 925–933.

(34) Ito, M.; Baba, M.; Sato, A.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Shigeta, S. Inhibitory Effect of Dextran Sulfate and Heparin on the Replication of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Vitro. Antiviral Res. 1987, 7 (6), 361–367.

(35) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; De Vreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R. Highly Potent and Selective Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by the Bicyclam Derivative JM3100. Antimicrob. Agents Chemother. 1994, 38 (4), 668–674.

(36) Schols, D.; Struyf, S.; Van Damme, J.; Este, J. A.; Henson, G.; De Clercq, E. Inhibition of T-Tropic HIV Strains by Selective Antagonization of the Chemokine Receptor CXCR4. J. Exp. Med. 1997, 186 (8), 1383–1388.

(37) Donzella, G. A.; Schols, D.; Lin, S. W.; Este, J. A.; Nagashima, K. A.; Maddon, P. J.; Allaway, G. P.; Sakmar, T. P.; Henson, G.; De Clercq, E.; et al. AMD3100, a Small Molecule Inhibitor of HIV-1 Entry via the CXCR4 Co-Receptor. Nat. Med. 1998, 4 (1), 72–77.

(38) Gonzalez-Ortega, E.; Mena, M.-P.; Permanyer, M.; Ballana, E.; Clotet, B.; Este, J. A. ADS-J1 Inhibits HIV-1 Entry by Interacting with Gp120 and Does Not Block Fusion-Active Gp41 Core Formation. Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54 (10), 4487–4492.

(39) Cavrois, M.; De Noronha, C.; Greene, W. C. A Sensitive and Specific Enzyme-Based Assay Detecting HIV-1 Virion Fusion in Primary T Lymphocytes. Nat. Biotechnol. 2002, 20 (11), 1151–1154.

(40) Daecke, J.; Fackler, O. T.; Dittmar, M. T.; Krausslich, H.-G. Involvement of Clathrin-Mediated Endocytosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. J. Virol. 2005, 79 (3), 1581–1594.

(41) Skrabal, K.; Saragosti, S.; Labernardiere, J.-L.; Barin, F.; Clavel, F.; Mammano, F. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Isolated from Single Plasma Samples Display a Wide Spectrum of Neutralization Sensitivity. J. Virol. 2005, 79 (18), 11848–11857.

(42) Oberlin, E.; Amara, A.; Bachelerie, F.; Bessia, C.; Virelizier, J. L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Schwartz, O.; Heard, J. M.; Clark-Lewis, I.; Legler, D. F.; et al. The CXC Chemokine SDF-1 Is the Ligand for LESTR/Fusin and Prevents Infection by T-Cell-Line-Adapted HIV-1. Nature 1996, 382 (6594), 833–835.

(43) Mishra, R. K.; Shum, A. K.; Platanias, L. C.; Miller, R. J.; Schiltz, G. E. Discovery and Characterization of Novel Small-Molecule CXCR4 Receptor Agonists and Antagonists. Sci. Rep. 2016, 6, 1–9.

(44) Zirafi, O.; Kim, K.-A.; Standker, L.; Mohr, K. B.; Sauter, D.; Heigele, A.; Kluge, S. F.; Wiercinska, E.; Chudziak, D.; Richter, R.; et al. Discovery and Characterization of an Endogenous CXCR4 Antagonist. Cell Rep. 2015, 11 (5), 737–747.

(45) Carnec, X.; Quan, L.; Olson, W. C.; Hazan, U.; Dragic, T. Anti-CXCR4 Monoclonal Antibodies Recognizing Overlapping Epitopes Differ Significantly in Their Ability to Inhibit Entry of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J. Virol. 2005, 79 (3), 1930–1933.

(46) Sigrid, H.; Katrien, P.; Gary, B.; Erik, D. C.; Dominique, S. Chemokine Receptor Inhibition by AMD3100 Is Strictly Confined to CXCR4. FEBS Lett. 2002, 527 (1–3), 255–262.

(47) Connor, R. I.; Sheridan, K. E.; Ceradini, D.; Choe, S.; Landau, N. R. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1--Infected Individuals. J. Exp. Med. 1997, 185 (4), 621–628.

(48) Wagner, T. A.; Frenkel, L. M. Potential Limitation of CCR5 Antagonists: Drug Resistance More Often Linked to CXCR4-Utilizing than to CCR5-Utilizing HIV-1. AIDS 2008, 22 (17), 2393–2395.

(49) Melby, T.; Despirito, M.; Demasi, R.; Heilek-Snyder, G.; Greenberg, M. L.; Graham, N. HIV-1 Coreceptor Use in Triple-Class Treatment-Experienced Patients: Baseline Prevalence, Correlates, and Relationship to Enfuvirtide Response. J. Infect. Dis. 2006, 194 (2), 238–246.

(50) Wilkin, T. J.; Lalama, C. M.; McKinnon, J.; Gandhi, R. T.; Lin, N.; Landay, A.; Ribaudo, H.; Fox, L.; Currier, J. S.; Mellors, J. W.; et al. A Pilot Trial of Adding Maraviroc to Suppressive Antiretroviral Therapy for Suboptimal CD4(+) T-Cell Recovery despite Sustained Virologic Suppression: ACTG A5256. J. Infect. Dis. 2012, 206 (4), 534–542.

(51) Missé, D.; Cerutti, M.; Noraz, N.; Jourdan, P.; Favero, J.; Devauchelle, G.; Yssel, H.; Taylor, N.; Veas, F. A CD4-Independent Interaction of Human Immunodeficiency Virus-1 Gp120 With CXCR4 Induces Their Cointernalization, Cell Signaling, and T-Cell Chemotaxis. Blood 1999, 93 (8), 2454–2462.

(52) Balabanian, K.; Harriague, J.; Decrion, C.; Lagane, B.; Shorte, S.; Baleux, F.; Virelizier, J.-L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Chakrabarti, L. A. CXCR4-Tropic HIV-1 Envelope Glycoprotein Functions as a Viral Chemokine in Unstimulated Primary CD4+ T Lymphocytes. J. Immunol. 2004, 173 (12), 7150–7160.

(53) Hendrix, C. W.; Collier, A. C.; Lederman, M. M.; Schols, D.; Pollard, R. B.; Brown, S.; Jackson, J. B.; Coombs, R. W.; Glesby, M. J.; Flexner, C. W.; et al. Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AMD3100, a Selective CXCR4 Receptor Inhibitor, in HIV-1 Infection. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2004, 37 (2), 1253–1262.

(54) Henrich, T. J.; Kuritzkes, D. R. HIV-1 Entry Inhibitors: Recent Development and Clinical Use. Curr. Opin. Virol. 2013, 3 (1), 51–57.

(55) Martin, C.; Bridger, G. J.; Rankin, S. M. Structural Analogues of AMD3100 Mobilise Haematopoietic

Progenitor Cells from Bone Marrow in Vivo According to Their Ability to Inhibit CXCL12 Binding to CXCR4 in Vitro. Br. J. Haematol. 2006, 134 (3), 326–329.

(56) Pulliam, A. C.; Hobson, M. J.; Ciccone, S. L.; Li, Y.; Chen, S.; Srour, E. F.; Yang, F.-C.; Broxmeyer, H. E.; Clapp, D. W. AMD3100 Synergizes with G-CSF to Mobilize Repopulating Stem Cells in Fanconi Anemia Knockout Mice. Exp. Hematol. 2008, 36 (9), 1084–1090.

(57) Geminder, H.; Sagi-Assif, O.; Goldberg, L.; Meshel, T.; Rechavi, G.; Witz, I. P.; Ben-Baruch, A. A Possible Role for CXCR4 and Its Ligand, the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1, in the Development of Bone Marrow Metastases in Neuroblastoma. J. Immunol. 2001, 167 (8), 4747–4757.

(58) Kijima, T.; Maulik, G.; Ma, P. C.; Tibaldi, E. V.; Turner, R. E.; Rollins, B.; Sattler, M.; Johnson, B. E.; Salgia, R. Regulation of Cellular Proliferation, Cytoskeletal Function, and Signal Transduction through CXCR4 and c-Kit in Small Cell Lung Cancer Cells. Cancer Res. 2002, 62 (21), 6304–6311.

(59) Hwang, J. H.; Hwang, J. H.; Chung, H. K.; Kim, D. W.; Hwang, E. S.; Suh, J. M.; Kim, H.; You, K. H.; Kwon, O. Y.; Ro, H. K.; et al. CXC Chemokine Receptor 4 Expression and Function in Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88 (1), 408–416.

(60) Darash-Yahana, M.; Pikarsky, E.; Abramovitch, R.; Zeira, E.; Pal, B.; Karplus, R.; Beider, K.; Avniel, S.; Kasem, S.; Galun, E.; et al. Role of High Expression Levels of CXCR4 in Tumor Growth, Vascularization, and Metastasis. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 2004, 18 (11), 1240–1242.

(61) Schimanski, C. C.; Bahre, R.; Gockel, I.; Muller, A.; Frerichs, K.; Horner, V.; Teufel, A.; Simiantonaki, N.; Biesterfeld, S.; Wehler, T.; et al. Dissemination of Hepatocellular Carcinoma Is Mediated via Chemokine Receptor CXCR4. Br. J. Cancer 2006, 95 (2), 210–217.

(62) Xu, C.; Zhao, H.; Chen, H.; Yao, Q. CXCR4 in Breast Cancer: Oncogenic Role and Therapeutic Targeting. Drug Des. Devel. Ther. 2015, 9, 4953–4964.

(63) Kircher, M.; Herhaus, P.; Schottelius, M.; Buck, A. K.; Werner, R. A.; Wester, H.-J.; Keller, U.; Lapa, C. CXCR4-Directed Theranostics in Oncology and Inflammation. Ann. Nucl. Med. 2018, 32 (8), 503–511.

(64) Vagima, Y.; Lapid, K.; Kollet, O.; Goichberg, P.; Alon, R.; Lapidot, T. Pathways Implicated in Stem Cell Migration: The SDF-1/CXCR4 Axis. Methods Mol. Biol. 2011, 750, 277–289.

(65) Launay, O.; Paul, S.; Servettaz, A.; Roguet, G.; Rozenberg, F.; Lucht, F.; Lambert, C.; Presles, E.; Goulvestre, C.; Meritet, J.-F.; et al. Control of Humoral Immunity and Auto-Immunity by the CXCR4/CXCL12 Axis in Lupus Patients Following Influenza Vaccine. Vaccine 2013, 31 (35), 3492–3501.

(66) Debnath, B.; Xu, S.; Grande, F.; Garofalo, A.; Neamati, N. Small Molecule Inhibitors of CXCR4. Theranostics 2013, 3 (1), 47–75.

(67) Nagafuchi, Y.; Shoda, H.; Sumitomo, S.; Nakachi, S.; Kato, R.; Tsuchida, Y.; Tsuchiya, H.; Sakurai, K.; Hanata, N.; Tateishi, S.; et al. Immunophenotyping of Rheumatoid Arthritis Reveals a Linkage between HLA-DRB1 Genotype, CXCR4 Expression on Memory CD4(+) T Cells, and Disease Activity. Sci. Rep. 2016, 6, 29338.

(68) Galkina, E.; Ley, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis (*). Annu. Rev. Immunol. 2009, 27, 165–197.

(69) Bonham, L. W.; Karch, C. M.; Fan, C. C.; Tan, C.; Geier, E. G.; Wang, Y.; Wen, N.; Broce, I. J.; Li, Y.; Barkovich, M. J.; et al. CXCR4 Involvement in Neurodegenerative Diseases. Transl. Psychiatry 2018, 8 (1), 73.

(70) Conley-LaComb, M. K.; Semaan, L.; Singareddy, R.; Li, Y.; Heath, E. I.; Kim, S.; Cher, M. L.; Chinni, S. R. Pharmacological Targeting of CXCL12/CXCR4 Signaling in Prostate Cancer Bone Metastasis. Mol. Cancer 2016, 15 (1), 68.

(71) Burger, M.; Glodek, A.; Hartmann, T.; Schmitt-Graff, A.; Silberstein, L. E.; Fujii, N.; Kipps, T. J.; Burger, J. A. Functional Expression of CXCR4 (CD184) on Small-Cell Lung Cancer Cells Mediates Migration,

Integrin Activation, and Adhesion to Stromal Cells. Oncogene 2003, 22 (50), 8093–8101.

(72) Kim, J.; Takeuchi, H.; Lam, S. T.; Turner, R. R.; Wang, H. J.; Kuo, C.; Foshag, L.; Bilchik, A. J.; Hoon, D. S. B. Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Colorectal Cancer Patients Increases the Risk for Recurrence and for Poor Survival. J. Clin. Oncol. 2005, 23 (12), 2744–2753.

(73) Ehtesham, M.; Mapara, K. Y.; Stevenson, C. B.; Thompson, R. C. CXCR4 Mediates the Proliferation of Glioblastoma Progenitor Cells. Cancer Lett. 2009, 274 (2), 305–312.

(74) Rato, S.; Maia, S.; Brito, P. M.; Resende, L.; Pereira, C. F.; Moita, C.; Freitas, R. P.; Moniz-Pereira, J.; Hacohen, N.; Moita, L. F.; et al. Novel HIV-1 Knockdown Targets Identified by an Enriched Kinases/Phosphatases ShRNA Library Using a Long-Term Iterative Screen in Jurkat T-Cells. PLoS One 2010, 5 (2).

(75) Kwon, M.; Firestein, B. L. DNA Transfection: Calcium Phosphate Method. Methods Mol. Biol. 2013, 1018, 107–110.

(76) Reed, L. J.; Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoints. Am. J. Epidemiol. 1938, 27 (3), 493–497.

(77) Wood, K. V. Luc Genes: Introduction of Colour into Bioluminescence Assays. J. Biolumin. Chemilumin. 1990, 5 (2), 107–114.

(78) Montefiori, D. C. Measuring HIV Neutralization in a Luciferase Reporter Gene Assay. Methods Mol. Biol. 2009, 485, 395–405. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-170-3_26.

(79) Borrego, P.; Calado, R.; Marcelino, J. M.; Bartolo, I.; Rocha, C.; Cavaco-Silva, P.; Doroana, M.; Antunes, F.; Maltez, F.; Caixas, U.; et al. Baseline Susceptibility of Primary HIV-2 to Entry Inhibitors. Antivir. Ther. 2012, 17 (3), 565–570.

(80) Chou, T. C. Derivation and Properties of Michaelis-Menten Type and Hill Type Equations for Reference Ligands. J. Theor. Biol. 1976, 59 (2), 253–276. https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90169-7.

(81) Princen, K.; Hatse, S.; Vermeire, K.; De Clercq, E.; Schols, D. Evaluation of SDF-1/CXCR4-Induced Ca2+ Signaling by Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) and Flow Cytometry. Cytometry. A 2003, 51 (1), 35–45.

(82) Gee, K. R.; Brown, K. A.; Chen, W. N. U.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca2+-Indicator Dyes. Cell Calcium 2000, 27 (2), 97–106.

(83) Adachi, A.; Gendelman, H. E.; Koenig, S.; Folks, T.; Willey, R.; Rabson, A.; Martin, M. A. Production of Acquired Immunodeficiency Syndrome-Associated Retrovirus in Human and Nonhuman Cells Transfected with an Infectious Molecular Clone. J. Virol. 1986, 59 (2), 284–291.

(84) Freed, E. O.; Englund, G.; Martin, M. A. Role of the Basic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix in Macrophage Infection. J. Virol. 1995, 69 (6), 3949–3954.

(85) Zhang, H.; Zhou, Y.; Alcock, C.; Kiefer, T.; Monie, D.; Siliciano, J.; Li, Q.; Pham, P.; Cofrancesco, J.; Persaud, D.; et al. Novel Single-Cell-Level Phenotypic Assay for Residual Drug Susceptibility and Reduced Replication Capacity of Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. J. Virol. 2004, 78 (4), 1718–1729.

(86) Chang, L. J.; Urlacher, V.; Iwakuma, T.; Cui, Y.; Zucali, J. Efficacy and Safety Analyses of a Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derived Vector System. Gene Ther. 1999, 6 (5), 715–728.

(87) Toohey, K.; Wehrly, K.; Nishio, J.; Perryman, S.; Chesebro, B. Human Immunodeficiency Virus Envelope V1 and V2 Regions Influence Replication Efficiency in Macrophages by Affecting Virus Spread. Virology 1995, 213 (1), 70–79.

(88) Wehrly, K.; Chesebro, B. P24 Antigen Capture Assay for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Using Readily Available Inexpensive Reagents. Methods 1997, 12 (4), 288–293.

(89) Wu, L.; Martin, T. D.; Carrington, M.; Kewal Ramani, V. N. Raji B Cells, Misidentified as THP-1 Cells, Stimulate DC-SIGN-Mediated HIV Transmission. Virology 2004, 318 (1), 17–23.

Supporting Information

Anti-HIV-1 activity of pepRF1, a proteolysis-resistant CXCR4 antagonist derived from Dengue virus capsid protein

Iris Cadima-Couto[1], Alexandra Tauzin[2], João M. Freire[1], Tiago N. Figueira[1], Clara Pérez-Peinado[3], Catarina Cunha-Santos[4], Inês Bártolo[4], Nuno Taveira[4,5], Joao Goncalves[4], Fabrizio Mammano[2*], David Andreu[3*], Miguel A.R.B Castanho[1*], Ana Salomé Veiga[1*]

[1]*Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal*

[2]*INSERM UMR 1124, Université de Paris, 45 rue des Saints Pères, F-75006 Paris, France*

[3]*Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona Biomedical Research Park, 08003 Barcelona, Spain*

[4]*Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Avenida Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal*

[5]*Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM), Instituto Universitário Egas Moniz, Monte de Caparica, Portugal*

*Correspondence to: Fabrizio Mammano, fabrizio.mammano@inserm.fr; David Andreu, david.andreu@upf.edu; Miguel Castanho, macastanho@medicina.ulisboa.pt; Ana Salomé Veiga, aveiga@medicina.ulisboa.pt

Supplementary Figure S1: pepR stability in human serum……..S2

Supplementary Table S1. Fragments resulting from pepR digestion by serum……...S2

Supplementary Figure S2: Mass spectra of pepR fragments……S3

Supplementary Table S2: Peptide-derivatives obtained with the sequential truncation of pepR……..S3

Supplementary Figure S3: Cytotoxicity of pepR and pepRF1…….S4

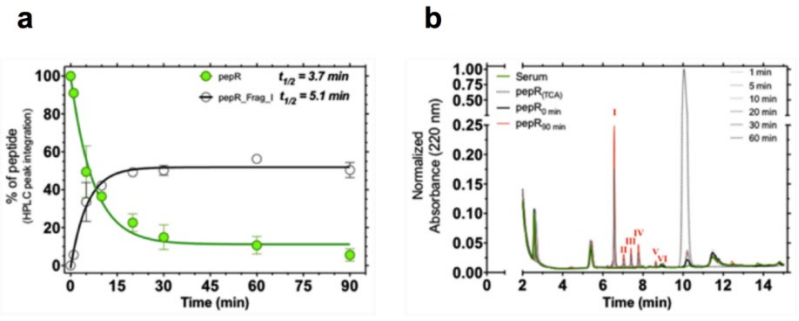
Supplementary Figure S4: Antiviral activity of pepR against HIV-1NL4.3-VSV-G……..S5

Supplementary Figure S5: Effect of pepR and pepRF1 on the integrity of viral particles…...S6

Supplementary Figure S6: pepR inhibits CXCR4-tropic HIV-1 clones carrying patient-derived envelope glycoproteins……S7

Supplementary Figure S7: CCR5 recognition by pepR and pepRF1……...S8 Supplementary Figure S8: Analytical reverse-phase HPLC and ESI-MS of purified pepR and pepRF1……..S9

1. pepR stability in human serum



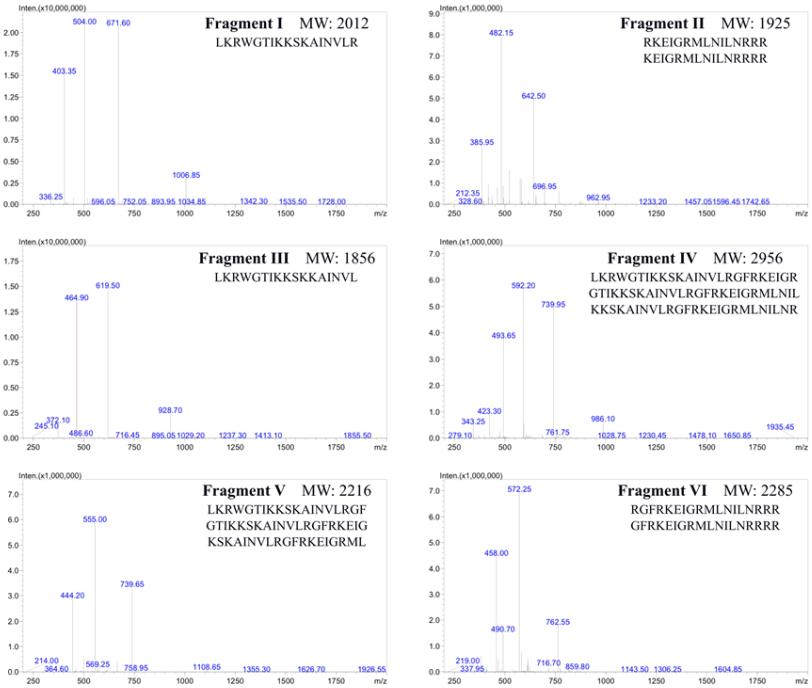
Supplementary Figure S1. pepR stability in human serum. (a) Time course of pepR decay in human serum (green circles, determined as % of starting HPLC peak) and of emerging main by-product, fragment I (white

circles). The first curve was fitted to an exponential decay for half-life ($t_{1/2}$) estimation. (b) RP-HPLC chromatograms of pepR, human serum and pepR human serum digests at various time points (0 to 90 min). Peaks labeled I to VI in the red trace correspond to pepR degradation fragments, with the primary structures outlined in Table 1.

Supplementary Table S1. Fragments resulting from pepR digestion by serum. Primary structures for peaks I to VI on Figure S1, proposed on the basis of MS data. MS spectra of the fragments are shown on Figure S2.

Peptide	Retention time (min)	Observed mass (Da)	Sequence	Calculated mass (Da)
pepR	10.0	4278	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLN ILNRRRR	4279.20
Fragment I	6.4	2012	LKRWGTIKKSKAINVLR	2011.47
Fragment II	6.9	1925	RKEIGRMLNILNRRR KEIGRMLNILNRRRR	1925.32 1925.32
Fragment III	7.3	1856	LKRWGTIKKSKAINVL	1855.28
Fragment IV	7.7	2956	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGR GTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNIL KKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNR	2955.57 2956.62 2955.59
Fragment V	8.5	2216	LKRWGTIKKSKAINVLRGF GTIKKSKAINVLRGFRKEIG KSKAINVLRGFRKEIGRML	2215.70 2215.65 2216.71
Fragment VI	8.8	2285	RGFRKEIGRMLNILNRRR GFRKEIGRMLNILNRRRR	2285.73 2285.73

2. Mass spectra of pepR fragments



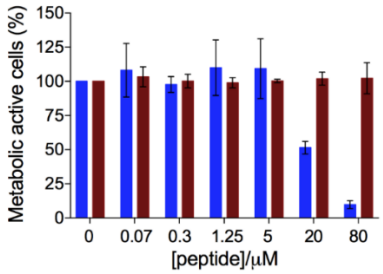
Supplementary Figure S2. Mass spectra of peptide fragments resulting from human serum digestion of pepR (as shown in Figure S1B). Amino acid sequences compatible with MS data are shown below the fragment title. For Fragments II and IV-VI, the experimental mass is compatible within experimental error with more than one

primary structure.

Supplementary Table S2. Peptide-derivatives obtained with the sequential truncation of pepR

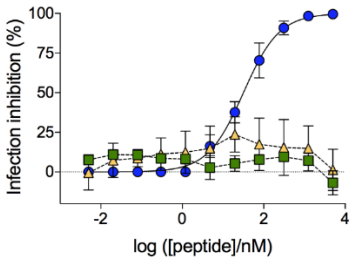
Peptide	Sequence	Length	Net charge
pepR	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR	35	+13
ΔC4-pepR	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILN	31	+9
ΔC8-pepR	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRML	27	+9
ΔC12-pepR	LKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEI	23	+8
ΔN4-pepR	GTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR	31	+11
ΔN8-pepR	KSKAINVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR	27	+10
ΔN12-pepR	INVLRGFRKEIGRMLNILNRRRR	23	+8
ΔN22-pepR	GRMLNILNRRRR	13	+6

3. Cytotoxicity of pepR and pepRF1



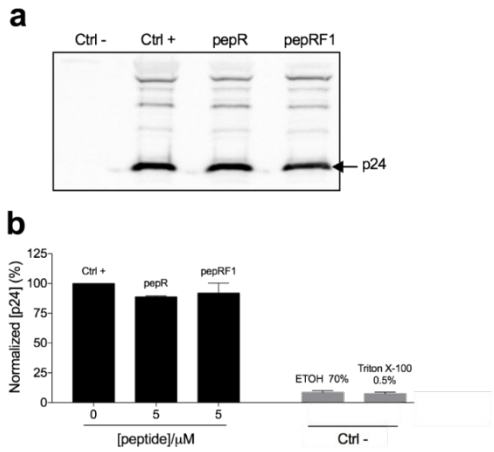
Supplementary Figure S3. Cytotoxicity of pepR and pepRF1. TZM-bl cells were incubated for 3 h with the indicated concentrations of pepR (blue bars) and pepRF1 (red bars). After 45 h, the effect of the peptides on the metabolic activity of cells was measured by quantifying the amount of resazurin, a non-fluorescent indicator dye, converted to red-fluorescent resorufin via the reduction reactions of metabolically active cells. The effect of peptides on the metabolic activity of cells was also studied 3 h after incubation of cells with peptides and similar results were obtained (data not shown).

4. Antiviral activity of pepR against HIV-1NL4.3-VSV-G



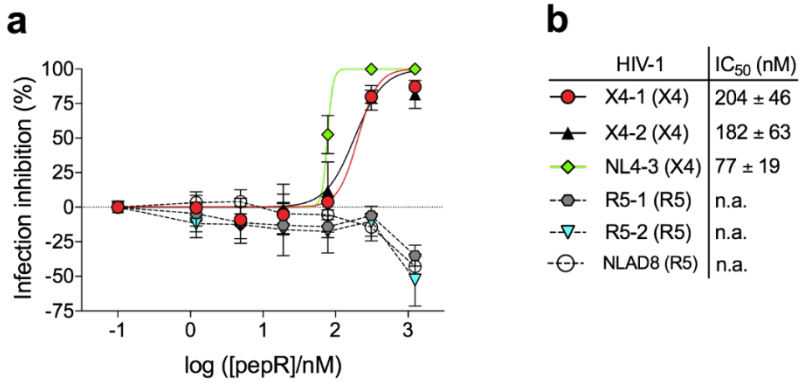
Supplementary Figure S4. *In vitro* evaluation of pepR activity against HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G and HIV-$1_{NL4.3}$. The antiviral activity of pepR against HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G was determined by infecting TZM-bl cells in the presence of increasing concentrations of the peptide. T20, which targets gp41 of HIV-1 envelope, was tested against HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G as a control. The effect of pepR on HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G infection was compared to HIV-$1_{NL4.3.}$ Viral infectivity was quantified 48 h post-infection through luciferase reporter-enzyme activity and converted to percentage of viral infection inhibition: HIV-$1_{NL4.3\ wt}$ + pepR (IC_{50}= 37 ± 3.8 nM); HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G + pepR (IC_{50}= n.a.); HIV-$1_{NL4.3}$-VSV-G + T20 (IC_{50}= n.a.).

5. Effect of pepR and pepRF1 on the integrity of viral particles



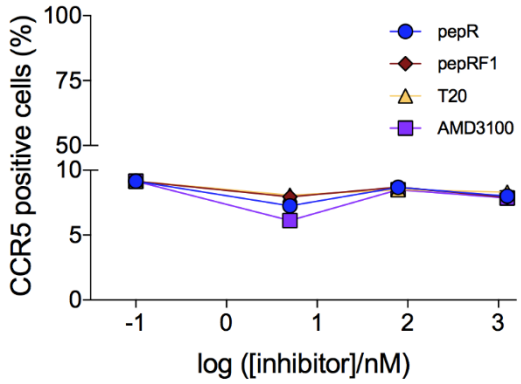
Supplementary Figure S5. Effect of pepR and pepRF1 on HIV-$1_{NL4.3}$ viral particle integrity. (a) Treatment of HIV-$1_{NL4.3}$ particles with 5 µM of pepR or pepRF1 followed by detection of viral-associated p24 protein by Western blot. Negative control (Ctrl -) for integrity corresponds to disruption of virions treated with 0.5% (v/v) Triton X-100. Positive control (Ctrl +) for integrity corresponds to virions that were not disrupted. An identical level of viral p24 protein in the presence of pepR and pepRF1 compared with positive control (no peptide) indicates that the viral particles were not disrupted. (b) Quantification of HIV-$1_{NL4.3}$ p24 protein associated to intact viral particles. HIV-$1_{NL4.3}$ particles were incubated with 5 µM pepR or pepRF1. Intact viral particles, recovered from viral supernatants, were then quantified by measuring viral-associated p24 protein using the appropriate antibodies provided by the QuickTiter™Lentivirus Titer Kit, following manufacture instructions. Absorbance of each sample at 450 nm was measured in an Infinite M200 microplate reader from Tecan. Positive control (Ctrl +) for integrity corresponds to virions that were not disrupted (virions in the absence of peptides). Viral supernatants treated with 70% (v/v) ethanol and 0.5% (v/v) Triton X-100 were used as controls for viral disruption (Ctrl -).

6. pepR inhibits CXCR4-tropic HIV-1 clones carrying patient-derived envelope glycoproteins



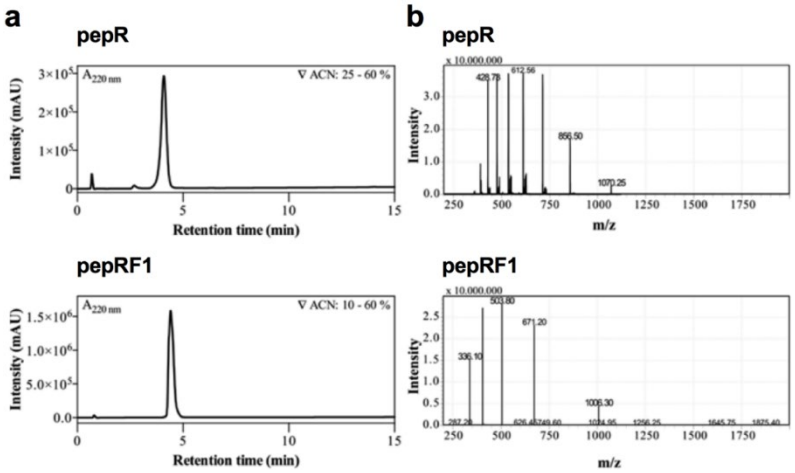
Supplementary Figure S6. **Antiviral effect of pepR on HIV-1 viruses carrying primary CXCR4 and CCR5 HIV-1 envelopes.** Dose-response curves (a), and corresponding mean IC_{50} values (b) for inhibition of viral infection of pepR against viruses carrying primary CXCR4-tropic envelopes (clones X4-1 and X4-2) and CCR5-tropic envelopes (clones R5-1 and R5-2) isolated from a patient, and against the reference strains NL4.3 (CXCR4-tropic) and NLAD8 (CCR5-tropic). Infection inhibition was evaluated by infecting TZM-bl cells in the presence of increasing concentrations of pepR. Viral infectivity was measured 40h post-infection through β-galactosidase reporter-gene expression and converted to percentage of viral infection inhibition. Data points represent the average of results obtained from two independent experiments.

7. CCR5 recognition by pepR and pepRF1



Supplementary Figure S7. CCR5 detection on the cell surface by pepR and pepRF1. $CD4^+$ T-lymphocytes were pre-incubated 10 min at room temperature with different concentrations (5, 78, 1250 nM) of pepRF1, pepR, T20 and AMD3100. Cells were stained with CCR5 monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of cells that were positive for the surface staining of CCR5. Data points represent the results obtained from one experiment.

8. Analytical reverse-phase HPLC and ESI-MS of purified pepR and pepRF1



Supplementary Figure S8. (a) Analytical RP-HPLC chromatograms and (b) ESI mass spectra of purified pepR and pepRF1.

Article 4 : Reservoir (en préparation)

Article 5 : Inhibition of HIV replication by the 12 interferon-α subtypes (en préparation)

Article 6 : Rev (en préparation)