



**HAL**  
open science

# Impact des multiples infections naturelles par des rétrovirus simiens sur la charge provirale et la clonalité rétrovirale *in vivo*

Brice Jegado

► **To cite this version:**

Brice Jegado. Impact des multiples infections naturelles par des rétrovirus simiens sur la charge provirale et la clonalité rétrovirale *in vivo*. Maladies infectieuses. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1272 . tel-03353420

**HAL Id: tel-03353420**

**<https://theses.hal.science/tel-03353420>**

Submitted on 24 Sep 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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1272

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale : N° ED 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat : Virologie**  
**Discipline : Biologie**

Soutenue publiquement le 17/12/2020, par :  
**Brice Jegado**

---

**Impact des multiples infections naturelles par  
des rétrovirus simiens sur la charge provirale  
et la clonalité rétrovirale *in vivo***

---

Devant le jury composé de :

Docteur Martine PEETERS  
Professeur Anne VAN DEN BROEKE  
Docteur Sébastien CALVIGNAC-SPENCER  
Docteur Mathias FAURE  
Docteur Rejane RUA  
Docteur Jocelyn TURPIN

Rapportrice  
Rapportrice  
Examineur  
Examineur  
Examinatrice  
Invité

Professeur Renaud MAHIEUX  
Docteur David FOUCHET

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



# Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

## COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



## Résumé

Les primates non-humains (PNH) sont les hôtes naturels de plusieurs rétrovirus exogènes tels que STLV-1 (virus de la leucémie simienne de type 1) et SFV (virus foamy simien), et certains cas de co-infections naturelles ont été répertoriés (SFV/STLV-1). Comme HTLV-1 chez l'Homme, STLV-1 est l'agent étiologique de l'ATL (leucémie à cellule T de l'adulte), mais la majorité des PNH infectés restent asymptomatiques. HTLV-1 promeut l'expansion clonale des cellules infectées et l'expansion clonale de STLV-1 a également été démontrée *in vivo* chez les PNH (Turpin et al., 2017). SFV, lui, provoque une infection asymptomatique, mais aucune donnée n'est disponible quant à la régulation de la réplication de SFV en cas de co-infection. L'objectif du projet consiste à évaluer l'influence de STLV-1 sur la charge provirale (PVL) et la clonalité rétrovirale de SFV chez des babouins naturellement infectés par SFV et STLV-1. Nous avons tout d'abord montré que la PVL de SFV augmente dans le sang des babouins naturellement co-infectés (Alais et al., 2018), par rapport aux animaux infectés uniquement par SFV. Nous avons ensuite démontré que SFV est capable de se répliquer par expansion clonale des cellules infectées *in vivo* et nos premiers résultats suggèrent que l'expansion clonale de SFV n'est pas favorisée par STLV-1. Enfin, une approche de DNA-FISH (Fluorescence *in situ* hybridization), nous permettra de déterminer si, *in vivo*, une même cellule peut être co-infectée par les deux rétrovirus SFV et STLV-1. Ce projet permet d'apporter des informations sur la

réplication du virus SFV et met en avant l'influence des co-infections rétrovirales sur la réplication des rétrovirus exogènes *in vivo*.

**Mots-clés :** SFV, STLV-1, clonalité, LM-PCR, rétrovirus, ATL, transmission inter-espèces, modèle animal.

**Équipe d'accueil :** Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), équipe Oncogenèse Rétrovirale, INSERM U1111 - Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, F-69007, Lyon, France.

## **Abstract: Impact of exogenous retroviruses within naturally infected non-human primates on the proviral load and retroviral clonality *in vivo***

Non-human primates (NHPs) are natural hosts for exogenous retroviruses such as STLV-1 (Simian T-cell Leukemia Virus type 1) and SFV (Simian Foamy Virus), and natural cases of co-infections have been reported (SFV/STLV-1). As described for HTLV-1 in humans, STLV-1 is the etiologic agent of ATL (Adult T cell Leukemia) in NHPs, but the majority of infected animals remain asymptomatic. Furthermore, as for HTLV-1, which is able to replicate through clonal expansion of infected cells, the quantification of the proviral load together with the identification of proviral integration sites in STLV-1-infected NHPs have highlighted the clonal expansion of STLV-1 *in vivo* (Turpin et al., 2017). On the other hand, SFV is considered as non-pathogenic, but whether co-infections might regulate SFV replication is unknown. The aim of the project is to evaluate the influence of STLV-1 on the proviral load and the retroviral clonality of SFV in naturally infected baboons. First, we have reported that the SFV proviral load increases in the blood of baboons naturally co-infected with SFV and STLV-1 (Alais et al., 2018). We next demonstrate for the first time that SFV is able to replicate by clonal expansion of infected cells *in vivo*, as described for HTLV-1 and STLV-1. However, STLV-1 does not seem to promote clonal expansion of SFV *in vivo*. Lastly, in order to analyze if one unique cell can be co-infected by both SFV and STLV-1 *in vivo*, we develop a DNA-FISH (fluorescence in situ hybridization) approach. Altogether, this work sheds light on the replication



of SFV in naturally infected NHPs, and emphasizes the fact that co-infection can significantly impact the replication of exogenous viruses *in vivo*.

*A mon défunt père, Philippe Jegado  
A ma très chère maman, Elisabeth Jegado*

*Ce manuscrit de thèse représente un investissement de 4 années de recherches. Je suis fier et reconnaissant de vous dédier mon travail. Merci d'avoir contribué à ma réussite. Papa, je sais que tu seras toujours près de nous comme tu l'as été de ton vivant. Repose en paix.*

*A mon épouse, Azra Farvin Jegado*

*Azra, je ne pourrais écrire tout ce que je ressens pour toi dans ces quelques lignes. Ces années passées à tes côtés ont été sublimées par ton amour et notre mariage. Je te dédie ce travail en témoignage de ma reconnaissance et de l'amour que je te porte.*

*A mon frère, Mathieu Besnard*

*Mathieu, je ne saurai exprimer toute l'affection que j'ai pour toi. Je te dédie mon travail en témoignage de l'amour d'un frère à un autre. Puissent nos liens fraternels se consolider encore plus. Je te souhaite tout le bonheur du monde.*

*Merci d'avoir cru en moi.*

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, de près ou de loin, à travers ces quelques lignes.

Dans un premier temps, je souhaite remercier le Pr Anne Van den Broeke et le Dr Martine Peeters d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Dr Rejane Rua, le Dr Sébastien Calvignac-Spencer et le Dr Jocelyn Turpin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Enfin, je remercie le Pr Mathias Faure d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Par la même occasion, je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Ali Saïb, le Dr Marie Sémon et le Dr Vincent Grass pour leurs précieux conseils au cours de mon doctorat.

Je remercie tout particulièrement le Pr Renaud Mahieux de m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour son encadrement scientifique en tant que directeur de thèse. Tu as toujours été bienveillant et a su me conseiller lors de nos discussions très constructives. Merci de m'avoir accordé de présenter mes travaux lors de congrès nationaux et internationaux mais aussi de m'avoir permis de rencontrer de nombreux scientifiques collaborant ou non avec nous sur le projet. Tout cela m'a permis de développer une maturité et une autonomie scientifique lors de ces 4 années de thèse. Je te remercie aussi pour le suivi et les corrections (en un temps record) de mon manuscrit de thèse et des articles. Ta passion pour la recherche et tes connaissances scientifiques sont admirables et forcent le respect. Je te remercie très sincèrement pour la confiance dont tu as fait preuve à mon égard pour que le projet soit mené à bien.

Je tiens à remercier le Dr David Fouchet, co-directeur de mon projet ainsi que le Pr Dominique Pontier. Je regrette que notre collaboration n'ait pas pu être menée à bien en raison des différents événements mais je vous remercie pour nos discussions et vos conseils. Je souhaite également remercier le laboratoire d'excellence « Ecofect » d'avoir financé mon doctorat pendant ces 4 années et bien sûr les membres du CIRI, de l'ENS et de l'université Lyon 1 que j'ai pu rencontrer.

Un grand merci au Dr Jocelyn Turpin pour son encadrement (presque) totalement à distance tout au long de ces 4 années mais aussi pour ses conseils avisés. Merci d'avoir pris le temps de me former et de me guider à travers ce parcours semé d'obstacles. Encore merci pour la bière à Londres, je t'en dois toujours une. Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi et je te souhaite sincèrement un très bel avenir professionnel et personnel. J'en profite pour remercier à nouveau le Dr Jocelyn Turpin ainsi que le Dr Anat Melamed, le Pr

Charles Bangham et toute l'unité de médecine à l'Imperial College de Londres de m'avoir accueilli et formé sur l'analyse de la clonalité rétrovirale.

Je remercie le Dr Magali Naville et le Pr Jean-Nicolas Volff dans le cadre des analyses bio-informatiques. Magali, je te remercie pour ton expertise en la matière, pour nos discussions, tes explications ainsi que pour la création du « pipeline » bio-informatique, une étape indispensable pour le projet. Je remercie à nouveau le Dr Anat Melamed pour son aide très précieuse et ses conseils. Je vous remercie d'avoir pris le temps de m'expliquer des programmes quelques peu obscurs pour le commun des mortels. J'ai ainsi pu développer de nouveaux outils qui me seront très utiles à l'avenir, bien que du chemin reste à faire pour me lancer dans la programmation ! Merci au Dr Romain Lacoste, à la station de primatologie et bien entendu à tous les babouins pour les échantillons et merci aux Drs Barthélémy Ngoubangoye et Augustin Mouinga-Ondémé pour notre début de collaboration. Merci à l'équipe du Dr Marlène Dreux de m'avoir accueilli pour que je puisse réaliser mes expérimentations. Enfin, merci au Pr Patrick Lomonte et Simon Roubille pour notre collaboration dans la mise en place du FISH sur HTLV-1 *in vitro* et le Dr Laurence Game et son équipe à Londres pour le séquençage à haut-débit et leurs conseils.

Mes remerciements à tous les membres de l'équipe Oncogénèse Rétrovirale, passés et présents. Je tiens à remercier le Dr Hélène Dutartre et le Dr Chloé Journo pour leur expertise scientifique mais aussi pour leur conseil lors de la préparation de mes différents oraux et écrits. Je suis aussi très reconnaissant de votre soutien ces dernières semaines qui ont été éprouvantes pour toute l'équipe. Hélène, encore merci de m'avoir poussé à faire une offre pour l'achat de l'appartement, j'ai enfin un bureau pour travailler. Un grand merci à Sandrine, la maman du labo, pour toutes nos discussions sur le plan humain et scientifique mais aussi pour le projet qui n'aurait pas existé sans tout le travail remarquable que tu as fourni au préalable. Ça a été un réel plaisir de partager la paillasse du sous-sol avec toi pendant ces années (sans sous-entendu) et c'était aussi rassurant d'avoir un pompier dans l'équipe. Je remercie les membres actuels de l'équipe, Brenda, Gustave, Auriane, Julien, Samuel stagiaire et Janelle pour leur bonne humeur au labo ainsi que leur aide et soutien dans la préparation de ma soutenance. Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai pris plaisir à former au cours de mon projet : Gustave, Edouard, Alix et Tayssa. J'espère que ma formation vous a été profitable. Je remercie les anciens membres avec qui j'ai eu de plus brèves interactions : Aurélien, Youssef, Maria-Joao, Sayo, Stefania, Victoria, Bertrand et Laurent. Merci aussi à l'équipe des LR pour votre dynamisme et votre bonne humeur qui sont toujours agréables.

Je tiens à remercier tous mes amis Lyonnais (et pour certains, anciens membres de l'équipe) : Nico (dit le « collègue » ou le meilleur ami d'Oullins), Momo, Loulou, Hugo, Max le chevelu, Elise, Olivier, Sandrine, Gergès, Elodie et

bien entendu Jack et Daniels. Merci à vous d'avoir été là pour me soutenir mais aussi pour toutes ces soirées « traquenards ». Spéciale dédicace au ti'punch et aux lunettes de soleil du lundi. Vous êtes des amis en or. Je remercie bien entendu toute ma famille et en particulier mes parents et mon frère car c'est grâce à vous et votre soutien que j'en suis arrivé là aujourd'hui même si vous ne savez toujours pas sur quoi je travaille. Je remercie mes amis et témoins, Aurélie et Niko, qui ont toujours cru en moi. Enfin, je remercie mon épouse, Azra dit Zazou, pour m'avoir supporté pendant ces années, notamment lors de la rédaction de mon manuscrit. Merci à toi et aussi à Kalu et Kala d'avoir été là dans les meilleurs comme dans les pires moments.

Enfin, un grand merci à ceux qui liront ce manuscrit.

# Table des matières

REMERCIEMENTS .....	9
AVANT-PROPOS .....	19
TABLE DES FIGURES.....	23
TABLE DES TABLEAUX.....	26
ABREVIATIONS.....	27
INTRODUCTION.....	31
<b>CHAPITRE 1. LES PRIMATES NON-HUMAINS .....</b>	<b>32</b>
A. Classification .....	32
B. Les PNH, modèles d'étude des infections virales.....	33
<b>CHAPITRE 2. LA FAMILLE DES <i>RETROVIRIDAE</i> .....</b>	<b>37</b>
A. Définition .....	37
B. Taxonomie.....	37
C. Organisation génomique.....	40
<b>CHAPITRE 3. LES RETROVIRUS SIMIENS ET HUMAINS.....</b>	<b>41</b>

A.	Les deltarétrovirus : revue à propos de STLV-1, un modèle d'étude des infections par HTLV-1 .....	42
I.	Résumé de la revue .....	44
II.	Introduction .....	44
III.	Épidémiologie de STLV-1 .....	47
IV.	Phylogénie de STLV-1 .....	50
V.	Transmission inter-espèces de STLV-1 .....	53
VI.	Pathologies liées à STLV-1 chez les PNH naturellement infectés.....	53
VII.	Modèles des PNH infectés par STLV-1 .....	56
i.	<i>Après une infection naturelle par STLV-1.....</i>	56
ii.	<i>Après une transmission inter-espèces de STLV-1 .....</i>	59
iii.	<i>Après une infection artificielle par HTLV-1.....</i>	59
B.	Les virus foamy simiens .....	64
I.	Origine et pathologie associée .....	64
II.	Transmission et prévalence des SFV parmi les PNH.....	64
III.	Phylogénie des SFV.....	65
IV.	Les virus foamy simiens chez l'Homme.....	67
i.	<i>Origine .....</i>	67
ii.	<i>Transmissions zoonotiques des PNH à l'Homme .....</i>	68
iii.	<i>Prévalence et Pathologie associée.....</i>	69
C.	Les Lentivirus simiens à l'origine du VIH-1 et VIH-2 .....	69

## CHAPITRE 4. INFECTION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE PAR LES

### RETROVIRUS SIMIENS ET HUMAINS ..... 73

A.	Tropisme cellulaire.....	73
B.	Étapes précoces du cycle de réplication des rétrovirus.....	75
I.	Attachement aux récepteurs et fusion des membranes.....	75
II.	Transcription inverse.....	77
III.	Aspects moléculaires de l'intégration provirale.....	79
i.	Mécanisme d'intégration.....	79
ii.	Formes non intégrées de l'ADN viral.....	84
C.	Expression du génome proviral et production des virions...	86
D.	Dissémination rétrovirale.....	89
I.	Cas du virus foamy simien.....	90
II.	Infection <i>de novo</i> par le virus libre.....	90
III.	Infection <i>de novo</i> par un contact cellule-cellule.....	92

### CHAPITRE 5. ÉTAT DE L'ART DE LA CLONALITE RETROVIRALE ..... 96

A.	Notion d'expansion clonale des cellules infectées.....	96
B.	Clonalité des virus STLV-1 et HTLV-1.....	97
I.	Infection persistante chez l'hôte.....	97
II.	Rôle de Tax et HBZ/SBZ dans l'expansion clonale.....	98
III.	Rôle des sites d'intégrations sur la clonalité d'HTLV-1.....	100



i.	<i>Sites d'intégration préférentiels du provirus.....</i>	100
ii.	<i>Impact des UIS sur l'expansion clonale des cellules infectées .....</i>	104
iii.	<i>Influence des UIS sur l'expression des génomes cellulaire et provirale.....</i>	106
IV.	Influence de la clonalité rétrovirale et de la charge provirale sur la pathogenèse d'HTLV-1 et STLV-1 .....	112
i.	<i>Influence de clonalité sur l'ATL et l'HAM/TSP.....</i>	112
ii.	<i>Influence de la charge provirale sur l'ATL et HAM/TSP.....</i>	113
iii.	<i>Données sur STLV-1 et les PNH.....</i>	114
V.	Influence des co-infections non rétrovirales sur l'expansion clonale des virus HTLV-1 .....	115
C.	<b>Clonalité du VIH-1 et SIV .....</b>	<b>116</b>
I.	Mise en place des cellules réservoirs et latence.....	116
II.	Mécanismes d'expansion clonale des cellules infectées par les virus VIH-1 et SIV.....	117
i.	<i>Expansion clonale par stimulation antigénique .....</i>	119
ii.	<i>Expansion clonale homéostatique.....</i>	120
iii.	<i>Expansion clonale médiée par l'intégration provirale .....</i>	120
D.	<b>Données connues à ce jour à propos du SFV et PFV.....</b>	<b>122</b>
I.	Latence du SFV dans les cellules infectées .....	122
II.	Sites d'intégrations <i>in vitro</i> .....	122

E.	Clonalité étudiée chez d'autres deltarétrovirus.....	124
I.	Le virus de la leucose bovine.....	125
II.	Le virus HTLV-2 .....	126
	PROBLÉMATIQUE.....	128
	RÉSULTATS .....	134
	CHAPITRE 1. INFLUENCE DE STLV-1 SUR LA CHARGE PROVIRALE DE SFV CHEZ DES BABOUINS NATURELLEMENT CO-INFECTES .....	135
A.	Contexte de l'étude et résultats .....	135
B.	Article .....	137
C.	Discussion.....	152
	CHAPITRE 2. SEQUENÇAGE DU GENOME COMPLET DU PROVIRUS DE SFV CHEZ LES BABOUINS .....	155
A.	Contexte de l'étude et résultats .....	155
B.	Article .....	157
	CHAPITRE 3. CLONALITE RETROVIRALE DES VIRUS SIMIENS SFV ET STLV-1 CHEZ DES BABOUINS NATURELLEMENT INFECTES.....	162
A.	Introduction.....	162
B.	Matériels et méthodes.....	164

I.	Cohorte de babouins.....	164
II.	Lignées cellulaires .....	165
III.	Extraction de l'ADN génomique.....	165
IV.	Séquençage du LTR proviral.....	168
V.	Amplification des UIS proviraux de SFV et STLV-1.....	172
VI.	Préparation des adaptateurs.....	175
VII.	Préparation de la banque de séquençage.....	176
VIII.	Séquençage à haut-débit (HTS).....	177
IX.	Analyses <i>in silico</i> des données de l'HTS.....	178
	<i>i.</i> Contrôle de la qualité des séquences.....	179
	<i>ii.</i> Filtre et nettoyage des données.....	182
	<i>iii.</i> Alignement des séquences contre le génome de référence.....	184
	<i>iv.</i> Identification des clones et quantification de l'abondance clonale..	186
	<i>v.</i> Élimination des sites aspécifiques .....	187
	<i>vi.</i> Élimination des sites dupliqués entre les échantillons.....	188
	<i>vii.</i> Élimination des séquences jumelles.....	189
	<i>viii.</i> Profils de clonalité et calcul de l'index d'oligoclonalité (OCI).....	190
	<i>ix.</i> Tests statistiques .....	191
C.	Résultats.....	192
	I.    Analyse du polymorphisme du LTR proviral de SFV et STLV-1 .....	192
	II.   Clonalité de SFV et STLV-1 .....	200
	<i>i.</i> Contrôle de la qualité des séquences.....	200

ii.	<i>Validation de l'expérimentation .....</i>	201
iii.	<i>Prolifération clonale du virus SFV dans le sang des babouins mono-infectés.....</i>	203
iv.	<i>Influence de STL-1 sur la réplication de SFV .....</i>	204
D.	Discussion.....	211
CHAPITRE 4. VISUALISATION DE L'INTEGRATION PROVIRALE		
D'HTLV-1 PAR FISH <i>IN VITRO</i> .....		215
A.	Introduction.....	215
B.	Matériels et méthodes.....	216
I.	Lignées cellulaires .....	216
II.	Fixation et perméabilisation des cellules .....	216
III.	Marquage des sondes HTLV-1 et DNA-FISH .....	218
C.	Résultats.....	218
D.	Discussion.....	219
DISCUSSION.....		221
BIBLIOGRAPHIE.....		233
ANNEXES.....		280

## **Avant-propos**

Mon travail de thèse a débuté en Décembre 2016 après avoir obtenu mon diplôme de Master en virologie moléculaire et médicale à Paris. Ces années de doctorat ont été menées sous la direction du Pr Renaud Mahieux qui dirige l'équipe d'oncogenèse rétrovirale au centre international de recherche en infectiologie (CIRI) et sous la co-direction du Dr David Fouchet au sein du laboratoire de biométrie et biologie évolutive dirigé par le Pr Dominique Pontier. Ils m'ont donné l'opportunité de découvrir la ville de Lyon et de me retrouver aujourd'hui ici à finaliser le fruit de mes 4 années de recherche.

Le cœur de mon projet consiste à étudier l'influence d'infections multiples par des rétrovirus exogènes sur la clonalité rétrovirale et la charge provirale chez des babouins naturellement infectés. En d'autres termes, nous cherchons à identifier les sites d'intégration des rétrovirus simiens au sein du génome de l'hôte, notamment le virus foamy simien (SFV) et le virus T-lymphotrope simien de type 1 (STLV-1), à partir d'échantillons de 2 cohortes de babouins, l'une uniquement infectée par SFV et l'autre co-infectée par les 2 virus. Cela nous permettrait d'identifier les régions génomique cibles et de conclure sur l'expression provirale de SFV et STLV-1 entre les 2 cohortes et ainsi de voir l'influence de la co-infection sur la réplication de SFV. Ce projet est né d'une étude menée à bien par le Dr Sandrine Alais (Alais et al., 2018) et d'une étroite collaboration avec le centre de primatologie de Rousset-sur-Arc, dirigé par le Dr Romain Lacoste, au sein duquel sont hébergés les singes. L'étude d'Alais et al (à laquelle j'ai contribué) montre une

augmentation de la charge provirale de SFV dans le sang des babouins co-infectés avec STLV-1 ainsi qu'une transactivation du LTR du virus foamy par la protéine Tax d'HTLV-1 *in vitro*. Cela indique une possible interaction entre ces virus au sein de l'hôte.

Ce projet, financé par le Labex Ecofect, est la résultante de nombreuses collaborations qui m'ont permis aujourd'hui de rédiger mon manuscrit. De plus, l'aspect intéressant de ce projet et ce qui à mon sens représente sa force, est la pluridisciplinarité qui y est impliquée puisqu'elle fait intervenir l'infectiologie, la virologie, la biologie moléculaire, la bioinformatique ainsi que la modélisation mathématique. Malheureusement, ce dernier aspect ne sera pas traité ici, tout simplement par manque de temps, puisque les résultats n'ont été obtenus que très récemment et le contexte lié au Covid19 n'a pas joué en notre faveur. C'est pourquoi je présenterai uniquement les aspects de mise en place et d'optimisation des expérimentations dans mon manuscrit avec les résultats préliminaires (les analyses et la rédaction de l'article correspondant étant encore en cours). Un point important à signaler est que je présenterai dans mon introduction des informations relatives aux virus VIH-1 et SIV puisqu'ils représentent des modèles très étudiés concernant les mécanismes d'intégration provirale et de la pathogenèse. Il est utile de spécifier que les virus HTLV-1/STLV-1 et VIH-1/SIV se répliquent majoritairement par 2 mécanismes différents, respectivement, l'expansion clonale des cellules infectées et la réplication productive bien qu'ils ne soient pas exclusifs. Ce sont ces caractéristiques que je vais mettre en avant dans

mon introduction afin de pouvoir discuter des résultats obtenus en particulier pour le virus SFV pour lequel peu de données étaient disponibles sur ses mécanismes de propagation avant ces travaux.

Une étape indispensable pour répondre à la problématique de ma thèse fut la mise en place et l'optimisation d'une technique, nommée *Ligation Mediated-Polymerase Chain Reaction* (LM-PCR), permettant d'analyser la clonalité sur des échantillons co-infectés. Cela a permis d'apporter une expertise technique supplémentaire au sein de l'équipe, sous la supervision du Dr Jocelyn Turpin dans l'équipe dirigée par le Pr Charles Bangham à Londres. La mise en place de l'analyse bio-informatique a nécessité l'aide indispensable du Dr Magali Naville au sein de l'équipe du Pr Jean-Nicolas Volff à l'institut de génomique fonctionnelle de Lyon (IGFL) ainsi que du Dr Anat Melamed, faisant partie de l'équipe du Pr Charles Bangham.

De plus, ce projet m'a donné l'opportunité d'encadrer un étudiant en seconde année de Master, Gustave Fourcaud, qui débute sa thèse sur la continuité de mon projet au sein de l'équipe suite à sa réussite au concours de l'Ecole Doctorale.

J'ai également développé des projets annexes, notamment afin d'apporter les bases nécessaires au développement de l'étude de la clonalité chez les virus foamy, comme le séquençage du génome complet du provirus de SFV chez le babouin qui était non répertorié dans les bases de données avant cette étude. Ce dernier a fait l'objet d'une publication scientifique (Jegado and Mahieux, 2019) qui

sera présenté dans les résultats de mon manuscrit. En continuité du projet central de ma thèse sur l'interaction des virus SFV et STLV-1 en cas de co-infection d'un même hôte, j'ai voulu évaluer si une cellule unique pouvait-être co-infectée par 2 rétrovirus différents *in vitro* par l'utilisation d'une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Ce projet a démarré grâce à notre collaboration avec l'équipe dirigée par le Pr Patrick Lomonte à l'Institut Neuromyogène de Lyon et Simon Roubille, doctorant au sein de cette même équipe. J'ai pu obtenir des résultats préliminaires sur l'optimisation de la technique que je présenterai dans la partie résultats.

Le déroulement de mon projet s'est accompagné de la rédaction d'une revue dans *Retrovirology* (Jégado et al., 2019) qui figure dans l'introduction ainsi que d'autres articles, non liés à mon projet, présentés en **annexe 5**.

Afin de faciliter la lecture de mon manuscrit au format électronique, il est préférable de l'afficher en double page afin de placer les figures référencées en vis-à-vis du texte correspondant.



# Table des figures

Figure 1. Représentation des études réalisées chez les primates non-humains et associées aux infections virales chez l'Homme.....	35
Figure 2. Comparaison des structures génomiques et transcrits des rétrovirus simples et complexes.....	39
Figure 3. Épidémiologie de STLV-1 chez les PNH sauvages ou en captivité provenant d'Asie et d'Afrique .....	49
Figure 4. Épidémiologie de SFV chez les primates non-humains (PNH) sauvages ou en captivité provenant d'Afrique, d'Asie et du Nouveau Monde.....	63
Figure 5. Tropisme cellulaire des rétrovirus VIH-1/SIV, HTLV-1/STLV-1 et SFV dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) in vivo.....	73
Figure 6. Mécanisme d'intégration du provirus dans l'ADN génomique cellulaire. ....	80
Figure 7. Représentation des formes non-intégrées de l'ADN viral et provirale après import du complexe de préintégration dans le noyau cellulaire. ....	83
Figure 8. Comparaison des étapes tardives entre les Orthorétrovirus (VIH-1 et HTLV-1) et les virus foamy (SFV et PFV).....	87
Figure 9. Expansion clonale des cellules infectées par un rétrovirus au cours du temps.....	95
Figure 10. Sites d'intégrations préférentiels du provirus HTLV-1 dans le génome de l'hôte.....	99

Figure 11. Lien entre les sites d'intégration du virus HTLV-1 et l'expansion clonale des cellules infectées. ....	103
Figure 12. Lien entre les sites d'intégration du virus HTLV-1 et l'expression de la protéine Tax d'HTLV-1.....	105
Figure 13. Influence de la clonalité d'HTLV-1 sur le développement des pathologies ATL et HAM/TSP.....	111
Figure 14. Influence de l'intégration provirale du VIH-1 sur l'expansion clonale des cellules infectées.....	118
Figure 15. Principe de la Ligation Mediated - Polymerase Chain Reaction (LM-PCR) associée au séquençage à haut débit (HTS) adapté à partir de Gillet et al., 2017. ....	171
Figure 16. Structure des produits PCR obtenus après amplification des sites d'intégration proviraux de SFV ou STLV-1.....	173
Figure 17. Structure d'un adaptateur.....	175
Figure 18. Séquençage des amplicons SFV et STLV-1 par HTS. ....	177
Figure 19. Filtre et nettoyage des données obtenues par HTS.....	181
Figure 20. Identification des clones et quantification de l'abondance clonale. ....	185
Figure 21. Exemples de profils de clonalité rétroviral observés après cartographie des sites d'intégrations uniques. ....	190
Figure 22. Sites d'hybridation des amorces LM-PCR à la fin des LTR proviraux de SFV et STLV-1. ....	198

Figure 23. Représentation du nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 dans chaque échantillon.....	205
Figure 24. Nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 pour chaque échantillon dans les différentes cohortes de babouins.....	205
Figure 25. Représentation de l'index d'oligoclonalité (OCI) de SFV et STLV-1 pour chaque échantillon dans les différentes cohortes de babouins.....	207
Figure 26. Représentation de l'index d'oligoclonalité (OCI) de SFV et STLV-1 en fonction de la charge provirale (PVL) de STLV-1 chez les babouins co-infectés...	209
Figure 27. Représentation du nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 en fonction de l'index d'oligoclonalité.....	209
Figure 28. Visualisation par DNA-FISH (DNA-Fluorescent In Situ Hybridization) des intégrations provirales d'HTLV-1 in vitro.....	217

# Table des tableaux

Tableau 1. Études décrivant l'infection naturelle ou expérimentale des PNH par STLV-1 (ou HTLV-1).....	55
Tableau 2. Comparaison des séquences protéiques entre HBZ d'HTLV-1 et SBZ de STLV-1.....	55
Tableau 3. Comparaison des séquences protéiques entre Tax d'HTLV-1 et STLV-1. ....	55
Tableau 4. Liste des amorces permettant d'amplifier le LTR proviraux de SFV et STLV-1 chez les babouins naturellement infectés. ....	167
Tableau 5. Programmes d'amplification des LTR proviraux de SFV et STLV-1.....	167
Tableau 6. Programmes d'amplification des sites d'intégration uniques de SFV et STLV-1 en LM-PCR. ....	173
Tableau 7. Polymorphisme de séquence retrouvé à la fin du LTR proviral de SFV et STLV-1.....	193

# Abréviations

## A

A3G : APOBEC3G

AC : Porteurs asymptomatiques

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGM : Singe vert d'Afrique

ALV : Virus de la leucose aviaire

AP1 : Activator Protein 1

APH-2 : Protéine anti-sens d'HTLV-2

APOBEC3G : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G

ARN : Acide ribonucléique

ARNg : ARN génomique

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

ART : Traitement anti-rétrovirale

ATK : HTLV-1 sous-type A

ATL : Leucémie à cellule T de l'adulte

ATLV : Virus de l'ATL

AZT : Azidothymidine

## B

BACH2 : BTB domain and CNC Homolog 2

BLAST : Basic local alignment search tool

BLV : Virus de la leucose bovine

## C

CCR5 : CC chemokine receptor

CD : Cluster of differentiation

CHIKV : Virus chikungunya

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

Covid19 : Coronavirus disease 2019

CREB : cAMP response element-binding protein

CTCF : CCCTC-binding factor

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor

## D

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing  
Non-integrin  
DENV : Virus de la dengue  
DNA-FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence sur ADN  
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

## **E**

EBOV : Virus Ebola  
EBV : Virus Epstein-Barr  
EL : HTLV-1 sous-type B

## **F**

FT : Facteur de transcription  
FV : Virus foamy

## **G**

GLUT-1 : Transporteur de glucose de type 1

## **H**

HAM/TSP : Myélopathie associée à HTLV-1/Paraparésie spastique tropicale  
HAT : Histone acétyltransférase  
HBV : Virus de l'hépatite B  
HBZ : HTLV-1 basic leucine zipper factor  
HCV : Virus de l'hépatite C  
HDAC : Histone désacétylase  
HEV : Virus de l'hépatite E  
HFV : Virus foamy humain  
HHV-8 : Virus du sarcome de Kaposi  
HLA : Human leukocyte antigen  
HSPG : Protéoglycanes à héparane sulfate  
HSV : Virus de l'herpès simplex  
HTLV : Virus T lymphotrope humain  
HTS : Séquençage à haut-débit

## **I**

ICTV : Comité international de la taxonomie des virus  
IFN : Interféron  
IL : Interleukine  
IN : Intégrase

## **L**

LEDGF/p75 : Lens Epithelium-Derived Growth Factor  
LEF1 : Lymphoid enhancer-binding factor 1  
LM-PCR : Ligation mediated - polymerase chain reaction

LTR : Long terminal repeat

## **M**

MAPQ : Score de la qualité de l'alignement

Mf5 : Souche STLV-1 asiatique

miRNA : MicroARN

MKL2 : MKL/myocardin-like 2

## **N**

NES : Séquence d'export du noyau

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural killer

NRP-1 : Neuropiline-1

## **O**

OCI : Index d'oligoclonalité

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

OMS : Organisation mondiale de la santé

## **P**

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PBS : Site de fixation de l'amorce

PCR : Polymerase chain reaction

PFV : Virus foamy prototype

PI : Promoteur interne

PIC : Complexe de préintégration

PNH : Primates non-humains

PR : Protéase

PTLV : Virus T lymphotrope des primates

PVL : Charge provirale

## **Q**

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction

## **R**

RCM : Singe mangabey à collier blanc

RNA-seq : Séquençage à haut débit des ARN

RPMI : Roswell park memorial institute

RT : Transcriptase inverse

## **S**

SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SBZ : STLV-1 basic leucine zipper factor  
SFV : Virus foamy simien  
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise  
SIV : Virus de l'immunodéficience simienne  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
STC : Strand transfer complex  
STLV : Virus T lymphotrope simien  
SVF : Sérum de veau fœtal  
SV40 : Virus simien 40

## **T**

TCC : Target capture complex  
TCF1 : Transcription factor T-cell factor 1  
TCR : T-cell receptor  
TFBS : Région de fixation de facteurs de la transcription  
TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$   
TSS : Sites d'initiation de la transcription

## **U**

UIS : Site d'intégration unique

## **V**

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire  
VZV : Virus varicelle-zona

## **W**

WNV : Virus West-Nile

## **Z**

ZIKV : Virus Zika



# **INTRODUCTION**

# Chapitre 1. Les primates non-humains

## A. Classification

L'ordre des primates est divisé en 2 sous-ordres : les Strepsirrhini, que sont les prosimians ou primates primitifs (tels que les Lémurs), et les Haplorrhini. Parmi ces derniers, on retrouve le groupe des Simiiformes contenant les Platyrrhini (singes du Nouveau Monde) et les Catarrhini, dont font parties la famille des Cercopithecidae (singe de l'Ancien Monde) et la super-famille des Hominoïdes.

La famille des Cercopithecidae est scindée en 2 sous-familles, les Cercopithecinae et les Colobinae. L'ensemble représente plus de 130 espèces variées de primates non-humains (PNH) tels que les babouins, les mandrills ou encore les macaques. Les singes de l'Ancien Monde sont naturellement présents en Afrique ou en Asie (Stewart and Disotell, 1998). La super-famille des Hominoïdes inclue les grands singes tels que les chimpanzés, les bonobos, les gorilles, les gibbons, les orangs-outans (Perelman et al., 2011) et les humains.

Les singes du Nouveau Monde auraient divergé des Catarrhini il y a environ 40 millions d'années. Ils sont présents en Amérique Centrale, Amérique du Sud ainsi qu'au Mexique où on comptabilise plus de 150 espèces (Schneider, 2000).

## B. Les PNH, modèles d'étude des infections virales

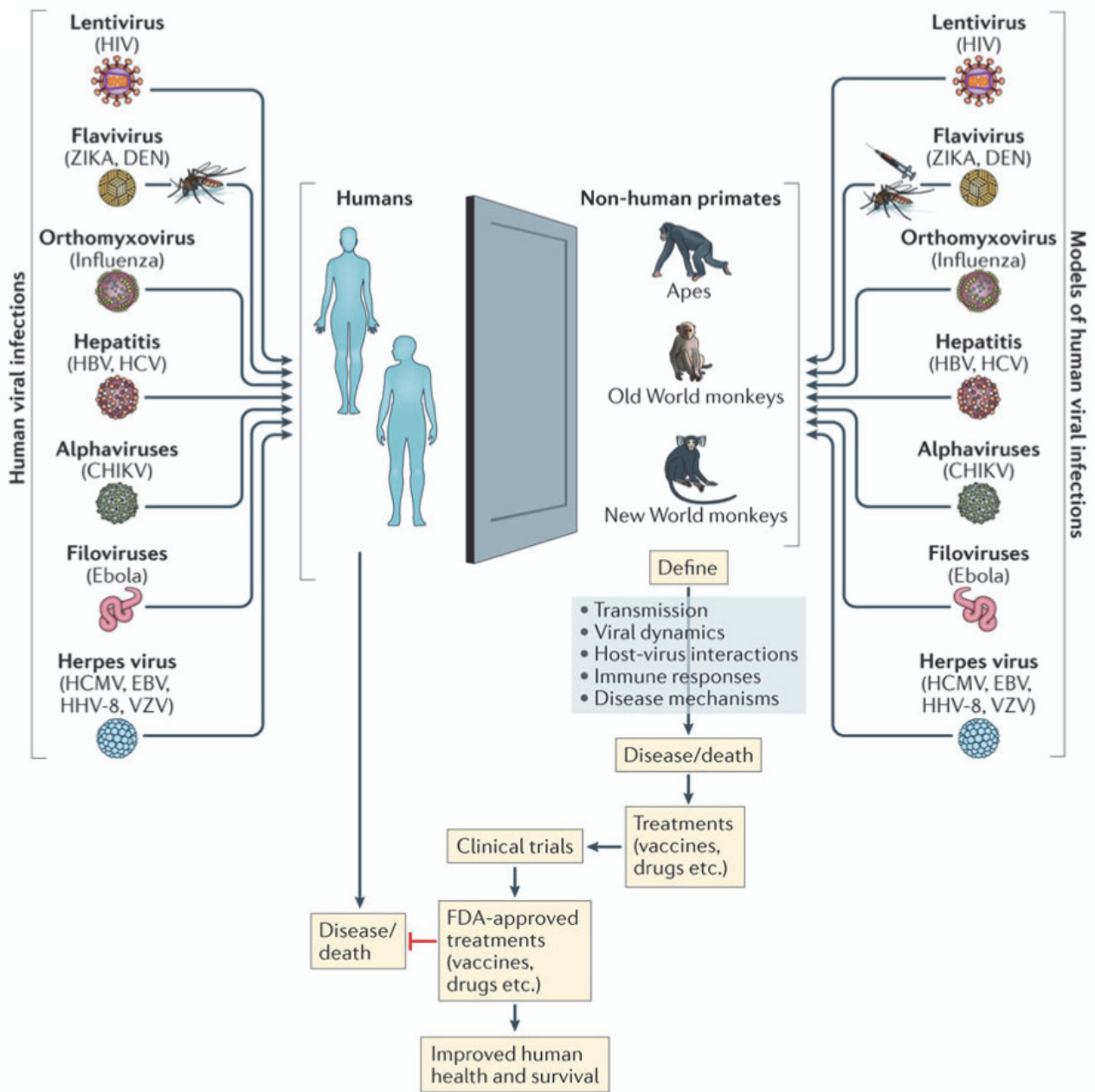
Les modèles animaux représentent un outil puissant dans la compréhension des interactions hôte-pathogènes, ainsi que dans la mise au point de traitement thérapeutique ou d'un vaccin.

Les rongeurs, comme les souris, sont largement utilisés lors d'études scientifiques mais il s'avère que certaines pathologies virales humaines ne peuvent pas être reproduites chez ces modèles. Les chimpanzés représentaient un modèle de choix dans l'étude de la pathogenèse du virus de l'hépatite C (VHC) ainsi que dans la mise au point d'un vaccin puisque le virus ne se réplique pas chez les autres PNH (Estes et al., 2018). Chaque année, entre 100 000 et 200 000 PNH majoritairement captifs sont utilisés dans la recherche scientifique à travers le monde (Arnason, 2018). En France, la réglementation sur l'utilisation des modèles animaux stipule que les animaux doivent provenir d'élevages. De plus, la physiologie des PNH étant proche de celle de l'Homme, certaines pathologies viro-induites et les réponses immunitaires innées et adaptatives associées sont similaires (Estes et al., 2018).

Parmi les PNH, les singes de l'Ancien Monde sont majoritairement utilisés en tant que modèles. Nous pouvons prendre en exemple les études associées au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) identifié comme agent responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise ou SIDA en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983). Plus de 40 espèces de singes d'Afrique sont des hôtes

naturels du SIV (l'homologue simien du VIH-1) et ne développent pas de stade SIDA (Del Prete and Lifson, 2018; Garcia-Tellez et al., 2016; Locher et al., 2001; Sodora et al., 2009). Ces caractéristiques font d'eux des modèles de choix dans la compréhension de la coévolution entre le SIV et son hôte induisant une répression de la progression de la pathologie.

Les différentes espèces de macaques retrouvées en Asie, notamment les macaques rhésus, crabier et à queue de cochon, sont aussi très utilisées dans la pathogenèse du VIH-1 puisque ces espèces développent, à l'inverse des singes africains, un stade SIDA en réponse à l'infection par SIV (Del Prete and Lifson, 2018; Garcia-Tellez et al., 2016; Mallard and Williams, 2018).



**Figure 1. Représentation des études réalisées chez les primates non-humains et associées aux infections virales chez l'Homme.**

Les primates non-humains sont utilisés en tant que modèles dans la compréhension d'une pathogenèse viro-induite, mise au point d'un traitement thérapeutique ou encore d'un vaccin. VIH = virus de l'immunodéficience humaine ; ZIKA = virus Zika ; DEN = virus de la dengue ; Influenza = virus de la grippe ; VHB = virus de l'hépatite B ; VHC = virus de l'hépatite C ; CHIKV = le virus du Chikungunya ; HCMV = cytomégalovirus ; EBV = virus d'Epstein-Barr ; HHV-8 = virus du sarcome de Kaposi ; VZV = le virus varicelle-zona. Figure provenant de l'article d'Estes et al, 2018.

Les PNH sont associés à un large panel d'études d'infections virales (**figure 1**) : les virus de l'hépatite C et E (HCV et HEV), le virus de la dengue (DENV), le virus Zika (ZIKV), le virus West Nile (WNV), le virus du Chikungunya (CHIKV), le virus Ebola (EBOV) etc. (Alves Dos Santos and Fink, 2018; Basler, 2017; Brianti et al., 2017; Burm et al., 2018; Estes et al., 2018; Fujiwara, 2018; Garrison et al., 2019; Manickam et al., 2018; Mifsud et al., 2018; Ouwendijk and Verjans, 2015; Palermo et al., 2013; Pena et al., 2018; Sestak, 2018; Siragam et al., 2018; St Claire et al., 2017; Tang-Huau et al., 2019; Valentine et al., 2019). Au cours de mon projet de thèse je discuterai exclusivement des rétrovirus humains et simiens apparentés : les VIH et SIV, les virus T lymphotropes humains et simiens (HTLV et STLV) ainsi que les virus foamy simiens (SFV).

# Chapitre 2. La famille des *Retroviridae*

## A. Définition

Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le diamètre varie en moyenne de 100 à 200nm (Zhang et al., 2015). Le génome rétroviral est dit diploïde puisque les particules virales possèdent 2 copies d'ARN simple brin à polarité positive. Pendant le cycle de réplication au sein d'une cellule infectée, les rétrovirus ont la particularité de rétrotranscrire leur génome en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse. Ainsi, le génome ADN rétroviral va par la suite être intégré dans le génome de la cellule hôte. Une fois intégré, le génome rétroviral est nommé provirus. La localisation de l'intégration joue un rôle majeur dans l'expression du génome proviral qui sera alors réprimée ou favorisée pour ainsi permettre la production de nouvelles particules virales ou virions (voir introduction chapitre 4-B et C).

## B. Taxonomie

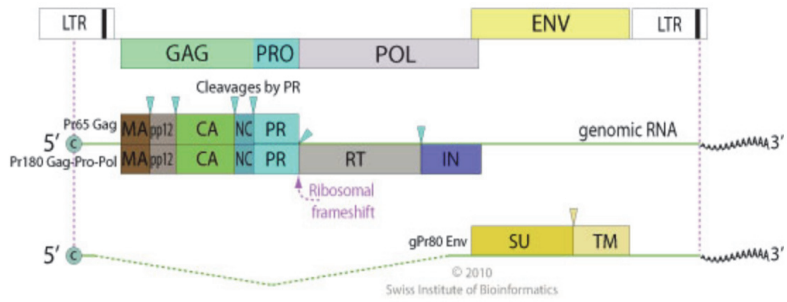
En se basant sur la morphologie des particules virales, leur structure génomique ainsi que leur pouvoir pathogène, le Comité International de la Taxonomie des Virus (ICTV) a scindé la famille des *Retroviridae* en 2 sous-familles :

Les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae*. Chacune possédant, de façon respective, 6 et 5 genres de rétrovirus. Les *Orthoretrovirinae* regroupent les genres Alpharétrovirus, Betarétrovirus, Deltarétrovirus, Epsilonrétrovirus, Gammarétrovirus et Lentivirus totalisant un nombre de 49 espèces rétrovirales. On compte parmi celles-ci des rétrovirus ayant un caractère pathogène pour l'Homme comme le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) ou encore le virus de la leucémie humaine de type 1 (HTLV-1) décrits dans les chapitres 3-C et 3-A de l'introduction.

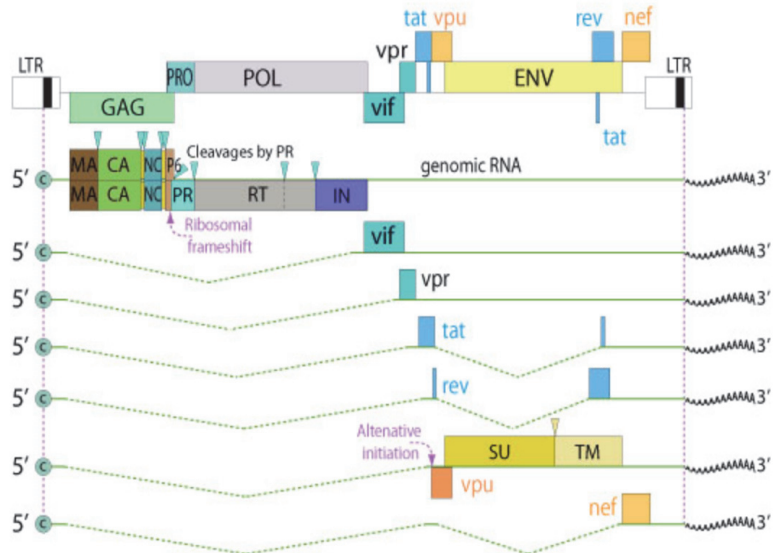
Concernant les *Spumaretrovirinae*, plusieurs classifications ont été réalisées par l'ICTV depuis la première description du virus foamy en 1954 (Enders and Peebles, 1954). Les nombreux cas d'infection par les virus foamy chez un ensemble varié d'animaux a permis d'obtenir, en 2011, une classification regroupant les virus foamy spécifiques d'un hôte donné au sein d'un genre unique, les Spumavirus. Cela aboutissant aux 6 espèces suivantes : le virus foamy simien (SFV) du singe vert d'Afrique, du macaque et du chimpanzé mais aussi les virus foamy bovin, équin et félin. En 2017, l'augmentation du nombre d'infection par les virus foamy identifiée par des techniques de séquençage, notamment chez les primates non-humains, a contraint l'ICTV à mettre à jour la classification des *Spumaretrovirinae* (Khan et al., 2018). Cette sous-famille regroupe maintenant 5 genres : les Simiispumavirus, Prosimiispumavirus, Bovispumavirus, Felispumavirus et Equispumavirus incluant 19 espèces différentes, majoritairement présentes chez



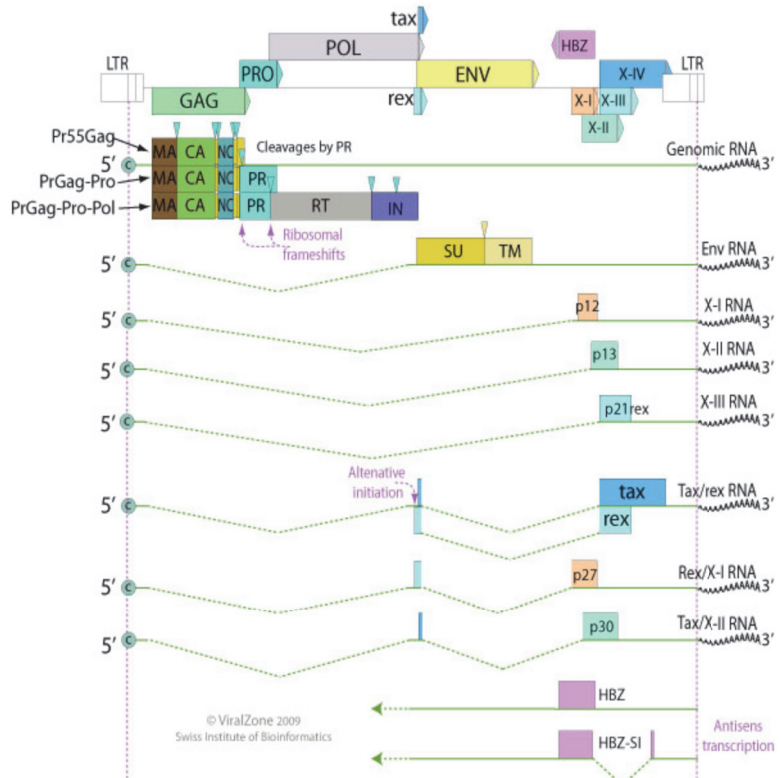
Rétrovirus simple -  
AIV



Rétrovirus complexe -  
VIH-1



Rétrovirus complexe -  
HTLV-1



**Figure 2. Comparaison des structures génomiques et transcrits des rétrovirus simples et complexes.**

Représentation des gènes *gag pro pol* et *env* communs à tous les rétrovirus. Les rétrovirus complexes possèdent des gènes supplémentaires dits auxiliaires. ALV = virus de la leucose aviaire. VIH-1 = virus de l'immunodéficience humaine de type 1. HTLV-1 = virus de la leucémie humaine de type 1. Images provenant de viralzone (<https://viralzone.expasy.org/>).

les Simiispumavirus (SFV). Un nombre encore en expansion grâce aux études permettant d'identifier de nouvelles espèces infectées.

## C. Organisation génomique

Le génome des rétrovirus, sous forme provirale, est encadré en 5' et 3' par 2 séquences longues répétées et non codantes, les LTR 5' et LTR 3' (constitués des régions U3, R et U5). Ils interviennent dans la régulation de l'expression du génome proviral et dans son intégration au sein du génome cellulaire. L'ensemble des rétrovirus possèdent 4 gènes en communs dont 2 gènes structuraux, *gag* et *env*, et 2 gènes enzymatiques *pro* et *pol*.

De plus, la structure génomique des rétrovirus permet de caractériser 2 groupes. Les rétrovirus simples possèdent uniquement les gènes *gag pro pol* et *env*. Les rétrovirus complexes ont des gènes additionnels (Weiss, 1996) qui interviennent à différentes étapes du cycle de réplication ainsi que dans la pathogenèse (**figure 2**, pour revue voir Miyazaki et al., 2011).

# Chapitre 3. Les rétrovirus simiens et humains

La majorité des pathologies infectieuses que l'on retrouve chez l'Homme ont une origine zoonotique, c'est à dire le passage d'un agent pathogène d'une espèce animale à l'Homme (Wolfe et al., 2007). L'organisation mondiale de la santé animale (OIE, 2014) indique que 60% des 1 400 agents pathogènes humains sont d'origine animale et 75% des pathologies animales émergentes peuvent contaminer l'homme. Un changement d'environnement ainsi que des réponses immunitaires variées soumettent les agents pathogènes à des pressions de sélection constantes. Concernant les infections virales, une étape d'adaptation du virus à son nouvel hôte est alors nécessaire afin qu'il puisse se répliquer et se transmettre à d'autres individus pour survivre (Jacquet et al., 2018). Un hôte qui assure la préservation d'un agent pathogène est considéré comme un réservoir. Le franchissement de la barrière d'espèce peut alors être associé à des pathologies chez l'Homme, c'est la notion de maladies émergentes.

Ces infections zoonotiques sont à l'origine d'épidémies (dissémination virale au sein de la population humaine) ou de pandémies (propagation du virus à l'échelle mondiale) au sein de la population (Salvetti and Baize, 2015). L'exemple

le plus récent étant la pandémie du Coronavirus SARS-CoV-2 qui a débuté en Chine en 2019.

Les PNH sont considérés comme une source de virus pouvant émerger dans la population humaine, notamment chez les personnes à risques étant en contact avec les singes (Locatelli and Peeters, 2012). Nous savons aujourd'hui que l'Homme peut être infecté par différents virus foamy simiens (SFV) faisant parties de la sous-famille des *Spumaretrovirinae*. Les virus T-lymphotropes humains (HTLV-1, 3 et 4) et les virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et 2) ont aussi des origines simiennes.

## A. Les deltarétrovirus : revue à propos de STLV-1, un modèle d'étude des infections par HTLV-1

Parmi les PNH circulent les rétrovirus T-lymphotropes simiens de type 1, 2 et 3 et 4 (LeBreton et al., 2014; Locatelli and Peeters, 2012). Certaines études ont décrit les virus STLV-1, STLV-3 et STLV-4 comme étant à l'origine de leurs homologues humains, HTLV-1, HTLV-3 et HTLV-4 de façon respective. Les rétrovirus STLV-2 et HTLV-2 sont phylogénétiquement distincts et aucune transmission zoonotique n'a été mis en évidence (Gessain et al., 2013; LeBreton et al., 2014; Mahieux and Gessain, 2011; Peeters et al., 2014). L'ensemble des virus T-lymphotropes humains (HTLV-1 à 4) et simiens (STLV-1, 2, 3 et 4) forme un groupe nommé les PTLV-1 à 4 (virus des primates T-lymphotropes).

Les rétrovirus STLV-1 et HTLV-1 sont les deltarétrovirus les plus étudiés de par leur pathogénicité ainsi que leur prévalence plus importante. C'est pourquoi, durant mon projet de thèse, mon intérêt se porte en partie sur l'utilisation de STLV-1 en tant que modèle d'étude des infections par HTLV-1. Point important que je discute dans ma revue publiée dans *Retrovirology* en 2019 (PMID : 31843020) :

## **Le rétrovirus simien STLV-1, un modèle d'étude des infections humaines par HTLV-1**

Brice Jegado<sup>1</sup>, Fatah Kashanchi<sup>2</sup>, Hélène Dutartre<sup>1</sup>, Renaud Mahieux<sup>1\*</sup>

1: Centre International de la Recherche en Infectiologie, équipe Oncogénèse Rétrovirale, INSERM U1111 - Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Fondation pour la Recherche Médicale, Labex Ecofect, Lyon, France

2: Laboratoire de virologie moléculaire, Université George Mason, Manassas, VA, USA

\* correspondance : Renaud Mahieux, Ph.D; email: [renaud.mahieux@ens-lyon.fr](mailto:renaud.mahieux@ens-lyon.fr)

### **Mots-clés**

HTLV-1, STLV-1, ATL, prévalence, transmission zoonotique, modèle animal, thérapie

## I. Résumé de la revue

Quelques années après l'identification du rétrovirus HTLV-1 chez l'Homme, son homologue simien nommé STLV-1 a été découvert. Aujourd'hui, nous savons que ce virus est très répandu parmi les primates non-humains. Des études d'épidémiologie ont permis d'identifier les homologues simiens de tous les sous-types d'HTLV-1, à l'exception des sous-types A et G. Comme HTLV-1, le virus simien est un virus oncogène responsable de la leucémie à cellule T de l'adulte (ATL) chez les PNH. En revanche, aucun cas de myélopathie n'a été décrit pour ce virus. Les homologies entre HTLV-1 et STLV-1 font de ce dernier un outil très intéressant pour étudier la pathogenèse d'HTLV-1 ainsi que pour la mise au point de traitements et vaccins.

## II. Introduction

Le premier rétrovirus oncogène humain a été découvert aux États-Unis dans une lignée cellulaire provenant d'un échantillon de sang d'un patient souffrant d'un lymphome cutané (Poiesz et al., 1980, 1981). Quelques années après, la leucémie à cellule T de l'adulte ou ATL (touchant les lymphocytes T CD4+) a été décrite au Japon (Takatsuki et al., 1977; Uchiyama et al., 1977). En 1982, des équipes japonaises ont mis en évidence qu'un rétrovirus était lié au développement de l'ATL chez des patients et l'ont alors nommé le virus de l'ATL (ATLV). D'autres travaux ont montré que des patients ATL au Japon produisaient des anticorps spécifiques dirigés contre le virus découvert aux États-Unis et l'ont

ainsi renommé en virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1). Cela a notamment permis d'identifier le premier foyer endémique lié à ce rétrovirus (Gallo, 2005).

Par la suite, une seconde pathologie a été associée à HTLV-1 chez des patients souffrant d'une neuromyélopathie sévère appelée la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM) (Gessain et al., 1986). Nous savons aujourd'hui qu'environ 5 à 10 millions d'individus sont infectés par HTLV-1 à travers le monde, bien que cette prévalence soit probablement sous-estimée. De plus, 2 à 4% de personnes infectées vont développer soit une ATL soit une TSP/HAM ce qui sous-entend que la majorité des cas infectés par HTLV-1 ne développe pas de pathologies et reste asymptomatique (Futsch et al., 2017). Les zones endémiques d'HTLV-1 sont situées au Japon, en Afrique Centrale, aux Caraïbes et en Amérique du Sud (Gessain and Cassar, 2012). De plus, le génome de ce virus est particulièrement stable, notamment parce qu'il se réplique principalement par expansion clonale des cellules infectées y compris chez les personnes asymptomatiques (Wattel et al., 1995). Les études épidémiologiques couplées à la stabilité génomique du virus ont permis d'identifier les différents sous-types d'HTLV-1. L'ensemble sauf le sous-type A cosmopolite, aurait une origine provenant d'Afrique ou d'Asie (Gessain and Cassar, 2012). Les cas d'ATL ont été décrits chez des personnes infectées par les sous-types A, B et C du virus HTLV-1 ce qui implique que l'ATL n'est pas induite uniquement par le sous-type cosmopolite (Einsiedel et al., 2013; Mahieux et al., 1997a). À noter que les sous-

types B et C n'expriment pas les protéines auxiliaires p12 et/ou p30. Par conséquent, il faut encore déterminer si la fréquence plus faible de cas d'ATL liée à ces sous-types est la conséquence de l'absence de ces protéines.

En 1982, des lymphocytes provenant d'un macaque japonais sont mis en co-culture avec une lignée cellulaire chroniquement infectée par HTLV-1 pouvant produire des particules virales, les cellules MT-2. L'infection des lymphocytes du macaque a permis d'obtenir une lignée simienne infectée par HTLV-1 ce qui suggère que le macaque japonais est sensible à l'infection par ce virus (Miyoshi et al., 1982a). Des études de séroprévalence ont ensuite montré que les macaques japonais sont naturellement infectés par un virus apparenté à HTLV-1 (Miyoshi et al., 1982b). De la même façon, les sérums prélevés chez des primates de l'Ancien Monde ont été testés et ont révélé la présence d'anticorps spécifiques ciblés contre HTLV-1. En revanche, les singes du Nouveau Monde ne semblent pas être porteurs de ce virus ce qui laisse suggérer que l'endémicité de virus simien se situe en Afrique et en Asie (Hayami et al., 1984). Les analyses de séquences ont permis de caractériser cet agent pathogène en tant que virus T-lymphotrope simien (STLV) (Komuro et al., 1984; Watanabe et al., 1986). De nos jours, nous savons que les primates de l'Ancien Monde sont naturellement infectés par divers STLV-1 et que l'origine zoonotique d'HTLV-1 chez l'Homme se situe il y a environ 27 300 ans (95%CI 19 100-35 500) en Afrique, même si des transmissions inter-espèces se produisent encore aujourd'hui (Filippone et al., 2015; Kazanji et al., 2015; Mossoun et al., 2017). En conséquence de l'homologie de séquence entre



HTLV-1 et STLV-1, ces virus ont été groupés dans la famille des PTLV (virus T-lymphotrope des primates) (Guo et al., 1984; Sherman et al., 1992; Watanabe et al., 1985).

Le développement de l'ATL chez les PNH naturellement infectés par STLV-1 (Locatelli and Peeters, 2012; Turpin et al., 2017), malgré l'absence de certaines protéines auxiliaires (Afonso et al., 2019), fait de ce virus un outil indispensable dans la compréhension de la pathogenèse d'HTLV-1. Ma revue compare HTLV-1 et STLV-1 selon différents aspects pour justifier l'utilisation du virus simien comme modèle d'étude.

### **III. Épidémiologie de STLV-1**

Dans le but de d'identifier les espèces simiennes infectées par STLV-1, des études de séroprévalence ont été effectuées grâce à des kits développés sur la détection d'anticorps spécifiques d'HTLV-1 et par PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Concernant les macaques japonais, les sérums prélevés ont été testés et 25% étaient séropositifs. Une séroprévalence élevée était observée chez les singes verts d'Afrique (AGM). D'autres études ont ensuite mis en évidence une infection STLV-1 chez de nombreuses espèces de PNH de l'Ancien Monde (Hunsmann et al., 1983; Lowenstine et al., 1986). L'étude d'Ishikawa et al, basée sur la séroprévalence de STLV-1 chez 567 échantillons de sang de PNH (30 espèces différentes) sauvages et captifs au Kenya, Gabon, Ghana, Cameroun, Éthiopie et Indonésie, a permis de détecter STLV-1 chez de nombreuses espèces : AGM,

singes de Syke, babouins olive, singes rouges, mandrills, gorilles et macaques (Ishikawa et al., 1987). La séroprévalence variait de 11 à 25% en fonction des espèces. D'autres équipes ont révélé la présence de STLV-1 chez les singes vert d'Afrique, les vervets et différentes espèces de babouins en Afrique du Sud et en Éthiopie (Becker et al., 1985; Ishida et al., 1986; Moné et al., 1992; Voevodin et al., 1997a). Comme au Japon, et de la même façon que chez l'Homme, l'infection augmente avec l'âge des individus et l'incidence de la pathologie est plus élevée chez les femelles.



De nombreuses autres études épidémiologiques ont été effectuées (Botha et al., 1985; Courgnaud et al., 2004; Coursaget et al., 1985; Daniel et al., 1988; Dracopoli et al., 1986; Estaquier et al., 1991; Fultz et al., 1990; Hayami et al., 1983; Yamamoto et al., 1983, 1984a, 1984b) permettant ainsi de répertorier 31 espèces de PNH de l’Ancien Monde naturellement infectées par STLV-1 dont la séroprévalence varie de 0 à 80% (Koralnik et al., 1994; Locatelli and Peeters, 2012; Mahieux et al., 1998a; Moné et al., 1992; Saksena et al., 1994; Schatzl et al., 1992; Sintasath et al., 2009; Van Dooren et al., 2007) (**Figure 3**).

Dans l’hypothèse que le virus HTLV-1 est apparu lors d’une transmission zoonotique des PNH vers l’Homme, des analyses de séquences ont été réalisées pour comparer les homologies entre STLV-1 et HTLV-1.

#### IV. Phylogénie de STLV-1

Depuis le premier séquençage du génome proviral complet d’HTLV-1 (Seiki et al., 1983), les analyses phylogénétiques ont permis d’identifier les différents sous-types du virus (Gessain and Cassar, 2012) :

- Le sous-type A cosmopolite retrouvé partout dans le Monde.
- Les sous-types B, D, E, F et G endémiques en Afrique Centrale.
- Le sous-type C Australo-mélanésien qui est le plus divergent.

Basé sur la phylogénie et l'horloge moléculaire, l'origine d'HTLV-1 A, B, D et E est estimée à environ 27 300 ans +/- 8 200 ans tandis que le sous-type F aurait émergé il y a plus de 10 000 ans.

En 1984, l'article de Watanabe et al montre une origine commune entre le virus ATL et HTLV-1 (Watanabe et al., 1984). De plus, des analyses de séquences entre HTLV-1 et STLV-1 provenant de macaques japonais, macaques à queue de cochon, atèles à face rouge, AGM, chimpanzés et babouins ont démontré une même organisation génomique, c'est à dire *LTR-gag-pol-env-pX-LTR* (Filippone et al., 2015; Guo et al., 1984; Kazanji et al., 2015; Komuro et al., 1984; Mossoun et al., 2017; Watanabe et al., 1986). En effet, les séquences de STLV-1 du macaque à queue de cochon en Asie et celui de l'AGM en Afrique ont, respectivement, 90 et 95% d'homologie avec HTLV-1. Cela permet de conclure que STLV-1 peut être séparé en 2 groupes parmi les singes asiatiques et africains et que HTLV-1 aurait une origine zoonotique africaine (Watanabe et al., 1986).

Concernant le sous-type HTLV-1 B, la phylogénie montre que ce virus est très proche de la souche de STLV-1 du chimpanzé (98% d'homologie), mais aussi celles infectant le singe des marais d'Allen (96%) et les gorilles au Zaïre, en République centrafricaine et au Cameroun (Ayoub et al., 2017; Koralnik et al., 1994; Meertens et al., 2001; Voevodin et al., 1997b). Les sous-types D et F sont, quant à eux, homologues du virus STLV-1 pouvant infecter les mandrills et différentes espèces de Cercopithèques au Cameroun et au Gabon (Liégeois et al., 2008; Mahieux et al., 1998b; Makuwa et al., 2004; Sintasath et al., 2009). La région

codant pour les protéines d'enveloppe du virus HTLV-1 sous-type E est génétiquement proche de STLV-1 chez les babouins chacma et jaune (Van Dooren et al., 2001). En revanche, aucun homologue simien n'a été identifié pour les sous-types A et G. L'ensemble de ces données suggère fortement que plusieurs épisodes de transmissions inter-espèces ont eu lieu entre les PNH mais aussi des PNH vers l'Homme.

Les souches les plus divergentes de STLV-1 sont présentes chez 2 espèces de singes asiatiques, le macaque de Tonkean en Indonésie et le macaque à face rouge en Inde, en Thaïlande et en Chine (Ibrahim et al., 1995; Mahieux et al., 1997b; Van Dooren et al., 2005). HTLV-1 sous type C présent en Mélanésie et Australie serait plus proche de la souche simienne infectant le macaque de Tonkean. De plus, la datation moléculaire permet de déduire que l'introduction de STLV-1 en Asie se serait passée il y a environ 156 000 à 269 000 ans (Van Dooren et al., 2001). Cela suggère que l'infection du macaque par STLV-1 aurait par la suite émergée en HTLV-1 dans la population humaine.

L'article de Calvignac et al montre une méthode mise au point pour amplifier les séquences génomiques de STLV-1 à partir d'échantillons d'os provenant d'un singe vervet au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Calvignac et al., 2008). Ainsi, il serait possible d'utiliser cette technique pour étudier l'évolution de STLV-1 au cours du temps chez des échantillons de singes momifiés disponibles en Égypte et en Asie.

## **V. Transmission inter-espèces de STLV-1**

La prévalence du virus HTLV-1 varie entre 1 et 40% chez les adultes et dépend de l'âge, du sexe et de la localisation géographique (Gessain and Cassar, 2012). Nous savons aujourd'hui qu'HTLV-1 peut se transmettre par voie sexuelle, de la mère à l'enfant et par contact avec du sang infecté. Cependant, la transmission de STLV-1 apparaît principalement lors d'un comportement agressif entre les PNH (Leendertz et al., 2004; Nerrienet et al., 1998; Niphuis et al., 2003; d'Offay et al., 2007; Roussel et al., 2015a), même si la transmission sexuelle est plus importante chez certaines espèces comme les vervets (Dracopoli et al., 1986).

## **VI. Pathologies liées à STLV-1 chez les PNH naturellement infectés**

De façon similaire à HTLV-1, la plupart des primates non-humains infectés par STLV-1 restent asymptomatiques tout au long de leur vie (Allan et al., 2001). Concernant la TSP/HAM, aucun PNH ayant développé cette pathologie n'a été identifié y compris chez ceux captifs et infectés depuis longtemps. Pourtant, des études de phylogénie montrent qu'HTLV-1 chez un patient Africain souffrant de TSP/HAM est très similaire à une souche de STLV-1 provenant d'un singe mangabey enfumé asymptomatique (Enose-Akahata et al., 2016). D'autres études ont montré des homologues similaires (Salemi et al., 1998; Touzé et al., 1996). De plus, aucune mutation spécifique au sein du génome d'HTLV-1 n'est liée à cette pathologie. Ainsi, le fait que les PNH ne développent pas de TSP/HAM pourrait

être lié au mode de transmission plutôt qu'à la durée de l'infection puisque chez l'Homme le développement de la pathologie à l'âge adulte à lieu entre 40 et 50 ans (Yamano and Sato, 2012). En revanche, la longévité des PNH n'excède pas les 50 ans (en moyenne) dans la nature et en captivité.

À l'inverse, des caractéristiques cliniques et pathologiques similaires à l'ATL chez l'Homme ont été répertoriées chez les PNH infectés par STLV-1 (Allan et al., 2001; Hubbard et al., 1993; McCarthy et al., 1990; Miura et al., 2013; Noda et al., 1986; d'Offay et al., 2013; Sakakibara et al., 1986; Tsujimoto et al., 1987; Turpin et al., 2017). Le premier cas signalé concernait un lymphome chez un macaque infecté (Homma et al., 1984) et était le précurseur d'autres cas souffrant de symptômes similaires chez des babouins, gorilles et AGM (Hubbard et al., 1993; McCarthy et al., 1990; d'Offay et al., 2013; Srivastava et al., 1986; Tsujimoto et al., 1987; Voevodin et al., 1985). Une étude récente a montré que des cellules exprimant la protéine Tax de STLV-1 étaient détectées dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes, les ganglions mésentériques et axillaires ainsi que les poumons d'un babouin infecté souffrant d'ATL. En revanche, elles étaient absentes dans le sang (Turpin et al., 2017). Comme ce qui a été décrit pour l'ATL humaine, les biopsies du babouin présentaient des infiltrats de cellules positives CD3+ et CD25+ au niveau du derme, de l'hypoderme et des cellules musculaires.



**Tableau 1. Études décrivant l'infection naturelle ou expérimentale des PNH par STLV-1 (ou HTLV-1).**

Etudes	Infection naturelle par STLV-1	Transmission inter-PNH par STLV-1	Infection expérimentale par HTLV-1
<b>Mécanismes de (co-)infections : réplication rétrovirale</b>	Miura et al 2013	Dube et al 2013	Kazanji et al 1997
	Ma et al 2015	Voevodin et al 1985	Kazanji et al 2000
	Castro et al 2016	Voevodin et al 1996	Kazanji et al 2006
	Termini et al 2017	Voevodin et al 1997a	Montreux et al 2001
<b>Traitements thérapeutiques et vaccins</b>	Furuta et al 2017	Voevodin et al 1997b	Debacq et al 2005
	Yee et al 2013	McGinn et al 2002	Heraud et al 2006
	Souquière et al 2009a	Pise-Masison et al 2014	
	Souquière et al 2009b	Valeri et al 2010	
<b>Réponse cytotoxique</b>	Souquière et al 2014	McGinn et al 2004	
	Sugata et al 2016		
	Turpin et al 2017		
	Afonso et al 2010		

**Tableau 2. Comparaison des séquences protéiques entre HBZ d'HTLV-1 et SBZ de STLV-1.**

La souche ATK correspond au sous-type HTLV-1A et EL au sous-type B. STLV-1 *Papio anubis* (= babouin olive) est une souche africaine et Mf5 provient d'un macaque asiatique.

	HTLV - 1A ATK	HTLV-1B EL
HTLV -1A ATK	-	74,27%
HTLV-1B EL	74,27%	-
<b>STLV-1 <i>Papio anubis</i></b>	83,01%	71,36%
STLV-1 Mf5	75,71%	61,43%

**Tableau 3. Comparaison des séquences protéiques entre Tax d'HTLV-1 et STLV-1.**

	HTLV - 1A ATK	HTLV-1B EL
HTLV -1A ATK	-	97,26%
HTLV-1B EL	97,26%	-
<b>STLV-1 <i>Papio anubis</i></b>	96,03%	95,74%
STLV-1 Mf5	92,92%	93,31%

## VII. Modèles des PNH infectés par STLV-1

### i. *Après une infection naturelle par STLV-1*

Étant donné la grande homologie de séquence entre STLV-1 et HTLV-1 ainsi que le développement d'ATL induit par STLV-1, les PNH infectés tels que les macaques japonais, les babouins et les mandrills ont été utilisés pour effectuer des études moléculaires (Castro et al., 2016; Furuta et al., 2017; Ma et al., 2015; Miura et al., 2013; Souquière et al., 2009a; Sugata et al., 2016; Termini et al., 2017; Yee et al., 2013) (**Tableau 1**). Comme HTLV-1, le virus simien infecte principalement les cellules T CD4+ bien que l'expression de Tax soit aussi détectée dans les cellules souches hématopoïétiques *in vivo* et que l'ADN proviral soit présent dans toutes les cellules lymphoïdes et myéloïdes qui dérivent de ces cellules souches infectées (Furuta et al., 2017). L'infection par STLV-1 conduit à l'expression des protéines Tax et SBZ (l'équivalent d'HBZ pour HTLV-1) au sein des cellules infectées. Les séquences protéiques sont très similaires à celles de Tax et HBZ d'HTLV-1 (**Tableaux 2 et 3**) et possèdent les mêmes propriétés d'activation du LTR proviral et de la voie de signalisation cellulaire NF- $\kappa$ B. Par exemple, une charge provirale ou PVL (nombre de cellules comportant une intégration provirale) élevée de STLV-1 est liée à une forte expression de l'IL-2, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  et TNF- $\alpha$  chez des mandrills infectés et asymptomatiques (Souquière et al., 2009b). Grâce aux données connues sur HTLV-1, cette observation est probablement due à l'expression de la protéine Tax même si cela n'a pas été démontré pour STLV-1. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de l'IL-2 et IFN $\gamma$  ainsi que pour

IFN $\gamma$  et TNF- $\alpha$  chez des macaques et des babouins (Termini et al., 2017; Yee et al., 2013). L'infection par STLV-1 engendre aussi une activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) en réponse aux cellules infectées et exprimant la protéine Tax (Castro et al., 2016; Termini et al., 2017).

Les protéines TCF1 et LEF1, spécifiques des lymphocytes T, peuvent empêcher la fixation de Tax sur le LTR proviral. Leur expression élevée dans les thymocytes inhibe ainsi la réplication de STLV-1 dans le thymus. À l'inverse, leur effet est inhibé dans les lymphocytes T du sang périphérique chez l'Homme et les PNH via l'effet de Tax sur la protéine STAT5a. Ces observations pourraient expliquer pourquoi Tax est plus efficace dans ces cellules et pourquoi HTLV-1 peut induire l'ATL dans le sang (Ma et al., 2015). En fonction de la souche de STLV-1, la protéine SBZ est soit très conservée par rapport à HBZ soit elle contient des insertions et délétions (**Tableau 2**). Néanmoins, dans tous les cas, les animaux peuvent développer une ATL (Miura et al., 2013; Turpin et al., 2017). Cela est probablement dû à la conservation des terminaisons N-terminales et C-terminales (domaine leucine zipper) entre HBZ et SBZ.

STLV-1 est capable de se répliquer par expansion clonale des cellules infectées chez les animaux asymptomatiques et ceux ayant développé une ATL, comme HTLV-1 (Miura et al., 2013; Turpin et al., 2017). La thérapie anti-virale utilisant l'azidothymidine (AZT) combinée à l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) améliore le taux de survie des patients ATL souffrant des formes aiguës et chroniques. En revanche, l'utilisation de ce traitement lors d'un essai clinique chez des babouins ATL n'a

montré aucune amélioration. Il serait alors intéressant de vérifier si l'absence de rémission chez les babouins est liée à une mutation de la protéine p53, mutation décrite chez des patients ATL qui ne répondaient pas au traitement à l'AZT (Datta et al., 2006). En prenant en compte que traiter les patients ATL est compliqué et qu'une PVL élevée est associée à l'ATL, une étude a regardé si cette PVL pouvait être diminuée chez des PNH infectés et asymptomatiques grâce à un traitement combinant le valproate et l'AZT (Afonso et al., 2010). En effet, la diminution de la PVL après traitement était associée à une réponse CTL anti-Tax plus importante, confirmant ainsi l'importance de la réponse immunitaire dans le contrôle des infections virales (Afonso et al., 2010). Une autre étude utilisant le mogamulizumab (un anti-CCR4 utilisé chez des patients ATL en récurrence) inoculé chez des macaques japonais infectés par STLV-1 conduit à une forte baisse de la PVL (Miura et al., 2013; Sugata et al., 2016). Ces données permettent de conclure que les animaux infectés par STLV-1 sont de bons modèles pour la mise au point de traitements.

Finalement, une étude récente chez 2 PNH infectés et asymptomatiques montre que l'immunisation lors de l'utilisation du virus de la vaccine recombinant pouvant exprimer Tax-22 (inhibe la voie NF- $\kappa$ B) ou un mutant HBZ LL/AA (l'induction de la transcription par Tax est partiellement altérée) est liée à une diminution temporaire de la PVL de STLV-1 (Sugata et al., 2016).

## ii. *Après une transmission inter-espèces de STLV-1*

Un nombre limité d'articles décrivent les transmissions de STLV-1 entre les espèces simiennes (Dube et al., 2013; Voevodin et al., 1996, 1997a, 1997b) (**Tableau 1**). Une de ces études observe que des babouins infectés par une souche de STLV-1, provenant de macaques rhesus, ont ensuite développé une ATL (Voevodin et al., 1996). C'est le seul cas montrant qu'une transmission inter-espèce de STLV-1 peut induire une pathologie parmi les PNH. Des infections expérimentales de macaques à queue de cochon avec du STLV-1 du mangabey enfumé ont montré un taux d'anticorps faible ainsi qu'une mortalité élevée de cause inconnue (McGinn et al., 2002). D'autres équipes ont infecté des singes Tantalus et des singes rouges par des souches de STLV-1 provenant d'autres espèces de PNH. Les tests PCR ont confirmé l'infection des animaux dont un présentait une mutation dans le génome proviral (Dube et al., 2013). En revanche, le fait que le virus reste infectieux malgré la présence de cette mutation dans le gène *pol* reste inexpliqué.

## iii. *Après une infection artificielle par HTLV-1*

L'homologie importante entre STLV-1 et HTLV-1 ainsi que les outils disponibles pour l'étude de ce dernier ont poussé certains laboratoires à utiliser le clone moléculaire d'HTLV-1 et des cellules infectées par HTLV-1 sur les PNH (**Tableau 1**). En effet, l'infection des animaux après inoculation du virus humain

permet d'étudier la primo-infection ainsi que la dissémination virale *in vivo*, ce qui est inaccessible chez l'Homme. L'infection de Saïmiris, qui ne sont pas naturellement infectés par STLV-1 (Kazanji et al., 1997), montre que les organes lymphoïdes représentent les réservoirs majeurs du virus (Kazanji et al., 2000). De plus, l'infection des PNH par HTLV-1 est liée à une augmentation de l'expression de l'IL-2, IL-10, IFN $\gamma$  comme décrit pour HTLV-1 chez l'Homme et STLV-1 chez les singes (Kazanji et al., 2006). Chez les Saïmiris, le virus réplique aussi par expansion clonale des cellules infectées après transcription inverse de son génome dans les phases précoces (Mortreux et al., 2001). Le développement de l'ATL est également observé (Debacq et al., 2005). Comme pour les babouins traités à l'AZT/IFN (Turpin et al., 2017), l'arsenic combiné à l'IFN- $\alpha$  n'induit pas de diminution de la PVL d'HTLV-1 même si le nombre de cellules caractéristiques de l'ATL diminue pour des raisons inconnues (Heraud et al., 2006).

Des cellules provenant de macaques rhésus et à queue de cochon ont été transfectées par un clone moléculaire d'HTLV-1 pour être inoculées chez leurs hôtes respectifs (McGinn et al., 2004; Pise-Masison et al., 2014; Valeri et al., 2010). L'infection des macaques à queue de cochon a induit l'apparition de nombreuses pathologies différentes de l'ATL ce qui suggère que ces animaux ne pouvaient pas être utilisés en tant que modèle pour étudier HTLV-1. En revanche, les conséquences concernant les macaques rhésus étaient différents puisque les animaux sont restés asymptomatiques. Les protéines p8 et p12 du virus sont liées à une augmentation de l'activité des protéines cellulaires NFAT et STAT-5 ainsi

que de la production d'IL-2, tandis que p30 d'HTLV-1 peut contrôler la régulation post-transcriptionnelle des gènes viraux *in vitro* (Anupam et al., 2013; Bai and Nicot, 2012). Ainsi, cette espèce simienne était un bon modèle pour étudier le rôle de ces protéines *in vivo* (Pise-Masison et al., 2014; Valeri et al., 2010). Cela a permis de montrer que p12 et p30 sont nécessaires pour la réplication d'HTLV-1 dans les cellules dendritiques (Valeri et al., 2010), tandis que p12 et p8 ont un rôle dans la résistance du virus à la réponse CTL. Ces études *in vivo* apportent des observations sur les mécanismes utilisés par HTLV-1 pour établir une infection chronique ainsi que sur le rôle important des cellules myéloïdes dans l'infection.

Les auteurs ont aussi montré que les résultats obtenus chez ces macaques étaient différents de ceux observés chez un autre modèle animal infecté (le lapin) par le même clone moléculaire ce qui démontre l'importance du modèle simien dans l'étude de la pathogenèse d'HTLV-1. L'ensemble de ces données montre que le virus HTLV-1 est un outil approprié dans la compréhension de la transmission et de la pathogenèse (ATL) induite par HTLV-1. De plus, les PNH mono-infectés par HTLV-1 et co-infectés avec SIV sont de bons modèles dans la mise au point de traitements contre HTLV-1 et VIH-1.







## B. Les virus foamy simiens

### I. Origine et pathologie associée

La première souche de virus foamy (FV) fut isolée à partir de cellules de reins d'un macaque (Enders and Peebles, 1954). Par la suite, le virus foamy a été isolé chez des espèces animales diverses ce qui a permis de conclure que ce virus est ubiquitaire (Pinto-Santini et al., 2017). Chez les PNH, les SFV sont responsables d'infections persistantes. De plus, aucune pathologie n'est associée aux infections par FV chez les espèces réservoirs (Pinto-Santini et al., 2017).

### II. Transmission et prévalence des SFV parmi les PNH

Les SFV sont ubiquitaires et sont retrouvés chez de nombreuses espèces de PNH testées (Switzer et al., 2005). Cela inclut les espèces de l'Ancien Monde, du Nouveau Monde et les Hominoïdes. La prévalence des SFV varie de 75 à 100% des individus adultes infectés parmi les PNH en captivité (**Figure 4**) (Ayoub et al., 2013; Blasse et al., 2013; Blewett et al., 2000; Broussard et al., 1997; Calattini et al., 2004, 2006a, 2006b; Engel et al., 2006; Feeroz et al., 2013; Gessain et al., 2013; Ghersi et al., 2015; Goldberg et al., 2009; Hood et al., 2013; Huang et al., 2012; Hussain et al., 2003; Jegado and Mahieux, 2019; Jones-Engel et al., 2005, 2006, 2007; Kaul et al., 2019; Leendertz et al., 2010; Liu et al., 2008; Miranda et al., 2019; Morozov et al., 2009; Mouinga-Ondémé et al., 2010; Muniz et al., 2013, 2015, 2017; Pinto-Santini et al., 2017; Reid et al., 2017; Richard et al., 2015; Rua and

Gessain, 2015; Santos et al., 2019; Schillaci et al., 2005; Schweizer et al., 1999; Stenbak et al., 2014).

La transmission horizontale des SFV parmi les PNH s'effectue par morsure, léchage de plaie ou partage de nourriture (Calattini et al., 2006b; Hood et al., 2013; Liu et al., 2008). En effet, la présence de particules virales infectieuses a été décrite dans la salive, notamment dans les cellules épithéliales à la surface de la muqueuse orale chez les macaques et singes verts d'Afrique (Falcone et al., 1999; Murray et al., 2006, 2008). La transmission verticale de la mère au petit a aussi été mise en évidence chez des chimpanzés (Blasse et al., 2013).

La séropositivité des PNH vis à vis de l'infection par SFV augmente avec l'âge. L'infection est plus rare chez les PNH nourrissons (<1 an), ce qui est probablement dû à la présence d'anticorps provenant de la mère lors de l'allaitement qui préviennent alors l'infection. Le nombre d'individus infectés augmente chez les animaux juvéniles (1 à 4 ans) puis la séoprévalence devient plus importante chez l'adulte (Broussard et al., 1997; Calattini et al., 2006a; Hood et al., 2013; Jones-Engel et al., 2007; Liu et al., 2008; Mouinga-Ondémé et al., 2010; Muniz et al., 2015).

### **III. Phylogénie des SFV**

Les virus foamy simiens sont des virus anciens et qui ont co-évolué avec leur hôte depuis au moins 30 millions d'années (Switzer et al., 2005). De nombreuses études ont décrit des souches de SFV génétiquement distinctes et spécifiques

d'une espèce de PNH donnée et de la localisation géographique (Aiewsakun et al., 2019; Bieniasz et al., 1995; Broussard et al., 1997; Calattini et al., 2006a, 2006b; Feeroz et al., 2013; Fuentes et al., 2020; Ghersi et al., 2015; Goldberg et al., 2009; Hashimoto-Gotoh et al., 2020; Liu et al., 2008; McClure et al., 1994; Miranda et al., 2019; Mouinga-Ondémé et al., 2010; Muniz et al., 2013; Reid et al., 2017; Santos et al., 2019; Schweizer and Neumann-Haefelin, 1995; Shankar et al., 2019; Switzer et al., 2005; Verschoor et al., 2004). Le génome du SFV possède une conservation importante parmi l'ensemble des espèces infectées et la variabilité génétique chez un individu est très faible au cours du temps. Celle-ci ne dépasse pas 1% chez les PNH ou chez l'Homme malgré plusieurs années d'infection (Mouinga-Ondémé et al., 2010; Rua et al., 2013; Schweizer et al., 1999).

La stabilité génomique associée à la spécificité hôte-virus permet d'identifier l'hôte d'origine lors d'une transmission inter-espèce de SFV chez un autre PNH ou chez l'Homme.

A titre d'exemple, en Côte d'Ivoire, une souche de SFV d'un Colobe rouge a été isolée chez le chimpanzé, prédateur des Colobes (Leendertz et al., 2008). De la même façon, le SFV d'une espèce simienne appartenant au genre *Cercopithecus* a été isolé chez un chimpanzé au Cameroun (Liu et al., 2008). D'autres transmissions inter-espèces de SFV ont été mises en évidence chez différentes espèces de Capucins, des singes du Nouveau Monde (Ghersi et al., 2015). Le dynamisme de la circulation du virus SFV au sein des PNH engendre avec le temps des surinfections de l'hôte par le virus (Blasse et al., 2013) qui peuvent aboutir à l'apparition de

phénomènes de recombinaisons. Ainsi, des études phylogénétiques ont montré des souches recombinantes de SFV lors de co-infections (Feeroz et al., 2013; Galvin et al., 2013; Liu et al., 2008; Richard et al., 2015).

#### IV. Les virus foamy simiens chez l'Homme

##### i. Origine

En 1971, le premier cas de ce que l'on pensait être le virus foamy « humain » (HFV) a été décrit à partir d'une culture de cellules lymphoïdes dérivant d'un carcinome du nasopharynx chez un patient originaire du Kenya (Achong et al., 1971a, 1971b). Il s'est avéré, grâce à des analyses de séquençage, que le génome proviral de ce virus avait une forte homologie avec un virus foamy simien isolé à partir d'un chimpanzé, SFVcpz (Herchenröder et al., 1994). En 1995, une étude a été effectuée sur les comparaisons de séquences entre « HFV » et plusieurs souches de SFV isolées à partir de différentes espèces simiennes telles que les chimpanzés, les macaques, le singe vert d'Afrique ou encore le singe-araignée (Schweizer and Neumann-Haefelin, 1995). L'analyse a montré qu'HFV a une homologie plus importante avec les différentes souches de SFVcpz, notamment avec une souche provenant d'une espèce de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) vivant au Kenya (Rua and Gessain, 2015). Ces observations suggèrent que le cas initial de « HFV » aurait une origine zoonotique et serait plus précisément un variant de la souche simienne. Elle a ainsi été renommée

SFVcpz(hu) ou *Prototype foamy virus* (PFV) pour la souche adaptée et utilisée en laboratoire (Pinto-Santini et al., 2017). Le virus PFV peut induire un effet cytopathogène des cellules *in vitro*, c'est à dire l'apparition de cellules géantes multinuclées ou « syncytia » (Tobaly-Tapiero et al., 2005), mais n'est en revanche pas l'agent étiologique du carcinome du nasopharynx qui était en fait dû au virus d'Epstein-Barr (EBV).

## ii. *Transmissions zoonotiques des PNH à l'Homme*

Les contacts entre l'Homme et les primates non-humains peuvent être fréquents, en fonction de leur localisation géographique ou des professions humaines. Dans certaines parties du Monde telles que l'Afrique, l'Asie ou l'Amérique du Sud et Amérique Centrale, la population cohabite avec les PNH, pratique la chasse et manipule de la viande de brousse. De la même façon, certaines personnes sont professionnellement en contact avec les PNH (zoos, laboratoires de recherche et centres de primatologie). Les contacts avec le sang et la salive des PNH, principalement par morsure, favorisent les transmissions zoonotiques de SFV dans la population humaine (Betsem et al., 2011; Buseyne, 2019; Calattini et al., 2007; Mouinga-Ondémé et al., 2011; Murray and Linial, 2019; Narat et al., 2018; Pinto-Santini et al., 2017; Rua and Gessain, 2015; Rua et al., 2012, 2014; Schweizer et al., 1997; Wolfe et al., 2004).

### iii. *Prévalence et Pathologie associée*

A la suite de la découverte de PFV, de nombreux laboratoires ont essayé de rechercher l'existence d'infections par le virus foamy simien chez l'Homme (techniques décrites par Meiering and Linial, 2001). Basée sur des techniques de sérologie et de biologie moléculaire, une étude a permis de détecter 3 cas d'infections par SFV chez des individus travaillant dans des laboratoires en contact avec des PNH (Rua and Gessain, 2015; Schweizer et al., 1997). Plus de 100 cas d'infections par SFV ont été actuellement répertoriés (Gessain et al., 2013, 2020; Pinto-Santini et al., 2017; Rua and Gessain, 2015). Aucune transmission inter-humaine n'a été décrite, ce qui suggère que l'homme n'est pas un réservoir de ce virus (Boneva et al., 2002; Gessain et al., 2013; Pinto-Santini et al., 2017). Bien qu'aucune pathologie n'ait été mise en évidence chez l'Homme *in vivo*, la tendance à développer une anémie serait plus fréquente chez des personnes infectées par SFV (Buseyne, 2019). De plus, une infection chronique est associée à une stimulation des monocytes et lymphocytes T CD8 + *in vivo* telle qu'elle a été décrite dans une population humaine vivant en Afrique (Gessain et al., 2020).

## C. Les Lentivirus simiens à l'origine du VIH-1 et VIH-2

Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) a été décrit chez plus de 40 espèces de PNH naturellement présentes en Afrique uniquement (Nyamota et al., 2020). L'infection est fréquemment considérée comme asymptomatique chez les

PNH africains sauvages, bien que des études aient montré une progression vers un stade apparenté au SIDA chez des espèces en captivité et infectées chroniquement ainsi que chez des chimpanzés sauvages (Keele et al., 2009; Locatelli and Peeters, 2012).

Comme pour le virus SFV, il existe une spécificité entre le SIV et certaines espèces de PNH africains ainsi que des co-infections et des phénomènes de recombinaisons parmi les singes. L'apparition de nouvelles souches de SIV se traduit par les transmissions inter-espèces et l'émergence du virus chez de nouveaux hôtes (Locatelli and Peeters, 2012; Sharp and Hahn, 2011).

La prévalence du SIV au sein des primates non-humains sauvages peut varier de 0 à 50% selon une espèce donnée (Sharp and Hahn, 2011) et dépend aussi de la localisation géographique, l'âge et le sexe des individus (Filippone et al., 2017; Locatelli et al., 2016; Nyamota et al., 2020) ce qui joue un rôle majeur sur les transmissions inter-espèces du SIV. Ainsi, nous pouvons supposer que la circulation plus limitée des virus SIV et STLV-1 parmi les PNH par rapport à SFV serait médiée par les modes de transmissions différents de ce dernier.

Des études montrent que la transmission du SIV se fait de façon horizontale mais aussi de façon verticale. A l'inverse de SFV, la transmission du SIV par morsure n'est pas aussi efficace en raison d'une présence relativement faible du virus dans la salive des PNH (Thomas et al., 2010). En revanche, notre équipe a montré que la charge provirale du virus STLV-1 était aussi très faible dans la salive de babouins naturellement infectés alors qu'il se transmet par morsure (Alais et al.,



2018). Il serait alors intéressant de déterminer s'il existe une charge provirale minimale pouvant aboutir à la transmission du virus par morsure. D'autres voies sont alors privilégiées comme la reproduction ou encore la consommation de proies infectées (Filippone et al., 2017; Locatelli and Peeters, 2012; Sharp and Hahn, 2011) bien que l'étude de Fouchet et al montre que les interactions sociales au sein d'une communauté de mandrill participent à la transmission du virus, comme le toilettage, le léchage de plaies et autres interactions qui favorisent les échanges de fluides infectés (Fouchet et al., 2012). De plus, la circulation du SIV ainsi que sa persistance au sein d'une communauté serait liée à la transmission tardive du virus, c'est à dire au cours des stades tardifs de l'infection de l'hôte (Roussel et al., 2015b).

En revanche, les analyses phylogénétiques ont montré que le SIV du chimpanzé (SIVcpz) et celui du gorille (SIVgor) auraient passé la barrière d'espèces à plusieurs occasions pour s'adapter au sein de la population humaine. Le SIVcpz est apparu après transmissions inter-espèces et recombinaisons de 2 virus, le SIV du mangabey à collier blanc (SIVrcm) et celui pouvant infecter plusieurs espèces de Cercopithèques (SIVmus/mon/gsn) (Bailes et al., 2003). D'autre part, la perte du gène auxiliaire *vpx* du SIVrcm chez le SIVcpz, par recombinaison, a induit la modification de la région 3' du gène *vif* chevauchant *vpx*. La protéine qui en résulte étant plus efficace dans la dégradation du facteur de restriction de la réplication virale APOBEC3G ou A3G (*apolipoprotein B mRNA editing, enzyme-catalytic, polypeptidelike 3G*) chez le chimpanzé, ce qui a permis au virus de

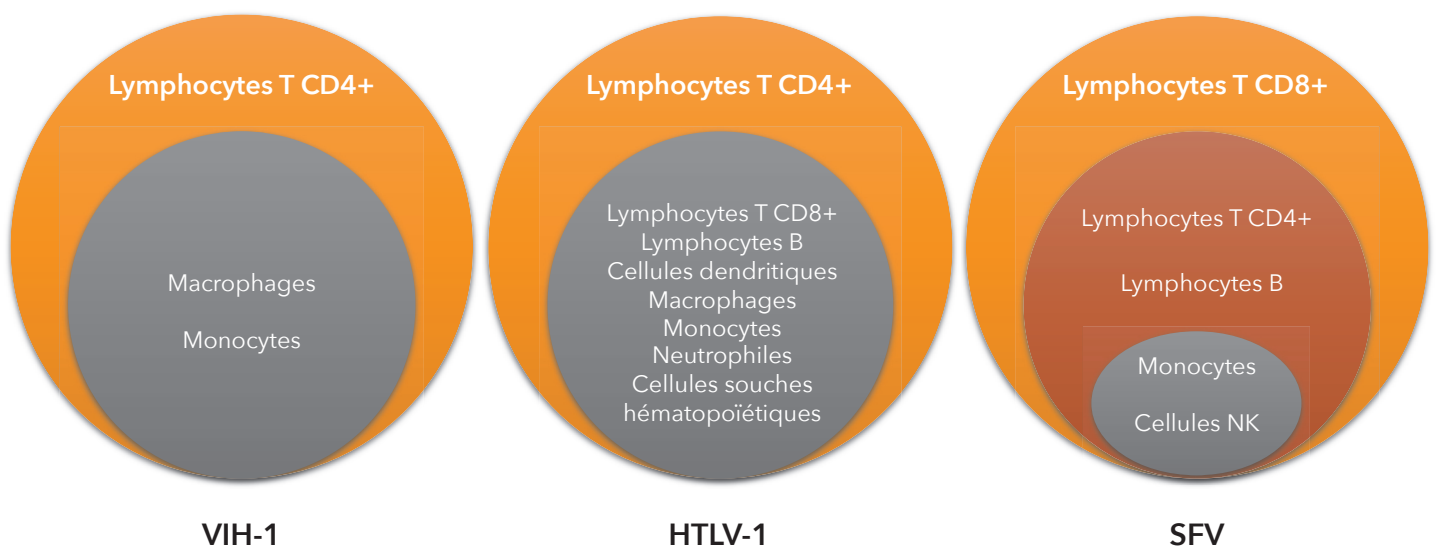
s'adapter. De plus, la protéine Vif du SIVcpz peut dégrader l'A3G de l'Homme aussi efficacement que le fait le VIH-1 (Etienne et al., 2013).

La manipulation et la consommation de viande de brousse infectée par des souches de SIVcpz et SIVgor recombinantes aurait engendré l'apparition des 4 groupes M, N, O et P qui appartiennent au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (Peeters et al., 2014). Le groupe M étant le virus pandémique qui infecte aujourd'hui plus de 37 millions de personnes dans le monde (selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2018). De la même façon, les 9 groupes A à H du VIH de type 2 ont pour origine zoonotique le SIV provenant d'un singe mangabey enfumé. Globalement, le VIH-2 est beaucoup moins prévalent et pathogène que le VIH-1 (Locatelli and Peeters, 2012; Sharp and Hahn, 2011).

# Chapitre 4. Infection cellulaire et moléculaire par les rétrovirus simiens et humains

## A. Tropisme cellulaire

Chez l'Homme et les PNH, les rétrovirus vont infecter différentes populations cellulaires et peuvent persister tout au long de la vie de l'hôte. Dans le sang, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont les cibles majoritaires de ces virus (**figure 5**).



**Figure 5. Tropisme cellulaire des rétrovirus VIH-1/SIV, HTLV-1/STLV-1 et SFV dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) *in vivo*.**

En effet, le génome proviral du virus HTLV-1 est majoritairement retrouvé dans les lymphocytes T CD4+ activés *in vivo* (Futsch et al., 2017) bien qu'il soit aussi détecté dans les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Hishizawa et al., 2004; Koyanagi et al., 1993; Macatonia et al., 1992; Nagai et al., 2001; Rodrigues et al., 2018). Le virus simien STLV-1 infecte majoritairement les T CD4+ mais la protéine Tax est détectée dans des cellules souches hématopoïétiques *in vivo* et l'ADN proviral est présent dans les lignées myéloïdes et lymphoïdes qui dérivent de ces cellules souches chez des macaques japonais. Ce phénomène est aussi observé pour HTLV-1 chez des patients asymptomatiques ou souffrant de HAM/TSP (Furuta et al., 2017).

HTLV-1 partage un tropisme commun avec le VIH-1 et SIV puisque ces virus infectent principalement les lymphocytes T CD4+. De plus, ces virus peuvent être latents (absence de réplication du virus) dans ces cellules ainsi que dans les monocytes et macrophages formant ainsi les cellules réservoirs du virus (Campbell et al., 2014; Gama et al., 2018; Kandathil et al., 2016; Wetzel et al., 2018). En revanche, les cellules dendritiques retrouvées dans la peau et la rate de patients infectés ne semblent pas être une cible du VIH-1 *in vivo* (McIlroy et al., 1995; Pope et al., 1995).

Le virus PFV est capable d'infecter et de se répliquer au sein d'un large panel de lignées cellulaires *in vitro*, indépendamment de l'espèce d'origine à partir de laquelle les cellules ont été isolées (Yu et al., 1996). *In vivo*, SFV est aussi

ubiquitaire et le virus reste latent dans presque tous les tissus où il a été recherché, notamment dans les cellules sanguines. Chez des personnes mordues et infectées par des gorilles, chimpanzés et AGM, le virus SFV infecte majoritairement les lymphocytes T CD8+ mais est aussi détecté dans les lymphocytes T CD4+ (cellules naïves et mémoires), lymphocytes B et très rarement dans les monocytes et cellules NK (*Natural Killer*) (von Laer et al., 1996; Rua and Gessain, 2015; Rua et al., 2014). De plus, les cellules épithéliales de la muqueuse orale chez des macaques, des cercopithèques ainsi que chez des singes du Nouveau Monde semblent être un site de réplication active du virus (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013).

## B. Étapes précoces du cycle de réplication des rétrovirus

### I. Attachement aux récepteurs et fusion des membranes

L'infection cellulaire par un rétrovirus débute par la reconnaissance et l'interaction de la protéine d'enveloppe virale avec le ou les récepteur(s) cellulaire(s) permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et l'entrée de la capsid dans le cytoplasme. Dans le cas du virus HTLV-1, ses protéines d'enveloppe vont reconnaître des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) pour ensuite interagir avec la neuropiline-1 (NRP-1) et le transporteur de glucose de type 1 (GLUT-1). Les molécules HSPG et GLUT-1 sont exprimées à la

surface de nombreuses populations cellulaires tandis que NRP-1 est présent à la surface des cellules dendritiques, lymphocytes T activés et cellules endothéliales (Pique and Jones, 2012). De plus, La molécule DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) joue un rôle dans la fixation et l'entrée du virus HTLV-1 dans les cellules dendritiques (Jain et al., 2009). L'homologie importante entre HTLV-1 et STLV-1 suggère que ce dernier utilise les mêmes récepteurs d'entrée lors de l'infection cellulaire (Kim et al., 2006).

Concernant le virus SFV, les premières étapes du cycle viral ont été très peu investiguées. En effet, le récepteur cellulaire utilisé pour entrer dans la cellule n'est toujours pas identifié bien qu'il puisse interagir, comme HTLV-1, avec la molécule HSPG pour se fixer à la membrane cellulaire (Plochmann et al., 2012). Le virus foamy semble subir une étape d'endocytose (plutôt qu'une fusion des membranes) suivie d'une libération de la capsid dans le cytoplasme dépendant d'un pH acide (Picard-Maureau et al., 2003).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 vont majoritairement reconnaître la molécule CD4, membre de la super-famille des immunoglobulines, qui est exprimée à la surface des lymphocytes T CD4+ mais aussi des monocytes et macrophages (Swanstrom et al., 2018). Ce mécanisme induit un changement de conformation pour que les glycoprotéines d'enveloppe du virus interagissent avec les co-récepteurs de chimiokines CCR5 (exprimé par les lymphocytes T mémoires et naïfs ainsi que les monocytes/macrophages) et CXCR4 (exprimé par lymphocytes T mémoires) (Bleul et al., 1997; Wetzel et al., 2018). Une étude a

montré que le SIV n'interagit pas avec CXCR4 mais peut interagir avec CCR5 bien qu'il puisse aussi infecter des cellules T CD4+ n'exprimant pas cette molécule (Deng et al., 1997). Chez le mangabey enfumé, le mangabey à collier blanc (RCM) et l'AGM, les molécules CCR5 et CXCR6 peuvent médier l'entrée du virus dans les lymphocytes de ces hôtes réservoirs, tandis que chez le macaque rhésus, le CCR5 est exclusivement ciblé par le SIVmac (Elliott et al., 2015; Riddick et al., 2015; Wetzel et al., 2018). Nous savons que le chimpanzé, un PNH africain développe aussi un stade SIDA en réponse au SIV, à l'inverse des autres espèces. Ce qui est un point intéressant car le SIVcpz est à l'origine du VIH-1 chez l'Homme et interagit exclusivement avec les cellules CCR5+ (Wetzel et al., 2018). Il existe alors une dichotomie entre les hôtes réservoirs asymptomatiques (mangabey enfumé, AGM et RCM) et ceux qui développent un état pathologique (macaque rhésus, chimpanzé et l'Homme) sur l'utilisation du CCR5 et CXCR6 par le virus (Wetzel et al., 2018).

## **II. Transcription inverse**

À la suite de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, la capsid est libérée dans le cytoplasme. Celle-ci contient les 2 copies d'ARN génomique (ARNg) ainsi que la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). L'ARNg est alors rétrotranscrit en ADN double brin complémentaire (ADNc) pendant le transfert de la capsid vers le noyau cellulaire. Une étude récente a montré que la décapsidation se ferait dans le noyau à proximité du site

d'intégration de l'ADN rétrotranscrit suite à une infection par le VIH-1 *in vitro* (Burdick et al., 2020). De nombreuses études ont été menées sur le cycle viral du VIH-1 et ont permis d'émettre des suggestions sur les mécanismes utilisés par HTLV-1 (Martin et al., 2016). Nous savons que pour le virus VIH-1, la transcription inverse se déroule en parallèle de la décapsidation (Cosnefroy et al., 2016; Hulme et al., 2011). Bien que le processus soit similaire entre les rétrovirus, chaque espèce virale va exploiter des facteurs cellulaires spécifiques pour assurer la transcription inverse. L'initiation de cette étape consiste à recruter les ARN de transfert (ARNt) en tant qu'amorce qui va s'hybrider sur le site de fixation de l'amorce (PBS) de l'ARN viral afin de débiter la synthèse d'un brin d'ADN. La séquence du PBS détermine alors l'identité de l'ARNt utilisé par le virus (Jin and Musier-Forsyth, 2019). Des études *in vitro* ont montré que le VIH-1 pouvait recruter en priorité l'ARNt<sup>Lys,3</sup> (Wain-Hobson et al., 1985) mais aussi les ARNt<sup>Lys1,2</sup>, ARNt<sup>Met</sup>, ARNt<sup>Glu</sup> et ARNt<sup>His</sup> bien que la réplication du virus soit moins efficace (Palmer et al., 2007). *In vivo*, le VIH-1 et le SIV semblent pouvoir recruter les ARNt<sup>Lys,3</sup>, ARNt<sup>Lys1,2</sup> et ARNt<sup>Lys6</sup> (Fennessey et al., 2019).

Concernant les virus HTLV-1 et PFV, ils semblent recruter les l'ARNt<sup>Pro</sup> et l'ARNt<sup>Lys1,2</sup>, respectivement (Lindemann and Rethwilm, 2011; Seiki et al., 1983). Il est alors possible de penser que la quantité d'ARNt<sup>Lys1,2</sup> dans la cellule pourrait limiter l'efficacité de la réplication lors d'une co-infection cellulaire par le VIH-1/SIV et PFV.



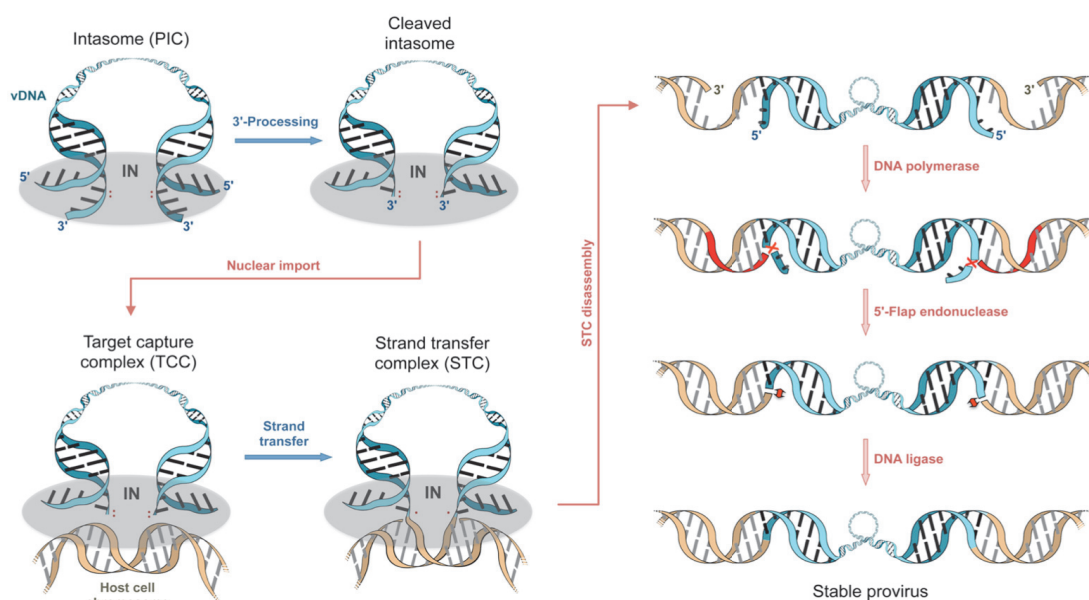
Parmi les rétrovirus, la RT possède un taux d'erreur élevé ce qui engendre l'apparition de mutations dans le génome viral et par conséquent joue un rôle dans l'émergence d'un virus chez un hôte. Cependant, les virus foamy possède une conservation importante du génome pour des individus d'une même espèce au cours du temps, comparé aux orthorétrovirus (Schweizer et al., 1999). Le taux d'erreur induit par la RT du virus PFV ( $1.1 \times 10^{-5}$  mutations par nucléotides (nt) par cycle de réplication) est similaire à celle du VIH-1 (en moyenne  $6,3 \times 10^{-5}$  mutations/nt/cycle) *in vivo* (Gärtner et al., 2009; Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Or, la variation des virus foamy *in vivo* a été estimée autour de  $1.7 \times 10^{-8}$  mutations par site par année ce qui est proche de la variabilité retrouvée pour l'ADN mitochondrial (Switzer et al., 2005). Cela suggère que la faible activité de réplication du virus foamy *in vivo* serait principalement responsable de la conservation du génome. De la même façon, le virus HTLV-1 présente aussi très peu de variations comme PFV/SFV ce qui pourrait être expliqué ici par une faible activité de réplication mais aussi un taux d'erreur de la RT plus faible que ceux du PFV et VIH-1 ( $7 \times 10^{-6}$  mutations/nt/cycle) (Mansky, 2000).

### III. Aspects moléculaires de l'intégration provirale

#### i. Mécanisme d'intégration

Une des caractéristiques qui distingue les rétrovirus des autres familles virales est leur capacité à intégrer l'ADNc au sein du génome cellulaire (ADNg)

sous la forme d'un provirus. Cette étape, qui est conservée parmi les rétrovirus, a été l'objet de nombreuses études structurales notamment dans le cas des virus PFV et VIH-1. À la suite de la transcription inverse de l'ARN viral, l'ADNc est complexé avec plusieurs protéines virales, en particulier l'IN, et des protéines cellulaires afin de former le complexe de préintégration (PIC) (Demeulemeester et al., 2015; Lesbats et al., 2016). Au sein du PIC se trouve l'intasome qui fait appel à un tétramère d'IN lié aux extrémités de l'ADNc du PFV et du VIH-1 mais des structures variées ont été observées pour d'autres rétrovirus (Faure et al., 2005; Guiot et al., 2006; Lee et al., 2019; Passos et al., 2017). Dans le noyau de la cellule, l'intégration du provirus nécessite que l'ADNc soit linéaire. De plus, l'IN ne peut pas agir sur un provirus déjà intégré (Brown et al., 1987; Fujiwara and Mizuuchi, 1988; Roth et al., 1989). Ce processus se fait selon 2 étapes, le *3'-processing* et le *strand transfer* (transfert de brin) (**figure 6**).



**Figure 6. Mécanisme d'intégration du provirus dans l'ADN génomique cellulaire.**

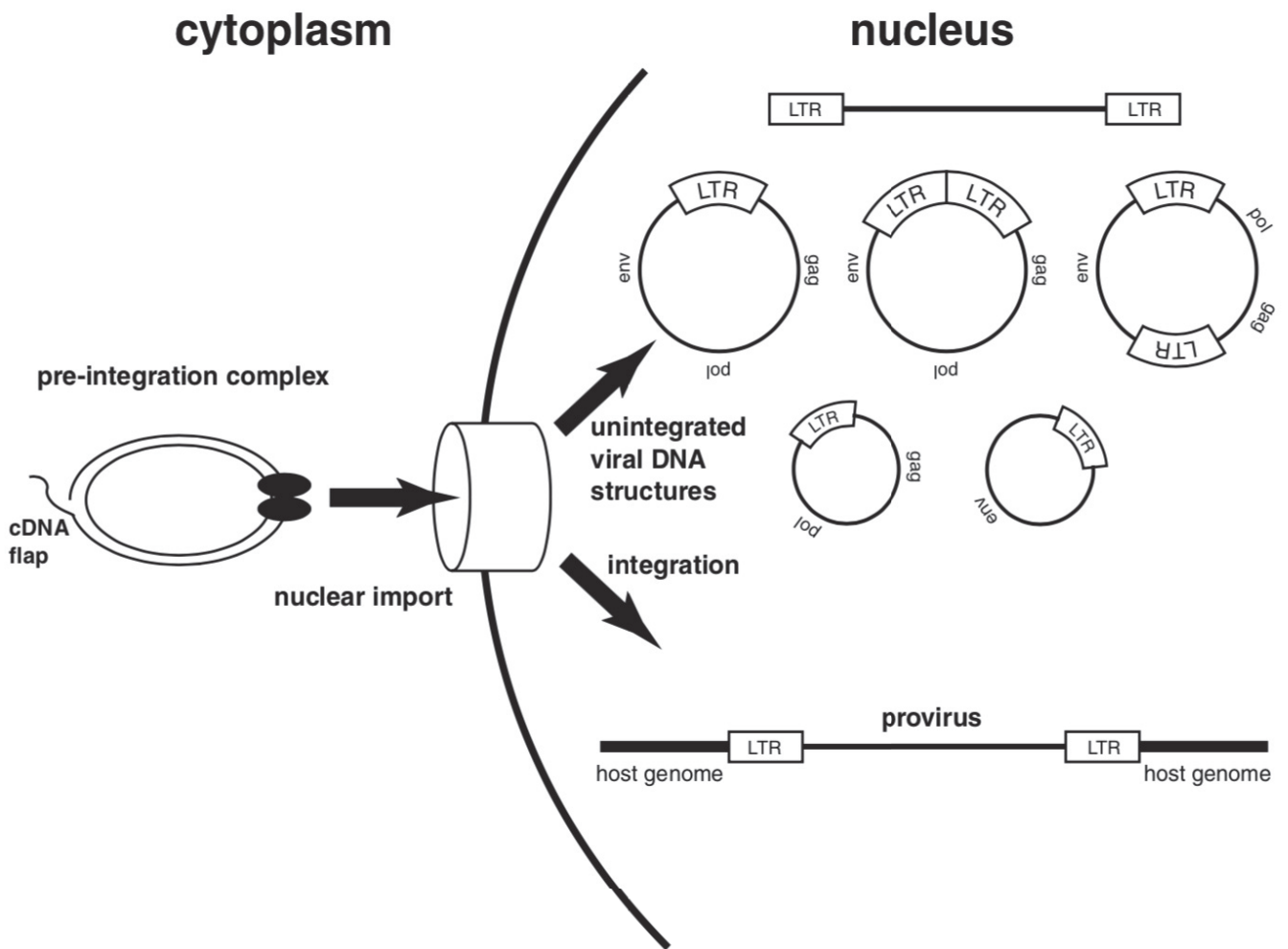
Les réactions sont catalysées par l'intégrase virale (*3'-processing* et *strand transfer*) puis par les enzymes cellulaires intervenant dans la réparation de l'ADN. PIC = complexe de préintégration ; TCC = *target capture complex* ; STC = *strand transfer complex*. Image de la revue de Lesbats et al., 2016.

L'IN reconnaît les séquences *att* au niveau des LTR (début de la région U3 du LTR 5' et fin de la région U5 du LTR 3') afin de s'y fixer (Valkov et al., 2009). Le tétramère va réaliser une coupure simple brin des extrémités de l'ADNc par hydrolyse. Cela permet de supprimer un di- ou trinuécléotide et de libérer un groupement 3'-OH fixé sur le di-nuécléotide invariant 5'-CA-3' des LTR (Lesbats et al., 2016). Ce modèle d'intégration est alors dit symétrique. En revanche, le 3'-*processing* des virus foamy semble asymétrique puisque seule la région U5 est modifiée. L'extrémité de la région U3, générée via la transcription inverse, étant déjà substrat adéquat pour l'intégration du provirus (Enssle et al., 1999; Juretzek et al., 2004).

L'intasome peut ensuite se fixer à l'ADNg pour former le complexe TCC (*target capture complex*) et induire une coupure simple brin de l'ADNg pour y lier les extrémités 3'-OH de l'ADNc. L'intasome du PFV et du VIH-1 montre une intégration préférentielle au niveau des nucléosomes *in vitro* et *in vivo* (Lesbats et al., 2016; Wilson et al., 2019).

Une fois lié, l'ensemble forme le complexe STC (*strand transfer complex*) laissant les extrémités 5' de l'ADNc sous forme simple brin et libre, sous-entendu que l'intégration est encore incomplète. La dissociation du complexe STC permet la prise en charge du site d'intégration par des enzymes cellulaires de réparation de l'ADN afin de joindre les extrémités 5' de l'ADNc à l'ADNg. La réparation se fait par excision de nucléotides via une ADN polymérase, une endonucléase et une ligase, ce qui aboutit à l'intégration d'un provirus stable au sein du génome

cellulaire (Lesbats et al., 2016). À la suite de quoi, l'expression du provirus va médier la production de nouvelles particules virales. Cependant, l'intégration aboutit souvent à une infection non productive à cause d'évènements de délétions ou méthylations du LTR 5' ainsi que des mutations des gènes viraux (Anderson and Maldarelli, 2018; De Celis-Kosmas et al., 1997; Miyazaki et al., 2007). Les provirus défectueux sont capables de produire certaines protéines virales qui peuvent être ciblées lors des réponses immunitaires (Imamichi et al., 2016; Pollack et al., 2017).



**Figure 7. Représentation des formes non-intégrées de l'ADN viral et provirale après import du complexe de préintégration dans le noyau cellulaire.**

Image de l'article de Meyerhans et al., 2004.

## ii. *Formes non intégrées de l'ADN viral*

Bien que la forme linéaire de l'ADNc soit considérée comme la forme précurseur de l'intégration, l'infection des cellules génère de nombreuses formes non-intégrées de l'ADNc dans le cytoplasme et dans le noyau. L'étape de 3'-*processing* peut avoir lieu dans le cytoplasme juste après la transcription inverse. Cela aboutit alors à une accumulation d'ADNc linéaire qui peut se circulariser sous diverses formes épisomales très étudiées dans le cas du VIH-1 (**figure 7**) (Hamid et al., 2017; Meyerhans et al., 2004) :

- La forme circulaire à 2-LTR créée via la jonction des extrémités 5'-CA-3' par recombinaison non-homologue (NHEJ), un système de réparation de l'ADN cellulaire.
- Les formes circulaires à 1-LTR produit après une transcription inverse défectueuse, après recombinaison homologue entre les LTR ou encore après auto-intégration, c'est à dire l'intégration d'une ou des deux extrémités 5'-CA-3' dans l'ADNc.
- Il existe aussi des formes linéaires non-intégrées issues de l'activité de l'intégrase qui peut cliver les jonctions LTR-LTR des formes circulaires à 2-LTR. Ces formes sont par la suite dégradées au bout d'une heure dans les cellules en division, bien qu'elles puissent persister dans les lymphocytes T et les macrophages pendant plusieurs jours à 1 mois (Kelly et al., 2008).

L'abondance relative de chaque forme a été quantifiée dans l'étude de Munir et al révélant que la forme provirale est majoritaire, suivie des formes circulaires à 1-LTR et à 2-LTR puis des formes linéaires non-intégrées (Munir et al., 2013).

Les formes épisomales du VIH-1 et SIV apparaissent chez des populations cellulaires variées *in vivo* et *in vitro* (Hamid et al., 2017; Policicchio et al., 2018) et sont considérées comme étant des versions défectueuses de l'ADNc puisqu'elles ne peuvent pas être directement intégrées au génome cellulaire (Lobel et al., 1989). En revanche, certaines observations remettent en question le rôle de l'épisome à 2-LTR. Des études ont montré que l'ADNc à 2-LTR pouvait servir de matrice fonctionnelle pour l'expression des protéines du VIH-1 dans les cellules infectées, bien qu'elle reste moins importante que l'expression du provirus (Brussel and Sonigo, 2004; Engelman et al., 1995; Thierry et al., 2016; Wiskerchen and Muesing, 1995). De plus, ils peuvent persister dans les cellules en croissance et infectées par le VIH-1. La dilution du nombre d'épisomes dans le temps étant due à la division cellulaire et non à la dégradation de l'ADNc ce qui montre une stabilité importante des formes à 2-LTR (Gillim-Ross et al., 2005; Stein et al., 2016; Swiggard et al., 2004). L'étude de Delelis et al a notamment montré que l'IN du virus PFV pouvait spécifiquement cliver une séquence palindromique au niveau des jonctions LTR-LTR de la forme épisomale afin de contribuer à l'intégration de ces molécules au sein du génome cellulaire (Delelis et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec des études préliminaires réalisées sur d'autres rétrovirus,

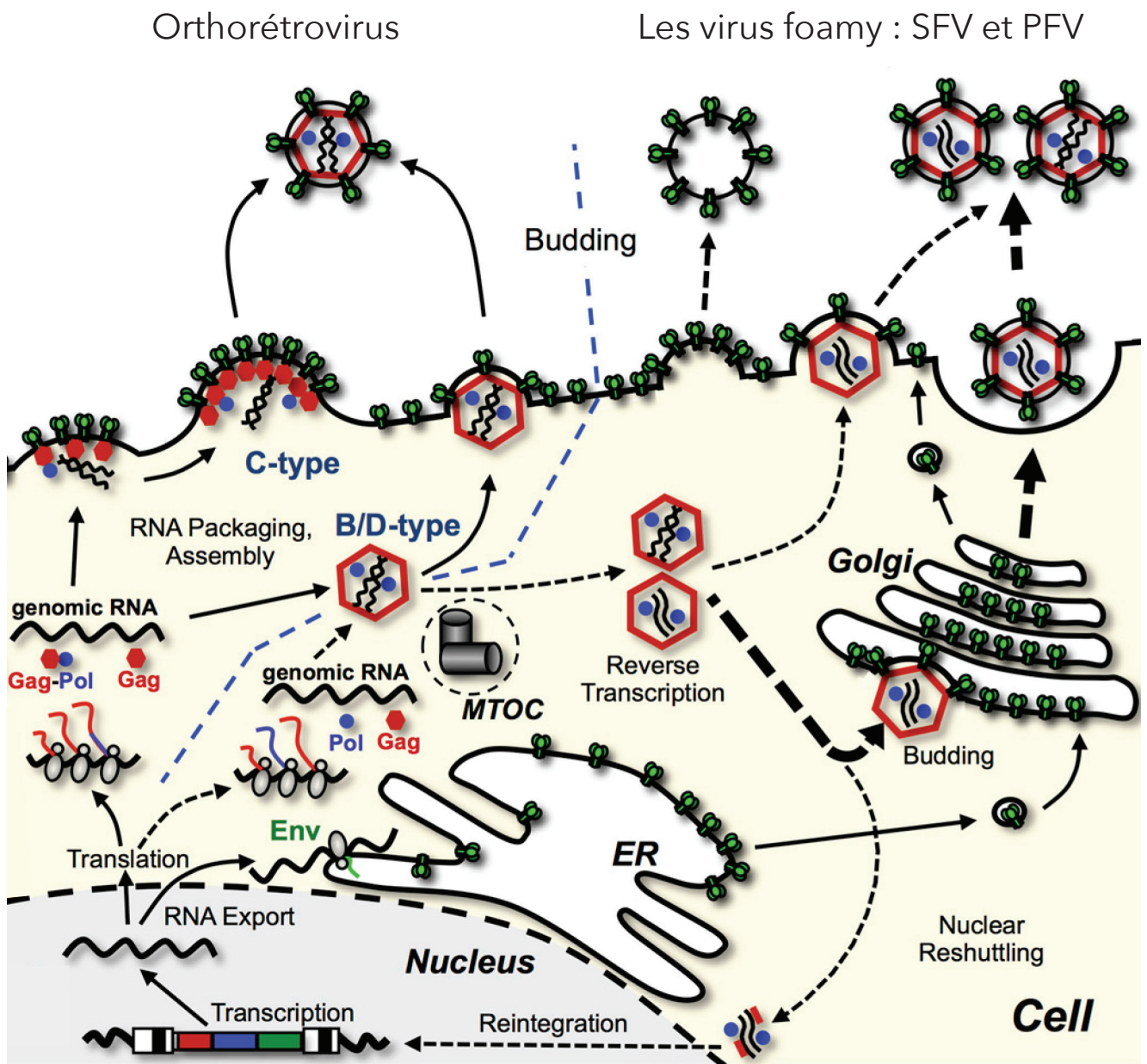
notamment le VIH-1 (Delelis et al., 2008; Duyk et al., 1985; Panganiban and Temin, 1984; Thierry et al., 2015).

## C. Expression du génome proviral et production des virions

Après intégration du provirus, l'activité transcriptionnelle est contrôlée par la région promotrice située au niveau du LTR 5' et dépend de la localisation du site d'intégration dans le génome cellulaire (voir introduction chapitre 5). Dans le cas du VIH-1, il existe une activité basale de la transcription qui est assurée par des facteurs de transcription cellulaire (FT). Celle-ci permet l'expression de la protéine Tat virale qui va fortement augmenter l'activité transcriptionnelle du provirus (Ne et al., 2018). Bien qu'elle soit moins étudiée, la protéine Tat du virus SIV agit aussi en tant qu'activateur de la transcription du provirus *in vitro* (van der Velden et al., 2012). De la même manière, le gène codant la protéine Tax des virus HTLV-1 et STLV-1 est exprimé en premier et va induire une boucle de régulation positive sur le LTR 5' ainsi que sur le LTR 3'. En effet, ce dernier peut servir de région promotrice pour la transcription d'ARNm anti-sens codant pour la protéine HBZ et SBZ respectivement pour HTLV-1 et STLV-1 (Harrod et al., 2000; Miura et al., 2013).

Concernant les virus foamy, la région promotrice du LTR 5' possède aussi des sites de fixation de FT cellulaires et de la protéine virale Tas pour SFV (Bel-1





**Figure 8. Comparaison des étapes tardives entre les Orthorétrovirus (VIH-1 et HTLV-1) et les virus foamy (SFV et PFV).**

MTOC = centre organisateur des microtubules ; ER = réticulum endoplasmique. Image adaptée de Hamann et Lindemann., 2016.

pour PFV) mais ne possède aucune activité basale (Rethwilm, 1995). Cependant, le génome contient une seconde région promotrice située à l'extrémité 3' du gène de l'enveloppe, en amont du gène codant pour la protéine Tas. Ce promoteur interne (PI) possède une activité transcriptionnelle basale qui permet l'expression de la protéine Tas. Cette dernière va aussi exercer une régulation positive sur l'IP et le LTR 5' (Bodem, 2011).

Les ARNm produits sont exportés hors du noyau par les protéines virale Rev et Rex des virus VIH-1 et HTLV-1, respectivement, pour ensuite être traduits par la machinerie ribosomique et produire les protéines Gag, Pro, Pol et Env nécessaires à la production des virions (Fogarty et al., 2011; Mailler et al., 2016). La protéine Gag va migrer à la membrane plasmique pour former des multimères. De la même façon, la protéine d'enveloppe se retrouve à la membrane en subissant des étapes de glycosylations au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. En parallèle, l'ARN génomique, transcrit à partir du génome proviral, est encapsidé à la membrane par les protéines Gag (Delamarre et al., 1996; Mailler et al., 2016). La particule virale bourgeonne ensuite de la cellule infectée via la membrane cellulaire constituée des protéines d'enveloppes. Le processus concernant le virus foamy semble différent. Les ARNm et génomiques sont exportés dans le cytoplasme via l'interaction avec la protéine Gag qui possède une séquence d'export du noyau (NES) (**figure 8**).

D'une façon intéressante, les virus foamy peuvent rétrotranscrire le génome ARN durant les étapes tardives, lors de l'encapsidation, ce qui induit la production

de particules virales avec un génome à ADN ou ARN. En revanche, cette étape dépend de la souche de virus foamy ainsi que de la population cellulaire infectée (Rethwilm, 2010). Le virus va bourgeonner au niveau de l'appareil de Golgi où se trouvent les glycoprotéines d'enveloppe. La libération des virions hors de la cellule se ferait alors par exocytose, bien qu'elle puisse aussi se faire par bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire (Hamann and Lindemann, 2016).

Pendant le bourgeonnement ou juste après, la protéine Gag est clivée par la protéase pour former les protéines de la matrice, la capsid et la nucléoprotéine. Ce processus est primordial pour la maturation des particules rétrovirales infectieuses (Mailler et al., 2016).

## D. Dissémination rétrovirale

À la suite d'une réplication productive qui aboutit à la formation de nouvelles particules virales infectieuses, les rétrovirus peuvent se disséminer en infectant de nouvelles cellules selon différentes voies : l'infection *de novo* par le virus libre, l'infection via un contact cellulaire ou encore l'expansion clonale des cellules infectées (voir introduction chapitre 5).

## I. Cas du virus foamy simien

Le virus est présent dans la muqueuse orale des singes de l’Ancien Monde et du Nouveau Monde (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013) ainsi que dans les poumons et les matières fécales de macaques rhésus (Blasse et al., 2013; Liu et al., 2008; Murray et al., 2006). Très peu d’études ont investigué le mécanisme de dissémination utilisé par SFV pour infecter de nouvelles cellules chez les PNH, à l’inverse des virus VIH-1/SIV et HTLV-1/STLV-1. En revanche, Hook et al suggère *in vitro* que les PBMC infectées peuvent migrer jusqu’à la muqueuse orale et que les interactions cellulaires conduisent à la production de particules virales infectieuses. Le virus peut aussi passer de la muqueuse orale aux PBMC non-infectées (Hooks and Gibbs, 1975). Une seconde étude suggère que SFV pourrait établir un état de latence dans les cellules épithéliales en contact avec la lame basale puis, une fois les cellules différenciées, l’expression des virions serait établie pour être libérés à la surface des cellules épithéliales de la muqueuse orale, après desquamation. Mais aucune donnée ne montre l’infection des cellules à la lame basale (Murray et al., 2008).

## II. Infection *de novo* par le virus libre

L’infection par le VIH-1 et SIV est associée à la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang chez l’Homme et les PNH asiatiques qui évolue vers un stade SIDA. L’état asymptomatique des PNH réservoirs ne serait pas dû à un contrôle efficace du système immunitaire de l’hôte sur la réplication du virus puisque la

virémie (taux de particules virales libres dans le sang) est au moins aussi importante que chez les PNH non-naturels qui développent un stade SIDA (Goldstein et al., 2000; Silvestri et al., 2003). L'infection des macaques par le SIV, qui développent un état pathologique, est caractérisée par une activité apoptotique plus importante par rapport aux PNH africains asymptomatiques (Cumont et al., 2008; Meythaler et al., 2009; Silvestri et al., 2003). De la même manière, des patients infectés par le VIH-1 et non traités montrent une mortalité cellulaire importante (Sternfeld et al., 2009). L'inhibition de la réplication du virus VIH-1 chez des patients traités par thérapie anti-rétrovirale (ART) montre une diminution de cette mortalité dans le sang périphérique (Chavan et al., 1999). En revanche, les infections naturelles des PNH africains par le SIV ne sont pas associées à une déplétion des lymphocytes malgré une virémie importante (Silvestri et al., 2003). En plus de la virémie, l'apoptose des cellules peut être induite par d'autres mécanismes tels que la reconnaissance de la protéine d'enveloppe du virus par les lymphocytes T CD8+ *in vitro*, l'activation chronique du système immunitaire ou encore l'activation de voies cellulaires apoptotiques après intégration du provirus ou par accumulation d'ADN non-intégrés (Estaquier et al., 2013; Garg and Joshi, 2017). De plus, la majorité des cellules entrant en apoptose concerne les cellules non-infectées qui sont à proximité des cellules infectées par le VIH-1 (Finkel et al., 1995).

Les particules virales libres d'HTLV-1 sont moins infectieuses que le VIH-1 et SIV notamment à cause de leur temps de demi-vie très courte ainsi qu'une

instabilité de la protéine d'enveloppe (Li et al., 2019; Shinagawa et al., 2012). Une étude a comparé l'infectiosité des virus HTLV-1 et VIH-1 pseudotypés avec l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et a montré qu'HTLV-1 était moins infectieux (Derse et al., 2001). De plus, la transfusion de plasma provenant d'un individu infecté par HTLV-1 à un individu sain n'induit aucune séroconversion (Donegan et al., 1994) et des échantillons de plasma de patients chroniquement infectés par HTLV-1 montrent une absence de détection des ARN viraux à polarité positive (Demontis et al., 2015). La faible infectiosité d'HTLV-1 est causée par la glycoprotéine d'enveloppe et par les propriétés intrinsèques du virus. Ainsi, HTLV-1 utilise d'autres modes de dissémination *in vivo* afin d'infecter de nouvelles cellules.

### III. Infection *de novo* par un contact cellule-cellule

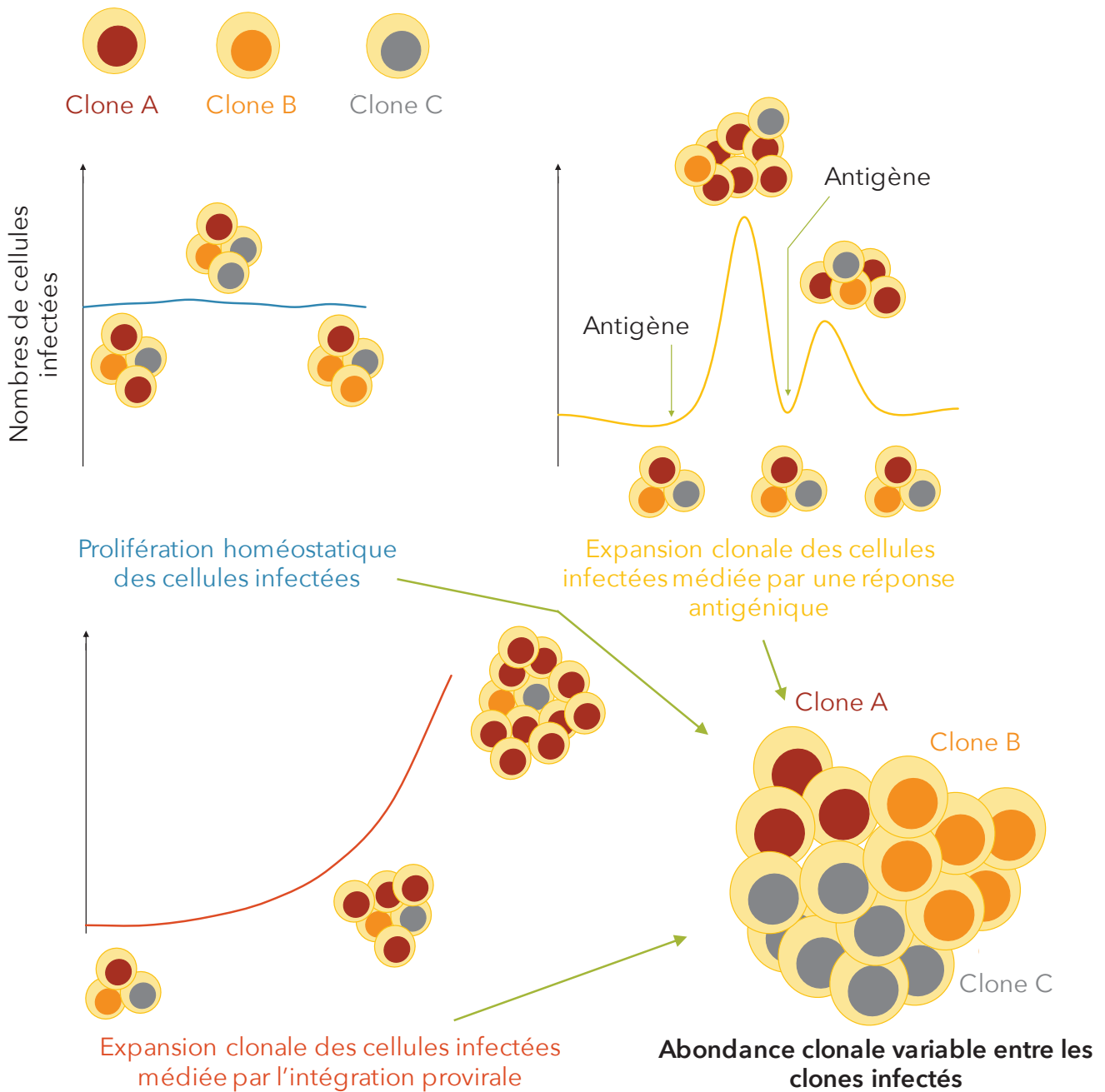
Le virus HTLV-1 se dissémine principalement par un contact entre une cellule infectée et non-infectée, ce qui implique un transfert des virions à la cellule cible par un point de contact entre les membranes cellulaires. C'est la voie de dissémination principale au cours des étapes précoces de l'infection, quand la charge provirale (PVL) est faible (Bangham et al., 2014), bien qu'elle persiste aussi lors d'une infection chronique (Laydon et al., 2020). Trois mécanismes décrivent la transmission d'HTLV-1 par contact cellule-cellule *in vitro* : la synapse virale, les conduits cellulaires et le biofilm viral (Igakura et al., 2003; Pais-Correia et al., 2010; Van Prooyen et al., 2010). La transmission par contact cellule-cellule a aussi été

décrite pour le VIH-1 et l'infectiosité d'HTLV-1 et du VIH-1 est plus importante via ce mécanisme par rapport à l'infection *de novo* par le virus libre (Mazurov et al., 2010; Pedro et al., 2019).

Après infection de l'hôte par le VIH-1, les cellules présentatrices d'antigènes non-permissives peuvent être utilisées en tant que transporteur du virus afin d'atteindre les organes lymphoïdes pour infecter les cellules T CD4+. Ici, l'infection requiert un contact cellule-cellule via la formation d'une synapse infectieuse (Dutartre et al., 2016; Pedro et al., 2019). Le virus peut aussi être transmis via une synapse virale à partir d'une cellule infectée et productive vers une cellule cible permissive, bien que des mécanismes alternatifs aient été mis en évidence *in vitro* (Pedro et al., 2019).







**Figure 9. Expansion clonale des cellules infectées par un rétrovirus au cours du temps.**

Les clones A, B et C en rouge, orange et gris représentent un site d'intégration unique du provirus dans le génome de la cellule. La division cellulaire peut être médiée par l'intégration provirale mais elle peut aussi être associée à une prolifération homéostatique ou encore à une stimulation antigénique. Ainsi, le clone cellulaire aura une activité mitotique plus ou moins importante et par conséquent, l'abondance clonale sera variable. Image adaptée de Liu et al., 2020.

# Chapitre 5. État de l'art de la clonalité rétrovirale

## A. Notion d'expansion clonale des cellules infectées

L'intégration du provirus après infection des cellules induit la formation de clones cellulaires qui se distinguent des autres clones par la localisation du provirus dans le génome de la cellule hôte. La prolifération des cellules permet la réplication passive du provirus lors de la mitose donnant lieu à 2 cellules filles qui possèdent la même intégration provirale que la cellule mère. Cependant, cette division n'est pas forcément dépendante du virus et peut être simplement associée à une prolifération homéostatique, à une stimulation par des cytokines ou des antigènes. Cela entraîne une division cellulaire plus ou moins favorisée pour certains clones par rapport à d'autres, aboutissant à un nombre de cellules sœurs variable entre les clones (**figure 9**). La contribution relative des clones sur la charge provirale et la pathogenèse varie grandement d'un clone à l'autre et dépend de différents paramètres : la persistance de l'infection, la localisation du site d'intégration du provirus, ainsi que la présence ou non d'autres pathogènes au sein de l'hôte.

## B. Clonalité des virus STLV-1 et HTLV-1

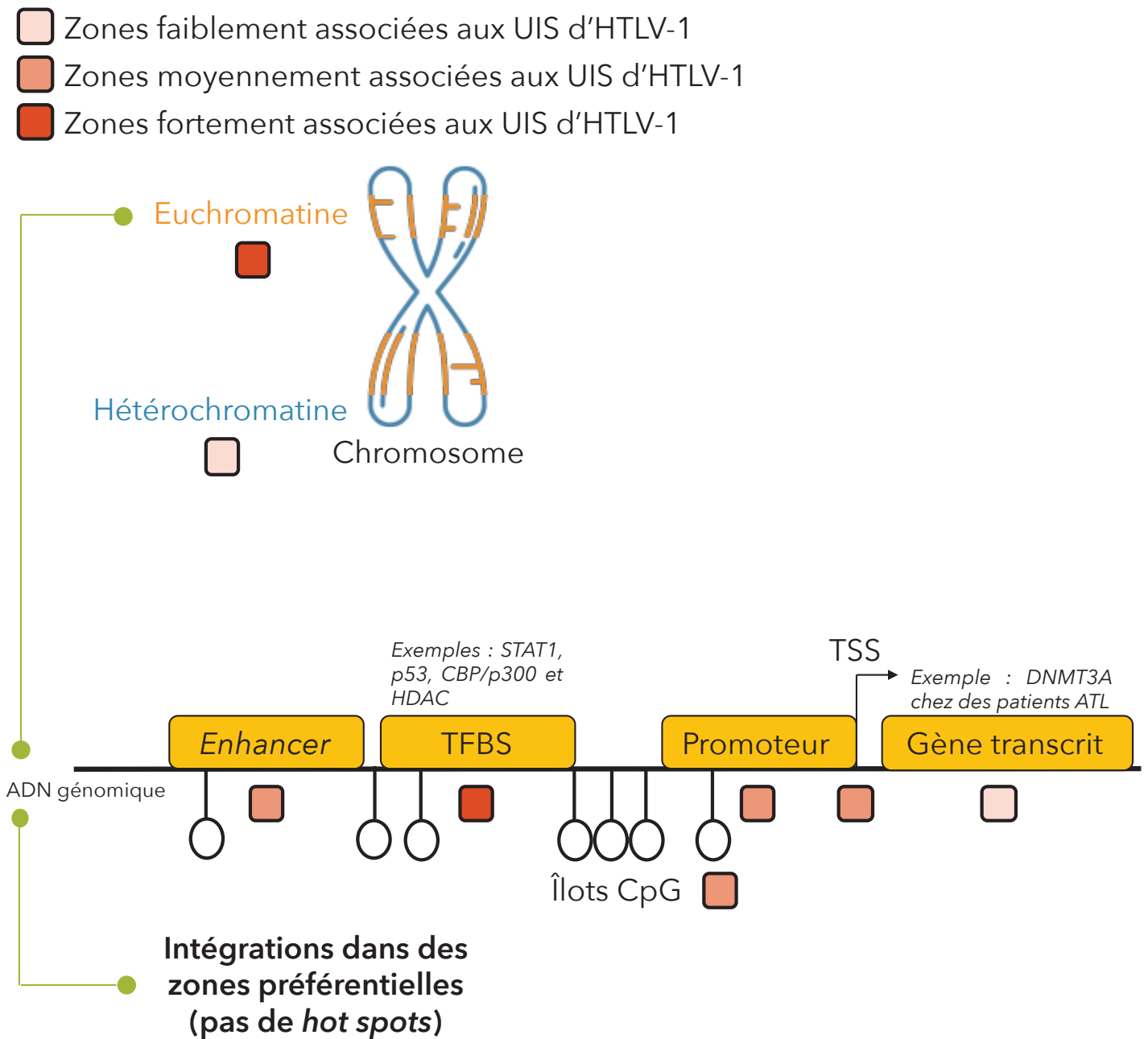
### I. Infection persistante chez l'hôte

Le génome d'HTLV-1 et STLV-1 varie très peu et possède un taux faible d'évolution au cours du temps, à l'inverse du VIH-1 (Gabet et al., 2003; Gessain et al., 1992; Hemelaar, 2013). De plus, l'absence de détection des ARNm et des protéines virales laisse suggérer que le virus produit peu de particules virales ou semble être à l'état de latence dans les PBMC et que la persistance du virus chez l'hôte est principalement médiée par l'expansion clonale des lymphocytes T CD4+ et CD8+ infectés induisant une maintenance ou une augmentation de la charge provirale chez l'Homme et les PNH (Alais et al., 2018; Bangham et al., 2014; Gabet et al., 2003; Melamed et al., 2015; Miura et al., 2013; d'Offay et al., 2013; Sibon, 2006; Souquière et al., 2009b; Tanaka et al., 2005; Turpin et al., 2017; Wattel et al., 1995, 1996; Zane et al., 2010). En effet, nous savons aujourd'hui que des clones HTLV-1 sont spécifiquement détectés après plusieurs années chez des personnes infectées (Etoh et al., 1997; Termini et al., 2017) et le maintien de ces clones au cours du temps n'est probablement pas dû à de nouvelles intégrations provirales puisqu'il n'existe pas de sites récurrents (*hot-spots*) (Cook et al., 2014; Furukawa et al., 1992; Gillet et al., 2011, 2013a; Melamed et al., 2013; Niederer et al., 2014). Cependant, ces observations n'excluent pas qu'une infection productive puisse persister chroniquement (Laydon et al., 2020) puisque le nombre total de clones augmente au cours du temps (Furukawa et al., 1992; Meekings et al., 2008; Wattel

et al., 1995, 1996) et des estimations récentes ont montré que des personnes infectées asymptomatiques ou souffrant de HAM/TSP possèdent une diversité clonale allant de  $10^4$  à  $10^5$  clones (Cook et al., 2014; Gillet et al., 2011; Laydon et al., 2014). De plus, Laydon et al a estimé qu'environ 100 à 200 clones apparaissent et meurent par jour, ce qui joue un rôle dans la diversité clonale et peut participer au développement d'une ATL (Laydon et al., 2020). D'autre part, une infection par HTLV-1 est associée à une réponse cytotoxique active et chronique (Bangham et al., 2009; Jacobson et al., 1990). L'ensemble des données discutées par la suite indique que l'équilibre de l'abondance clonale d'HTLV-1 et STLV-1 est la résultante de l'interaction entre la prolifération clonale et l'élimination des clones induite par la réponse CTL.

## **II. Rôle de Tax et HBZ/SBZ dans l'expansion clonale**

L'oncoprotéine Tax peut interagir avec de nombreux facteurs qui interviennent dans les voies de signalisation cellulaire, du cycle cellulaire et de réparation de l'ADN (Boxus and Willems, 2009). Notamment, Tax peut interagir avec les protéines CREB, NF-kB et AP1 qui sont responsables de la prolifération ainsi que la transformation et l'immortalisation des cellules chez l'Homme et chez les macaques japonais (Boxus and Willems, 2009; Miura et al., 2013; Schwob et al., 2019). Toutefois, cette protéine est aussi très immunogène et correspond à la cible principale de la réponse CTL activée de façon chronique ce qui induit l'élimination de nombreuses cellules infectées à l'exception de celles exprimant peu ou pas la



**Figure 10. Sites d'intégrations préférentiels du provirus HTLV-1 dans le génome de l'hôte.**

Le provirus a tendance à s'intégrer de façon préférentielle dans les zones transcriptionnellement actives (euchromatine). Notamment, HTLV-1 s'intègre au sein de régions régulatrices telles que des *enhancers*, des régions de fixation de facteurs de la transcription (TFBS), des régions promotrices, des îlots CpG ou encore au niveau de sites d'initiation de la transcription (TSS). HTLV-1 semble aussi s'intégrer dans les régions géniques. Image adaptée de Niederer et Bangham., 2014.

protéine Tax (Niederer and Bangham, 2014). L'inhibition de l'expression de Tax joue un rôle majeur dans l'évasion des cellules infectées au système immunitaire.

La protéine HBZ est capable d'inhiber l'expression de Tax (Clerc et al., 2008; Gaudray et al., 2002; Lemasson et al., 2007) tandis que Tax peut stimuler son expression (Landry et al., 2009) bien que de nombreux autres mécanismes interviennent dans la régulation de la transcription (Kulkarni and Bangham, 2018). À l'inverse de Tax, la protéine HBZ est moins reconnue par le système *human leukocyte antigen* (HLA) de type 1 ainsi que par la réponse cytotoxique, ce qui fait d'elle une protéine peu immunogène. D'autre part, la reconnaissance du système HLA est plus efficace chez les patients asymptomatiques (AC) que chez ceux qui souffrent de HAM/TSP (MacNamara et al., 2010). HBZ et SBZ jouent aussi un rôle important dans la stimulation de la prolifération des lymphocytes chez l'Homme et le macaque (Miura et al., 2013; Satou et al., 2006). L'expression faible et stable de la protéine au cours du temps est observée chez tous les patients souffrant d'ATL et de HAM/TSP ce qui suggère son importance dans la persistance et la survie des clones chez l'hôte (Yoshida et al., 2008).

### III. Rôle des sites d'intégrations sur la clonalité d'HTLV-1

#### i. Sites d'intégration préférentiels du provirus

De nombreuses études se sont intéressées aux profils génomiques dans lequel les provirus d'HTLV-1 s'intègrent (**figure 10**). Comme dit précédemment, l'intégration n'est pas aléatoire et semble cibler des zones préférentielles. De plus,

la majorité des lymphocytes T CD4+ naturellement infectés par HTLV-1 possèdent en moyenne une seule intégration provirale (Cook et al., 2012). Le virus va favoriser l'intégration au sein des régions transcriptionnellement actives du génome (euchromatine). L'intégration du provirus dans l'ADN génomique des lymphocytes T CD4+ infectés *in vitro* est observée aux alentours de promoteurs actifs et de zones d'amplification de la transcription (*enhancer*) (Gillet et al., 2011; Meekings et al., 2008). À noter que certaines intégrations sont associées à des zones inhibées (hétérochromatine) (Gillet et al., 2011). Si on regarde plus précisément les profils d'intégration, HTLV-1 s'intègre à proximité des sites d'initiation de la transcription (TSS) et des îlots CpG, à une distance allant de 1 000 paires de bases (pb) à 100 pb. *In vitro*, HTLV-1 favorise fortement l'intégration du provirus au niveau de régions de fixation de facteurs de la transcription (TFBS), notamment des protéines STAT1, p53, HDAC (histone désacétylase, ex : HDAC3 et HDAC6) et HAT (histone acétyltransférase, ex : CBP et p300). Ces protéines jouent un rôle dans la régulation de la réponse anti-virale, du cycle cellulaire et de la conformation de la chromatine (Melamed et al., 2013).

L'intégration du provirus par rapport à la région génomique peut être décrite comme étant symétrique, c'est-à-dire une intégration fréquente en amont ou en aval de la région cible ou asymétrique avec une préférence pour un des deux côtés de la cible. Concernant les régions géniques, des UIS ont été répertoriés au sein de certains gènes ou en amont, bien qu'ils soient moins favorisés (Gillet et al., 2011; Katsuya et al., 2019; Meekings et al., 2008; Rosewick et

al., 2017). La fréquence d'UIS répertoriés au niveau des gènes n'était significativement pas différente entre les patients AC, HAM/TSP et ATL (Katsuya et al., 2019) bien qu'une seconde étude ait montré qu'elle était plus élevée chez les AC par rapport aux HAM/TSP (Niederer et al., 2014). De nombreuses analyses des sites d'intégration du virus HTLV-1 ne mettent en avant aucun site récurrent (*hot spots*) *in vitro* et *in vivo* quelque soit l'état pathologique du patient (Cook et al., 2014; Gillet et al., 2011, 2013a; Melamed et al., 2013; Niederer et al., 2014) mais, dans 6% des cas d'ATL, les UIS des clones dominants sont associés à des intégrations situées en amont de régions géniques appartenant à différentes fonctions (Cook et al., 2014). Une seconde étude montre, à l'inverse de Cook et al, que les intégrations provirales d'HTLV-1 au sein de tumeurs chez des patients ATL présentent plutôt des intégrations au sein ou en aval de gènes impliqués dans le développement tumoral (Rosewick et al., 2017) : (1) Le provirus est intégré au sein d'un intron dans la même orientation qu'un gène induisant l'apparition d'un site de terminaison de la transcription et de polyadénylation prématuré sous le contrôle du LTR-5' proviral. Ces intégrations ont pour incidence une forte diminution de l'expression des exons en aval du provirus, notamment chez des anti-oncogènes. (2) Le provirus est intégré soit dans une région génique, soit en aval d'un gène dans la même orientation ou de façon opposée. Dans ces conditions, l'expression des transcrits anti-sens, dépendant du LTR 3' proviral et codant pour HBZ, indique qu'il y aurait une interaction transcriptionnelle avec les exons



Intégration de provirus défectueux  
chez les patients AC, HAM/TSP et  
ATL

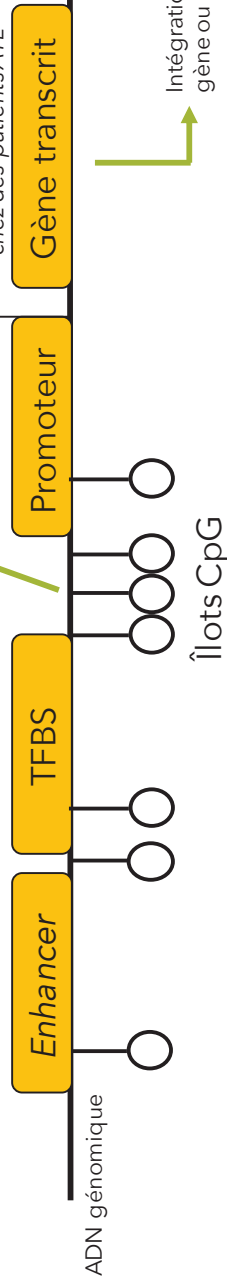
## Expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1

• Plus importante chez  
patients ATL et HAM/  
que chez les AC

Intégration en amont

Intégration dans la même  
orientation que le gène

Exemples : STAT1,  
p53, CBP/p300 et  
HDAC



Intégration au sein d'un  
gène ou en amont

• Pas de différence de la fréquence entr  
les patients AC, ATL et HAM/TSP

en amont du provirus ce qui aurait pour conséquence l'expression d'isoformes de gènes ou l'expression de gènes normalement silencieux (voir introduction chapitre 5-B.III.iii). Cependant, l'analyse des sites d'intégrations d'HTLV-1 au sein de tumeurs provenant de patients ATL ne montre aucune évidence de la présence de *hot-spots* à l'inverse du virus BLV (Rosewick et al., 2017) dont je discute en introduction chapitre 5-E.

## ii. *Impact des UIS sur l'expansion clonale des cellules infectées*

L'intégration du provirus au sein ou en amont de régions géniques est plus fréquente chez les clones abondants quand le provirus est intégré dans la même orientation que le gène ciblé *in vitro* et *in vivo* (Gillet et al., 2011; Melamed et al., 2013). De la même façon, une abondance clonale plus importante est liée à l'intégration du provirus en amont de TSS et d'îlots CpG *in vivo* mais l'orientation ne joue pas un rôle majeur ici (Melamed et al., 2013). L'intégration au niveau de sites qui favorisent l'expansion clonale est plus fréquente chez les patients HAM/TSP et ATL en comparaison des patients asymptomatiques (Gillet et al., 2011) (**figure 11**).

La présence de provirus défectueux ayant subi une délétion d'un LTR ou d'un gène est une caractéristique couramment observée lors d'une infection par

**.....**  
**clones par la réponse CTL**

Peut être associée à une activation de l'expression de Tax

Intégration de provirus défectueux chez les patients AC, HAM/TSP et ATL

Activation de l'expression Tax

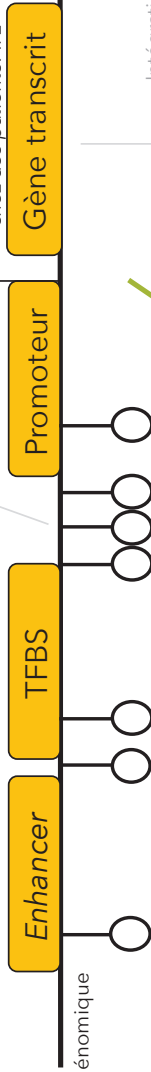
**Expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1**

Plus importante chez les patients ATL et HAM/TSP que chez les AC

Intégration dans la même orientation que le gène

Exemples : STAT1, p53, CBP/p300 et HDAC

Exemple : DNMT3A chez des patients ATL

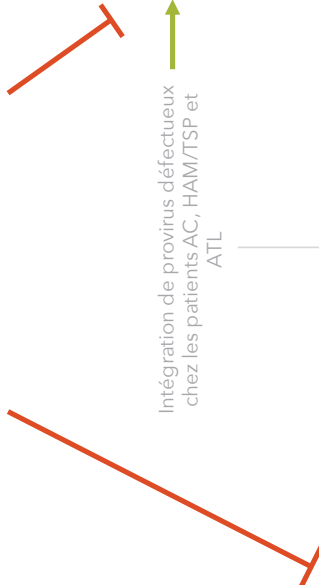


Intégration au sein d'un gène ou en amont

Pas de différence de la fréquence entre les patients AC, ATL et HAM/TSP

Intégration en aval Inhibition de l'expression Tax

Inhibition de l'expression Tax



HTLV-1 *in vivo* et *in vitro* (Hashikura et al., 2016; Kataoka et al., 2015; Katsuya et al., 2019). L'étude de Katsuya et al observe ce phénomène chez des patients AC, HAM/TSP et ATL dans 18,8%, 17,3% et 30,2% des cas respectivement et est associé à une prolifération clonale plus importante (Katsuya et al., 2019). Toutefois, la fréquence de provirus intégrés défectueux vs complet n'est pas différente au sein des gènes cibles. Ces données, associées à la proportion importante de gènes dont l'expression est modulée par les transcrits dépendants du LTR 3' proviral, sont en accord avec des études précédentes montrant une perte d'expression du LTR 5' proviral ou l'apparition de mutations dans le gène codant pour la protéine Tax (Kataoka et al., 2015; Rose et al., 2000; Takeda et al., 2004) (voir introduction chapitre 5-B.III.iii).

### iii. *Influence des UIS sur l'expression des génomes cellulaire et provirale*

Selon le profil des UIS, l'expression du provirus peut être régulée par l'environnement génomique où il se trouve. La position du provirus n'affecte pas uniquement l'expansion clonale mais aussi l'expression de la protéine Tax (**figure 12**). Les lymphocytes T n'exprimant pas Tax sont associés à une intégration provirale au sein d'une région génique et dans la même orientation transcriptionnelle (Melamed et al., 2013). D'autre part, plus le gène en amont du provirus est proche, plus l'expression de Tax est inhibée.

Cela implique qu'un mécanisme d'interférence transcriptionnelle peut inhiber Tax. Il existe une corrélation opposée entre l'abondance clonale et l'expression de Tax puisqu'elle est majoritairement exprimée dans les clones minoritaires (Melamed et al., 2013). Malgré le rôle de Tax dans l'activation de la prolifération et la transformation cellulaire, l'inhibition de son expression apporte un avantage dans la survie des clones *in vivo* puisqu'elle est très immunogène. Cela rend compliqué l'analyse de la clonalité pendant une infection précoce car beaucoup de cellules sont éliminées par la réponse CTL. Il est donc possible que le rôle de Tax ne soit pas de maintenir une abondance clonale *in vivo* mais plutôt de permettre la production de virions et l'infection de nouvelles cellules. D'autre part, 54% des clones de patients ATL (Cook et al., 2014) ont perdu l'expression de Tax à travers la méthylation ou la délétion du LTR 5' ou par l'apparition de mutations dans le gène (en particulier par l'apparition d'un codon stop) (Bangham et al., 2009; Kataoka et al., 2015; Koiwa et al., 2002; Miyazaki et al., 2007; Niewiesk and Bangham, 1996; Rosewick et al., 2017; Sibon et al., 2013; Takeda et al., 2004; Termini et al., 2017).

Concernant les TSS et les îlots CpG, leur présence en amont du provirus est associée à cette inhibition tandis qu'en aval, l'expression de Tax est observée. De plus, l'intégration en aval des TFBS, notamment le site de STAT1, est liée à une proportion importante de cellules T exprimant Tax pour un clone donné (Melamed et al., 2013). L'expression de Tax *in vitro* peut aussi être détectée même si certains provirus sont défectueux (Hashikura et al., 2016).

La protéine Tax permet d'activer l'expression du provirus mais aussi de gènes cellulaires (Matsuoka and Jeang, 2011) qui peuvent contribuer à la persistance des clones chez l'hôte et contribuer à la pathogenèse. En revanche, l'activation constitutive de NFκB (normalement activée par Tax) a été observée même en l'absence de la protéine virale (Mori et al., 1999; Yoshida, 2001). L'étude de Kinpara et al observe que des transcrits anti-sens provenant du génome cellulaire fusionnés avec du LTR proviral à l'extrémité 3' montre une activation de la voie NFκB (Kinpara et al., 2015). De la même façon, nous savons que l'ARN d'*hbz* est capable de promouvoir la prolifération des cellules T infectées (Mitobe et al., 2015; Satou et al., 2006) et que le taux de transcrits codant pour la protéine HBZ dans les tumeurs de patients ATL, évaluée par *RNA-sequencing*, est plus important pour *hbz* que *tax* (Rosewick et al., 2017). Ces données laissent supposer que les transcrits viraux jouent un rôle dans la prolifération et la survie des cellules T infectées.

Des études récentes ont montré le rôle des micro ARN (miRNA) chez les virus HTLV-1, BLV, HSV 1 et 2, EBV, CMV, HHV-8 et SV40 (virus simien 40) dans l'expression des gènes viraux, l'échappement au système immunitaire et la survie des cellules infectées (Satou et al., 2006; Sullivan et al., 2005; Piedade and Azevedo-Pereira, 2016; Durkin et al., 2016). Concernant HTLV-1, il y a un effet opposé entre la protéine HBZ et l'ARN codant pour HBZ puisque la protéine promeut l'entrée en phase S du cycle cellulaire et l'apoptose tandis que l'ARN atténue la mortalité cellulaire et active la prolifération des cellules T *in vitro* (Mitobe

et al., 2015). Une étude sur 426 patients ATL montre l'apparition d'ARN hybride entre le LTR 5' ou l'ARN *hbx* avec la séquence génomique cellulaire juxtaposée pouvant atteindre une taille de 50kb (Kataoka et al., 2015). De plus, des mutations mais aussi des variations de copies de gènes sont observées dans 97,8% de la cohorte (sur 370 échantillons) se traduisant par des amplifications ou des délétions homozygotes dont certains gènes font partie de l'interactome de Tax (Boxus and Willems, 2009; Kataoka et al., 2015). C'est notamment le cas de la voie de signalisation TCR-NFκB montrant de nombreuses altérations (Kataoka et al., 2015; Marçais et al., 2020), particulièrement des mutations somatiques récurrentes, dans 90% des cas d'ATL et se traduisant par des gains de fonctions de certains composants ou perte de fonction pour les inhibiteurs de la régulation de ces voies. L'étude de Kataoka et al montre aussi une hyper-méthylation importante des îlots CpG induisant une inhibition de l'expression des gènes, comme ceux impliqués dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1. L'ensemble de ces altérations pourrait participer à la survie de la cellule infectée puisqu'elles touchent majoritairement des gènes impliqués dans la modulation de la réponse immune.

Un autre mécanisme utilisé par HTLV-1 pour modifier la régulation de l'expression des gènes est l'interaction avec la protéine CTCF. Il s'agit d'un facteur de transcription pouvant reconnaître une séquence de 20nt sur environ 50000 sites dans le génome humain ce qui permet de former des boucles de chromatine et induire des contacts entre promoteurs et *enhancers* et donc de réguler

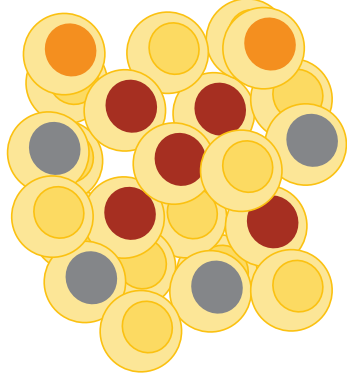
l'expression des gènes. Il a été observé que CTCF peut reconnaître un motif présent dans le génome proviral d'HTLV-1 au niveau de la région pX (Melamed et al., 2018; Satou et al., 2016). Cela aurait pour conséquence d'induire la formation de boucles anormales et des contacts entre le provirus et des sites génomiques distant de 1,4Mb (Melamed et al., 2018). De plus, l'étude montre une activation de l'expression des gènes directement flanquant en amont (anti-sens) et/ou en aval du provirus (sens) mais aussi à des sites plus distants ainsi qu'une altération de l'épissage induisant la formation de nouveaux transcrits ce qui est en accord avec les études de Kataoka et al et Rosewick et al montrant une transcription anti-sens du provirus et continuant vers l'ADN génomique de l'hôte (Kataoka et al., 2015; Rosewick et al., 2017). Dans un premier temps, l'altération de la transcription bidirectionnelle laisse suggérer que la présence du provirus HTLV-1 altère les contacts normaux entre les promoteurs et enhancers en créant de nouveaux contacts et en annulant certains pré-existants. Dans un second temps, les contacts pourraient rapprocher le LTR proviral à proximité d'un gène et causer une transcription anormale (Melamed et al., 2018). Il existe entre  $10^4$  et  $10^5$  clones différents chez l'hôte et chaque clone possède une intégration provirale unique dans une localisation génomique précise (Cook et al., 2014), il est possible de postuler qu'HTLV-1 pourrait déréguler des dizaines de milliers de gènes au sein d'un seul hôte par ce mécanisme.

Ainsi, l'ensemble de ces données laisse suggérer qu'il pourrait y avoir une sélection clonale basée sur l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques





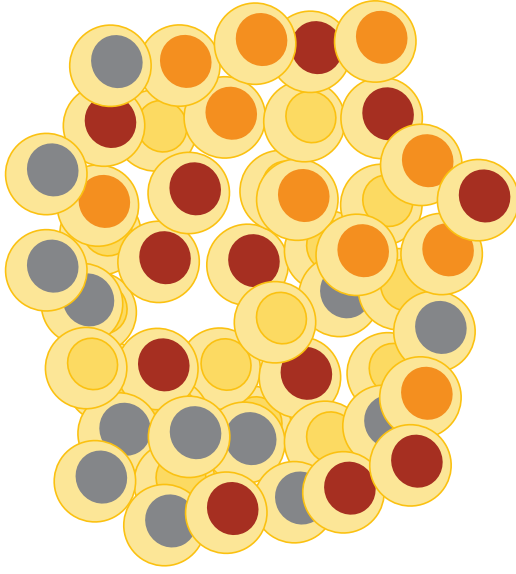
Clone A Clone B Clone C  
Clone A (avec des mutations)



Patients AC infectés par HTLV-1

Présence de clones majoritaires et minoritaires (= **oligo**clonalité)

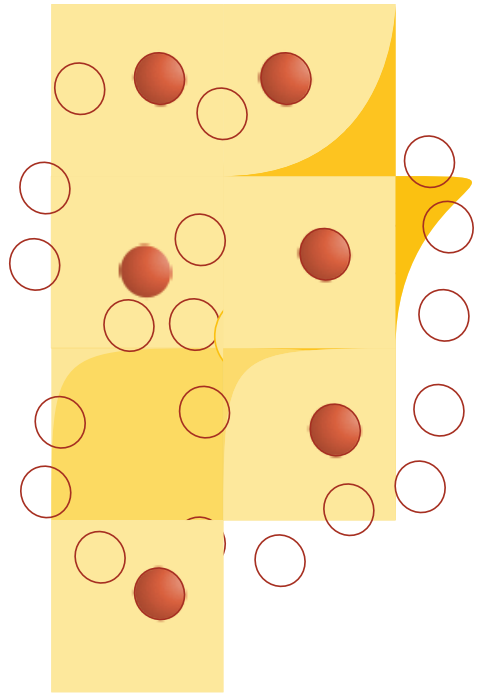
Charge provirale **faible**



Patients ayant développés une HAM/TSP

Présence de clones majoritaires et minoritaires (= **oligo**clonalité)

Charge provirale **élevée**



Patients ayant développés une ATL

Présence d'un clone dominant (= **mono**clonal) possédant des mutations somatiques

Charge provirale **élevée**

dans les génomes proviraux et cellulaires afin d'échapper au système immunitaire, de proliférer et survivre, même en absence de Tax reconnue par la réponse CTL.

#### IV. Influence de la clonalité rétrovirale et de la charge provirale sur la pathogenèse d'HTLV-1 et STLV-1

La clonalité d'HTLV-1 et STLV-1 varie selon l'état pathologique des individus infectés. Chez l'Homme mais aussi les PNH infectés, l'expansion clonale des cellules infectées dans le sang concerne principalement les T CD4+ bien qu'une minorité de lymphocytes T CD8+ constitue la PVL (Melamed et al., 2015; d'Offay et al., 2013; Souquière et al., 2009b). Une estimation du nombre de clones chez un hôte infecté par HTLV-1 suggère qu'il y aurait entre environ  $10^4$  et  $10^5$  clones dans la circulation sanguine (Bangham et al., 2014; Laydon et al., 2014).

##### i. *Influence de clonalité sur l'ATL et l'HAM/TSP*

Des patients AC ou souffrant de HAM/TSP montrent une prolifération oligoclonale (présence d'un ou plusieurs clones ayant une abondance clonale importante et de nombreux clones minoritaires) des lymphocytes T CD4+ infectés tandis qu'elle tend vers une monoclonalité chez les patients ATL (1 seul clone dominant dans 80 à 95% des cas) (**figure 13**) (Artesi et al., 2017; Cook et al., 2014; Gillet et al., 2011; Katsuya et al., 2019; Rosewick et al., 2017). Une étude a montré que plus la taille des clones d'abondance moyenne chez les AC augmente plus le risque de développer une ATL est élevé (Farmanbar et al., 2017). De plus, le suivi

de l'évolution des clones HTLV-1 au cours du temps chez des patients AC ayant développé une ATL montre l'apparition de mutations génétiques au sein des PBMC des années avant le diagnostic de la pathologie (Marçais et al., 2020; Rowan et al., 2020). Ces 2 phénomènes jouent un rôle majeur dans le processus de tumorigenèse. En revanche, il reste à déterminer le rôle des transcrits hybrides dans la pathogenèse.

## ii. *Influence de la charge provirale sur l'ATL et HAM/TSP*

Il n'existe pas de corrélation entre la diversité clonale et la charge provirale entre les AC et les patients HAM/TSP mais semble être significative chez les patients ATL (Gillet et al., 2011). De plus, cette dernière peut varier d'un facteur 1000 entre les patients infectés et est relativement constante à l'échelle d'un individu au cours du temps (Cook et al., 2014; Demontis et al., 2013; Gillet et al., 2011). La PVL augmente lentement après plusieurs décennies (Sasaki et al., 2010). À noter que les individus ayant une PVL élevée dans le sang sont plus à risque de développer une ATL ou une HAM/TSP (Iwanaga et al., 2010; Matsuzaki et al., 2001) ce qui laisse suggérer que la réponse CTL est plus efficace chez les patients AC **(figure 13)**.

### iii. *Données sur STLV-1 et les PNH*

La prolifération oligoclonale et monoclonale des cellules naturellement infectées par STLV-1 a aussi été observée chez des macaques japonais, des babouins et AGM souffrant d'ATL (Miura et al., 2013; d'Offay et al., 2007, 2013; Turpin et al., 2017). Comme dans le cas d'une infection par HTLV-1, une augmentation de la PVL dans le sang de macaques et babouins infectés par STLV-1 est associée au développement de l'ATL (Gabet et al., 2003; Miura et al., 2013; d'Offay et al., 2013; Turpin et al., 2017) et il existe une corrélation entre le nombre de sites d'intégrations uniques et la charge provirale dans le sang et les organes d'un babouin ATL (Turpin et al., 2017). Cette même étude montre aussi une PVL élevée dans certains organes (ganglions lymphatiques, rate et poumons) et dans le sang d'un babouin ATL naturellement infecté par STLV-1 ce qui suggère fortement que les clones provenant du sang se sont infiltrés dans les organes. De plus, lorsque l'on regarde la diversité clonale au sein de ces organes par rapport au sang, on peut s'attendre à retrouver des similarités entre les différents compartiments mais il s'avère qu'il existe une prolifération spécifique de certains clones dans les organes, formant ainsi des niches où les clones infectés peuvent proliférer. Dans le cas d'HTLV-1, la majorité des cas d'ATL humain montre la présence soit d'un clone dominant (plus de 35% d'abondance clonale), soit de 2 clones majoritairement égaux ou encore la présence d'un clone dominant avec quelques clones intermédiaires. En revanche, on ne peut pas exclure la présence de plusieurs provirus dans une même cellule. Concernant STLV-1 chez ce babouin

ATL, les profils de clonalités sont différents puisque l'on observe un clone dominant mais aussi un grand nombre de clones intermédiaires et minoritaires plutôt similaires à un profil observé chez les patients AC et HAM/TSP dans le cas d'HTLV-1 (Turpin et al., 2017).

## V. Influence des co-infections non rétrovirales sur l'expansion clonale des virus HTLV-1

La stimulation de la prolifération clonale n'est pas exclusivement liée à l'intégration du provirus ainsi qu'à son expression. Les lymphocytes T possèdent des récepteurs antigéniques (TCR) spécifiques d'un clone à l'autre. Par exemple, dans le cas de la co-infection entre HTLV-1 et *Strongyloides stercoralis* (un ver responsable de la strongyloidiasis) ou encore avec une bactérie responsable d'une dermatite chez des patients. Les UIS des clones majoritaires étaient exclus des zones favorisant l'expansion clonale malgré une abondance clonale plus élevée (Gillet et al., 2013a). De la même façon, une étude a voulu regarder l'influence du virus de l'hépatite B (HBV) sur la clonalité d'HTLV-1 chez des individus co-infectés en Australie (Turpin et al., 2019). L'expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1 était plus importante chez les patients co-infectés. Il est alors possible que l'expansion clonale puisse être médiée par la reconnaissance d'un antigène par un TCR spécifique lors de co-infections chez l'hôte.

## C. Clonalité du VIH-1 et SIV

### I. Mise en place des cellules réservoirs et latence

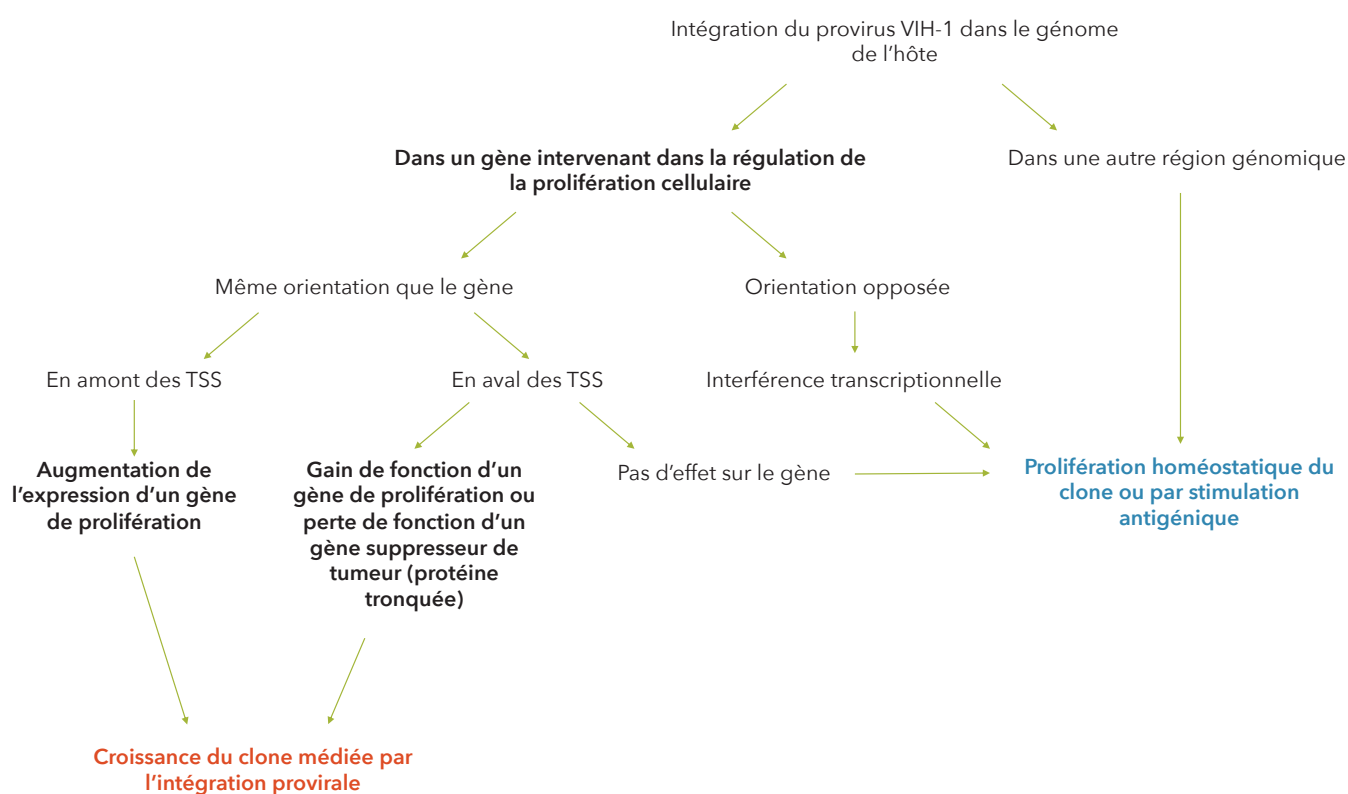
Un traitement anti-rétroviral (ART) chez des patients (adultes et enfants) chroniquement infectés par le VIH-1 va bloquer l'infection *de novo* en inhibant plusieurs étapes du cycle de réplication du virus (Kearney et al., 2014; Van Zyl et al., 2017). Des résultats similaires ont été obtenus chez des macaques rhésus infectés par le RT-SHIV (SIV contenant la transcriptase inverse du VIH-1) (Kearney et al., 2015). Cependant, certaines cellules infectées par le virus persistent dans le sang pendant plusieurs années post-thérapie (McGary et al., 2017; Palmer et al., 2008; Wagner et al., 2014) et le niveau de PVL reste faible mais stable pendant des années chez la plupart des patients sous traitement (Bauer et al., 2020; Besson et al., 2014). De plus, l'interruption du traitement est associée à la reprise d'une réplication active du virus *in vivo* et la virémie remonte en quelques semaines à un niveau similaire observé avant le traitement (Davey et al., 1999; von Wyl et al., 2011; Yerly et al., 2004). Les cellules persistantes sont des lymphocytes T CD4+ mémoires et réservoirs du virus latent qui possèdent un temps de demi-vie très long de 43 à 44 mois (Crooks et al., 2015; Siliciano et al., 2003). Chez l'Homme et le macaque, elles sont établies au bout de quelques jours post-infection, notamment pendant la phase « d'éclipse » qui correspond aux moments précoces de l'infection où les virions ne sont pas encore produits (Henrich et al., 2017; Okoye et al., 2018; Whitney et al., 2014). Des études ont montré que ces cellules peuvent échapper au système immunitaire et qu'elles peuvent se maintenir en

quiescence (Chun et al., 1998; Finzi et al., 1997, 1999; Wong et al., 1997). Toutefois, la maintenance des réservoirs viraux peut être liée à la division cellulaire homéostatique, antigénique ou médiée par le site d'intégration du provirus (Hokello et al., 2019; Murray et al., 2016), augmentant ainsi le nombre de cellules infectées sans réplication active du virus. Ainsi, les cellules réservoirs représentent une barrière majeure dans la mise en place d'un traitement puisqu'elles peuvent persister et croître par expansion clonale.

## **II. Mécanismes d'expansion clonale des cellules infectées par les virus VIH-1 et SIV**

Différentes études ont montré qu'environ 40% des lymphocytes T CD4+ infectés possédant un provirus complet pouvaient subir de l'expansion clonale lors d'un traitement ART, bien que plus de 90% des UIS soient des provirus défectueux par l'apparition de mutations ou délétions de gènes viraux (Anderson and Maldarelli, 2018; Bruner et al., 2016; Bui et al., 2017; Ho et al., 2013; Hosmane et al., 2017; Li et al., 2019; Lorenzi et al., 2016; Symons et al., 2018; Veenhuis et al., 2018). Cependant, les clones possédant les provirus complets sont plus susceptibles d'être reconnus par une réponse CTL chez l'hôte infecté (Veenhuis et al., 2018). À noter que, comme dans le cas du virus HTLV-1, la majorité des cellules T CD4+ possèdent une seule intégration provirale *in vivo* (Josefsson et al., 2011). L'expansion clonale des cellules T infectées est stable et lente au cours du temps

bien que les cellules réservoirs soient en expansion de façon constante (Besson et al., 2014; Bui et al., 2017; Hosmane et al., 2017; Lorenzi et al., 2016; Siliciano et al., 2003). Cela illustre un profil polyclonal (plusieurs clones ayant une abondance équivalente) et suggère que les clones du VIH-1 peuvent soit croître et décroître lors d'une stimulation du système immunitaire par un antigène, soit subir une prolifération homéostatique ou encore être médiée par le site d'intégration du provirus (**figure 14**).



**Figure 14. Influence de l'intégration provirale du VIH-1 sur l'expansion clonale des cellules infectées.**



### i. *Expansion clonale par stimulation antigénique*

En dépit du traitement ART, l'activation chronique du système immunitaire persiste dans le sang des individus infectés ce qui signifie que le LTR 5' de certains clones du VIH-1 est toujours actif et que les provirus (complets et défectueux) peuvent produire certaines protéines virales qui seront reconnues par les lymphocytes T CD8+ (Ho et al., 2013; Imamichi et al., 2016; Pollack et al., 2017). Ainsi, les clones ne pouvant pas exprimer l'antigène sont susceptibles d'échapper au système immunitaire et de se répliquer par expansion clonale de manière plus efficace. En revanche, l'infection chronique du système immunitaire par le VIH-1 aura tendance à induire une perte de la prolifération des lymphocytes T CD4+ infectés et lymphocytes T CD8+ au cours du temps (Betts et al., 2001; Pinzone et al., 2019; Pitcher et al., 1999).

L'expansion clonale des lymphocytes T CD4+ mémoires infectés peut être médiée par la reconnaissance d'antigène ou de cytokines. Chez un individu infecté par le VIH-1 et ayant développé un carcinome, la virémie et l'abondance d'un clone augmentaient au fur et à mesure de la progression de la tumeur en dépit du traitement ART. Cela indique que l'expansion clonale et la production de particules virales sont liés à une réponse antigénique contre la tumeur (Simonetti et al., 2016). Une caractéristique supplémentaire peut être ajoutée à la dynamique de l'expansion clonale car la prolifération des lymphocytes T est différente d'un antigène à l'autre.

## ii. *Expansion clonale homéostatique*

En réponse à la déplétion des lymphocytes T CD4+, la production d'IL-7 est amplifiée et active la prolifération des cellules T sans réactivation de la réplication du VIH-1 *in vitro* et *in vivo* (Napolitano et al., 2001; Vandergeeten et al., 2013). Cela suggère que les lymphocytes T CD4+ infectés par le virus peuvent subir de l'expansion clonale homéostatique sans être ciblés et éliminés par le système immunitaire.

## iii. *Expansion clonale médiée par l'intégration provirale*

De la même façon que pour HTLV-1, l'intégration du provirus se fait dans des zones préférentielles *in vitro* et *in vivo*, en particulier dans les introns de gènes transcriptionnellement actifs (Han et al., 2004; Ho et al., 2013; Schröder et al., 2002; Shan et al., 2011). Les profils d'intégrations *in vitro* et *in vivo* sont cependant différents. *In vitro*, l'intégration tend à se faire de façon aléatoire dans les introns, peu importe son orientation par rapport au gène. *In vivo*, chez des patients sous traitement ART, les UIS sont fréquemment retrouvés dans des introns spécifiques et en amont de TSS appartenant à des oncogènes (orientation identique ou opposée) tels que *BACH2*, *MKL2* et *STATB5* (Liu et al., 2020; Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014), bien que ces sites représentent une faible proportion par rapport au nombre total de clones (<3%). De plus, ces sites ont été détectés dans plusieurs études avec différentes méthodes et l'intégration dans la même orientation est associée à de l'expansion clonale (Ikeda et al., 2007; Maldarelli et

al., 2014; Wagner et al., 2014). L'intégration du provirus dans les zones fortement actives est médiée par l'interaction de protéines cellulaires avec l'intégrase virale comme par exemple le facteur LEDGF/p75 (*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*) (Poletti and Mavilio, 2018).

Des PBMC isolées à partir d'individus humains et de macaques ont été utilisées pour comparer les UIS du VIH-1 et du SIV *in vitro*. Les données montrent que le SIV possède un profil d'intégration similaire au VIH-1 en ciblant préférentiellement des gènes communs fortement exprimés (plus de 70% des UIS sont similaires dans le génome de l'Homme et dans celui du macaque) (Ferris et al., 2019). Chez des macaques infectés par le SIV suivant un traitement ART, le virus cible aussi les gènes *BACH2*, *MKL2* et *STATB5* comme observé pour le VIH-1. Les sites *BACH2* et *MKL2* n'étaient pas associés à de l'expansion clonale tandis qu'un seul clone du SIV intégré dans la même orientation que le site *STATB5* était lié à de l'expansion clonale. En revanche, l'orientation des UIS tend à être légèrement plus élevée dans le sens opposé au gène (Ferris et al., 2019).

Quand le provirus du VIH-1 est intégré dans le gène cible, il peut y avoir une compétition entre les régions promotrices du virus et du gène de l'hôte induisant une interférence transcriptionnelle ce qui peut jouer un rôle important dans la prolifération des cellules infectées. Par exemple, dans le cas où le virus est intégré en amont du TSS du gène *BACH2* (gène impliqué dans la prolifération cellulaire), le promoteur du virus active la transcription ainsi que l'épissage des gènes viraux via la protéine Tat sur le site du *major splice donor* (MSD) du virus et,

indirectement, active l'épissage du gène cellulaire conduisant à la synthèse protéique (Mueller et al., 2018; Pinzone et al., 2019). D'autres profils d'intégrations peuvent aboutir à des gains ou pertes de fonction de protéines associées à la prolifération cellulaire (Liu et al., 2020).

## D. Données connues à ce jour à propos du SFV et PFV

### I. Latence du SFV dans les cellules infectées

Bien que l'ADN proviral du virus SFV soit détecté dans les PBMC, l'infection semble être à l'état de latence, donnant lieu à des infections persistantes chez les PNH et l'Homme (Falcone et al., 1999; Murray et al., 2008; Rua et al., 2013; Soliven et al., 2013). De plus, la charge virale, traduite par la présence d'ARN transcrits à partir du provirus, n'est pas détectée dans la salive de personnes infectées ce qui suggère que SFV est latent dans le sang et dans la salive chez l'Homme (Rua et al., 2013). Un point important est que la clonalité et l'hypothèse que le virus utilise l'expansion clonale des cellules infectées pour se disséminer n'ont jamais été démontrés *in vitro* et *in vivo*.

### II. Sites d'intégrations *in vitro*

Le virus PFV fait l'objet de nombreuses études structurales concernant les mécanismes impliqués dans le processus d'intégration du provirus dans le

génomique cellulaire (Lesbats et al., 2016; Mackler et al., 2018). Toutefois, très peu d'études ont investigué les zones génomiques ciblées par le provirus du PFV *in vitro*. À l'inverse des virus HTLV-1/STLV-1 et VIH-1/SIV, le virus foamy favorise fortement l'intégration dans les régions où la transcription est inhibée (hétérochromatine) et pauvre en gène (Maskell et al., 2015; Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Néanmoins, lorsqu'un UIS est détecté dans une région génique, le provirus s'intègre au niveau des régions promotrices (Nowrouzi et al., 2006) et des délétions au niveau des LTR ont été répertoriées (De Celis-Kosmas et al., 1997). Plusieurs études ont montré que la sélection des sites d'intégrations est en partie médiée par les interactions entre l'intégrase et des protéines cellulaires associées à la chromatine, comme pour le VIH-1 avec le facteur LEDGF (Poletti and Mavilio, 2018). Le profil d'intégration de PFV et l'absence de pathologie chez l'hôte laisse suggérer que l'intasome pourrait interagir avec de tels facteurs cellulaires et cibler les nucléosomes condensés (Lesbats et al., 2016). En effet, la protéine Gag du virus peut interagir directement avec la chromatine (Lesbats et al., 2017) et l'intasome du PFV a tendance à cibler l'ADN super-enroulé bien que le temps de recherche d'un site d'intégration par l'intasome limite l'intégration du provirus (Mackler et al., 2018). De la même façon, il existe une séquence dans le LTR proviral pouvant être reconnue par CTCF chez SFV et qui pourrait bloquer son activité et participer à la faible présence d'altérations dans le génome cellulaire (Goodman et al., 2017).

L'ensemble de ces données est en accord avec la latence virale établie *in vivo* chez les PNH et l'Homme. Toutefois, l'infection productive dans la salive des animaux laisse suggérer que le contrôle du système immunitaire sur SFV est plus efficace chez l'Homme que chez les PNH.

## E. Clonalité étudiée chez d'autres deltarétrovirus

Dans cette partie, j'ai choisi de présenter et de discuter des travaux portant sur la clonalité de 2 autres rétrovirus, BLV et HTLV-2, faisant partie du même genre qu'HTLV-1 et STLV-1, les deltarétrovirus. Il s'agit de 2 modèles intéressants car ils possèdent des caractéristiques spécifiques qui font d'eux des modèles de choix dans l'étude de pathogenèse liée à HTLV-1. En effet, les bovins naturellement infectés par le BLV sont majoritairement asymptomatiques et environ 5% des cas va développer une leucémie touchant les lymphocytes B. Cependant, il est possible d'infecter des moutons de façon expérimentale et ainsi obtenir une cohorte où 100% des individus développent une leucémie en temps très court (environ 20 mois après infection) (Van den Broeke et al., 2010; Willems et al., 1992). Concernant HTLV-2, ce virus est aussi capable de causer des infections persistantes chez l'Homme mais, à l'inverse d'HTLV-1, il n'a jamais été associé au développement d'une leucémie.

## I. Le virus de la leucose bovine

De la même façon qu'HTLV-1, le virus de la leucose bovine (BLV), un autre rétrovirus appartenant au genre Deltarétrovirus, peut induire une infection persistante chez son hôte et se dissémine par expansion clonale des lymphocytes infectés 2 mois post-infection (Gillet et al., 2013b). Ainsi, lors de l'infection précoce, le virus aura tendance à produire de nouvelles particules virales pour infecter de nouvelles cellules (illustrée par une propagation polyclonale des cellules infectées) en ciblant des régions actives du génome cellulaire tels que des îlots CpG et régions géniques (Gillet et al., 2013b; Murakami et al., 2011). Cependant, une infection chronique va engendrer une sélection négative des clones par la réponse immunitaire (diminution de la PVL) qui va médier l'expansion des clones restants (Gillet et al., 2013b). D'autre part, l'infection expérimentale de moutons par le BLV dans l'étude de Rosewick et al montre que les UIS du BLV sont fréquemment retrouvés au voisinage de gènes impliqués dans la formation tumorale. À l'instar de HTLV-1, le provirus du BLV s'intègre au sein de régions similaires dans le génome de la cellule de l'hôte (soit dans une région génique soit inter-génique notamment en aval). Cela ayant pour conséquence une modification de la régulation de l'expression des gènes par interférence transcriptionnelle en particulier via la synthèse du transcrit anti-sens codant pour la protéine virale AS (l'équivalent de HBZ chez HTLV-1). À l'inverse d'HTLV-1, l'analyse des sites d'intégrations du virus BLV, au sein de tumeurs provenant des moutons, montre la présence de 65 *hot-spots* d'intégration au niveau de gènes impliqués dans le

processus tumoral (61 dans les gènes et 4 inter-géniques) qui sont également tous retrouvés chez ces animaux à l'état asymptomatique (Rosewick et al., 2017). Ainsi, la perturbation de ces gènes par l'intégration provirale peut contribuer à une survie plus importante des clones cellulaires. Indirectement, cela peut induire l'apparition de mutations somatiques et participer au développement de l'ATL.

## II. Le virus HTLV-2

Bien que le virus HTLV-2 ne soit pas associé au développement d'une leucémie, il est capable de causer des infections persistantes chez l'Homme ainsi que d'immortaliser des lymphocytes humains *in vitro* (Chen et al., 1983; Tarsis et al., 1998). Et, dans le même cas qu'HTLV-1, HTLV-2 est capable d'infecter les lymphocytes T-CD4+ et CD8+ *in vivo* (Kannian et al., 2012) bien que les cellules T CD8+ soient la cible majoritaire (Melamed et al., 2014). De plus, l'expansion clonale des cellules infectées par HTLV-2 a été décrite *in vivo* (Cimarelli et al., 1996; Gabet et al., 2006). L'étude Melamed et al montre que le virus HTLV-2 est capable d'induire l'expansion clonale des lymphocytes T CD8+ infectés et l'analyse de la clonalité montre un faible nombre de clones avec une abondance plus importante que dans le cas d'HTLV-1 bien que l'analyse des sites d'intégrations montre des similarités au niveau chromosomiques et nucléotidiques ce qui implique que les intégrases d'HTLV-1 et HTLV-2 pourraient cibler des régions similaires lors de l'infection précoce et de l'intégration du provirus (Melamed et al 2014). Cela pourrait s'expliquer par une réponse CTL moins efficace contre HTLV-2



par rapport à HTLV-1 ou alors par le fait que l'expansion clonale serait médiée par un autre mécanisme comme la reconnaissance d'un antigène. Il semble aussi qu'HTLV-1 utilise la réplication *de novo* plus fréquemment qu'HTLV-2 puisque la diversité clonale est plus importante. Ainsi, l'absence de leucémie induite par HTLV-2, associée aux profils de clonalité, indique que l'oligoclonalité des cellules infectées n'est pas synonyme d'une prolifération maligne. Les clones dominants pourraient avoir un temps de vie court impliquant une succession de ces clones au cours du temps (il n'y a pas de variations de la PVL au bout de 10 ans) (Melamed et al., 2014). De plus, la protéine Tax d'HTLV-2 est plus dépendante de l'interleukine 2 (IL-2) pour la transformation des cellules *in vitro* ce qui pourrait expliquer une prolifération moins importante des cellules infectées se traduisant par un faible potentiel oncogénique du virus (Higuchi and Fujii, 2009). Il serait intéressant de vérifier l'implication de l'ARN et de la protéine anti-sens APH-2 (l'équivalent de HBZ chez HTLV-1) dans la survie des clones HTLV-2 bien que la protéine ne semble pas être impliquée dans l'activation de la prolifération cellulaire (Barbeau et al., 2013).

# PROBLÉMATIQUE

Nous savons aujourd'hui que le virus STLV-1, homologue simien d'HTLV-1, infecte naturellement plus d'une trentaine d'espèces de primates non-humains (PNH), dont les babouins (*Papio anubis*), l'espèce modèle utilisée au cours de mon travail de thèse. De plus, STLV-1 est aussi capable d'induire une prolifération des lymphocytes T CD4+ pouvant engendrer le développement d'une ATL chez les PNH (voir introduction chapitre 3-A).

À l'inverse de STLV-1, SFV est très prévalent chez les PNH naturellement infectés puisqu'il est détecté dans la majorité des animaux testés mais seulement une centaine de cas d'infection humaine a été répertoriée dans le Monde, bien que ce nombre soit probablement sous-estimé. Aucun cas de transmission inter-humaine n'a été identifié. Le virus est considéré comme non-pathogène même si une étude a montré quelques anomalies sanguines chez certains patients infectés. La transmission du virus se fait principalement par échange de fluides via la salive, mais la transmission verticale de la mère à l'enfant est également possible. Cela implique qu'il est difficile d'obtenir des échantillons négatifs puisque la prévalence (en captivité) augmente avec l'âge et peut atteindre 100% des individus infectés à l'âge adulte (voir introduction chapitre 3-B).

De nombreux cas de pluri-infections rétrovirales ont déjà été décrits chez l'Homme (HTLV-1/VIH-1, HTLV-1/SFV, VIH-1/SFV) et les PNH (STLV-1/SIV, STLV-1/SFV, SIV/SFV) (Beilke et al., 2004; Durand et al., 1995; Goldberg et al., 2009; Harrison et al., 1997; Nerrienet et al., 1998; Oo et al., 2015; Souquière et al., 2014; Switzer et al., 2008, 2016; Traina-Dorge et al., 2007). Les co-infections VIH-1/HTLV-

1 conduisent à une augmentation significative de la charge provirale (PVL) d'HTLV-1 ainsi qu'à un possible ralentissement de la progression de la pathologie induite par le VIH-1 (Beilke et al., 2004, 2007; Oo et al., 2015), bien que des résultats opposés aient été observés dans d'autres études (Beilke et al., 2005; Casoli et al., 2007; Casseb et al., 2007, 2008; Rahimi et al., 2014). De plus, le pourcentage de lymphocytes T CD4+ est plus faible chez des mandrills co-infectés par STLV-1 et SIV comparé à une cohorte uniquement infectée par l'un ou l'autre virus (Souquière et al., 2014). Concernant SFV, le virus semble être à l'état de latence et infecte principalement les lymphocytes T CD8+ et T CD4+. Des macaques co-infectés par SIV et SFV présentent une diminution des lymphocytes T CD4+ ainsi qu'un taux de mortalité plus important (Choudhary et al., 2013). D'une façon comparable, l'infection du virus foamy *in vitro* est associée à une transmission cellulaire plus importante du VIH-1 (Schiffer et al., 2004). Aucune donnée ne montre l'influence de la co-infection VIH-1/SFV et HTLV-1/SFV sur la pathogenèse chez l'Homme. Ces études, même si limitées en nombre, ont montré que les co-infections rétrovirales étaient complexes, non neutres et pourraient avoir un effet majeur *in vivo* sur le développement des pathogenèses associées. Par exemple, des patients co-infectés par HTLV-1 et VIH-1 ont plus de risque de développer une pathologie associée à HTLV-1 (Beilke et al., 2004; Casseb et al., 2007). Ces résultats suggèrent notamment une potentielle compétition entre les rétrovirus sur l'infection des cellules notamment les lymphocytes T CD4+, alors que nous ne savons pas si une cellule unique peut être co-infectée par plusieurs rétrovirus.

Ce travail de thèse est basé sur les données obtenues dans l'étude d'Alais et al à laquelle j'ai contribué (Alais et al., 2018). Nous voulions voir si STLV-1 a une influence sur l'infection par SFV, en mesurant la charge provirale du virus SFV dans le sang et la salive des babouins (*Papio anubis*) pour notamment tester l'influence de la co-infection sur la transmission par la salive. L'étude montre que la charge provirale du virus SFV est plus importante dans les échantillons de sang de babouins naturellement co-infectés avec STLV-1 par rapport aux animaux uniquement infectés par SFV. En revanche, il ne semble pas avoir d'influence dans la salive. Ces données, combinées à la transactivation du LTR du virus foamy par la protéine Tax de HTLV-1 *in vitro* (dans cette même étude), indique que STLV-1 influence positivement la réplication du virus SFV dans le sang.

L'objectif principale de ma thèse est de comprendre l'impact de STLV-1 sur la réplication de SFV dans le sang de ces babouins naturellement (co-)infectés. Nous savons que le virus peut se répliquer de façon active dans la salive et produire de nouvelles particules virales, mais la charge provirale de SFV dans le sang des animaux mono-infectés est faible. Il paraît légitime de se demander si l'infection persistante dans le sang est uniquement due à de la latence virale ou si le virus peut se disséminer, à bas bruit, par infection *de novo* ou par expansion clonale des cellules infectées, (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013). Ce dernier mécanisme n'a encore jamais été démontré pour SFV. J'ai voulu ainsi déterminer si l'impact de STLV-1 sur la PVL de SFV se faisait à travers l'une et/ou l'autre de ces voies de propagation. Pour

répondre à cette question j'ai mis en place et optimisé une technique d'amplifications des sites d'intégration proviraux dans le génome cellulaire (*Ligation mediated-polymerase chain reaction*) afin d'identifier le mode de propagation de SFV mais aussi de caractériser de façon précise les sites d'intégration pour SFV et STLV-1. Associé au génome du babouin et à des données de transcriptomique (Tung et al., 2015), nos analyses nous permettront d'identifier les régions génomiques cibles et d'émettre des hypothèses sur l'expression provirale de SFV et STLV-1 entre les 2 cohortes afin de voir l'influence de la co-infection sur la réplication de SFV. Cependant, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin d'appliquer de réelles conclusions sur l'expression des provirus. Ces mises au point ont nécessité le séquençage du génome complet du provirus SFV jusqu'à lors non répertorié dans les bases de données pour le *Papio anubis*. La seconde partie de ma thèse a pour objectif de caractériser les mécanismes à l'origine de la propagation plus importante de SFV dans les PBMC chez les PNH co-infectés avec STLV-1. Nous avons ainsi testé deux hypothèses non-exhaustives :

- La transactivation de Tax soluble va directement induire l'activation du génome proviral de SFV qui pourrait se répliquer par infection *de novo* ou par expansion clonale des cellules infectées. J'ai ainsi déjà montré par des approches *in vitro* (Alais et al., 2018) que Tax d'HTLV-1 était capable de transactiver le LTR de SFV.

- L'augmentation de la PVL de SFV est médiée par l'expansion clonale de HTLV-1 dans le cas où une cellule unique est co-infectée par les 2 virus. J'ai ainsi mis en place une technique d'hybridation *in situ* dans le but de vérifier *in vitro* si une cellule unique pouvait être co-infectée par SFV et HTLV-1.

# RÉSULTATS



# Chapitre 1. Influence de STLV-1 sur la charge provirale de SFV chez des babouins naturellement co-infectés

## A. Contexte de l'étude et résultats

Dans l'étude d'Alais et al, pour laquelle j'ai contribué, nous avons à disposition 2 cohortes de 18 babouins naturellement infectés par SFV ou par SFV et STLV-1. Nous voulions voir si les co-infections naturelles par ces 2 virus ont une influence sur la transmission du virus SFV, notamment par la salive. En effet, ce mode de transmission a été décrit pour les 2 virus mais, à l'inverse de SFV, nous ne savons pas s'il y a des particules virales de STLV-1 dans la salive. La différence de transmission peut s'expliquer par le taux de particules virales dans la salive des animaux infectés.

Nous avons tout d'abord montré que la PVL de STLV-1 est plus élevée dans le sang que dans la salive et qu'il n'existe pas de corrélation entre la PVL du sang et celle de la salive pour un échantillon donné. Cela suggère que la charge provirale de STLV-1 dans le sang ne peut pas être utilisée en tant que facteur de prédiction de la présence du virus dans la salive. Bien qu'il ne semble pas avoir d'influence

dans la salive, notre étude montre que la charge provirale du virus SFV est plus importante dans les échantillons de sang de babouins naturellement co-infectés avec STLV-1 par rapport aux animaux uniquement infectés par SFV. En revanche, il n'existe pas de corrélation entre la PVL de SFV et de STLV-1 dans le sang des animaux co-infectés.

L'influence positive de STLV-1 sur la réplication de SFV dans le sang suggère deux hypothèses principales : l'augmentation de la PVL de SFV est médiée par STLV-1 dans le cas où une cellule unique peut être co-infectée par les 2 virus ou la protéine Tax soluble va transactiver le LTR de SFV dans une cellule déjà infectée. Par ailleurs, nous savons que la protéine Tax soluble d'HTLV-1 est capable de transactiver des gènes cellulaires (Lindholm et al., 1990; Marriott et al., 1991). Nos résultats *in vitro* démontrent que cette protéine virale est capable d'activer l'expression du génome proviral du PFV de manière dose-dépendante. Dans le cas d'une cellule unique co-infectée, il est aussi possible d'imaginer que l'activation de la prolifération clonale et la production de particules virales puissent coexister.

Il ne faut pas oublier que, comme dans le cas du VIH-1, la prolifération clonale n'est pas exclusivement influencée par l'intégration provirale. Cela peut être due à une prolifération passive (homéostatique) ou encore à une stimulation cytokinique par un autre pathogène à un temps donné ce qui expliquerait la charge provirale plus élevée pour certains échantillons.

## B. Article

L'article ci-dessous, dans lequel je fais partie des auteurs, a été publié en Octobre 2018 dans le journal *Plos Neglected Tropical Disease* (PMID : 30273350).

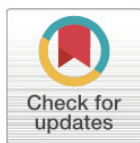
RESEARCH ARTICLE

# STLV-1 co-infection is correlated with an increased SFV proviral load in the peripheral blood of SFV/STLV-1 naturally infected non-human primates

Sandrine Alais<sup>1,2</sup>, Amandine Pasquier<sup>1,2,3</sup>, Brice Jegado<sup>1,2</sup>, Chloé Journo<sup>1,2</sup>, Réjane Rua<sup>4</sup>, Antoine Gessain<sup>4</sup>, Joelle Tobaly-Tapiero<sup>5</sup>, Romain Lacoste<sup>6</sup>, Jocelyn Turpin<sup>1,2,7</sup>, Renaud Mahieux<sup>1,2</sup>\*

**1** International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis laboratory, INSERM U1111 – Université Claude CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France, **2** Equipe labellisée “Ligue Nationale Contre le Cancer” et Labex Ecofect, Lyon, France, **3** Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France, **4** Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, CNRS UMR 3569, Pasteur Institute, Paris, France, **5** INSERM U944-CNRS Université Paris Diderot, UMR7212-IUH-Hôpital St-Louis, Dynamic of Retroviruses and Retrotransposons Group, Paris, France, **6** Station de Primatologie-UPS846-CNRS, France, **7** Section of Virology, Department of Medicine, Imperial College London, London United Kingdom

\* These authors contributed equally to this work.  
\* [renaud.mahieux@ens-lyon.fr](mailto:renaud.mahieux@ens-lyon.fr)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Alais S, Pasquier A, Jegado B, Journo C, Rua R, Gessain A, et al. (2018) STLV-1 co-infection is correlated with an increased SFV proviral load in the peripheral blood of SFV/STLV-1 naturally infected non-human primates. *PLoS Negl Trop Dis* 12(10): e0006812. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006812>

**Editor:** Benjamin Althouse, Institute for Disease Modeling, UNITED STATES

**Received:** May 10, 2018

**Accepted:** September 3, 2018

**Published:** October 1, 2018

**Copyright:** © 2018 Alais et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** RM and CJ are supported by ENS Lyon. JT was supported by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. SA is supported by INSERM. BJ is supported by ANR Labex Ecofect. This work was supported by ARC, Labex Ecofect and La Ligue Contre le Cancer “programme Équipe Labellisée”. The funders had no role in study

## Abstract

Simian T-Leukemia Virus type 1 and Simian Foamy Virus infect non-human primates. While STLV-1, as HTLV-1, causes Adult T-cell Leukemia/lymphoma, SFV infection is asymptomatic. Both retroviruses can be transmitted from NHPs to humans through bites that allow contact between infected saliva and recipient blood. Because both viruses infect CD4+ T-cells, they might interfere with each other replication, and this might impact viral transmission. Impact of STLV-1 co-infection on SFV replication was analyzed in 18 SFV-positive/STLV-1-negative and 18 naturally SFV/STLV-1 co-infected *Papio anubis*. Even if 9 animals were found STLV-1-positive in saliva, STLV-1 PVL was much higher in the blood. SFV proviruses were detected in the saliva of all animals. Interestingly, SFV proviral load was much higher in the blood of STLV-1/SFV co-infected animals, compared to STLV-1-negative animals. Given that soluble Tax protein can enter uninfected cells, we tested its effect on foamy virus promoter and we show that Tax protein can transactivate the foamy LTR. This demonstrates that true STLV-1 co-infection or Tax only has an impact on SFV replication and may influence the ability of the virus to be zoonotically transmitted as well as its ability to promote hematological abnormalities.

## Author summary

Foamy viruses infect a lot of mammalian hosts including non-human primates (NHP) and humans. Foamy infection is not associated with disease, although a recent report

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

described hematological abnormalities in infected humans. Some NHP species are also naturally infected with another retrovirus i.e. Simian T lymphotropic virus type 1, while humans are infected with the Human T lymphotropic virus type 1 counterpart. Both viruses cause leukemia. Here we report that natural foamy/STLV-1 co-infection is associated with a higher foamy virus proviral load in blood. Co-infected animals might therefore present a higher risk of developing hematological disease.

## Introduction

Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) infects 5 to 20 million individuals worldwide [1]. This retrovirus promotes CD4+ T-cell proliferation and causes either a lymphoproliferative disease named Adult T-cell Leukemia/lymphoma (ATL) [2, 3] or a neurological disease called HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis [4, 5]. Simian T-Lymphotropic Virus type 1 (STLV-1) is the simian counterpart of HTLV-1. It is transmitted among non-human primates (NHPs) through sexual intercourses as well as through bites [6, 7]. It is also transmitted to humans after bites [8]. STLV-1 and HTLV-1 strains from the same regions are usually almost undistinguishable at the nucleotide level and more than thirty Old World NHP species, including baboons, are infected with STLV-1 [9–13]. Even if STLV-1 has been infecting NHPs for millennia [14], it still causes lymphoproliferative diseases in naturally infected NHPs (i.e. NHP ATL), as it is the case for HTLV-1 in humans [15, 16].

Foamy viruses are also members of the *Retroviridae* family. Even if more than 100 cases of Human Foamy Virus (HFV) infection of zoonotic origin have been reported to date, the number of HFV-infected carriers is unknown (for reviews see [17, 18]). HFV inter-human transmission does not seem to occur and the consequences of this infection *in vivo* remain unknown [17, 19]. Thus, this virus is considered as non-pathogenic in humans, although a recent report demonstrated hematological abnormalities [20]. HFV simian counterpart, SFV, is highly prevalent in NHPs [21]. It has co-evolved with Old World primates for 30 to 100 million years [22], is well adapted to these hosts and is considered non-pathogenic [23]. SFV is readily transmitted among individuals via the saliva, and some reports suggest that in NHPs, SFV active replication is mainly restricted to epithelial cells of the oral mucosa [24]. However, viral DNA is also detected in CD4+ and CD8+ T-cells and in B cells *in vivo* [25], and it was previously suggested that PBMCs represent a site of foamy virus viral latency [26].

To date, no report has demonstrated either *in vitro* or *in vivo* that a given cell could be simultaneously infected with more than one retroviral species. However, cases of natural HTLV-1/HIV-1, HTLV-1/HFV or HIV-1/HFV [27–32] as well as STLV-1/SFV or STLV-1/SIV-1 co-infections [33–35] have been reported. HIV-1/HTLV-1 co-infection has a significant impact on HTLV-1 as well as on HIV-1 pathogenesis in humans [27, 36]. As an example, co-infected patients have a higher risk of HTLV-1-induced neurological disease, inflammatory conditions and leukemia [27, 37]. In addition, a lower HIV-1 viral load was found to be associated with a higher HTLV-1 proviral load (PVL) in humans, while anti-HIV-1 therapy in HIV-1/HTLV-1 co-infected carriers increases HTLV-1 PVL. These results strongly suggest that both retroviruses compete for CD4+ T-cell infection.

Although HIV-1/HFV co-infection has been reported to occur *in vivo* [32], pathogenesis-related data have only been obtained in NHPs. Indeed, co-infected animals have a decreased CD4+ T-cell population and an accelerated death rate [38]. Consistently, persistent infection with foamy virus increases HIV-1 cell-to-cell transmission *in vitro* [39].

These results imply that retroviral co-infection can have a strong effect *in vivo*, even if a given cell might not simultaneously be infected with both retroviruses.

We have access to a colony of baboons (*Papio anubis*) through the CNRS primate center of Rousset-sur-Arc, France. A series of individuals is naturally co-infected with STLV-1 and SFV, while others are only infected with SFV. These animals are followed up on a yearly basis and blood samples are taken routinely. We previously showed that the ratio between CD4+ and CD8+ T-cells remains constant between STLV-1-positive and STLV-1-negative animals and that STLV-1 infection increases the proportion of effector CD8+ T-cells [40]. Given that STLV-1 and SFV may compete for CD4+ T-cells infection *in vivo*, we investigated here, in a series of 36 animals, whether STLV-1 co-infection impacted or not SFV proviral load in the blood and in the saliva. This could then result in an increased risk of zoonotic transmission in case of severe bites [41]. As all animals in the cohort were infected with SFV, we could not decipher whether SFV infection impacts STLV-1 PVL. Of note, STLV-1 provirus has never been searched in saliva, while studies on the presence of HTLV-1 provirus in this fluid, which contains lymphocytes, are rare [42, 43], and there is no evidence that HTLV-1 could be transmitted through this fluid. We first demonstrate that STLV-1 provirus can be found in the saliva in half of the infected animals that were tested, which is not negligible. In addition, STLV-1/SFV co-infection does not affect SFV PVL in the saliva but leads to a very significant increase in SFV proviral load in the blood. In addition, we show that PTLV-1 Tax protein can activate foamy LTR. These results demonstrate that STLV-1 co-infection has some beneficial effect on SFV replication *in vivo*. This may influence the ability of the virus to be zoonotically transmitted.

## Methods

### Ethics statement

The use of animals was approved by ethic committee (APAFIS#4227–201604130940121) from French Minister of education and research. Animals are housed at the primate center of the CNRS (UPS 846) in Rousset-sur-Arc and cared for in compliance with French regulations. All individuals live in social groups and have free access to outdoor areas connected to indoor areas. Enclosures are enriched by wooden platforms and vertical structures. Baboons are fed four times a day with monkey pellets, seed mixture, fresh vegetables and fruits. Water is available *ad libitum*. The experimental procedure complied with the current French laws and the European directive 86/609/CEE. Blood and saliva samples were obtained after anesthesia. Animals were cared for in compliance with French regulations. Animals were anesthetized by ketamine and Medetomidin to allow blood (at the saphenous vein) and saliva collection.

### Animals

Thirty-six SFV naturally infected baboons (*Papio anubis*) were included in this study. Eighteen animals were STLV-1 uninfected and eighteen were STLV-1 naturally infected as determined by immunofluorescence with HTLV-1 infected MT-2 cells confirmed by western-blot (MP diagnostics HTLV-1/II 2.4 for some of them). All animals but one were females.

### Blood samples

Whole blood was obtained by venipuncture from the internal saphenous vein and transferred into Vacutainer tubes containing EDTA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated on Ficoll gradient. Briefly, blood was diluted 2-fold in PBS-2mM EDTA before loading on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). After centrifugation (30 min 400g at room

temperature), PBMCs were collected, washed in PBS-2mM EDTA and frozen in 90% SVF, 10% DMSO. High-molecular-weight DNA was then extracted from frozen PBMC samples using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel) with slight modifications, as follows. Cells were defrosted in complete medium, counted and aliquoted (5 million by tube). Lysis was performed for 1 hour at 56°C and elution was performed with 90 µl of elution buffer supplied in the kit. DNA concentration was then measured (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

### Saliva samples

Saliva and buccal cells were obtained by harvesting 1–2 ml of PBS deposited in the mouth of the animals at the jwol level without scrapping cheeks. After centrifugation for 10 min at 400g, high-molecular-weight DNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel). DNA concentration was measured (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

### SFV real-time PCR

Real-time PCR (qPCR) was performed with 20–40 ng of genomic DNA for β-actin amplification and with 100–120 ng of genomic DNA for LTR amplification, using the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), 0,2µM of each primer (PBF3 and 3R see below) using the SYBR Green Master mix (Roche) on a StepOnePlus system (Applied Biosystem) in a total volume of 50µl. After denaturation at 95°C for 10 min, the reaction mixtures containing DNA were cycled 50 times at 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec. The melt curve was then performed as follow: 15 sec at 95°C, 1 min at 60°C followed by a gradual increase until 95°C with acquisition signal every 0.7°C. As a positive control that was used for all experiments, a fragment of *P. anu-bis* SFV 5'LTR was amplified using the same primers i.e. PBF3 (5' AAAGATATTGTATATTA GCCTTGCT) [44] and 3R (5' CACGTTGGGCGCCAATTG) [45]. Amplification of human β-actin (Act-F 5' TGAGCTGCGTGTGGCTCC and Act-R 5' GGCATGGGGGAGGGCATAACC) was done on each experimental sample. A series of diluted amplified products was obtained and used for normalization (i.e. SFV copy numbers for 100.000 cells). Sensitivity of the protocol was determined to be 10 copies/for 100ng of genomic DNA.

### STLV-1 real-time PCR

Real time PCR was performed with 20–40 ng of genomic DNA for β-actin amplification and with 100–120 ng of genomic DNA for *tax* amplification, using the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) containing ROX (Carboxy-X-Rhodamine) as an internal reference, in 50 µl of final volume. Samples were incubated for 10 min at 95°C; then 50 cycles were performed using a StepOnePlus system (Applied Biosystem) (10 sec at 95°C and 30 sec at 60°C), and then the melt curve was performed between 60°C and 95°C. Tax and β-actin primer efficacy was determined on a series of specific amplicon dilutions. Specific Tax primers Tax-F 5'-GTTGTATGAGTGATTGGCGGGTAA and Tax-R 5'-TGTTTTGGAGACTGTGTACAAG GCG were used. Amplification of human β-actin was done as described above and allowed to determine STLV-1 copy numbers for 100.000 cells. Sensitivity of the protocol was determined to be 10 copies/sample.

### Transfection and luciferase assay

10<sup>6</sup> Jurkat cells were transfected with 100 ng of foamy LTR-luc construct or of HTLV-1 LTR-luc construct in the presence of increasing amount of Tas [46, 47] or of Tax [48] constructs

(0–800ng) using the Superfect reagent (Qiagen). Transfections were carried out in the presence of a renilla luciferase vector (phRG-TK) in order to normalize for transfection efficiency. Thirty-six hours after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured using the Dual-luciferase assay system (Promega).

### Statistical analyses

Graphs and statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software. Comparison of PVL and of age between the different groups was performed using non-parametric unpaired T test (Mann-Whitney test). Comparison of the PVL in the saliva and in PBMCs was performed using non-parametric paired T test (Wilcoxon test, \*\*\* = p-value < 0.001; \*\*\*\* = p-value < 0.0001 and ns = not significant). Comparison of frequencies was performed by a  $\chi^2$  test.

### Results

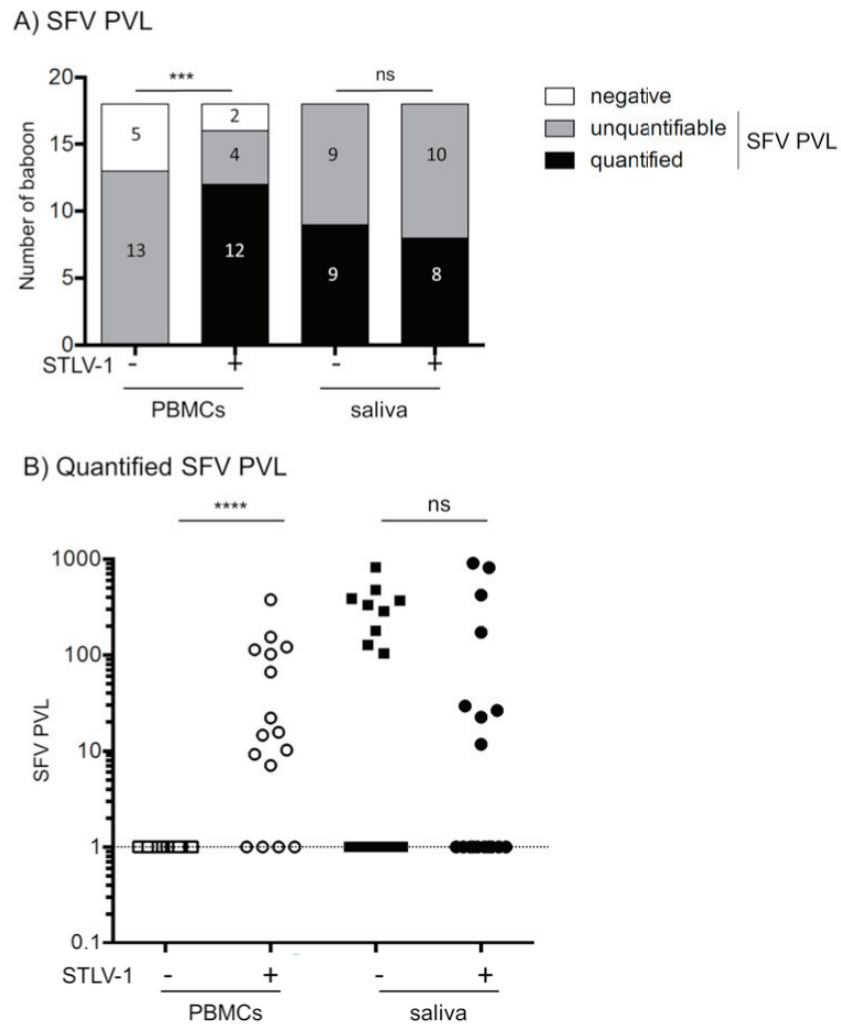
SFV and HTLV-1 proviruses, *i.e.* viral DNA integrated into the host genome, have been found in T-cells and saliva *in vivo* [25, 43]. Free SFV viral particles, *i.e.* viral RNA in cell-free samples, can also be found in saliva, while HTLV-1 particles are extremely rare and poorly infectious, as a result of which cell-cell contact is required for an efficient viral transmission [49]. We wanted to assess the effect of STLV-1 co-infection on SFV proviral load (PVL) in saliva and blood, and therefore the putative inter-individual viral transmission through infected cells. We therefore took advantage of a cohort of *Papio anubis*, and analyzed eighteen animals naturally co-infected with SFV and STLV-1, and the same number of animals that were only SFV-positive. The animals from both groups had a similar age (S1 Fig).

Because STLV-1 provirus has never been searched in saliva, we first assessed STLV-1 PVL in both the blood and saliva for each STLV-1-infected animal, by qPCR (Fig 1). Samples were classified as negative, positive but non-quantifiable (*i.e.* a quantifiable signal at least twice among 2 to 3 qPCR experiments, each performed in duplicate) but STLV-1 *tax* or SFV LTR copy number beyond the amplicon standard range in addition to a positive signal visible on a gel loaded with the PCR products, S2 Fig) or positive and quantified (positive qPCR and *tax* copy number within the amplicon standard range). Interestingly, saliva samples analyzed by qPCR were positive for STLV-1 proviral DNA in 9/18 animals, including 7 positive but non-quantifiable and 2 positive and quantified samples (Fig 1A). As a control, qPCR analyses performed on the blood showed positive and quantified results in all animals. The frequencies of negative, positive but non-quantifiable and positive and quantified samples among blood or saliva samples were significantly different (Fig 1A,  $p < 0.0001$ ). We then compared quantified STLV-1 PVL in the blood and in the saliva (Fig 1B). As expected, quantified STLV-1 PVL were significantly higher in the blood compared to the saliva (Fig 1B, median value for PBMCs = 363.7 and median value for saliva = 266.7,  $p < 0.001$ ). There was no significant correlation between the PVL in the blood and in the saliva since a high PVL in the blood was not associated with a high PVL in the saliva. This result suggests that HTLV-1 PVL in the blood cannot be used as a prediction factor for the presence of the virus in cells present in the saliva. Taken together, these results indicate that the STLV-1 provirus can be found in the saliva in half of the infected animals, which is not negligible.

To decipher whether STLV-1 infection impacts SFV replication, we then performed SFV proviral load analysis by qPCR in the blood and saliva of animals that were or not co-infected with STLV-1 (Fig 2). As for STLV-1, samples were classified as negative, positive but non-quantifiable (positive qPCR but LTR copy number beyond the amplicon standard range) or positive and quantified (positive qPCR and LTR copy number within the amplicon standard







**Fig 2. SFV proviral load in PBMCs and saliva.** (A) Number of baboons with a quantified SFV PVL (black box), a positive but non-quantifiable SFV PVL (grey box) and a negative SFV PVL (white box).  $\chi^2$  test, \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: non-significant. (B) Quantified SFV PVL in the saliva. Squares represent SFV mono-infected animals and circles represent STLV-1/SFV co-infected animals. Bars represent median values. The dotted line represents the threshold of quantification by real-time PCR. Mann-Whitney test, \*\*\*\*  $p < 0.001$  ns: non-significant.

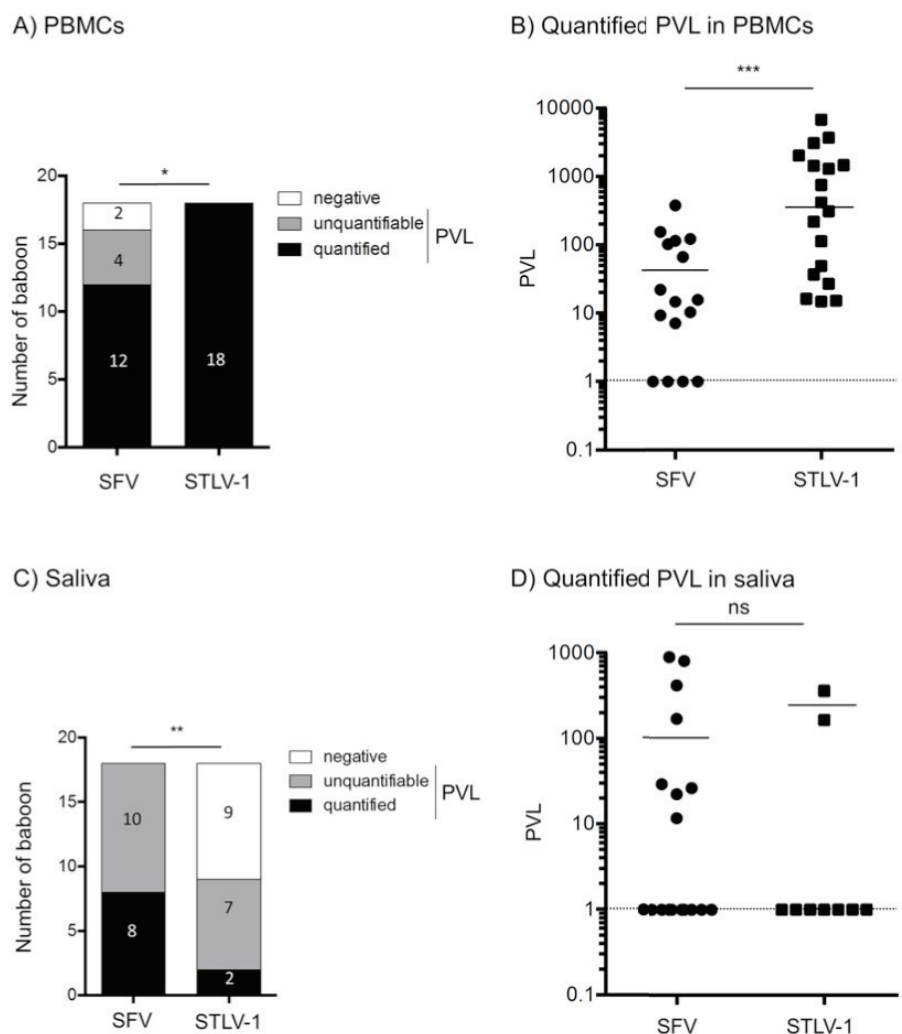
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006812.g002>

saliva of STLV-1-negative and STLV-1-positive animals were not significantly different (Fig 2B median value = 334.3 in SFV animals and 100.8 in SFV/STLV-1 co-infected animals, saliva values). Of note, there was no correlation between SFV PVL and STLV-1 PVL values in samples obtained from the 12 quantifiable samples (S3 Fig).

Regarding blood samples, even if the frequency of positive samples was similar between STLV-1-negative and positive groups (13 vs. 12+4 animals), the frequencies of negative, positive but non-quantifiable and positive and quantified samples were significantly different (Fig 2A, left columns,  $p < 0.0001$ ). Indeed, there was no animal where the SFV PVL could be quantified among STLV-1-negative animals, while 75% (i.e. 12 out of 18) of samples were quantified among SFV/STLV-1 co-infected animals. Thus, the SFV PVL in the blood is much higher in STLV-1 co-infected animals, indicating that STLV-1 co-infection may impact SFV replication.

These results also suggest that exposure to blood from co-infected animals should be linked to a higher risk of SFV transmission.

Finally, we compared STLV-1 and SFV PVL in blood and saliva of co-infected animals (Fig 3). The frequencies of negative, positive but unquantifiable and positive and quantified blood samples were significantly different between STLV-1 and SFV (Fig 3A,  $p = 0.025$ ). STLV-1 PVL were also significantly higher than quantified SFV PVL in PMBCs (Fig 3B, median value for SFV = 50,21 and median value for STLV-1 = 363,7,  $p < 0.001$ ). Similar analyses were performed with saliva samples. The frequencies of distribution in 3 categories (negative, unquantifiable- and quantifiable-positive animals) were significantly different between two viruses (Fig 3C,  $p = 0,0014$ ). However, contrary to results obtained in the blood, the quantified PVL



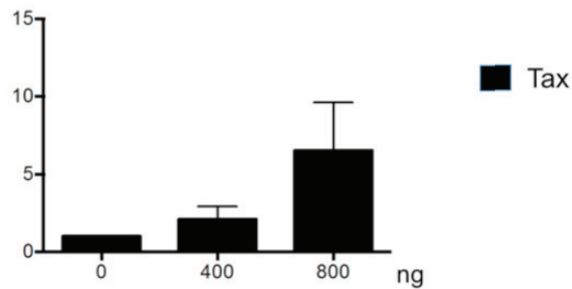
**Fig 3. Comparison of STLV-1 vs. SFV proviral load in blood and saliva samples.** (A and C) Number of infected baboons with a quantified SFV or STLV-1 PVL (black box), a positive but non-quantifiable SFV or STLV-1 PVL (grey box), and a negative SFV or STLV-1 PVL (white box) in the blood (A) and in the saliva (C).  $\chi^2$  test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (B and D) Quantified SFV and STLV-1 PVL in PMBCs (B) and in the saliva (D). The dotted line represents the threshold of quantification by real-time PCR. Bars represent median. Wilcoxon test, \*\*\*  $p < 0.001$ , ns: non-significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006812.g003>

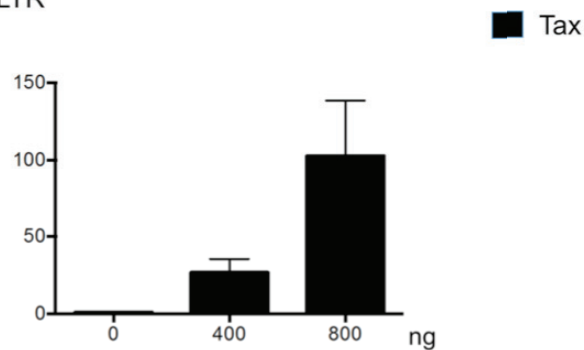
values were not significantly different between the two viruses (Fig 3D, median value for SFV = 100,82 and median value for STLV-1 = 266).

Since it was shown that Tax protein is also present under a soluble cell-free form [50, 51], it is therefore possible that such version of the viral protein is present *in vivo* in naturally infected animals where it could enter foamy infected cells. We then tested whether Tax can activate transcription from the foamy promoter in Jurkat T-cells (Fig 4). Indeed, and although less

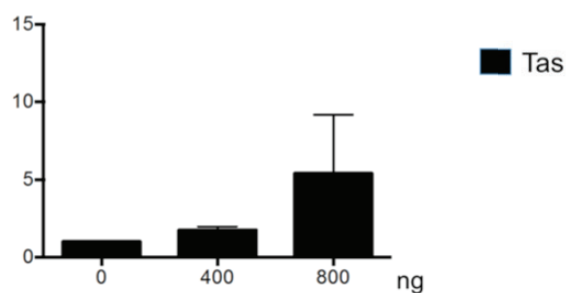
A) Foamy LTR



B) HTLV-1 LTR



C) Foamy LTR



**Fig 4. Tax protein can activate foamy promoter.**  $10^6$  Jurkat cells were transfected with foamy virus LTR-luc construct (A and C) or HTLV-1 LTR-luc (B) together with increasing amount of HTLV-1 Tax (A, B) or foamy Tas (C). Thirty-six hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean of 2 independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006812.g004>

efficient than Tax, Tax can activate transcription from foamy-LTR-luc construct in a dose-dependent manner. This observation might explain the observed increase SFV PVL in co-infected animals.

## Discussion

In this report, we first tried to detect STLV-1 provirus in saliva samples obtained without scratching cheeks. Our results clearly demonstrate that STLV-1 DNA is detected in the saliva in 50% of all infected and asymptomatic animals tested. Of note, STLV-1 PVL in saliva is much lower than in PBMCs. Such a study has not been frequently performed with HTLV-1, and, to our knowledge, never with STLV-1. Some results have suggested that, when proviral HTLV-1 is detected in the saliva as well as in epithelial cells and lymphocytes present in saliva, neutralizing antibodies are also present and prevent HTLV-1 transmission through saliva [42, 43, 52, 53]. However, given the fact that it is now well established that STLV-1 can be transmitted to humans through sever bites [8, 41], it would be interesting to determine if there is a minimal STLV-1 PVL value in NHP saliva required for putative STLV-1 transmission through bite. Unfortunately, while blood samples from people who had been bitten have been obtained, neither the NHP source nor its saliva were available.

Given the high prevalence of SFV among NHPs, humans are bitten by NHP that are probably all SFV-positive, and, in some cases STLV-1-positive. Our results clearly demonstrate that co-infection has a positive impact on SFV proviral load in PBMCs but not in the saliva. Thus, the risk of becoming infected by SFV after being bitten by an SFV/STLV-1 co-infected animal, compared to a SFV-only infected animal, should not be different. However, people exposed to the blood of SFV/STLV-1 co-infected animals during bush meat consumption [54] likely have a higher risk of becoming SFV-infected.

Previous reports have shown that HTLV-1 infected cells produce soluble Tax protein that can act as a viral transactivator on cellular genes [50, 51]. The observation of a positive effect of STLV-1 co-infection on SFV PVL suggested either that cells are truly co-infected with both viruses, or, alternatively, that soluble Tax transactivator enters cells already infected with SFV and acts on its promoter. Our results demonstrate that indeed Tax is able to activate transcription from the foamy LTR. Although this does not exclude the fact that true co-infection exists in animals, it is sufficient to suggest that Tax expression and capture leads to an increase in SFV viral replication and thus an increased SFV PVL. It remains to determine whether soluble Tax is secreted from STLV-1-infected cells *in vivo*, whether it escapes anti-Tax antibodies present in the plasma, and if it can activate SFV LTR in SFV-infected cells. Why this positive impact of STLV-1 co-infection is not visible in the saliva remains to be determined. Foamy infection has not been so far associated with a disease either in non-human primates or in humans. However, it is worth noting that foamy proviral load is usually low *in vivo*, and this might explain the lack of symptoms. The major difference between SFV proviral load in co-infected animals vs. mono-infected ones suggests that it would be of interest to pay more attention to these animals. As an example, one should perform autopsy and compare results with those of mono-infected animals in order to detect any change.

Of note, we did not have any SFV-negative and STLV-1-positive animal in our simian cohort. This prevented any study aimed at determining whether SFV infection is linked to an increased STLV-1 PVL compared to animals that would be STLV-1-mono-infected, although this would be of interest to gain a better insight into the mutual interactions between both retroviruses. Given that humans co-infected with both viruses or only with HTLV-1 are present in Africa, it would then be interesting to determine whether they are at higher risks for developing an HTLV-1 associated disease compared to HTLV-1 infected individuals. However,

performing epidemiological studies will be difficult, due to the fact that these individuals are so far in very limited number.

In conclusion, using *in vivo* samples, our results demonstrate for the first time the presence of STLV-1 and SFV retroviruses in the blood and saliva of infected asymptomatic baboons. It would be of interest to perform similar studies among animals living in the wild, although this will be technically very difficult. Our results also strongly suggest that STLV-1 co-infection has a positive effect on SFV replication in the blood, thus suggesting that STLV-1 co-infection might allow a higher rate of inter-individual and possibly inter-species transmission of foamy virus after exposure to infected blood.

## Supporting information

**S1 Fig. Similar ages in both group of studied non-human primates.** Unpaired t-test was used.  
(TIF)

**S2 Fig. STLV-1 Tax PCR results in PBMCs and saliva samples.** 2% agarose gels were loaded with PCR products. 213bp is the size of the Tax PCR-product, 107bp is the size of the actin PCR product.  
(TIF)

**S3 Fig. Lack of correlation between STLV-1 PVL and SFV proviral load.** Spearman test was used.  
(TIF)

## Acknowledgments

We thank all the primate-facility workers from the Primatology center from Rousset-sur-Arc for their help. We thank Dr Marie Semon for her help with the statistical analyses.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Formal analysis:** Brice Jegado, Chloé Journo, Antoine Gessain, Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Funding acquisition:** Chloé Journo, Renaud Mahieux.

**Investigation:** Sandrine Alais, Amandine Pasquier, Brice Jegado, Chloé Journo, Romain Lacoste, Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Methodology:** Sandrine Alais, Amandine Pasquier, Chloé Journo, Réjane Rua, Joelle Tobaly-Tapiero, Romain Lacoste, Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Project administration:** Renaud Mahieux.

**Resources:** Joelle Tobaly-Tapiero, Romain Lacoste, Renaud Mahieux.

**Supervision:** Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Writing – original draft:** Sandrine Alais, Chloé Journo, Antoine Gessain, Jocelyn Turpin, Renaud Mahieux.

**Writing – review & editing:** Brice Jegado, Réjane Rua.

## References

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3:388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388> PubMed Central PMCID: PMC3498738. PMID: 23162541
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77(12):7415–9. PubMed Central PMCID: PMC350514. PMID: 6261256
3. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(6):2031–5. PubMed Central PMCID: PMC346116. PMID: 6979048
4. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985; 2(8452):407–10. PMID: 2863442
5. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* 1986; 1(8488):1031–2. PMID: 2871307.
6. Lazo A, Bailer RT, Lairmore MD, Yee JA, Andrews J, Stevens VC, et al. Sexual transmission of simian T-lymphotropic virus type I: a model of human T-lymphotropic virus type I infection. *Leukemia.* 1994; 8 Suppl 1:S222–6. PMID: 7908709.
7. Roussel M, Pontier D, Kazanji M, Ngoubangoye B, Mahieux R, Verrier D, et al. Quantifying transmission by stage of infection in the field: the example of SIV-1 and STLV-1 infecting mandrills. *Am J Primatol.* 2015; 77(3):309–18. <https://doi.org/10.1002/ajp.22346> PMID: 25296992
8. Kazanji M, Mouinga-Ondeme A, Lekana-Douki-Etenna S, Caron M, Makuwa M, Mahieux R, et al. Origin of HTLV-1 in hunters of nonhuman primates in Central Africa. *J Infect Dis.* 2015; 211(3):361–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu464> PMID: 25147276
9. Koralnik IJ, Boeri E, Saxinger WC, Monico AL, Fullen J, Gessain A, et al. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol.* 1994; 68(4):2693–707. PubMed Central PMCID: PMC36747. PMID: 7908063
10. Mahieux R, Chappay C, Georges-Courbot MC, Dubreuil G, Mauclere P, Georges A, et al. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J Virol.* 1998; 72(12):10316–22. PubMed Central PMCID: PMC310621. PMID: 9811783
11. Saksena NK, Herve V, Durand JP, Leguenno B, Diop OM, Digouette JP, et al. Seroepidemiologic, molecular, and phylogenetic analyses of simian T-cell leukemia viruses (STLV-I) from various naturally infected monkey species from central and western Africa. *Virology.* 1994; 198(1):297–310. PMID: 8259665
12. Sintasath DM, Wolfe ND, Lebreton M, Jia H, Garcia AD, Le Doux-Diffo J, et al. Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(2):175–84. PubMed Central PMCID: PMC3657614. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080584> PMID: 19193260
13. Termini JM, Magnani DM, Maxwell HS, Lauer W, Castro I, Pecotte J, et al. STLV-1 infection of *Papio Anubis*: tax Sequence Heterogeneity and T Cell Recognition. *J Virol.* 2017. <https://doi.org/10.1128/JVI.00950-17> PMID: 28724769
14. Van Dooren S, Salemi M, Vandamme AM. Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes. *Mol Biol Evol.* 2001; 18(4):661–71. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003846> PMID: 11264418
15. d'Offay JM, Eberle R, Wolf RF, Kosanke SD, Doocy KR, Ayalew S, et al. Simian T-lymphotropic Virus-associated lymphoma in 2 naturally infected baboons: T-cell clonal expansion and immune response during tumor development. *Comp Med.* 2013; 63(3):288–94. PubMed Central PMCID: PMC3690435. PMID: 23759532
16. Noda Y, Ishikawa K, Sasagawa A, Honjo S, Mori S, Tsujimoto H, et al. Hematologic abnormalities similar to the preleukemic state of adult T-cell leukemia in African green monkeys naturally infected with simian T-cell leukemia virus. *Jpn J Cancer Res.* 1986; 77(12):1227–34. PMID: 2880832
17. Gessain A, Rua R, Betssem E, Turpin J, Mahieux R. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology.* 2013; 435(1):187–99. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.035> PMID: 23217627
18. Heneine W, Schweizer M, Sandstrom P, Folks T. Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003; 277:181–96. PMID: 12908773
19. Khan AS. Simian foamy virus infection in humans: prevalence and management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(5):569–80. <https://doi.org/10.1586/eri.09.39> PMID: 19485797

20. Buseyne F, Betsem E, Montange T, Njouom R, Bilounga Ndongo C, Hermine O, et al. Clinical signs and blood-test results of humans infected with zoonotic simian foamy viruses: a case-control study. *J Infect Dis.* 2018. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy181> PMID: 29608711
21. Meiering CD, Linial ML. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(1):165–76. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.165-176.2001> PMID: 11148008; PubMed Central PMCID: PMCPMC88968.
22. Switzer WM, Salemi M, Shanmugam V, Gao F, Cong ME, Kuiken C, et al. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature.* 2005; 434(7031):376–80. <https://doi.org/10.1038/nature03341> PMID: 15772660
23. Linial M. Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* 2000; 8(6):284–9. PMID: 10838587
24. Falcone V, Schweizer M, Neumann-Haefelin D. Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003; 277:161–80. PMID: 12908772
25. Rua R, Betsem E, Montange T, Buseyne F, Gessain A. In vivo cellular tropism of gorilla simian foamy virus in blood of infected humans. *J Virol.* 2014; 88(22):13429–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.01801-14> PubMed Central PMCID: PMCPMC4249094. PMID: 25210185
26. Soliven K, Wang X, Small CT, Feeroz MM, Lee EG, Craig KL, et al. Simian foamy virus infection of rhesus macaques in Bangladesh: relationship of latent proviruses and transcriptionally active viruses. *J Virol.* 2013; 87(24):13628–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.01989-13> PubMed Central PMCID: PMCPMC3838251. PMID: 24109214
27. Beilke MA, Theall KP, O'Brien M, Clayton JL, Benjamin SM, Winsor EL, et al. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(2):256–63. <https://doi.org/10.1086/422146> PMID: 15307036
28. Calattini S, Betsem EB, Froment A, Mauclore P, Tortevoye P, Schmitt C, et al. Simian foamy virus transmission from apes to humans, rural Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(9):1314–20. <https://doi.org/10.3201/eid1309.061162> PubMed Central PMCID: PMCPMC2857270. PMID: 18252101
29. Mouinga-Ondeme A, Betsem E, Caron M, Makuwa M, Salle B, Renault N, et al. Two distinct variants of simian foamy virus in naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*) and cross-species transmission to humans. *Retrovirology.* 2010; 7:105. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-105> PubMed Central PMCID: PMCPMC3009703. PMID: 21156043
30. Mouinga-Ondeme A, Caron M, Nkoghe D, Telfer P, Marx P, Saib A, et al. Cross-species transmission of simian foamy virus to humans in rural Gabon, Central Africa. *J Virol.* 2012; 86(2):1255–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.06016-11> PubMed Central PMCID: PMCPMC3255803. PMID: 22072747
31. Oo Z, Barrios CS, Castillo L, Beilke MA. High levels of CC-chemokine expression and downregulated levels of CCR5 during HIV-1/HTLV-1 and HIV-1/HTLV-2 coinfections. *J Med Virol.* 2015; 87(5):790–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.24070> PMID: 25678365
32. Switzer WM, Garcia AD, Yang C, Wright A, Kalish ML, Folks TM, et al. Coinfection with HIV-1 and simian foamy virus in West Central Africans. *J Infect Dis.* 2008; 197(10):1389–93. <https://doi.org/10.1086/587493> PMID: 18444796
33. Souquiere S, Makuwa M, Salle B, Lepelletier Y, Mortreux F, Hermine O, et al. Immunological alterations and associated diseases in mandrills (*Mandrillus sphinx*) naturally co-infected with SIV and STLV. *Virology.* 2014;454–455:184–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.018> PubMed PMID: 25243334
34. Switzer WM, Tang S, Zheng H, Shankar A, Sprinkle PS, Sullivan V, et al. Dual Simian Foamy Virus/ Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections in Persons from Cote d'Ivoire. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0157709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157709> PubMed Central PMCID: PMCPMC4911074. PMID: 27310836
35. Traina-Dorge VL, Martin LN, Lorino R, Winsor EL, Beilke MA. Human T cell leukemia virus type 1 up-regulation after simian immunodeficiency virus-1 coinfection in the nonhuman primate. *J Infect Dis.* 2007; 195(4):562–71. <https://doi.org/10.1086/510914> PMID: 17230416
36. Harrison LH, Vaz B, Taveira DM, Quinn TC, Gibbs CJ, de Souza SH, et al. Myelopathy among Brazilians coinfecting with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV. *Neurology.* 1997; 48(1):13–8. PMID: 9008486
37. Casseb J, Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LM, Olah I, Smid J, et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; 49(4):231–3. PMID: 17823752.
38. Choudhary A, Galvin TA, Williams DK, Beren J, Bryant MA, Khan AS. Influence of naturally occurring simian foamy viruses (SFVs) on SIV disease progression in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model. *Viruses.* 2013; 5(6):1414–30. <https://doi.org/10.3390/v5061414> PubMed Central PMCID: PMCPMC3717714. PMID: 23744104



39. Schiffer C, Lecellier CH, Mannioui A, Felix N, Nelson E, Lehmann-Che J, et al. Persistent infection with primate foamy virus type 1 increases human immunodeficiency virus type 1 cell binding via a Bet-independent mechanism. *J Virol.* 2004; 78(20):11405–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11405-11410>. 2004 PubMed Central PMCID: PMC521848. PMID: 15452263
40. Afonso PV, Mekaouche M, Mortreux F, Toulza F, Moriceau A, Wattel E, et al. Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood.* 2010; 116(19):3802–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270751> PMID: 20587783
41. Filippone C, Betsem E, Tortevoye P, Cassar O, Bassot S, Froment A, et al. A Severe Bite From a Non-human Primate Is a Major Risk Factor for HTLV-1 Infection in Hunters From Central Africa. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(11):1667–76. <https://doi.org/10.1093/cid/civ145> PMID: 25722199
42. Yamamoto T, Terada K, Nishida N, Moriuchi R, Shirabe S, Nakamura T, et al. Inhibitory activity in saliva of cell-to-cell transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 in vitro: evaluation of saliva as an alternative source of transmission. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(6):1510–5. PubMed Central PMCID: PMC5228205. PMID: 7650176
43. Achiron A, Higuchi I, Takenouchi N, Matsuoka E, Hashimoto K, Izumo S, et al. Detection of HTLV type I provirus by in situ polymerase chain reaction in mouthwash mononuclear cells of HAM/TSP patients and HTLV type I carriers. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997; 13(12):1067–70. <https://doi.org/10.1089/aid.1997.13.1067> PMID: 9264294
44. McClure MO, Bieniasz PD, Schulz TF, Chrystie IL, Simpson G, Aguzzi A, et al. Isolation of a new foamy retrovirus from orangutans. *J Virol.* 1994; 68(11):7124–30. PubMed Central PMCID: PMC5237151. PMID: 7933094
45. Herchenroder O, Renne R, Loncar D, Cobb EK, Murthy KK, Schneider J, et al. Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology.* 1994; 201(2):187–99. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1285> PMID: 8184531
46. Mercier G, Galien R, Emanoil-Ravier R. Differential effects of ras and jun family members on complex retrovirus promoter activities. *Res Virol.* 1994; 145(6):361–7. PMID: 7709072
47. Tobaly-Tapiero J, De Celis-Kosmas J, Bittoun P, Lasneret J, Poorters AM, Eladari ME, et al. Isolation and characterization of infectious full-length DNA clones of chimpanzee foamy viruses SFV6 and SFV7: evidence for a Tax-dependent internal promoter. *Res Virol.* 1996; 147(1):17–27. PMID: 8882337
48. Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, Turpin J, Vinera J, Cote E, et al. Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J Virol.* 2013; 87(2):1123–36. <https://doi.org/10.1128/JVI.01792-12> PubMed Central PMCID: PMC52354075. PMID: 23135727
49. Alais S, Mahieux R, Dutartre H. Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J Virol.* 2015; 89(20):10580–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01799-15> PubMed Central PMCID: PMC524580172. PMID: 26269171
50. Lindholm PF, Marriott SJ, Gitlin SD, Bohan CA, Brady JN. Induction of nuclear NF-kappa B DNA binding activity after exposure of lymphoid cells to soluble tax1 protein. *New Biol.* 1990; 2(11):1034–43. PMID: 2101630
51. Marriott SJ, Lindholm PF, Reid RL, Brady JN. Soluble HTLV-I Tax1 protein stimulates proliferation of human peripheral blood lymphocytes. *New Biol.* 1991; 3(7):678–86. PMID: 1751450
52. Lins L, de Carvalho VJ, de Almeida Rego FF, Azevedo R, Kashima S, Gallazi VN, et al. Oral health profile in patients infected with HTLV-1: clinical findings, proviral load, and molecular analysis from HTLV-1 in saliva. *J Med Virol.* 2012; 84(9):1428–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.23327> PMID: 22825822
53. Offen D, Achiron A, Wasserman L, Miller M, Shaklai M, Dabby R, et al. HTLV-1 in mouthwash cells from a TSP/HAM patient and asymptomatic carriers. *Arch Virol.* 1998; 143(5):1029–34. PMID: 9645208
54. Locatelli S, Peeters M. Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS.* 2012; 26(6):659–73. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328350fb68> PMID: 22441170

## C. Discussion

Nous avons montré que la présence de STLV-1 et SFV dans le sang de babouins naturellement (co-)infectés a une influence positive sur la dissémination du virus SFV *in vivo*. En effet, l'ensemble de ces données montre qu'une exposition au sang d'animaux co-infectés serait associée à un risque plus important de transmission de SFV. Ainsi, si on regarde uniquement la PVL, le risque d'infection par SFV après une morsure ne devrait pas être différent entre un animal mono-infecté et co-infecté par SFV et STLV-1. En revanche, nous ne savons pas si le taux de particules virales dans la salive est différent entre les babouins mono-infectés et co-infectés et nous pouvons penser que STLV-1 pourrait favoriser la production de virions de SFV.

Bien qu'une infection des cellules épithéliales de la muqueuse buccale par SFV puisse conduire à une expression de particules virales, son moyen de dissémination dans le sang n'a jamais été démontré puisqu'il est considéré comme latent dans les PBMC infectés. Cependant, la persistance du virus dans le sang peut aussi être médiée par une prolifération clonale des cellules infectées ou une réplication active du virus, même à bas bruit (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013). Ainsi, une première question à laquelle nous pouvons répondre est de déterminer cette voie de propagation majoritairement utilisée par le virus via l'analyse des profils de clonalité (voir résultats chapitre 3). Cela nous donnera une première indication mais une étude plus approfondie est nécessaire pour établir de réelles conclusions puisque la

clonalité en soi ne donne pas d'informations sur l'expression provirale. Dans le cas d'HTLV-1, nous savons aujourd'hui que le virus latent peut être réactivé par des épisodes de réexpression du génome proviral (*burst*, pour revue voir Kulkarni and Bangham, 2018). Ainsi, nous pourrions dans un premier temps mesurer le nombre de transcrits viraux dans nos échantillons afin de vérifier si SFV est latent puis, dans un second temps, mettre des cellules de babouins (infectées par SFV) en culture afin de voir si une production de particules virales est possible. De plus, il ne faut pas oublier que la prolifération homéostatique et par stimulation antigénique peuvent jouer un rôle majeur dans la persistance rétrovirale chez l'hôte. Dans le cadre de mon travail de thèse, une analyse des sites d'intégrations du provirus SFV est réalisée afin de savoir s'il existe des zones préférentielles comme dans le cas d'autres rétrovirus comme PFV, HTLV-1/STLV-1 et HTLV-2 ou des sites récurrents comme dans le cas du BLV. Nous pourrions comparer les données avec celles obtenues sur STLV-1 et émettre des hypothèses sur la réplication de SFV. En effet, l'augmentation de la PVL de SFV dans le sang des animaux co-infectés peut être expliquée par une activation de la production des particules virales ou une prolifération cellulaire plus importante, bien que les 2 voies ne soient pas exclusives. Ces modes de transmissions peuvent être visualisés par la présence d'une diversité de clones plus importante (infection *de novo*) ou par la présence de clones ayant proliféré de façon plus intensive (expansion clonale). Par ailleurs, des données provenant d'une analyse de transcriptome des cellules du sang total, obtenues par séquençage des ARN à haut-débit (RNA-seq), nous permettrons de

vérifier si les UIS de SFV et STLV-1 sont présents dans des régions plus ou moins exprimées du génome cellulaire (Tung et al., 2015).

# Chapitre 2. Séquençage du génome complet du provirus de SFV chez les babouins

## A. Contexte de l'étude et résultats

Au commencement de ce travail de thèse, nous avons pu constater que la séquence du génome complet concernant le provirus SFV chez les babouins infectés était absente des bases de données. En effet, seulement des séquences partielles étaient disponibles (Alais et al., 2018; Blewett et al., 2000; Broussard et al., 1997). De plus, le génome proviral de STLV-1 chez le *Papio anubis* est déjà accessible (numéro d'accèsion Genbank : JX987040.1). Il serait alors intéressant pour nous d'avoir à disposition la séquence complète du provirus SFV afin de mettre au point nos futures investigations sur les conséquences des co-infections rétrovirales SFV/STLV-1 chez le babouin. En effet, la séquence provirale, notamment le LTR et la région *gag*, est nécessaire pour mettre en place la LM-PCR sur SFV et STLV-1 (voir résultat chapitre 3-B). Nous avons notamment initié la mise au point d'un clone moléculaire du virus SFV qui fournira un outil indispensable pour de nombreuses études notamment l'influence des co-infections rétrovirale

sur la clonalité *in vitro*. Si une production des particules virales est possible, nous pourrions réaliser des (co-)infections cellulaires et analyser les interactions qui peuvent exister entre les rétrovirus. Nous pourrions, par exemple, vérifier si la protéine Tas peut transactiver le LTR de STLV-1 ou du SIV. Concernant les expérimentations *in vivo*, le génome complet est nécessaire pour mettre en place la mesure du nombre de transcrits dans un échantillon donné par RNA-seq mais aussi pour étudier l'influence des sous-populations virales sur les co-infections par séquençage à haut-débit.

En se basant sur des comparaisons de séquences avec le génome proviral de SFV provenant du singe vert d'Afrique (numéro d'accèsion Genbank : MF582544) et d'une guenon (numéro d'accèsion Genbank : NC\_043445), plusieurs fragments d'ADN proviral ont été amplifiés à partir d'ADN génomique d'un babouin naturellement co-infecté par SFV et STLV-1. L'amplification de l'ADN a été réalisée grâce une succession de PCR imbriquées via des amorces recouvrant la totalité du génome proviral de SFV dont la séquence a été obtenue par la méthode Sanger.

Le génome proviral de SFV possède une longueur de 13 393 nucléotides et un pourcentage en GC de 37,84% (numéro d'accèsion Genbank : MK241969.1). Nous avons par la suite réalisé une analyse phylogénétique basée sur 409 nucléotides du gène codant pour l'intégrase avec celles provenant d'autres espèces simiennes africaines et une espèce asiatique. Comme attendu, la structure du génome est similaire à celle des autres souches puisqu'elle contient les

séquences LTR 5' et 3' ainsi que les gènes *gag*, *pol*, *env*, *tas* et *bet*. L'analyse montre une spécificité virus/hôte et une proximité plus importante entre les souches africaines par rapport à celle retrouvée chez le macaque (souche asiatique). Ces données sont en accord avec la notion de co-évolution entre SFV et son hôte (Switzer et al., 2005).

## B. Article

L'article ci-dessous a été publié dans le journal *Microbiology Resource Announcements* (MRA) en Octobre 2019 (PMID : 31582445).



## Complete Genome Sequence of a *Papio anubis* Simian Foamy Provirus

Brice Jegado,<sup>a</sup> Renaud Mahieux<sup>a</sup>

<sup>a</sup>International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111-Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Fondation pour la Recherche Médicale, LabEx Ecofect, Lyon, France

**ABSTRACT** The full-length sequence of a *Papio anubis* simian foamy provirus was obtained by using PCR followed by Sanger sequencing. This simian foamy virus from a *P. anubis* animal (SFVp.anubis) is 13,393 bp long. Like other proviruses, the genome of SFVp.anubis is organized with long terminal repeats (LTRs), as well as *gag*, *pol*, *env*, *tas*, and *bet* genes. SFVp.anubis is closer to Old World African strains than to New World ones.

Similar to humans, nonhuman primates (NHPs) can be infected with the following three different families of exogenous retroviruses: simian immunodeficiency virus (SIV), simian T cell leukemia virus (STLV), and simian foamy virus (SFV), the counterparts of human immunodeficiency virus (HIV), human T cell leukemia virus (HTLV), and human foamy virus (HFV), respectively. However, and contrary to HIV and HTLV-1, the *Spumavirus* HFV is in fact still a simian virus, given the fact that it always originates from current contacts with NHPs and cannot be transmitted from human to human. SFV infection is asymptomatic, although a recent report described lower levels of hemoglobin in infected humans (1). SFV seroprevalence can reach >75% in captive and wild NHPs (2), and at least 31 and 45 NHP species are infected with STLV-1 and SIV, respectively (3, 4). Since these three retroviruses have common modes of transmission, coinfections are frequent in NHPs and might have a biological impact (5). As an example, it was recently shown that STLV-1/SFV natural coinfection leads to an increased SFV proviral load (6). Only partial sequences of baboon SFV were previously reported (6–8). Full-length foamy virus sequences obtained here from naturally infected captive baboons (*Papio anubis* housed at the primate center of the Centre National de la Recherche Scientifique [CNRS] [UPS 846] in Rousset-sur-Arc, France) will be useful for performing further investigation on coinfection consequences.

The use of animals was approved by the ethics committee (Autorisation de Projet Utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques [APAFIS] number 4227-201604130940121) of the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation. The experimental procedure complied with current French laws and European directive 86/609/CEE. Animals were cared for in compliance with French regulations and were anesthetized with ketamine and medetomidine to allow blood draw. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient, washed, and lysed. Genomic DNA was extracted from PBMCs using a NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel). The genomic DNA was then amplified by nested PCR using a series of long terminal repeats (LTRs), as well as *gag*, *pol*, *env*, and *bet/tas* primers (Table 1). Based on a sequence comparison with SFV from the African green monkey (GenBank accession number [MF582544](#)) and guenon (GenBank accession number [NC\\_043445](#)), we ascertained that we had obtained a complete proviral sequence. The SFV strain V909/03F sequence is 13,393 bp long with a GC content of 37.84%. Using PCR products, each nucleotide was sequenced (Eurofins) at least twice on both strands. From the

**Citation** Jegado B, Mahieux R. 2019. Complete genome sequence of a *Papio anubis* simian foamy provirus. *Microbiol Resour Announc* 8:e01063-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01063-19>.

**Editor** Kenneth M. Stedman, Portland State University

**Copyright** © 2019 Jegado and Mahieux. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Address correspondence to Renaud Mahieux, [renaud.mahieux@ens-lyon.fr](mailto:renaud.mahieux@ens-lyon.fr).

**Received** 28 August 2019

**Accepted** 9 September 2019

**Published** 3 October 2019



**TABLE 1** List of primers used to amplify the SFV *Papio anubis* simian foamy proviral sequence

Target gene	Primer	Sequence (5'–3')
LTR	SFV-TasR4	TTAAAAGGGAGACACTCTGGCTGAGGATGA
	SFV-TasR5	TTGGCACCTCGCCCAAACCTTAAAGAAGAATA
	SFV-LTR-F1	AAGACTGCACCTTGATAAAGAGTTC
	SFV-LTR-F2	TTAGATTGTACGGGAGCTCACCA
	FVLGF1-R	CTTACCAAACCTGGAGAGTCTCGAACA
	FVRU5-R	ACTCTCGRCGACGAGYAGTG
	3R	CACGTTGGGCGCCAATTG
<i>gag</i>	SFV-GagF1	GGAGGGAAGAACAAGACCTGTAAATC
	SFV-GagF2	GTTCAAATGCAAAGGGATGAGTTAG
	SFV-GagR3	AGCTCCCATCCAAAATCGG
	SFV-GagR4	SFV-GagR4 TATCGCTGGAGGAGCACTAGG
	SFV-GagF5	CAAAGGCAATCTGCCAACCTCAGTC
	SFV-GagF6	GGTAATCAGGGACGTGGTGATACA
	SFV-GagF	AGGAAGAGGGAACCAAAACCG
<i>pol</i>	SFV-PolR8	TGTGTCCTACTTGATTTTCCCAATGTTGCC
	SFV-PolR9	GACTGTACCAGTTGCTATGTGATGAG
	SFV-PolR6	GGATTAATTTGGGTTTCAGCTATAC
	SFV-PolR7	CAGCTGAGCTGTATGATCTCCAAG
	SFVmnd-IntF1	GCCACCCAAGGGAGTTATGTGG
	SFVmnd-IntF2	CCTGGATGCAGAGTTGGATC
	SFVmnd-IntR1	GCTGCACCCTGATCAGAGTG
	SFVmnd-IntR2	GAAGGAGCCTTAGTGGGGTA
<i>env</i>	SFV-EnvF1	GTCATAGACTGGAATGT
	SFV-EnvF2	CATCCAGAACCATAAT
	SFV-EnvF5	CGCAGTTTTACCCATTGGAT
	SFV-EnvF8	CAATGCCCACTCCAGGAATACATGAT
	SFV-EnvR6	ATCCAATGGGTGAAAACCTGCG
	SFV-EnvF9	TGACTGTCCAGTGACAGCA
	SFV-EnvF10	AGCATATGTACCCAGTGTGGTC
	SFV-EnvR1	CATATGCTGGTATTGAG
	SFV-EnvR3	TTCCAGGAAGCCATGACA
	<i>bet</i> and <i>tas</i>	SFV-BetR1
SFV-BetR2		GGTAAGTTTTCTCATTGGAAGGTC
SFV-BetF3		GATGCTTACACTCGGGGCTACCA
SFV-BetF4		TTGGCTGTGCAATGTGAGGA

individual PCR product sequences, genome assembly was performed using Genome Compiler software (v2.2.88), NCBI BLASTN, and Clustal W for alignment and analyses. Thirty-five complete SFV sequences available in GenBank were used to make sequence comparisons. The genomic structure organization of V909/03F was similar to that of other SFVs, with the presence of LTRs and *gag*, *pol*, *env*, *tas*, and *bet* sequences. As expected, the genome of strain V909/03F is more closely related to Old World monkey SFV strains, in particular from African animals, than to strains from New World animals (Fig. 1). The Pol amino acid sequence is the most conserved (up to 87% identity) between *P. anubis* and other animal species, while Tas and Bet in the closest strains are only 56% and 63% identical, respectively.

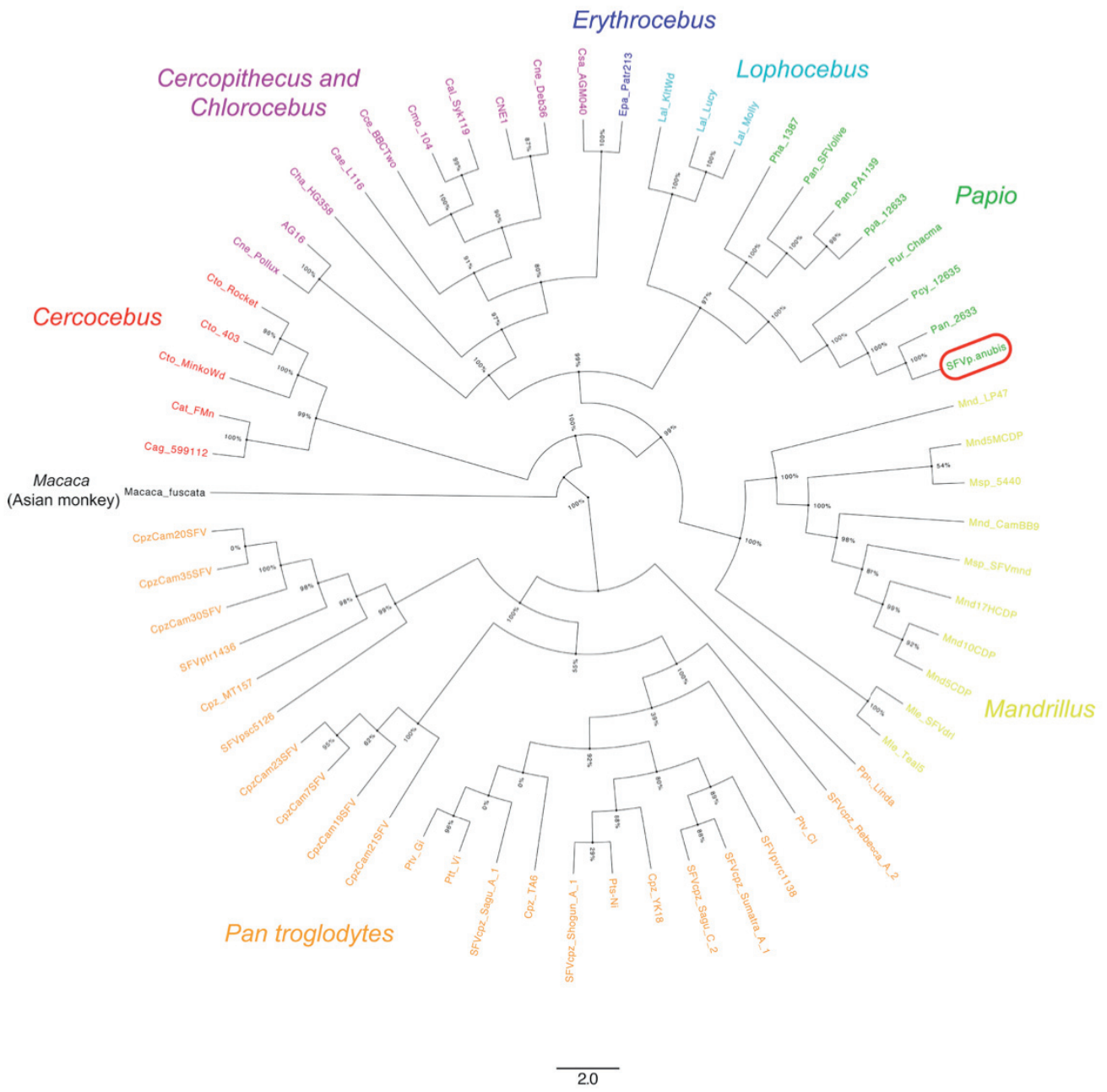
**Data availability.** The complete genome sequence of SFV V909/03F is available in GenBank under accession number [MK241969](https://doi.org/10.1093/mbe/mkz241).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We declare no conflicts of interest.

We thank S. Alais for providing blood samples and R. Lacoste for the use of the animal facility.

R. Mahieux is supported by ENS Lyon. B. Jegado is supported by LabEx Ecofect. Funding was provided by the French Laboratory of Excellence project ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) and by the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe Labellisée DEQ20180339200).



**FIG 1** Phylogenetic relationships between 409 bp of SFV integrase sequences among Old World NHP species. All sequences were aligned by ClustalW with Seaview software (sequences from 61 NHPs infected by SFV). The phylogenetic tree was constructed using the maximum-likelihood method (PhyML) with percentage values and edited with FigTree v1.4.4. Values next to branches are bootstrap values. Each color represents a given NHP genus, as follows: *Macaca* (black), *Cercocebus* (red), *Cercopithecus* and *Chlorocebus* (pink), *Erythrocebus* (dark blue), *Lophocebus* (light blue), *Papio* (green), *Mandrillus* (yellow), and *Pan troglodytes* (orange). The sequence circled in red (for SFVp.anubis, a simian foamy virus from a *P. anubis* animal.) represents the integrase sequence from our complete SFV genome.

B. Jegado performed the PCR and sequence and phylogeny analyses. B. Jegado and R. Mahieux wrote the manuscript.

**REFERENCES**

1. Buseyne F, Betsem E, Montange T, Njouom R, Bilounga Ndongo C, Hermine O, Gessain A. 2018. Clinical signs and blood test results among humans infected with zoonotic simian foamy virus: a case-control study. *J Infect Dis* 218:144–151. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy181>.  
 2. Mouinga-Ondémé A, Kazanji M. 2013. Simian foamy virus in non-human

Downloaded from <http://mra.asm.org/> on October 3, 2019 at ECOLE NORMALE

- primates and cross-species transmission to humans in Gabon: an emerging zoonotic disease in Central Africa? *Viruses* 5:1536–1552. <https://doi.org/10.3390/v5061536>.
3. Roussel M, Pontier D, Ngoubangoye B, Kazanji M, Verrier D, Fouchet D. 2015. Modes of transmission of simian T-lymphotropic virus type 1 in semi-captive mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Vet Microbiol* 179:155–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.010>.
  4. Ayouba A, Duval L, Liégeois F, Ngin S, Ahuka-Mundeke S, Switzer WM, Delaporte E, Arieu F, Peeters M, Nerrienet E. 2013. Nonhuman primate retroviruses from Cambodia: high simian foamy virus prevalence, identification of divergent STLV-1 strains and no evidence of SIV infection. *Infect Genet Evol* 18:325–334. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.015>.
  5. Leendertz SAJ, Junglen S, Hedemann C, Goffe A, Calvignac S, Boesch C, Leendertz FH. 2010. High prevalence, coinfection rate, and genetic diversity of retroviruses in wild red colobus monkeys (*Piliocolobus badius*) in Tai National Park, Cote d'Ivoire. *J Virol* 84:7427–7436. <https://doi.org/10.1128/JVI.00697-10>.
  6. Alais S, Pasquier A, Jegado B, Journo C, Rua R, Gessain A, Tobaly-Tapiero J, Lacoste R, Turpin J, Mahieux R. 2018. STLV-1 co-infection is correlated with an increased SFV proviral load in the peripheral blood of SFV/STLV-1 naturally infected non-human primates. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006812. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006812>.
  7. Blewett EL, Black DH, Lerche NW, White G, Eberle R. 2000. Simian foamy virus infections in a baboon breeding colony. *Virology* 278:183–193. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0649>.
  8. Broussard SR, Comuzzie AG, Leighton KL, Leland MM, Whitehead EM, Allan JS. 1997. Characterization of new simian foamy viruses from African nonhuman primates. *Virology* 237:349–359. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8797>.

# Chapitre 3. Clonalité rétrovirale des virus simiens SFV et STLV-1 chez des babouins naturellement infectés

## A. Introduction

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de la répllication entre SFV et STLV-1 dans le sang des babouins naturellement (co-)infectés. Les animaux vivent en semi-liberté dans le centre de primatologie de Rousset-sur-Arc en France (CNRS, unité UPS 846) dirigé par le Dr Romain Lacoste. Ce sont les mêmes individus utilisés dans notre étude précédente qui montrait l'influence de la co-infection SFV/STLV-1 sur la charge provirale (PVL) de SFV dans le sang et la salive des babouins (Alais et al., 2018). Cependant, nous possédons ici un échantillon supplémentaire provenant d'un babouin ATL co-infecté par SFV et STLV-1 (Turpin et al., 2017) et possède une charge provirale élevée (>68% pour STLV-1 et 30% pour SFV dans le sang).

Au vu des observations de l'article d'Alais et al qui montre une influence positive de STLV-1 sur la propagation du virus SFV chez les babouins naturellement co-infectés ainsi qu'une transactivation de la protéine Tax d'HTLV-1 sur le LTR du virus PFV *in vitro*. Nous nous sommes demandés si l'augmentation de

la PVL de SFV est médiée selon 2 hypothèses : par l'expansion clonale de STLV-1 dans le cas où une cellule unique est co-infectée par les 2 virus ou par la transactivation par Tax qui peut directement induire l'activation du génome proviral de SFV et pourrait se répliquer par infection *de novo* ou par expansion clonale des cellules infectées. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le rôle de la prolifération passive et induite par une stimulation antigénique dans la dissémination du virus.

De plus, nous pensions à l'origine que l'intégration du provirus dans le génome cellulaire était aléatoire mais de nombreuses études mettent en lumière le fait que le mécanisme d'intégration semble cibler des zones préférentielles chez différents rétrovirus *in vitro* et *in vivo*, notamment les virus VIH-1/SIV, HTLV-1/STLV-1, HTLV-2 et PFV, ou des sites récurrents (BLV) (voir introduction chapitre 5). Cela influence la régulation de l'expression des gènes proviraux et cellulaires ce qui peut médier l'expansion clonale des cellules infectées.

Ainsi, j'ai pu développer la technique de LM-PCR (*Ligation mediated-Polymerase Chain Reaction*) associée à du séquençage à haut-débit (HTS), en collaboration avec les Drs. Jocelyn Turpin et Anat Melamed ainsi que le Pr Charles Bangham (Département de médecine de l'Imperial College de Londres) qui possèdent une expertise sur la clonalité, notamment sur le virus HTLV-1 chez l'Homme. Notre collaboration avec le Dr Magali Naville et le Pr Jean-Nicolas Volff, à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), a permis d'établir l'ensemble de l'analyse bio-informatique des données de séquençage. La

particularité de mon projet a donc été d'adapter la LM-PCR de façon à ce qu'elle fonctionne directement sur des échantillons co-infectés par SFV et STLV-1 *in vivo* puis de l'intégrer comme outil au sein de l'équipe. La LM-PCR associée au séquençage à haut-débit va nous permettre d'obtenir une estimation de la prolifération clonale et de l'infection *de novo* qui se déroule au sein de l'hôte infecté. L'objectif principale de ma thèse est de comprendre l'influence que peut avoir STLV-1 sur la réplication de SFV dans le sang des babouins naturellement co-infectés.

## B. Matériels et méthodes

### I. Cohorte de babouins

L'accès aux échantillons de babouins a été approuvé par le comité d'éthique du Ministère français de l'éducation et de la recherche (APAFIS#4227-201604130940121). L'ensemble de la cohorte de babouins (*Papio anubis*) utilisée dans ce projet représente un total de 36 individus parmi lesquels 17 sont naturellement infectés par SFV et 19 autres sont naturellement co-infectés par SFV et STLV-1 (Turpin et al., 2017). L'infection par STLV-1 a été confirmée par western-blot (MP Diagnostics) (Alais et al., 2018). Tous les animaux sont asymptomatiques, à l'exception d'un seul qui a développé une ATL et est aujourd'hui décédé. Ce dernier est utilisé en tant que contrôle dans nos expérimentations. De plus, tous les babouins sauf deux sont des femelles. Le sang total des babouins et l'isolement des cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) ont été obtenus selon le

protocole de Alais et al. Toutes les données relatives à nos cohortes connues à ce jour sont répertoriées en **annexe 1**.

## II. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire Tarl2 (Tateno et al., 1984) a été utilisée pour la mise au point de l'analyse de la clonalité *in vitro*. Ces cellules sont des leucocytes de rat fournies par le laboratoire du Pr Charles Bangham. Cette lignée a été établie par co-culture avec les PBMC d'un patient ATL et contient une unique intégration provirale d'HTLV-1 par cellule.

Les cellules Jurkat sont une lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T CD4+ issues d'un patient atteint d'une leucémie à cellules T en 1977 (Schneider et al., 1977). Ces cellules ne sont pas infectées par un rétrovirus et n'ont donc aucune intégration provirale. Elles sont donc utilisées en tant que témoin négatif pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

## III. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des PBMC de babouins ainsi que des lignées cellulaires Tarl2 et Jurkat est extrait en utilisant le kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel, ref : 740952.50). Entre 3 et 4.10<sup>6</sup> cellules sont lysées pendant 1h à 56°C à la protéinase K et l'ADN est élué dans 100µl de tampon d'éluion (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Les

concentrations en ADN sont ensuite mesurées par spectrophotométrie au Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).



**Tableau 4. Liste des amorces permettant d'amplifier le LTR proviraux de SFV et STLV-1 chez les babouins naturellement infectés.**

L'amplification se fait par PCR semi-imbriquée à partir de 150ng d'ADN génomique extrait des PBMC des babouins.

Virus cible	Nom de l'amorce	Séquence 5' - 3'	Sens	PCR 1	PCR 2	Référence
SFV	FVRU5-F	CACTRCTCGCTGCGYCGAGAGT	Sens	X		Goldberg et al 2009
	FVLGF1-F	TGTTTCGAGACTCTCCAGGTTTGGTAAG	Sens		X	Wolfe et al 2004
	3R	CACGTTGGGCGCCAATTG	Anti-sens	X	X	Herchenröder et al 1994
STLV-1	LTRSTLVFW3	CAGGAGTCTATAAAAGCGTGG	Sens	X	X	-
	LTRSTLVR1	CGGCCGGGGTATCCTTTTGGG	Anti-sens	X		-
	STLVLTRR	CTGGTGGAATCGTAACTGGA	Anti-sens		X	-

**Tableau 5. Programmes d'amplification des LTR proviraux de SFV et STLV-1.**

**SFV (PCR 1 et PCR 2)**

Étape	Cycles	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	98°C	5 min
Dénaturation	20	98°C	10 sec
Hybridation		60°C	30 sec
Élongation		72°C	30 sec
Élongation finale	1	72°C	7 min
-	-	10°C	∞

**STLV-1 (PCR 1 et PCR 2)**

Étape	Cycles	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	98°C	3 min
Dénaturation	20	98°C	10 sec
Hybridation		64°C	20 sec
Élongation		72°C	20 sec
Élongation finale	1	72°C	10 min
-	-	10°C	∞

#### IV. Séquençage du LTR proviral

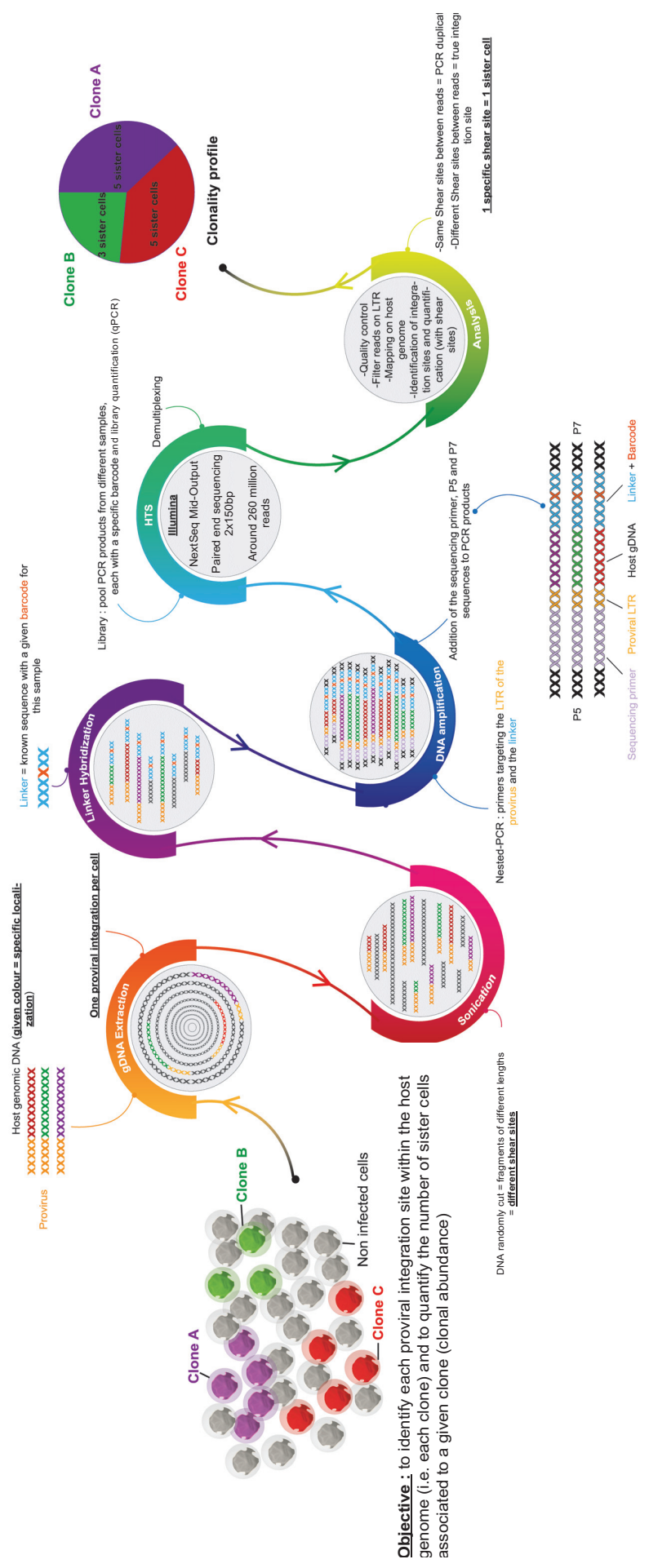
Le LTR 5' proviral de SFV, pour chaque babouin, et de STLV-1 pour les babouins co-infectés, est amplifié par PCR semi-imbriquée grâce à des amorces ciblant le LTR 5' et la région gag du provirus en utilisant 150ng d'ADN génomique. Les amorces ont été désignées à partir des génomes proviraux complet de SFV et STLV-1 séquencés chez le babouin (voir résultats chapitre 1). Les échantillons sont amplifiés via ces amorces à 10µM en tubes PCR contenant du tampon 5X haute-fidélité et l'ADN polymérase Phusion haute-fidélité (*New England Biolabs* NEB - M0530L), des désoxynucléotides triphosphates à 10mM (dNTP, Promega - U1240) et de l'eau (*Nuclease free water*, Qiagen - 129114). Les séquences et les positions des amorces ainsi que les programmes PCR sont décrits dans les **tableaux 4 et 5**. Après amplification, les amplicons sont visualisés et purifiés sur gel d'agarose à 2% en utilisant le kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega - A9282).

Puisque l'enzyme Phusion ne possède pas d'activité permettant de générer une adénosine (A) aux extrémités 3' des amplicons, il est nécessaire d'ajouter une étape d'addition du A afin de réaliser un clonage TA des produits PCR. Cette étape se réalise par l'ajout d'enzyme klenow fragment (3'→ 5' exo), du tampon NEB2 10X (NEB - M0212L) ainsi que des désoxyadénosine triphosphates à 10mM (dATP, Promega - U1240) aux produits PCR. L'incubation des échantillons se fait pendant 30min à 37°C. Les amplicons sont ensuite purifiés grâce au kit de purification PCR Qiaquick (Qiagen - 28106) et sont élués dans 40µl de tampon

d'élution à 10mM Tris-HCL et pH 8.5. Les concentrations en ADN sont ensuite mesurées par spectrophotométrie au Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Les amplicons sont insérés dans le plasmide pGEM (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I, Promega - A1360) en respectant le ratio 1:3. Le plasmide possède une extrémité T libre qui va permettre de réaliser l'hybridation TA avec les amplicons. La réaction se fait en présence du tampon de ligation 2X et de l'enzyme ADN T4 ligase puis sont incubés 1h à température ambiante. La transformation bactérienne de l'ADN plasmidique contenant l'insert se fait par choc thermique à 42°C des bactéries *Escherichia coli* compétentes (E. cloni 10G DUOs Chemically Competent Cells, Lucigen - 60107-1). Les échantillons sont incubés 1h à 37°C après avoir ajouté 600µl de milieu de culture S.O.C (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, Invitrogen - 15544034). Les transformations (300µl) sont étalées sur milieu nutritif gélosé LB (Luria-Bertani) contenant de l'ampicilline et sont incubées pendant la nuit à 37°C. Les colonies (au maximum 10 par échantillons) sont repiquées en milieu liquide LB contenant de l'ampicilline et sont incubées à 37°C toute la nuit. Nous réalisons une étape de PCR sur colonie pour vérifier si le plasmide pGEM contenant l'insert d'intérêt est bien présent. L'insert est amplifié par PCR via l'enzyme ADN polymérase GoTaq G2 et le tampon 5X (Promega - M7845), les dNTP à 10mM et les amorces à 10µM (SFV : FVLGF1-F / 3R et STLV-1 : LTRSTLVFW3 / STLVLTRR, voir **tableau 4**) utilisées précédemment (les cycles des programmes d'amplification sont augmentés à 40 cycles). Les colonies contenant l'ADN plasmidique avec notre insert d'intérêt (visualisée par la PCR sur colonie)

sont sélectionnées. L'ADN est ensuite extrait et purifié grâce au kit Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel - 740588). Les échantillons sont élués dans 50µl de tampon d'éluion à 5 mM Tris/HCl, pH 8.5.

Une fois validée, la région du LTR 5' de SFV et STLV-1 est séquencée par la méthode Sanger (plateforme Supremerun Eurofins Genomics) en utilisant amorces de séquençage T7 et SP6 fournies par la plateforme. L'alignement multiple des séquences est obtenu par Clustal Omega (paramètres par défaut) afin de vérifier la variabilité des LTR. L'alignement est visualisé grâce au logiciel Jalview v2.11.1.0. On estime que les LTR 5' et 3' ont une séquence identique pour un rétrovirus donné.



Cette technique permet d'identifier chaque intégration provirale (=clone) et de quantifier le nombre de cellules sœurs associée à un clone donné (=abondance clonale). L'ADN génomique, extrait des PBMC provenant des babouins naturellement infectés par SFV et STLV-1, est isolé de manière aléatoire par sonication ce qui induit des fragments de différentes tailles. Par la suite, on réalise une étape de ligation de l'adaptateur aux fragments d'ADN. Cet adaptateur contient un code-barre de 8nt spécifique d'un échantillon donné. L'amplification de l'ADN se fait par PCR entre le LTR du provirus SFV ou STLV-1 et l'adaptateur. Les produits PCR contiennent alors les régions suivantes : P5 et P7 (nécessaires pour la fixation des amplicons à la flowcell de l'HTS, l'amorce de séquençage Illumina qui assure l'hybridation de l'amorce de séquençage lors de l'HTS, la fin du LTR proviral de SFV ou STLV-1, l'ADN génomique cellulaire (LTR 3') ou proviral (LTR 5') et l'adaptateur avec le code-barre. Tous les produits PCR SFV et STLV-1 sont alors mélangés afin d'obtenir une banque de séquençage (=library) envoyée à la plateforme Illumina pour l'étape d'HTS. Le séquençage se fait à partir des 2 extrémités des fragments (2x150 paired end) via la technologie NextSeq Mid-output. Le démultiplexage des séquences se fait grâce au séquençage du code-barre qui permet d'associer nos séquences à un échantillon donné. Les profils de clonalité sont obtenus grâce à une analyse bio-informatique mise au point au laboratoire. Chaque part du graphique correspond à un clone donné (=un site d'intégration identifié) et l'amplitude de cette part correspond à l'abondance d'un clone donné.

## V. Amplification des UIS proviraux de SFV et STLV-1

L'identification des sites d'intégrations uniques (UIS) est effectuée par LM-PCR à partir de 5µg d'ADN génomique (à l'exception de 2 échantillons où la quantité de matériel était plus faible pour SFV et STLV-1) suivie du séquençage à haut-débit (HTS). Le protocole décrit dans Gillet et al nous a servi de base afin de l'adapter sur nos échantillons co-infectés par SFV et STLV-1 (Gillet et al., 2017) (**figure 15**). Après la cassure aléatoire de l'ADN génomique par sonication et ligation d'un adaptateur aux fragments d'ADN génomique, les échantillons sont amplifiés par une série de 3 PCR :

- PCR 1 : permet de réaliser une première amplification des UIS entre LTR proviral (SFVBio3A : 5'- GCCTTGCTTAAAGATCCACCTAGCGG-3' ou STLV-1Bio3A : 5'- AGTCTATAAAAGCGTGGAGACAGTTCAGG-3') et l'adaptateur (Bio4 : 5'TCATGATCAATGGGACGATCA-3') à partir de la totalité du produit de ligation pour chaque échantillon.
- PCR 2 : 1µl du produit de PCR 1 est utilisé pour une seconde amplification par PCR imbriquée entre le LTR (SFVSeqBio5A : 5'- **TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**GGAATAAGAGTGA ACTACTTATC-3' ou STLV-1SeqBio5 : 5'- **TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**CTCTCCAGGAGAGAAATTTAGT-3') et l'adaptateur (P7 : 5'-CAAGCAGAAGACGGCATA CGA-3'). Cette étape permet d'augmenter la spécificité d'amplification des UIS et d'intégrer l'amorce de séquençage Illumina (en bleu).

**Tableau 6. Programmes d'amplification des sites d'intégration uniques de SFV et STLV-1 en LM-PCR.**

**PCR1**

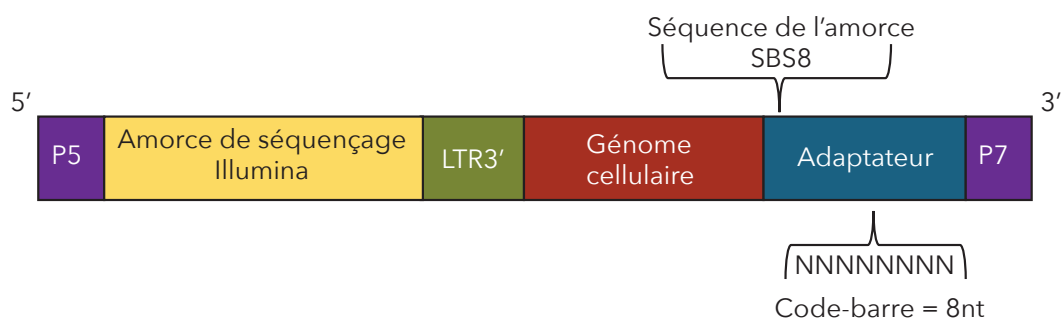
Étape	Cycles	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	98	30"
Dénaturation	7	98	5"
Élongation		72	1'
Dénaturation	18	98	5"
Hybridation		69 (SFV) ou 62 (STLV-1)	10" ou 20"
Élongation		72	1'
Élongation finale	1	72	9'
-	-	10	∞

**PCR2**

Étape	Cycles	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	98	30"
Dénaturation	3	98	5"
Hybridation		60	10" ou 20"
Élongation		72	30"
Dénaturation	9	98	5"
Hybridation		70	10" ou 20"
Élongation		72	30"
Élongation finale	1	72	9'
-	-	10	∞

**PCR3**

Étape	Cycles	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	98	30"
Dénaturation	10	98	5"
Hybridation		70	20"
Élongation		72	30"
Élongation finale	1	72	9'
-	-	10	∞



**Figure 16. Structure des produits PCR obtenus après amplification des sites d'intégration proviraux de SFV ou STLV-1.**

- PCR 3 : 5µl du produit de PCR 2 est utilisé afin d'amplifier la quantité d'amplicons, d'intégrer la région P5 (en vert) et de compléter l'amorce de séquençage Illumina (en bleu) via les amorces P5SeqA : 5'**AATGATACGGCGACCGAGATCTACACACTCTTTCCTACACGA**CGCTCTTCC-3' qui se fixe sur la séquence de l'amorce de séquençage (identique pour SFV et STLV-1) et P7 : 5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3' qui s'hybride sur l'adaptateur.

L'amplification (les programmes PCR sont indiqués dans le **tableau 6**) se fait grâce à ces amorces à 10µM (20µM pour les amorces Bio3A) en tubes PCR contenant du tampon 5X haute-fidélité et l'ADN polymérase Phusion haute-fidélité, des dNTPs à 10mM et de l'eau. Les amorces (synthétisée par la plateforme Eurofins) permettant l'amplification des UIS entre LTR proviral et l'adaptateur sont produits à partir des séquences de LTR du SFV et STLV-1. Comme les LTR 5' et 3' sont normalement identiques, on estime que l'hybridation des amorces se fait sur les 2 LTR et devrait générer 50% de séquences LTR5'-gag et 50% de séquences LTR3'-génomique cellulaire. Les échantillons sont purifiés après chaque étape grâce au kit de purification PCR Qiaquick. Après amplification, nous possédons pour un échantillon donné des amplicons de taille différentes (car la coupure se fait aléatoirement dans le génome) contenant les régions suivantes : P5 et P7, l'amorce de séquençage Illumina, le LTR 3' ou 5', le génome de l'hôte (ou gag), l'adaptateur contenant le code-barre et la séquence de fixation de l'amorce SBS8 (**figure 16**).





Les adaptateurs sont reconstitués dans de l'eau sans nucléase (Qiagen) à une concentration finale de 1000 $\mu$ M. Les 2 brins de l'adaptateur (10nmol chacun) sont hybridés par refroidissement progressif allant de 95°C jusqu'à 4°C. Les adaptateurs sont ensuite dilués à une concentration finale de 20 $\mu$ M. Ici, nous avons préparés les 57 adaptateurs différents pour l'ensemble de nos échantillons. Afin de s'assurer que les adaptateurs fonctionnent, ils sont tous testés en LM-PCR avec de l'ADN provenant de la lignée cellulaire Tar12 contenant une intégration provirale d'HTLV-1.

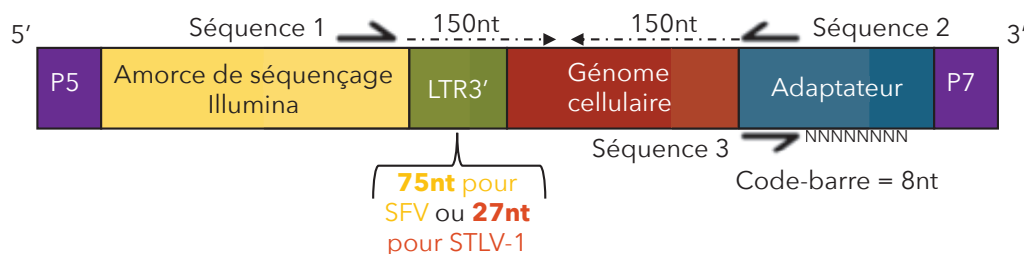
## VII. Préparation de la banque de séquençage

Une banque de séquençage est produite en combinant l'ensemble des produits PCR finaux purifiés (ou *library*) de tous les échantillons de SFV et STLV-1, basée sur les concentrations en ADN. Le volume d'échantillon déposé est estimé en fonction de la concentration afin d'obtenir un nombre de séquences, obtenues par HTS, équivalent pour tous les échantillons. Une étape de quantification de la banque est réalisée par qPCR (PCR quantitative) via des amorces ciblant les régions P5 (5'AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACAC-3') et P7 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3') et le kit PCR QuantiFast SYBR Green (Qiagen - 204054). Une courbe étalon est réalisée à partir d'une banque similaire (distribution de la taille des fragments équivalente par LM-PCR) séquencée précédemment permettant ainsi une quantification relative de la banque. La molarité du mélange final est également évaluée par Bioanalyzer ou TapeStation

(Agilent). Nous obtenons généralement des valeurs similaires par les deux approches.

## VIII. Séquençage à haut-débit (HTS)

La banque de séquençage est envoyée et séquencée dans une plateforme de séquençage localisée à Londres par le Dr Laurence Game et son équipe (*MRC Clinical Sciences Centre Genomics lab, Hammersmith Hospital*). La technologie utilisée est un NextSeq 550 Mid-output (des tests préalables ont été évalués sur un Miseq). Pour le séquençage, la banque est diluée à une concentration de 1.8pM et est dénaturée. Par la suite, chaque fragment est amplifié permettant la génération de groupe de séquences (= *cluster*). Une fois la génération de *clusters* terminée, le séquençage peut commencer. Cette étape consiste à séquencer les fragments d'ADN par ses 2 extrémités permettant d'avoir 2 séquences de 150nt par fragment (*2x150 paired-end*) ainsi qu'une troisième séquence correspondant au code-barre de 8nt (**figure 18**).



Amorce de séquençage illumina : 5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'  
 SBS8 sens : 5'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC-3'  
 SBS8 anti-sens : 5'-GATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG-3'

**Figure 18. Séquençage des amplicons SFV et STLV-1 par HTS.**

Séquence 1 : le LTR proviral de SFV (75nt) ou STLV-1 (27nt) en plus du génome cellulaire (150nt) ; séquence 2 : adaptateur vers le génome cellulaire (150nt) ; séquence 3 : code-barre de 8nt.

La séquence 1 (75nt de la fin du LTR proviral SFV ou 27nt pour STLV-1 en plus du génome cellulaire ou proviral) est obtenue grâce à l'amorce de séquençage Illumina (apportée par les PCR 2 et 3) tandis que les séquences 2 (adaptateur vers le génome cellulaire) et 3 (code-barre) sont obtenues grâce à l'amorce SBS8 sens et anti-sens, respectivement (séquences dans l'adaptateur).

Une banque contrôle dérivée du génome de PhiX est utilisée en tant que contrôle pour la génération de clusters (densité entre 129 et 165 clusters/mm<sup>2</sup>) mais également pour augmenter la diversité nucléotidique de nos échantillons qui présentent une faible diversité sur le début de la séquence 1 correspondant au LTR des virus. L'analyse Illumina consiste à faire l'analyse d'image (distinction des *clusters*) et le *base-calling* (détermine la qualité Q de chaque nucléotide séquencé). Les images acquises à chaque cycle de séquençage permettent d'obtenir un signal propre à chaque nucléotide. L'étape de *base-calling* est la probabilité qu'un nucléotide soit correctement lu par le séquenceur en fonction de ce signal (Cacho et al., 2016). Le démultiplexage est réalisé par la plateforme.

## **IX. Analyses *in silico* des données de l'HTS**

Dans le but d'identifier les clones et de quantifier l'abondance clonale associée, nous avons mis au point un pipeline informatique en collaboration avec le Dr Magali Naville et le Pr Jean-Nicolas Volff à l'IGFL et le Dr Anat Melamed (Département de médecine de l'Imperial College de Londres). Dans un premier temps, nous utilisons le portail Galaxy (Afgan et al., 2018) (mis à disposition par le

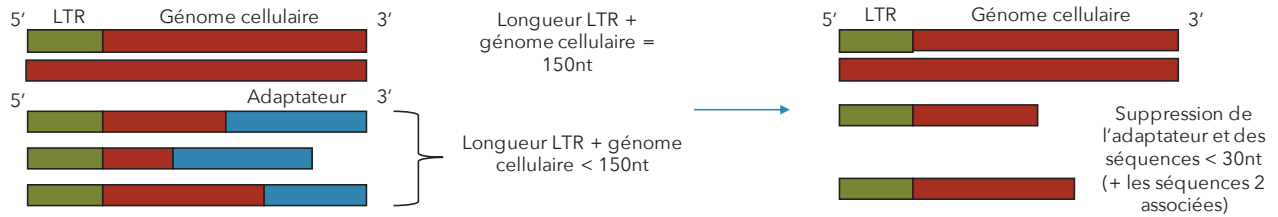
Centre Blaise Pascal à Lyon) afin de nettoyer et filtrer les données. Les séquences sont ensuite alignées contre le génome de référence. L'identification et la quantification des UIS se font grâce à plusieurs programmes que nous avons développés au laboratoire via les langages Python et R (disponibles sur Github, <https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project>).

### i. *Contrôle de la qualité des séquences*

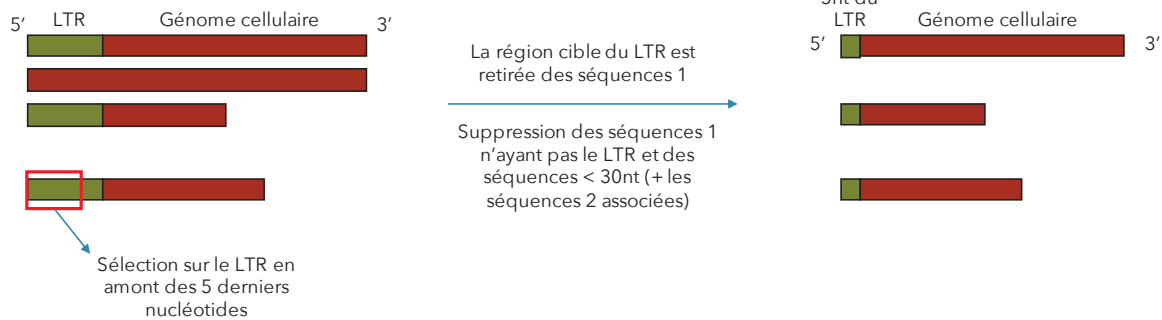
Les séquences 1 et 2 obtenues après le séquençage à haut-débit vont subir une étape de contrôle de la qualité. Nous utilisons le programme « FastQC » (disponible sur Galaxy) afin d'obtenir un rapport sur la qualité des séquences. Le programme représente le score Q Illumina à chaque position moyennée sur l'ensemble des séquences. Ce score représente la probabilité qu'un nucléotide soit incorrectement lue par le séquenceur. Plus le score est élevé, plus la probabilité de retrouver une erreur est faible. Par la suite, nous faisons une première sélection des séquences via le programme « Paired-FastQC\_Trimmer ». Le programme coupe les séquences dès que la moyenne sur 2 ou 3 nucléotides est inférieure à  $Q=30$  (1 erreur pour 1000 nucléotides ou 99,9% de précision). Par la suite, si la portion restante a une longueur maximale de 30nt, le programme élimine les séquences 1 et 2 associées. Ces étapes permettent de s'assurer de la robustesse de l'alignement des séquences contre le génome de référence en ne conservant que les séquences dont nous sommes garantis de la

qualité du *base-calling* et en éliminant les séquences trop courtes qui sont plus susceptibles de s'aligner à plusieurs endroits dans le génome.

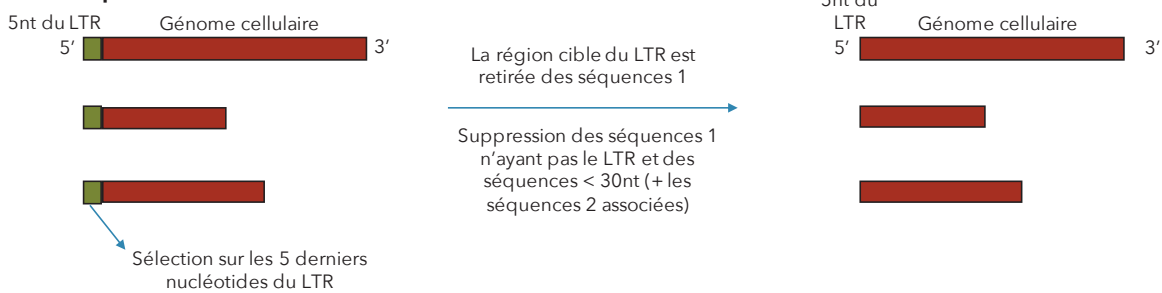
### Filtre 1 : sur les séquences 1



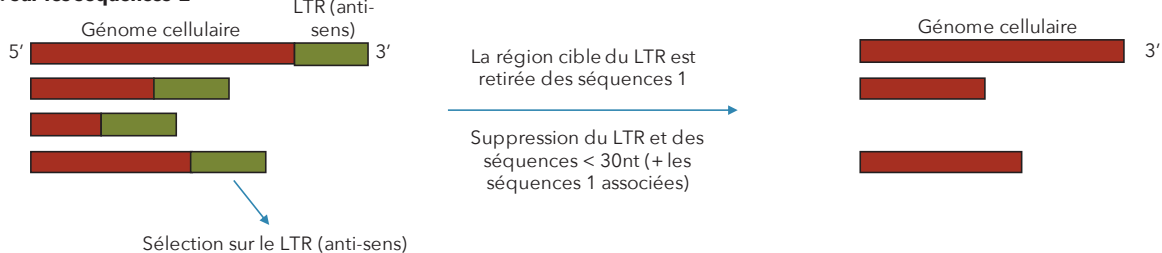
### Filtre 2 : sur les séquences 1



### Filtre 3 : sur les séquences 1



### Filtre 4 : sur les séquences 2



## Figure 19. Filtre et nettoyage des données obtenues par HTS.

Toutes les séquences sont passées au crible selon différents critères de spécificité via le programme « cutadapt ». Ce programme va passer en revue toutes les séquences et conserver celles qui possèdent une séquence cible qui sera coupée et retirée de la séquence. Le programme cutadapt permet ainsi d'enlever les séquences cibles et de conserver uniquement la région génomique pour assurer le bon alignement des séquences contre le génome de référence. Les séquences 1 et 2 sont associées en *paired-end* et celles ayant une taille inférieure à 30nt sont supprimées.

## ii. *Filtre et nettoyage des données*

Toutes les séquences sont passées au crible selon différents critères de spécificité ; ce nettoyage se fait en 4 étapes en utilisant le programme « cutadapt ». Ce programme va passer en revue les séquences et conserve celles qui possèdent une séquence cible donnée qui sera coupée et retirée de la séquence. Le programme « cutadapt » va ainsi permettre de sélectionner les séquences d'intérêts (qui comportent tous les éléments souhaités) et de conserver uniquement la région génomique cible pour assurer le bon alignement des séquences contre le génome de référence. Les séquences 1 et 2 sont associées en *paired-end*. Les différentes étapes sont résumées dans la **figure 19**.

**Filtre n°1** : « cutadapt » de l'adaptateur des séquences 1. Dans le cas où la longueur de l'ADN génomique entre le LTR et l'adaptateur est trop courte, la séquence 1 présentera une partie de l'adaptateur à son extrémité 3'. Pour pallier à cela, le programme va rechercher la séquence de l'adaptateur (en anti-sens : 5'-AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG-3') à l'extrémité 3' des séquences 1 et la supprimer. Ici, aucune variabilité de l'adaptateur n'est tolérée mais le programme doit prendre en compte le fait que seulement une partie de l'adaptateur peut être présente (*indels* = insertions/délétions). L'ensemble des séquences 1 est conservé à l'exception de celles présentant une taille inférieure à 30nt après suppression de l'adaptateur. Dans ce cas, les séquences 2 associées sont également supprimées.



**Filtre n°2** : « cutadapt » du LTR proviral des séquences 1 (correspondant aux nucléotides en amont des 5 dernières paires de bases du LTR). Dans le but de conserver uniquement les séquences qui correspondent à de vrais sites d'intégration du provirus, nous faisons une première sélection en 5' des séquences 1 en amont des 5 derniers nucléotides du LTR (SFV (70nt) : 5'GGAATAAGAGTGAAGTACTACTTATCCCAAGAGGTGTTAGTCTTTTAGGATAATCAATATACAATAATCTA-3' et STLV-1 (22nt) : 5'-CTCTCCAGGAGAGAAATTTAGT-3'). De la même façon, le programme tient compte des *indels* et accorde une variabilité de 10% pour SFV (3 mutations sur la séquence cible, voir les résultats sur la variabilité du LTR) et 0% pour STLV-1. Les séquences 1 d'une taille inférieure à 30nt et celles qui ne possèdent pas le LTR sont supprimées avec les séquences 2 associées.

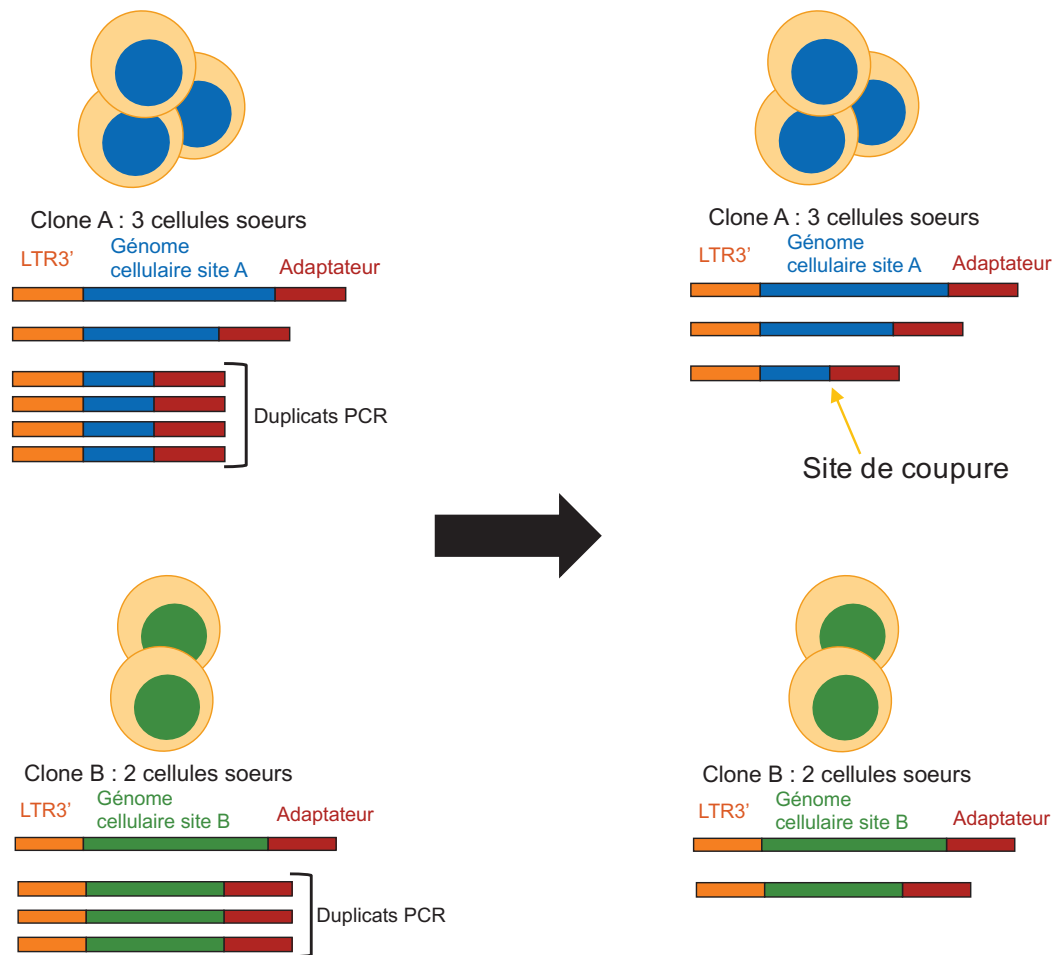
**Filtre n°3** : « cutadapt » des 5 derniers nucléotides du LTR des séquences 1 (spécifique et conservée pour un rétrovirus donné puisque c'est la séquence reconnue par l'intégrase virale). La seconde sélection se fait en 5' des séquences 1 sur les 5 dernières paires de bases du LTR proviral (SFV : 5'-TGACA-3' ou 5'-CGACA-3' et STLV-1 : 5'-ACACA-3') en ne tolérant aucune variabilité ni *indels*. Les séquences sont supprimées de la même façon que pour le filtre n°2. Cette étape est importante pour différencier les 2 rétrovirus SFV et STLV-1.

**Filtre n°4** : « cutadapt » du LTR éventuel des séquences 2. Dans un contexte identique au filtre n°1, les séquences 2 peuvent être constituées du LTR à leur extrémité 3'. Ainsi, il faut supprimer cette séquence (selon les mêmes critères que

ceux utilisés précédemment) pour assurer l'alignement. Les séquences résultantes inférieures à 30nt sont supprimées.

### iii. *Alignement des séquences contre le génome de référence*

Les séquences sont par la suite alignées contre le génome de référence du babouin (Panu\_3.0/papAnu4) récupéré dans la base de données UCSC (*University of California, Santa Cruz*, <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) ainsi que sur les séquences du gène *gag* de SFV et STLV-1 (puisque 50% des séquences, correspondant à une amplification à partir du LTR 5', devraient être alignées sur cette séquence). L'alignement est réalisé grâce au programme « Bowtie2 » (Langmead and Salzberg, 2012) en *paired-end* et en accordant une distance maximale de 1000nt entre les séquences 1 et 2. Les conditions de sonication permettent d'avoir des fragments d'une taille moyenne de 400pb et les conditions d'amplification ne permettent pas d'obtenir de plus grands fragments. De plus, la taille des fragments séquencés sur la plateforme est inférieure à 1000-1500nt. Afin d'augmenter la précision de l'alignement, notamment dans le cas où des séquences sont alignées contre des régions répétées, nous utilisons le paramètre  $k=100$ . Ainsi, chaque séquence sera alignée 100 fois sur le génome afin de trouver le meilleur score d'alignement. Seules les séquences ayant un score d'alignement  $MAPQ \geq 10$  sont conservées.



**1 integration par cellule : 1 site de coupure = 1 cellule sœur**

### Figure 20. Identification des clones et quantification de l'abondance clonale.

Les clones sont identifiés en fonction de la localisation de la séquence 1 et 2 dans le génome de la cellule hôte après alignement des séquences (il faut que les 2 séquences soient alignées dans la même région génomique). La quantification de l'abondance clonale se fait grâce aux séquences 2 (adaptateur - génome cellulaire) et aux sites de coupures engendrés suite à la sonication. La coupure de l'ADN se fait de façon aléatoire et va générer des fragments de tailles différentes pour un clone donné. De plus, il y a en moyenne une intégration unique par cellule (Cook et al., 2014) et la probabilité de couper aléatoirement le génome au même endroit entre 2 cellules sœurs est faible. Cela veut dire qu'un site de coupure est l'équivalent d'une cellule sœur. À l'inverse, les séquences 2 ayant un site de coupure identique sont considérées comme des duplicats PCR. Par exemple, pour les clones A et B, il y a respectivement 3 et 2 fragments de tailles différentes ce qui implique que le site de coupure entre le génome cellulaire et l'adaptateur est différent. La région LTR et génome cellulaire est identique entre les fragments pour un clone donné. Pour quantifier l'abondance clonale, il suffit de compter le nombre de sites de coupure différents pour un même clone. Ici, il y a 3 et 2 sites de coupures pour les clones A et B ce qui implique qu'il y a 3 et 2 cellules sœurs.

#### iv. *Identification des clones et quantification de l'abondance clonale*

Cette étape utilise un programme Python qui permet d'identifier les sites d'intégrations proviraux en fonction de la localisation des séquences 1 et 2 au sein de la même région du génome cellulaire, après alignement des séquences ([https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step\\_1\\_Clones\\_%26\\_sisters\\_quantification.R](https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step_1_Clones_%26_sisters_quantification.R)). Afin de tenir compte des *indels* possiblement introduits lors du séquençage, ce programme considère que des sites distants de moins de 5nt correspondent à un seul et unique site d'insertion. Ce site est choisi comme étant la position associée au plus grand nombre de sites de coupure (et à des sites de coupure égaux, au plus grand nombre de duplicats PCR).

Par la suite, la quantification de l'abondance clonale se fait grâce aux séquences 2 et aux sites de coupures engendrés lors de la sonication (**figure 20**). La coupure de l'ADN se fait de façon aléatoire et va générer des fragments de tailles différentes pour un clone donné. De plus, nous faisons l'hypothèse, pour nos analyses, qu'il n'y a qu'une intégration unique par cellule (Cook et al., 2014) et que la probabilité de couper aléatoirement le génome au même endroit entre 2 cellules sœurs est faible. Ainsi, pour plusieurs cellules sœurs d'un clone donné, la séquence 1 sera identique tandis que la localisation de la séquence 2 dans le génome, après alignement, est dépendante d'un site de coupure donné. À l'inverse, les séquences 2 ayant un site de coupure identique sont considérés comme des duplicats PCR. Cela veut dire qu'un site de coupure est l'équivalent

d'une cellule sœur. Cependant, plus le nombre de cellules sœurs augmente, plus la probabilité que 2 sites de coupure surviennent au même endroit augmente avec elle, générant des sites de coupure communs entre différentes cellules sœurs (Berry et al., 2012). Cela implique que l'abondance clonale est sous-estimée puisque l'on ne peut pas faire de différence entre des cellules sœurs différentes ou des duplicats PCR. Afin de limiter ce problème, nous utilisons le package R « *soniclength* » qui va estimer l'abondance clonale en fonction de la distribution de la taille des fragments d'ADN, en modélisant la probabilité qu'un site de coupure soit généré plusieurs fois indépendamment (Berry et al., 2012).

Le fichier de sortie précise alors le chromosome et la localisation chromosomique dans lequel l'UIS est intégré ainsi que son orientation, le nombre de sites de coupures, le nombre de cellules sœurs calibré, le nombre de duplicats PCR, et la séquence génomique amplifiée (ou *gag*).

#### v. *Élimination des sites aspécifiques*

Nous souhaitons vérifier si l'hybridation des amorces sur l'ADN, lors de l'amplification des UIS par LM-PCR, ne s'est pas fait de façon non-spécifique (sur l'ADN génomique cellulaire et non sur le LTR) engendrant ainsi la présence de faux sites d'intégration proviraux. De telles amplifications aspécifiques pourraient en effet être dues à la présence, dans le génome du babouin, de séquences similaires à la fin du LTR. Nous avons développé un programme Python pour identifier ces sites (<https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/>

Step\_2\_remove\_artefactual%20\_sites\_1.py). Ce programme fonctionne en plusieurs étapes puisqu'il va d'abord récupérer une séquence de 100nt étendue en amont et en aval d'un site d'intégration donné dans le génome du babouin (Panu\_3.0/papAnu4), à partir de sa localisation génomique. Par la suite, la séquence est alignée contre le LTR proviral (amorce + la fin du LTR) de SFV ou STLV-1 en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Si la séquence du LTR s'aligne contre la séquence du génome, et que la fin du LTR correspond au site d'insertion, cela suggère que l'amorce peut se fixer sur cette région et ainsi générer un faux site d'intégration. Il est ainsi supprimé et répertorié dans un autre fichier de sortie.

#### vi. *Élimination des sites dupliqués entre les échantillons*

Malgré la présence de zones d'intégration préférentielles dans le cas des rétrovirus HTLV-1/STLV-1, leur proportion implique que la probabilité qu'une intégration provirale se fasse exactement au même endroit dans le génome entre 2 animaux infectés est faible (voir introduction chapitre 5). Ainsi, des sites d'intégrations identiques identifiés chez plusieurs animaux sont considérés comme des sites dupliqués à la suite d'erreurs de code-barres introduites lors de l'amplification et du séquençage. Ces sites sont simplement supprimés en assignant l'UIS à l'échantillon qui possède le plus de cellules sœurs associées (ou à celui qui possède le plus grand nombre de duplicats PCR dans le cas où le nombre de cellules sœurs est le même). Si on ne peut pas faire de distinction, l'UIS

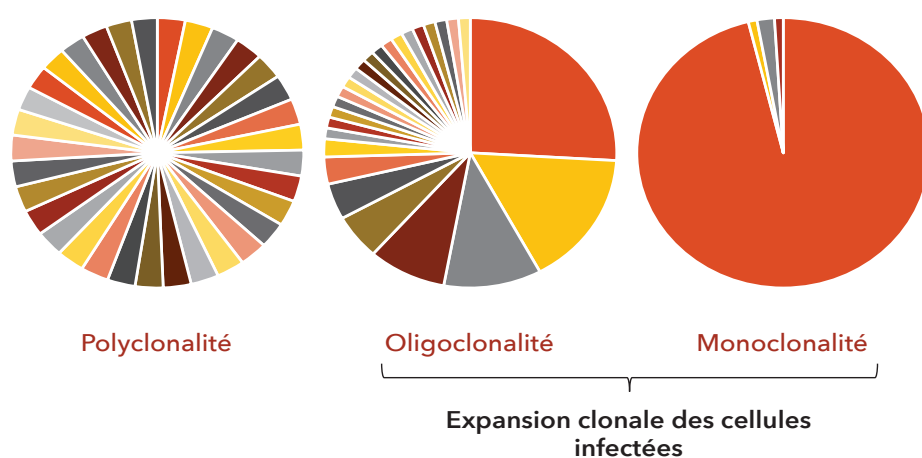
est éliminé de tous les échantillons concernés ([https://github.com/bjegado/ClonaRetroproject/blob/main/Step\\_3\\_list\\_of\\_duplicated\\_sites.py](https://github.com/bjegado/ClonaRetroproject/blob/main/Step_3_list_of_duplicated_sites.py) and [https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step\\_4\\_remove\\_duplicated\\_sites.py](https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step_4_remove_duplicated_sites.py)). Les UIS dans la région *gag* sont éliminés manuellement à cette étape.

### vii. *Élimination des séquences jumelles*

À certaines occasions, il est possible que des modifications de quelques nucléotides apparaissent dans une séquence, notamment lors de mauvaises incorporations lors de l'amplification par PCR ou des erreurs lors du séquençage. Cela peut avoir pour conséquence l'alignement de la séquence dans une zone différente du génome et de générer un nouveau site d'intégration ailleurs dans le génome (= séquences jumelles). Pour identifier ces séquences, nous avons développé un programme Python ([https://github.com/bjegado/ClonaRetroproject/blob/main/Step\\_5\\_remove\\_twins.py](https://github.com/bjegado/ClonaRetroproject/blob/main/Step_5_remove_twins.py)) qui aligne toutes les séquences 1 entre elles retrouvées au sein d'un échantillon donné (via BLAST). Dans le cas où la similarité dépasse 90% sur une longueur de 25nt, le programme regroupe les séquences ensemble (*clusters*). Parmi les séquences jumelles d'un cluster donné, nous gardons la localisation chromosomique de celui qui présente le plus grand nombre de cellule sœur. Si plusieurs séquences jumelles ont la même abondance clonale, nous gardons celle avec le plus de duplicats PCR. Si on ne peut pas faire de distinction, les séquences jumelles sont éliminées.

viii. *Profils de clonalité et calcul de l'index d'oligoclonalité (OCI)*

Une fois les données nettoyées, les sites cartographiés et quantifiés sont utilisés pour générer les différents profils de clonalité sur R ([https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step\\_6\\_clonality\\_profile.r](https://github.com/bjegado/ClonaRetro-project/blob/main/Step_6_clonality_profile.r)). La **figure 21** représente des exemples de profils que l'on peut observer.



**Figure 21. Exemples de profils de clonalité rétrovirale observés après cartographie des sites d'intégration uniques.**

Une part = un clone cellulaire. L'amplitude de la part = l'abondance clonale. Les profils monoclonaux et oligoclonaux sont représentatifs d'une expansion clonale des cellules infectées puisqu'un ou plusieurs clones sont majoritaires. Le profil polyclonal est caractérisé par la présence de clones de la même abondance.

Chaque part représente une intégration provirale et donc un clone donné. L'amplitude de la part représente quant à elle l'abondance clonale qui est représentée par l'abondance relative du clone par rapport aux autres clones dans un même échantillon. Cette abondance se calcul de la manière suivante :  $\frac{ni}{\sum ni}$  où  $ni$  correspond au nombre de cellules sœurs calibré pour un clone donné.



Les profils monoclonaux et oligoclonaux représentent une expansion clonale des cellules infectées où un ou plusieurs clones ont une activité mitotique plus importante. Nous voulons ainsi voir s'il existe une distribution clonale inégale contenant un ou plusieurs clones majoritairement représentés dans la PVL. Le profil polyclonal représente la présence de clones ayant une abondance équivalente.

L'index d'oligoclonalité (OCI) décrit la distribution clonale au sein d'un échantillon. L'OCI varie entre 0 (polyclonale) et 1 (monoclonale) et est calculé en utilisant le package « reldist » sur R (<https://CRAN.R-project.org/package=reldist>). L'OCI est basé sur le coefficient de Gini, une mesure statistique qui décrit la répartition d'une variable (l'abondance clonale) au sein d'une population (ici, les clones d'un échantillon donné).

## ix. *Tests statistiques*

L'analyse des données a été réalisée sur R disponible sur l'Institut Français de Bioinformatique (IFB, <https://www.france-bioinformatique.fr/>). Nous avons réalisé un test de Mann-Whitney pour la comparaison du nombre total de cellules infectées par les virus et de l'index d'oligoclonalité entre chaque cohorte. La corrélation entre l'OCI et la charge provirale de STLV-1 est représentée par un test de corrélation Spearman.

## C. Résultats

### I. Analyse du polymorphisme du LTR proviral de SFV et STLV-1

D'une façon générale, les virus évoluent dans un environnement dynamique et en perpétuel changement et sont donc soumis à des pressions de sélection fréquentes. Afin de survivre, un virus a besoin de s'adapter à ces nouveaux environnements via des processus évolutifs (Jacquet et al., 2018). Nous savons aujourd'hui que, pour une même espèce virale dans un hôte donné, la population des génomes viraux n'est pas homogène. En effet, la réplication virale peut conduire à l'apparition de mutations et donc d'une variabilité plus ou moins importante au sein d'une population virale. Les différences génétiques retrouvées au sein d'un hôte permettent de définir la notion de quasi-espèces virales. Le principe de cette théorie montre qu'une population virale est représentée par une mosaïque de génomes mutés et est gouvernée par une séquence majoritairement représentée. Cette dernière population possède alors une capacité de réplication plus importante que les autres à un temps donné (= sélection positive) (Domingo and Perales, 2018). Le LTR proviral est la région promotrice qui est connue pour sa variabilité de séquence au sein d'une même espèce rétrovirale (Benachenhou et al., 2009; Pluta et al., 2018). De plus, des études ont montrés que des mutations au sein du LTR peuvent être associée à une modification de l'activité transcriptionnelle et avoir une influence sur le tropisme et la pathogénèse (Angelopoulou et al., 2008; de Arellano et al., 2010; Barros et al., 2005).

**Tableau 7. Polymorphisme de séquence retrouvé à la fin du LTR proviral de SFV et STLV-1.**

Pour SFV, 6 et 7 souches sont identifiées, respectivement chez les mono- et co-infectés tandis que 3 souches sont observées dans le cas de STLV-1. (A) 10 babouins mono-infectés (n=170 séquences sur 17 échantillons, 460nt) semblent être infecté par une seule souche tandis que les 7 autres sont co-infectés par 2 ou 3 souches différentes. De plus, 2 souches sont majoritairement retrouvées, la souche non mutée et la souche 3. La souche 3 correspond au LTR qui se termine par 5'-CGACA-3' et est retrouvée chez 6 babouins (24 séquences sur 60). Toutes les autres souches se termine par 5'-TGACA-3'. (B) Parmi les babouins co-infectés (n = 67 séquences sur 12 échantillons, 357nt), on retrouve une seule souche majoritaire. De plus, le LTR se termine aussi par 5'-TGACA-3' pour toutes les souches (aucune séquence 5'-CGACA-3' n'a été identifiée). Ici, 9 babouins sont infectés par une souche unique (sur les 12) tandis que les 3 autres sont co-infectés par 2 souches. (C) Dans le cas de STLV-1 (n = 53 séquences sur 10 échantillons, 440nt), la séquence non mutée est aussi majoritaire et aucune co-infection n'a été identifiée ici.

**A : SFV (PNH mono-infectés)**

Échantillon	Séquence non mutée	Séquence mutée 1	Séquence mutée 2	Séquence mutée 3 (fin du LTR = CGACA)	Séquence mutée 4	Séquence mutée 5
#1	10 colonies / 10					
#2	10 colonies / 10					
#3	8 colonies / 10	2 colonies / 10				
#4	10 colonies / 10					
#5			4 colonies / 10	6 colonies / 10		
#6	10 colonies / 10					
#7	4 colonies / 10			6 colonies / 10		
#8					10 colonies / 10	
#9			4 colonies / 10	1 colonies / 10	5 colonies / 10	
#10			10 colonies / 10			
#11	7 colonies / 10			3 colonies / 10		
#12	6 colonies / 10			4 colonies / 10		
#13	10 colonies / 10					
#14				4 colonies / 10		6 colonies / 10
#15			10 colonies / 10			
#16	10 colonies / 10					
#17	10 colonies / 10					

**B : SFV (PNH co-infectés)**

Échantillon	Séquence non mutée	Séquence mutée 6	Séquence mutée 7	Séquence mutée 8	Séquence mutée 9	Séquence mutée 10	Séquence mutée 11
#1		9 colonies / 9					
#2	5 colonies / 5						
#3	7 colonies / 7						
#4	4 colonies / 4						
#5			3 colonies / 5	2 colonies / 5			
#6					3 colonies / 5	2 colonies / 5	
#7	5 colonies / 5						
#8	4 colonies / 4						
#9	4 colonies / 4						
#10	1 colonies / 5						4 colonies / 5
#11							4 colonies / 4
#12	10 colonies / 10						

**C : STLV-1**

Échantillon	Séquence non mutée	Séquence mutée 1	Séquence mutée 2
#1	5 colonies / 5		
#2	5 colonies / 5		
#3		5 colonies / 5	
#4	4 colonies / 4		
#5	4 colonies / 4		
#6	5 colonies / 5		
#7			5 colonies / 5
#8			5 colonies / 5
#9	10 colonies / 10		
#10	5 colonies / 5		

Ici, nous nous sommes demandés si les LTR proviraux de SFV et STLV-1 présente aussi un polymorphisme de séquence parmi nos animaux infectés. Dans le cadre de mon travail de thèse, il est nécessaire de vérifier s'il y a une variabilité afin de s'assurer que nos amorces pour la LM-PCR s'hybrident correctement sur des régions les plus conservées possible.

Concernant nos analyses, un total de 247 séquences d'une taille de 460 et 357 nucléotides (nt) a pu être obtenu pour le LTR de SFV, respectivement chez les animaux mono- (n=170 sur 17 échantillons) et co-infectés (n = 67 sur 12 échantillons) (**tableaux 7A et B**). Dans le cas de STLV-1, 53 séquences ont été obtenues chez 10 échantillons (440nt) (**tableau 7C**). De plus, les échantillons co-infectés testés ici ne correspondent pas tous aux animaux de notre étude puisque nous étions limités par la quantité d'ADN. Je n'ai donc pas pu obtenir la séquence du LTR de SFV et STLV-1 chez tous les babouins co-infectés. Les tableaux représentent les séquences mutées ou non par rapport à une séquence consensus (= « souche virale ») retrouvées dans chaque échantillon ainsi que leur proportion (nombre de colonie possédant la séquence en question). Les mutations ont été identifiées à partir de la séquence consensus propre à chaque cohorte et à chaque virus. Les séquences non mutées observées pour SFV chez les babouins mono- et co-infectés sont identiques (99% d'homologie) malgré une origine différente des babouins (Kenya et le parc zoologique de St. Vrain, **annexe 1**). Cela soutient la co-spéciation observée entre SFV et son hôte (Switzer et al., 2005). Globalement, il est possible de voir que le LTR de SFV semble plus variable que celui de STLV-1 car le

nombre de séquences mutées est plus important chez les animaux mono- et co-infectés. En effet, 6 et 7 souches différentes sont identifiées pour SFV (respectivement mono- et co-) tandis que 3 souches sont observées dans le cas de STLV-1. De plus, la région du LTR de SFV et STLV-1 reste très bien conservée puisque l'homologie de séquence est de 94%, 98% et 97,8%, respectivement pour les babouins uniquement infectés par SFV et co-infectés par SFV et STLV-1 (l'alignement multiple a été réalisé via Geneious v11.0.3). En revanche, le nombre de souches virales par échantillon ne reflète pas la diversité qu'il pourrait y avoir au sein des babouins puisque le nombre total de séquence par échantillon (maximum 10) ainsi que la taille de la séquence ne sont pas assez conséquents. Afin d'identifier cette diversité, nous pourrions réaliser du séquençage à haut-débit sur la totalité du génome de SFV et STLV-1 dans plusieurs échantillons puisque nous disposons des séquences complètes (voir résultats chapitre 2). Les données montrent que certains singes sont infectés par une unique souche (mutée ou non) mais aussi que certaines sont partagées parmi plusieurs animaux ce qui montre une circulation de ces différentes souches au sein des babouins comme observée chez 2 cohortes de mandrills au Gabon (Mouinga-Ondémé et al., 2010). Le **tableau 7A** montre que, chez les babouins mono-infectés par SFV, 10 singes sont infectés par une souche unique de SFV tandis que les 7 autres sont co-infectés par 2 ou 3 souches de SFV différentes. La transmission entre animaux d'une même famille est difficile à comparer puisque nous possédons des échantillons d'une même fratrie sans ceux provenant de la mère à l'exception des échantillons 3 et 8

(**annexe 1**) pour lesquels des souches différentes sont observées (respectivement la souche non mutée / souche 1 et la souche 4). En revanche, il ne faut pas exclure le fait que les babouins sont sûrement tous co-infectés par différentes souches puisque le nombre de séquences ici est limitant. De plus, 2 souches sont majoritairement retrouvées, la souche non mutée et la souche 3. Cette dernière correspond au LTR qui se termine par 5'-CGACA-3' et est retrouvée chez 6 babouins (24 séquences sur 60) ce qui est non négligeable. Toutes les autres souches se terminent par 5'-TGACA-3'. Concernant SFV chez les animaux co-infectés (**tableau 7B**), la quantité limitée d'échantillon explique que le LTR n'a pas pu être séquencé chez l'ensemble des singes et au vu de la conservation des séquences, j'ai estimé que le séquençage des 10 colonies par échantillon n'était pas nécessaire (cela est aussi valable pour STLV-1). Ainsi, le nombre de co-infections est certainement sous-estimé. Ici, une seule souche est majoritairement retrouvée (9 babouins sont infectés par une unique souche tandis que les 3 autres sont co-infectés par 2 souches). De plus, le LTR se termine aussi par 5'-TGACA-3' pour toutes les souches (aucune séquence 5'-CGACA-3' n'a été identifiée). Dans le cas de STLV-1 (**tableau 7C**), la séquence non mutée est aussi majoritaire et aucun cas de co-infection n'a été identifié ici. De la même façon, nous ne pouvons pas conclure ici sur la transmission de SFV et STLV-1 entre les animaux d'une même famille.

Cela montre que les contacts proches entre les animaux dans chaque cohorte peuvent induire la transmission de différentes souches d'un même virus

causant ainsi des surinfections virales. Ce phénomène est aujourd'hui bien connu et a été démontré pour d'autres virus comme le VIH-1 (Waters and Smit, 2012). Il serait donc intéressant de vérifier l'influence de chacune des souches sur la propagation des virus SFV et STLV-1 chez les animaux co-infectés. Concernant la souche 3 chez les babouins mono-infectés par SFV, nous serons en mesure de l'identifier dans nos analyses de la clonalité et de comparer les sites d'intégrations par rapport aux souches 5'-TGACA-3'. Malheureusement, nous ne pourrons pas faire la distinction avec les autres souches SFV et STLV-1 car les mutations se trouvent en amont des sites d'hybridation de nos amorces LM-PCR (se trouvant à la fin des LTR proviraux, voir résultats chapitre 3 - B.VII).

Ces données nous ont permis de désigner les amorces pour amplifier les sites d'intégration uniques de SFV et STLV-1 par LM-PCR. Les amorces ont ensuite été alignées contre le génome du babouin par BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*) sur la base de données Ensembl afin de limiter l'amplification non spécifique. La **figure 22** représente les séquences consensus de la fin du LTR de SFV et STLV-1 ainsi que la localisation des amorces. Les amorces ciblant le SFV sont utilisées pour les échantillons mono-infectés et co-infectés car l'homologie est assez forte pour trouver des séquences d'hybridation identiques.



**Figure 22. Sites d'hybridation des amorces LM-PCR à la fin des LTR proviraux de SFV et STLV-1.**

Pour SFV, les amorces Bio3A et Bio5A s'hybride respectivement en amont des 75 et 50nt de la fin du LTR. Concernant STLV-1, l'amorce Bio3A se fixe en amont des 404nt de la fin du LTR tandis que l'amorce Bio5 se fixe en amont des 5nt 5'-ACACA-3'.





## II. Clonalité de SFV et STLV-1

### i. Contrôle de la qualité des séquences

À la suite de l'amplification des sites d'intégration uniques de SFV et STLV-1 par LM-PCR et du séquençage à haut débit, les données sont tout d'abord démultiplexées en fonction du code-barre spécifique d'un échantillon donné. Ici, un total de 233 762 980 de séquences 1 et 2 ont été collectées correspondant à environ 65% des séquences brutes ayant passé le filtre de chasteté illumina. Le pourcentage relativement bas de séquences passant le filtre peut-être en partie expliqué par la faible diversité nucléotidique de nos bibliothèques sur la partie constante correspondant au LTR de SFV ou STLV-1 et ce malgré l'ajout de PhiX pour compenser. La qualité du *base-calling* moyen est également obtenu automatiquement ( $Q \geq 30$ ). Avec une moyenne  $>80\%$  des nucléotides possédant un  $Q > 30$ , le *base-calling* est de bonne qualité. Sur cet ensemble, la distribution des séquences entre chaque cohorte est bien proportionnée puisque l'on obtient environ 30% de séquences pour chaque groupe (SFV mono- = 37,7%, SFV co- = 34% et STLV-1 co- = 27,4%). Concernant les sites amplifiés et séquencés à partir de l'ADN de Jurkat, la proportion correspond aux 0,9% restants (pour SFV et STLV-1 combinés) ce qui était attendu puisqu'il s'agit de nos échantillons non-infectés mais cela sous-entend qu'il peut y avoir de l'amplification non spécifique ou encore des contaminations croisées lors de la préparation de la banque et l'apparition de mutations dans le code-barre de l'adaptateur. En effet, cette amplification non spécifique est confirmée lors des étapes de nettoyage, lorsque

l'on sélectionne les séquences ayant la fin du LTR proviral (voir résultats chapitre 3-B.VIII.ii). Concernant SFV la première sélection sur le LTR en amont des 5 derniers nucléotides (5'-T/CGACA-3') induit une perte de plus de 64% et 73% de la totalité des séquences respectivement pour les échantillons mono- et co-infectés. Lors de la seconde sélection (sur les 5 derniers nucléotides), la perte est plus faible puisqu'elle est de 18% et de 23%. Concernant STLV-1, la perte de séquence est dans les 2 cas de 38%. Ces données montrent qu'il y a une amplification non spécifique non négligeable pour les 2 virus. Une analyse plus approfondie sur l'identification de ces sites est actuellement en cours. Après nettoyage et alignement des séquences contre le génome, le nombre de séquences restantes est de 20%, 15% et 24% respectivement pour SFV mono-, SFV co- et STLV-1 co-infectés.

## ii. *Validation de l'expérimentation*

Après nettoyage des données de séquençage, nous avons identifié les vrais sites d'intégrations proviraux et quantifié l'abondance clonale de chaque clone après la suppression des sites dupliqués entre échantillon, des séquences jumelles dans un échantillon donné et des faux sites issus d'une amplification non spécifique. Aucun faux site n'a été identifié dans le cas de SFV mais pour STLV-1, le nombre de sites issus d'une amplification non spécifique varie de 1 à 28% des sites entre les échantillons. En revanche, il n'y a pas de corrélation entre la PVL de STLV-

1 et le nombre de faux sites amplifiés. L'identification de ces sites est actuellement en cours.

Sur l'ensemble de nos échantillons de départ, nous avons pu identifier les UIS et quantifier l'abondance clonale pour 15 échantillons sur 17 de la cohorte mono-infectée par SFV, 15/19 pour SFV chez les babouins co-infectés et 19/19 pour STLV-1 ce qui n'est pas surprenant car les PVL étaient faibles. Dans le cas des 2 babouins uniquement infectés par SFV qui n'ont donnés aucun résultat, presque la totalité des séquences est perdue lors de la double sélection sur le LTR ce qui indique qu'il y avait uniquement une amplification non spécifique pour ces 2 échantillons. Au sein de la cohorte co-infectée (pour SFV), les séquences ont été perdues lors de la double sélection sur le LTR mais aussi lorsque l'on a supprimé les sites dupliqués entre échantillon indiquant qu'ils étaient constitués de séquences issues d'une amplification non spécifique et de contaminations croisées (mutation du code-barre). Afin de vérifier si notre expérimentation fonctionne correctement, nous disposons de 2 contrôles que nous devons valider. Tout d'abord, l'utilisation de l'ADN de Jurkat (cellules non infectées) afin de déterminer si les sites que nous identifions sont bien spécifiques de nos virus. Après nettoyage des données, les sites amplifiés dans l'ADN de Jurkat par les amorces de SFV ont totalement été supprimés et pour STLV-1, seulement très peu de séquences sont encore présentes (49/240000) ce qui n'est pas inattendu au vu des possibles contaminations croisées.

Nous avons ensuite comparé les sites d'intégration de STLV-1 du babouin ATL identifiés dans l'étude de Turpin et al avec ceux de notre étude (Turpin et al., 2017). Nous avons globalement pu retrouver le même profil d'intégration bien qu'il y ait quelques différences puisque la technique de LM-PCR utilisée ainsi que l'analyse bio-informatique sont différents. Ces données suggèrent que nous pouvons être confiant dans l'analyse des résultats obtenus pour nos échantillons. **Les annexes 3 et 4** montrent le nombre de clones, de cellules infectées, l'OCI et les profils de clonalité de SFV et STLV-1 obtenus pour tous nos échantillons. Pour chaque graphique circulaire, nous avons précisé le nombre total de clones et de cellules infectées (l'ensemble des cellules sœurs de tous les clones) détectés ainsi que l'index d'oligoclonalité (OCI). A noter que les couleurs identiques entre tous les graphiques ne représentent pas des sites spécifiques partagés entre les échantillons. Il est possible de voir que sur chaque graphique, au moins un clone est majoritairement représenté pour chaque échantillon.

iii. *Prolifération clonale du virus SFV dans le sang des babouins mono-infectés*

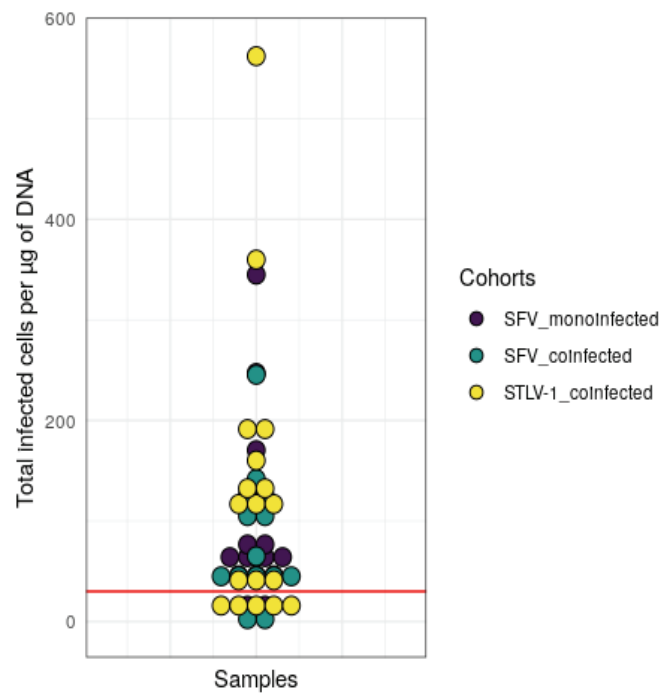
Au vu des valeurs de l'OCI pour la cohorte mono-infectée par SFV, qui varie de 0,4 à 0,7 (**annexes 3 et 4A**), nous pouvons conclure sur les profils oligoclonaux du virus SFV pour chaque échantillon. Cela indique que certains clones se répliquent de façon plus importante par expansion clonale par rapport à d'autres clones. Ces

clones majoritaires sont observés dans tous les échantillons et l'abondance clonale varie d'un échantillon à l'autre. De plus, l'analyse approfondie des sites d'intégration (actuellement en cours) au sein des clones majoritaires par rapport à ceux plus minoritaires permettra de fournir des informations pour comprendre pourquoi certains clones sont majoritairement représentés.

Ainsi, nous pouvons pour la première fois conclure que le virus SFV est capable de promouvoir l'expansion clonale des cellules *in vivo* dans le sang des animaux naturellement infectés par le virus.

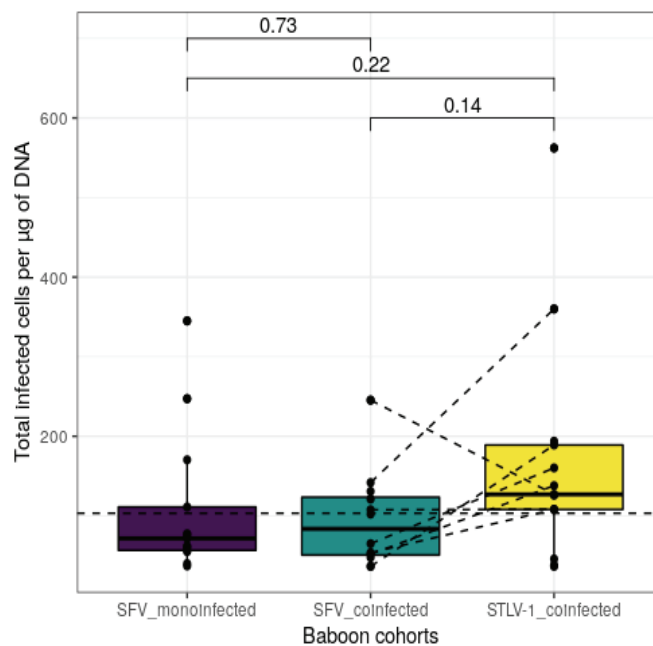
#### iv. *Influence de STLV-1 sur la réplication de SFV*

De la même façon, l'expansion clonale des cellules infectées est aussi observée pour SFV et STLV-1 dans la cohorte co-infectée (**annexes 3, 4B et 4C**). La charge provirale de SFV dans le sang des singes mono-infectés est trop faible pour être quantifiable par qPCR. De même pour les babouins co-infectés, la PVL n'a été obtenue que chez 12 échantillons sur 18 donc nous ne possédons pas toutes les valeurs de PVL du sang pour SFV et il nous est pour le moment impossible de savoir si l'OCI de SFV chez les singes mono et/ou co-infectés est corrélée à la PVL de SFV. En revanche, nous avons pu obtenir la PVL de STLV-1 pour tous les échantillons de sang et nous pourrions tester son impact sur la prolifération de SFV. Les données de PVL utilisées correspondent à celles de Alais et al mais une nouvelle mesure est actuellement réalisée pour SFV et STLV sur



**Figure 23. Représentation du nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 dans chaque échantillon.**

Ici, nous avons normalisé le nombre total de cellules infectées dans 1µg d’ADN. Pour nos futures analyses, nous gardons uniquement les échantillons ayant plus de 30 cellules infectées (seuil = barre en rouge).



**Figure 24. Nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 pour chaque échantillon dans les différentes cohortes de babouins**

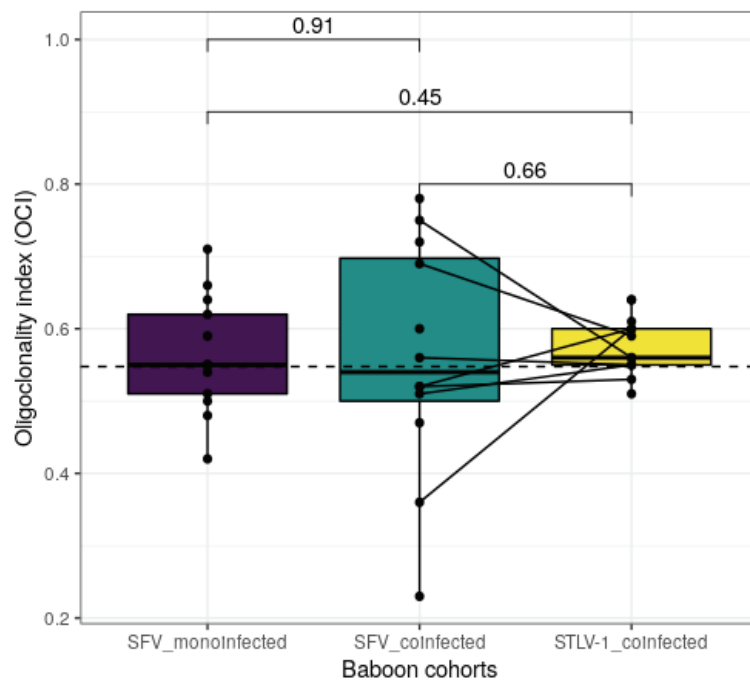
Légère augmentation du nombre de cellules infectées par SFV en présence de STLV-1 par rapport aux babouins mono-infectés bien que les résultats ne soient pas significatifs ( $P > 0,05$ , test de Mann-Whitney). La barre en pointillé représente la moyenne de la totalité des cellules infectées.

l'ensemble des échantillons et sur la même extraction d'ADN que la LM-PCR afin de limiter l'impact de la variabilité de la PVL. Afin de limiter les biais dans le calcul de l'OCI, seuls les échantillons avec plus de 30 cellules infectées (**figure 23**) seront intégrés dans l'étude. De la même façon, les données provenant du babouin ATL (Turpin et al., 2017) ne seront pas utilisées dans nos analyses afin d'éviter d'introduire un biais par la charge provirale très élevée de STLV-1 et SFV (**annexe 3**).

- Influence de STLV-1 sur le nombre de cellules infectées par SFV

Dans l'étude d'Alais et al (voir résultats chapitre 1), nous avons montré que la PVL de SFV augmente en présence de STLV-1 chez les babouins naturellement co-infectés par les 2 virus par rapport à ceux uniquement infectés par SFV (Alais et al., 2018). Nous avons donc voulu voir si le nombre cellules infectées que nous avons quantifié par LM-PCR est supérieur pour SFV chez les singes co-infectés. Le **figure 24** représente le nombre total de cellules infectées par SFV ou STLV-1 pour chaque échantillon dans les différentes cohortes. Bien que les données ne soient pas significatives, la médiane des échantillons SFV co-infectés est supérieure à celle des SFV mono-infectés ce qui est en accord avec nos résultats sur la PVL. De plus, le nombre de cellules infectées par STLV-1 est supérieur à SFV ce qui pourrait suggérer qu'une augmentation de la PVL de STLV-1 pourrait médier l'augmentation du nombre de cellules infectées par SFV. Le fait que l'on ne trouve pas de résultats significatifs, à l'inverse de nos observations sur la PVL, peut





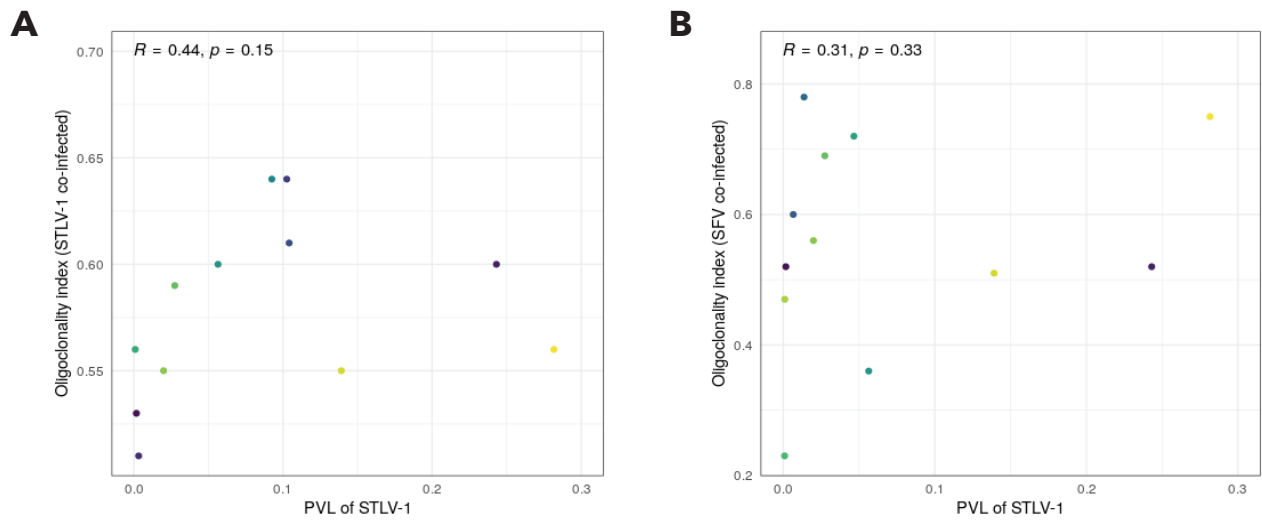
**Figure 25. Représentation de l'index d'oligoclonalité (OCI) de SFV et STLV-1 pour chaque échantillon dans les différentes cohortes de babouins.**

L'OCI n'est significativement pas différente entre les virus ( $P > 0,05$ , test de Mann-Whitney). La barre en pointillé représente la moyenne de l'OCI sur la totalité des échantillons.

s'expliquer par le fait que la qPCR permet de quantifier l'ADN génomique viral qu'il soit intégré ou non dans le génome cellulaire. Dans le cas de la LM-PCR, nous amplifions aussi les formes non-intégrées mais elles sont supprimées lors du nettoyage des séquences, notamment lors de l'alignement sur le génome du babouin. Afin d'évaluer la proportion des formes non-intégrées, il faudrait par exemple modifier nos paramètres d'alignement.

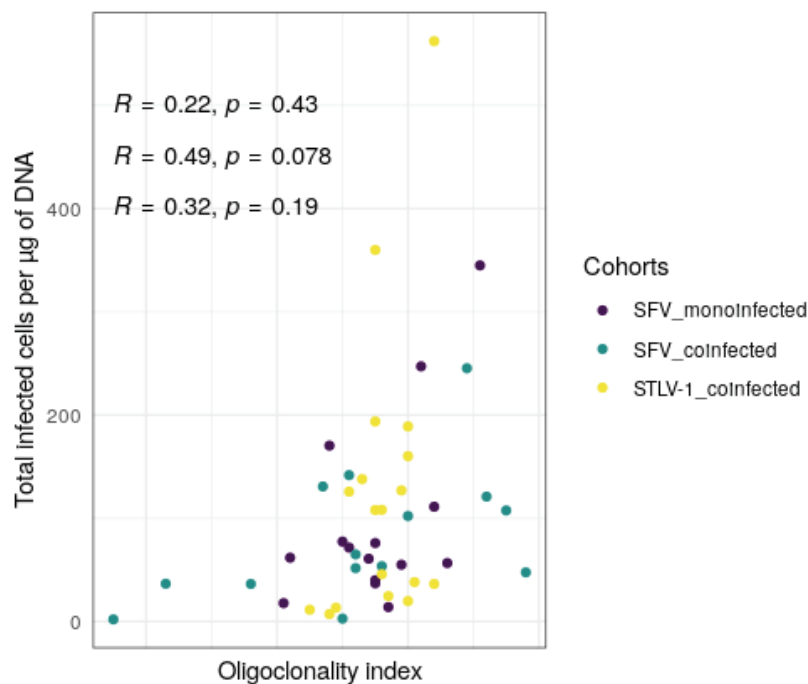
- Influence de STLV-1 sur la prolifération clonale des cellules infectées par SFV

Nous avons par la suite voulu tester si l'OCI de SFV augmente dans les échantillons co-infectés par rapport aux mono-infectés afin de vérifier s'il y a plus d'expansion clonale (notamment une augmentation vers un stade monoclonal) des cellules infectées par SFV en présence de STLV-1 (**figure 25**). Ici, nous n'observons pas d'augmentation de l'OCI de SFV et, de plus, il n'y a pas de différence significative de l'OCI entre les 2 virus au sein des différentes cohortes même si l'amplitude des échantillons SFV co-infectés est plus importante. En revanche, cela renforce la conclusion que SFV est capable de promouvoir l'expansion clonale des cellules infectées. Au sein de la cohorte co-infectée, les échantillons de SFV ayant un OCI élevé rappellent les observations décrites dans le cas d'HTLV-2 (Melamed et al., 2014), ce qui laisse suggérer que SFV n'est pas reconnu efficacement par la réponse CTL, à l'inverse d'HTLV-1, ou que la prolifération clonale est médiée par



**Figure 26. Représentation de l'index d'oligoclonalité (OCI) de SFV et STLV-1 en fonction de la charge provirale (PVL) de STLV-1 chez les babouins co-infectés.**

Il n'y a pas de lien entre le nombre de cellules infectées par STLV-1 **(A)** ou SFV **(B)** quand la PVL de STLV-1 augmente ( $P > 0,05$ , test de Spearman).



**Figure 27. Représentation du nombre total de cellules infectées par SFV et STLV-1 en fonction de l'index d'oligoclonalité.**

Nous n'observons pas de corrélations significatives entre le nombre de cellules infectées par SFV et STLV-1 dans chaque cohorte et l'OCI ( $P > 0,05$ , test de Spearman), bien que le coefficient de corrélation suggère une augmentation des cellules infectées avec l'OCI pour les échantillons SFV-co ( $R=0,49$ ).

un autre mécanisme comme la reconnaissance d'un antigène. Les échantillons SFV ayant un OCI très bas avec une prolifération clonale importante, comme par exemple l'échantillon 25 (**annexe 4B**), laissent suggérer qu'il pourrait y avoir plusieurs intégrations dans une même cellule. Afin de vérifier que l'expansion clonale des cellules infectées par SFV peut être médiée par STLV-1, nous avons regardé si l'OCI des 2 virus augmente en fonction de la PVL de STLV-1 (**figure 26**). Nous n'observons pas de lien significatif entre la prolifération clonale des cellules infectées par STLV-1 (figure 26A) et SFV (figure 26B) quand la charge provirale de STLV-1 augmente. Cette observation n'est pas inattendue puisque l'on sait que, dans le cas d'HTLV-1, une telle corrélation a été démontré uniquement chez des patients ATL (Gillet et al., 2011). De plus, si on regarde les profils de clonalité obtenu chez le babouin ATL, il est possible de voir que l'OCI et le nombre de cellules infectées par SFV et STLV-1 sont plus élevés que dans nos échantillons de singes asymptomatiques (OCI = 0,83 pour 895 (SFV) et 2249 (STLV-1) cellules infectées dans 1µg d'ADN, **annexe 3 et 4D**) avec 2 clones majoritaires. Cela suggère que dans le cas d'une ATL, STLV-1 semble favoriser l'expansion clonale des cellules infectées par SFV. Dans le cas de nos échantillons provenant des singes asymptomatiques, le coefficient de corrélation de Spearman ( $R=0,49$ ) suggère que le nombre de cellules infectées par SFV tend à augmenter quand l'OCI augmente dans la cohorte co-infectée, bien que les résultats ne soient pas significatifs (**figure 27**). Nous pouvons aussi observer que les échantillons avec un nombre élevé de cellules infectés sont associés à un OCI élevé ce qui renforce

l'idée de prolifération clonale. En présence de STLV-1, le nombre de cellules infectées par SFV augmente mais nous n'observons pas d'influence sur la prolifération clonale ce qui suggère que l'augmentation de la PVL de SFV pourrait être médiée par d'autres mécanismes. De plus, l'expansion clonale induite par SFV pourrait être amplifiée par la reconnaissance d'un antigène par la cellule. Dans le but de conclure sur l'influence de STLV-1 sur SFV chez les babouins co-infectés, l'analyse plus approfondie des sites d'intégrations proviraux est actuellement en cours.

## D. Discussion

Dans le cadre de l'étude de mon travail de thèse, le LTR 5' proviral de SFV et STLV-1 a pu être amplifié et séquencé à partir d'échantillons de PBMC provenant de 2 cohortes de babouins naturellement infectés par SFV ou co-infectés par SFV et STLV-1. Ces données nous ont permis de mettre au point différents jeux d'amorces dans le but d'amplifier les sites d'intégrations proviraux de SFV (SFV\_Bio3A et SFV\_Seq\_Bio5A) et STLV-1 (STLV-1\_Bio3A et STLV-1\_Seq\_Bio5) par LM-PCR. L'alignement multiple des séquences montre une homologie élevée du LTR 5' de SFV et STLV-1 (89% et 94% respectivement). Cette conservation peut s'expliquer par la faible activité de réplication des virus illustrée par une charge provirale très faible dans le sang des animaux (Alais et al., 2018). Comme HTLV-1, le virus STLV-1 est capable de promouvoir l'expansion clonale des cellules

infectées (Turpin et al., 2017) même si la diversité clonale observés est principalement due à une propagation *de novo* lors de l'infection initiale (Laydon et al., 2020). L'expansion clonale implique une conservation importante du génome proviral à l'inverse du VIH-1 et SIV qui se répliquent activement et ont une variabilité génomique plus élevée. Dans le cas du virus SFV, nous avons démontré que ce dernier peut engendrer l'expansion clonale des cellules infectées au sein des cohortes de babouins mono- et co-infectées ce qui peut expliquer la conservation du génome proviral. En revanche, la présence de mutations spécifiques au sein du LTR de SFV chez un ou plusieurs individus indique que différentes souches circulent au sein des 2 cohortes de babouins ce qui induit des surinfections et implique qu'il peut y avoir des co-transmissions de différentes souches virales et même de différents virus chez un hôte. En effet, l'étude de Mouinga-Ondémé et al a notamment montré la circulation de 2 souches de virus SFV au sein de 2 cohortes de mandrills en captivité au Gabon (Mouinga-Ondémé et al., 2010). Concernant nos cohortes de babouins, 2 variants de séquences, intéressants pour notre étude, ont été observées à la fin du LTR du virus SFV (5'-TGACA-3' et 5'-CGACA-3') et une séquence unique pour STLV-1 (5'-ACACA-3'). Ces courtes séquences sont importantes et sont spécifiques d'un virus donné puisque c'est le site où va se fixer l'intégrase virale permettant d'initier l'étape d'intégration du provirus. Lors de notre étude, ces séquences ont aussi de l'importance puisqu'elles nous permettent de distinguer les vrais sites d'intégrations proviraux de ceux non spécifiques. En effet, le nettoyage des

données obtenues après séquençage à haut-débit a permis de voir qu'une proportion non négligeable de séquences, dans notre contexte expérimental, est issue d'une amplification non spécifique des sites puisque plus de 60% ne possède pas le LTR de SFV et 38% pour STLV-1. Cela indique que des sites au sein du génome cellulaire des babouins ont une homologie de séquence avec nos amorces. Ici, nous avons pu démontrer que le nombre total de cellules infectées par SFV est supérieur dans la cohorte co-infectée par rapport aux babouins mono-infectés ce qui est en accord avec nos résultats de l'influence positive de STLV-1 sur la PVL de SFV (voir résultats chapitre 1). En revanche, nos résultats préliminaires ne montrent pas de lien significatif entre la prolifération clonale de SFV et l'augmentation de la PVL de STLV-1 dans le sang ou avec le nombre de cellules infectées, bien que ce dernier semble plus élevé pour les échantillons avec un OCI plus fort. Ces données suggèrent que STLV-1 peut influencer la réplication *de novo* du virus SFV tandis que la prolifération clonale induit par SFV pourrait être amplifiée par la reconnaissance d'un antigène par la cellule. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'influence de STLV-1 sur la prolifération clonale puisque l'on peut imaginer que tous les clones infectés par SFV puissent proliférer plus abondamment en présence de STLV-1 ce qui ne changerait pas la valeur de l'OCI. De plus, dans le cas d'une ATL, STLV-1 semble favoriser l'expansion clonale des cellules infectées par SFV. L'analyse des UIS de SFV et STLV-1 permettant d'obtenir l'annotation des régions génomiques dans lesquels les UIS sont insérés est en cours. De plus, nous avons à disposition des données

de transcriptomique (Tung et al., 2015) permettant de visualiser le niveau d'expression des gènes au sein des cellules du sang total. Nous sommes aussi en train d'analyser ces données afin de les associer aux sites d'intégration proviraux de SFV et STLV-1 pour déterminer si l'intégration peut se faire dans les régions exprimées afin de vérifier s'il existe une différence entre les singes mono-infectés par SFV et co-infectés par SFV et STLV-1. Nous pourrons ensuite regarder la proximité et la localisation de ces UIS par rapport aux gènes (en aval et en amont ainsi que la direction sens et anti-sens) pour avoir des premières informations sur l'influence potentielle de l'intégration provirale sur l'activité transcriptionnelle des gènes cellulaires et *vice-versa*.



# Chapitre 4. Visualisation de l'intégration provirale d'HTLV-1 par FISH *in vitro*

## A. Introduction

Puisque nous avons observé que le virus STLV-1 à une influence positive sur la propagation de SFV chez les babouins naturellement co-infectés (Alais et al., 2018), l'une de nos hypothèses était que l'augmentation de la charge provirale était médiée par STLV-1 dans le cas où une cellule unique peut-être co-infectée par les 2 virus.

Des études précédentes ont montré *in vitro*, par DNA-FISH (DNA-*Fluorescent In Situ Hybridization*), que le nombre d'intégration provirale dans le cas d'HTLV-1 est supérieur à un provirus par cellule et varie d'une lignée cellulaire à l'autre (Hashikura et al., 2016; Kobayashi et al., 1984; Meissner et al., 2017). Dans le cas des lignées chroniquement infectée par HTLV-1, comme par exemple les C91 PL et MT-2, le nombre d'intégration identifié est respectivement de 21 et 8 provirus par cellule. Ces études sont d'un intérêt majeur dans mon travail de thèse puisque, dans le but de vérifier si une cellule unique peut être co-infectée *in vivo*, il

est nécessaire de d'adapter le FISH *in vitro* car nous sommes limités en échantillons de cellules de babouins. Nous avons initié la mise au point d'une technique de DNA-FISH sur l'ADN proviral d'HTLV-1 *in vitro* dans les cellules C91 PL chroniquement infectée par le virus. Cette étape se fait en collaboration avec l'équipe dirigée par le Pr Patrick Lomonte à l'institut Neuromyogène de Lyon et Simon Roubille, doctorant au sein de cette équipe.

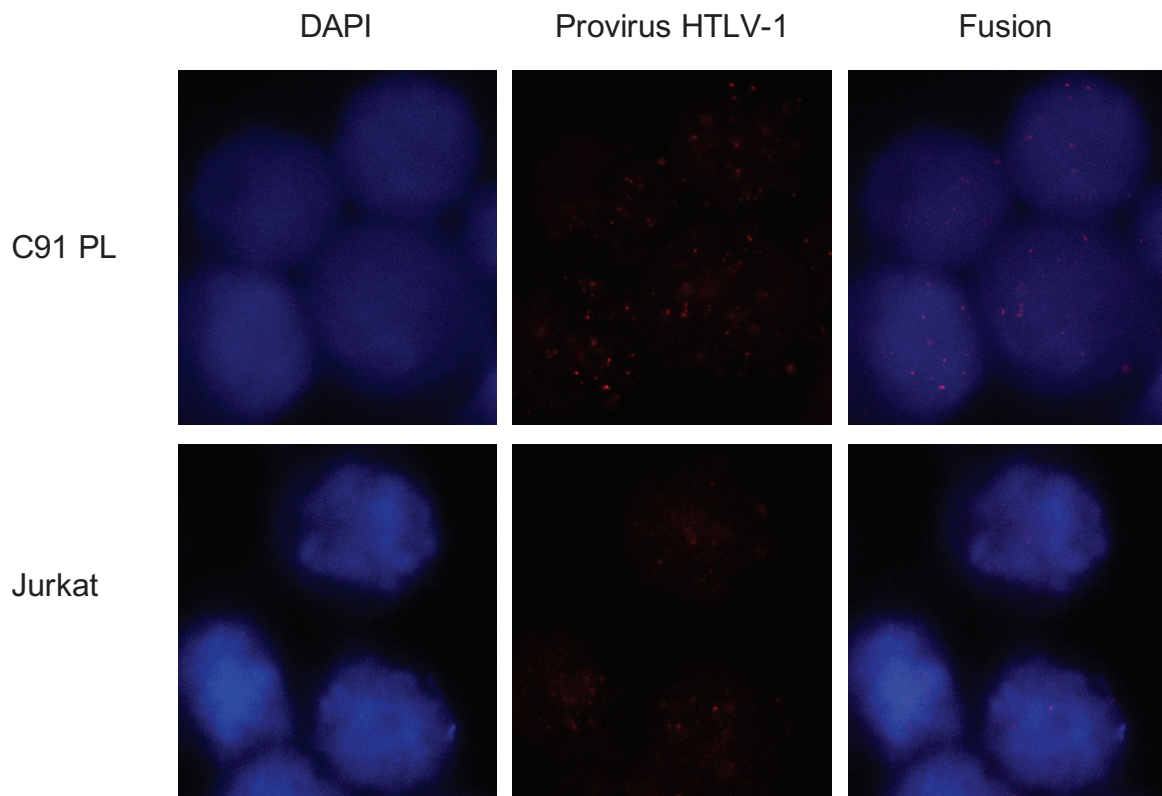
## B. Matériels et méthodes

### I. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire C91 PL a été utilisée pour la mise au point de la technique de FISH *in vitro*. Ces cellules sont des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1. Les cellules Jurkat sont utilisées en tant que témoin négatif pour les expérimentations *in vitro* puisque ces cellules ne sont pas infectées par un rétrovirus et n'ont donc aucune intégration provirale. Les cellules furent maintenues en culture en milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) avec 10% de SVF (Sérum de Veau Foetal) par Julien Beltramini, stagiaire au sein de l'équipe.

### II. Fixation et perméabilisation des cellules

Environ 500 000 cellules sont déposées en plaque 24 puits contenant des lamelles traitées à la poly-lysine (Sigma-P4832) puis sont fixées et perméabilisées



**Figure 28. Visualisation par DNA-FISH (DNA-Fluorescent *In Situ* Hybridization) des intégrations provirales d'HTLV-1 in vitro.**

La figure représente les sites d'intégration d'HTLV-1 (points de fluorescence rouge) dans les noyaux de la lignée cellulaire C91 PL, chroniquement infectée par HTLV-1. Nous pouvons voir la présence de multiples intégrations ce qui est en corrélation avec des observations provenant d'une étude précédente (Meissner et al., 2017). La lignée Jurkat est un contrôle négatif de nos expérimentations puisque les cellules ne sont pas infectées par le virus.

au méthanol (VWR-20847.307) à -20°C pendant 10 minutes. Cette étape a aussi été réalisée par Julien Beltramini.

### III. Marquage des sondes HTLV-1 et DNA-FISH

La technique de FISH permet de visualiser par fluorescence les sites d'intégration proviraux dans le noyau des cellules infectées. Ainsi, la préparation des sondes marquées est indispensable. Pour cela, 2 $\mu$ g de plasmide contenant le génome complet d'HTLV-1 est marqué à la cyanine 3 avec du Cy3-dCTP via un kit de translation de coupure (Roche) (Catez et al., 2014). La sonde est ensuite déposée sur les cellules pendant 2h à température ambiante (TA) puis 80°C pendant 5 minutes et 37°C toute la nuit. Cette étape va permettre de dénaturer l'ADN génomique cellulaire afin que les sondes puissent s'hybrider (Catez et al., 2014). Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au DAPI pendant 5 minutes à TA et les lames sont montées. L'acquisition se fait par microscopie confocale.

## C. Résultats

Après différents tests, nous avons pu obtenir les résultats préliminaires mais prometteurs sur la détection du provirus HTLV-1 par FISH *in vitro*. La **figure 28** représente la détection l'intégration provirale d'HTLV-1 au sein du noyau cellulaire (visualisé par le DAPI) des cellules C91 PL chroniquement infectées par le virus. Chaque point de fluorescence en rouge représente normalement une intégration provirale. À l'inverse de ce que l'on peut attendre *in vivo*, le nombre d'intégration

provirale *in vitro* est supérieur à un provirus par cellule et est variable selon la lignée cellulaire utilisé (Meissner et al., 2017). En effet, cette étude identifie 21 intégrations provirales d'HTLV-1 dans les cellules C91 PL. Ici, on observe aussi de multiples intégrations provirales mais le bruit de fond étant encore assez élevé, il sera nécessaire de faire des optimisations sur le protocole afin d'identifier le nombre de provirus d'HTLV-1 par cellule. En comparaison, nous observons quelques points de fluorescence dans le noyau des cellules Jurkat, bien que de façon minoritaire. Cela indique qu'il pourrait y avoir de l'hybridation non spécifique des sondes.

## D. Discussion

Notre équipe a démontré que la PVL de SFV augmente dans le sang des animaux co-infectés par SFV et STLV-1 par rapport à ceux uniquement infectés par SFV (Alais et al., 2018). De plus, nous avons montré *in vitro* que la protéine Tax d'HTLV-1 peut transactiver le LTR de virus PFV (cette même étude). L'une de nos hypothèses était que cette augmentation serait médiée par l'expansion clonale de STLV-1 dans le cas où une cellule unique est co-infectée par les 2 virus. J'ai ainsi mis en place une technique d'hybridation *in situ* (DNA-FISH) dans le but de vérifier *in vitro* si une cellule unique pouvait être co-infectée par PFV et HTLV-1. Nos résultats préliminaires sur l'adaptation de la technique sur HTLV-1 ont permis de montrer que de multiples intégrations provirales d'HTLV-1 sont présentes dans la

lignée cellulaire C91 PL, une lignée chroniquement infectée par le virus à l'instar d'une étude précédente (Meissner et al., 2017) observant un nombre variable d'intégration provirale en fonction de la lignée cellulaire infectée. Cependant, nos résultats indiquent que des optimisations sont encore nécessaires. Par la suite, nous souhaitons créer un clone moléculaire de SFV à partir du génome complet séquencé chez un babouin naturellement infecté (voir résultats chapitre 2). Cela nous permettrait de réaliser de nombreuses études *in vitro*, notamment de produire des particules virales et d'adapter la technique de FISH sur les provirus de SFV dans des lignées infectées. Ainsi, nous pourrions regarder *in vivo* si la co-infection d'une cellule unique est possible sur des cellules infectées provenant des babouins. Il sera tout d'abord préférable de faire les expérimentations sur notre échantillon contrôle correspondant au babouin ATL (Turpin et al., 2017) puisque les charges provirales dans nos échantillons sont très faibles. Au vu de la PVL élevée pour STLV-1 (>68% des cellules infectées) et SFV (30%) au sein du babouin ATL nous augmentons nos chances d'observer ces co-infections cellulaires.

# Discussion

L'Homme et les primates non-humains (PNH) peuvent être infectés par plusieurs rétrovirus exogènes T-lymphotropes : HTLV-1 (virus de la leucémie humaine de type 1) et STLV-1 (virus de la leucémie simienne de type 1), SFV (virus foamy simien), VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) et SIV (virus de l'immunodéficience simienne). De nombreux cas de co-infections ont déjà été décrits chez l'Homme (HTLV-1/VIH-1, HTLV-1/SFV, VIH-1/SFV) et les PNH (STLV-1/SIV-1, STLV-1/SFV, SIV-1/SFV) (Beilke et al., 2004; Durand et al., 1995; Goldberg et al., 2009; Harrison et al., 1997; Nerrienet et al., 1998; Oo et al., 2015; Souquière et al., 2014; Switzer et al., 2008, 2016; Traina-Dorge et al., 2007).

Le nombre de personnes co-infectés par le VIH-1 et HTLV-1 varie d'une étude à l'autre et peut aller de 0,11% chez des femmes enceintes en Guyane Française à 10,9% au sein d'une cohorte de patients au Brésil (Campos et al., 2020). La co-infection VIH-1 et HTLV-1 conduit à une augmentation significative de la PVL d'HTLV-1 ainsi qu'à un possible ralentissement de la progression de la pathologie induite par le VIH-1 (Beilke et al., 2004, 2007; Oo et al., 2015). De plus, un traitement ciblant le VIH-1 induit une augmentation de la PVL d'HTLV-1 chez des patients co-infectés. En revanche, la charge provirale semble diminuer chez des mandrills co-infectés par SIV et STLV-1 (Souquière et al., 2014). Ces résultats suggèrent fortement une compétition entre les 2 rétrovirus pour l'infection des cellules T CD4+ malgré que d'autres études montrent des résultats opposés (Beilke et al., 2005; Casoli et al., 2007; Casseb et al., 2007, 2008; Rahimi et al., 2014).



Des cas de co-infections naturelles par STLV-1 et SIV chez 2 espèces de PNH, le mangabey enfumé et l'AGM, sont à l'origine de tumeurs et lymphomes (Fultz et al., 1997; Traina-Dorge et al., 1992). De plus, l'article de Souquière et al a décrit l'apparition de pathologies (dermatite et gale) associées à une forte activation immunitaire et à la présence d'intégrations provirales de STLV-1 chez des mandrills co-infectés par STLV-1 et SIV (Souquière et al., 2014) alors qu'aucun signe clinique n'a été répertorié chez des mandrills uniquement infectés par STLV-1 (Souquière et al., 2009b). Ces observations laissent suggérer que ces co-infections jouent un rôle dans l'apparition de ces symptômes.

Dans le cas des co-infections rétrovirales avec le virus SFV chez l'Homme, l'absence de pathologie induite par SFV et le fait qu'aucune transmission inter-humaine n'ait été répertorié implique que la prévalence de SFV chez l'Homme est sous-estimée (voir introduction chapitre 3-B.II). Ainsi, très peu d'études se sont intéressées aux co-infections VIH-1/SFV et HTLV-1/SFV chez l'Homme. En effet, une co-infection par le VIH-1 et SFV a été identifiée chez une personne en République Démocratique du Congo (Switzer et al., 2008) mais les données en relation avec la pathogénèse éventuelle associée n'ont été obtenues que chez les PNH. De la même façon, seulement 2 personnes sur 1539 (0,13%) ont été co-infectées par ces 2 virus en Côte d'Ivoire (Switzer et al., 2016). Ainsi, des études ont montrés que les co-infections SFV et SIV sont plus importantes chez les PNH que chez l'Homme, notamment chez des cohortes de chimpanzés (21% d'individus infectés) et de colobes (23%) (Goldberg et al., 2009; Liu et al., 2008). Cette observation semble

logique puisque la prévalence du virus SFV est importante et peut varier de 75% à 100% chez les PNH adultes en captivité. Au sein d'une cohorte de macaque, la co-infection par le SIV et SFV est associée à une déplétion des lymphocytes T CD4+ ainsi qu'à une augmentation du nombre d'ARN viraux du SIV induisant un taux de mortalité plus élevé (Choudhary et al., 2013). De plus, une réplication active du virus SFV (présence d'ARN viraux) au sein des lymphocytes T CD4+ au niveau du jéjunum a été décrite chez des macaques co-infectés avec SIV (Murray et al., 2006). Dans le cas de la co-infection entre SFV et HTLV-1, 4,8% (13/269) d'un groupe de chasseurs d'origine Africaine (Afrique Centrale) était co-infecté par ces 2 rétrovirus (Filippone et al., 2015).

L'ensemble de ces données montrent que ces co-infections rétrovirales sont présentes chez l'Homme et les PNH et peuvent avoir une influence sur la pathogenèse au sein de l'hôte. Notre équipe a montré que, chez des babouins naturellement co-infectés, la présence de STLV-1 et SFV dans le sang influence positivement la dissémination du virus SFV *in vivo* puisque la charge provirale est supérieure à celle retrouvée chez des babouins uniquement infectés par SFV (Alais et al., 2018). De la même façon, nous avons montré par LM-PCR que le nombre de cellules infectées par SFV tend à être supérieur dans le sang des singes co-infectés. Cela implique que le risque de transmission de SFV par exposition au sang des singes co-infectés est plus élevé même si nous ne connaissons pas la proportion de génome proviral complet du virus dans les cellules infectées. En revanche, la PVL de SFV dans la salive n'est pas différente entre les 2 cohortes mais

est aussi élevée que dans le sang des singes co-infectés. Cela peut être expliqué par le fait que le virus puisse se répliquer de façon active dans les cellules épithéliales de la paroi buccale même si cela reste à déterminer dans le cas de nos échantillons (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013). Nous savons que les virus SFV et STLV-1 peuvent être transmis lors d'un transfert de fluides d'un hôte à un autre, notamment par morsure (voir introduction chapitre 3). De plus, nous avons identifié des mutations conservées dans le LTR proviral de SFV et STLV-1 qui suggère la présence de différentes souches pour une même espèce virale et que ces souches sont partagées parmi les animaux infectés. Cela laisse supposer, qu'au sein de nos 2 cohortes, les souches virales sont co-transmises entre les animaux. Ainsi, et bien que la PVL de STLV-1 soit faible dans nos échantillons de salive, nous pouvons suggérer qu'une co-transmission des 2 virus SFV et STLV-1 peut se produire.

La persistance de SFV dans les PBMC est considérée comme latente mais peut aussi être médiée par une prolifération clonale des cellules infectées ou une réplication active du virus (Falcone et al., 1999; Muniz et al., 2017; Murray et al., 2008; Soliven et al., 2013). Ici, et comme dans le cas d'HTLV-1 et STLV-1, nous avons pu montrer pour la première fois que SFV semble promouvoir l'expansion clonale des cellules infectées dans le sang des singes en l'absence et en présence de STLV-1. Bien que nos analyses de l'influence de STLV-1 sur SFV soient encore en cours, il est possible que la réplication du virus SFV soit aussi favorisée par la réplication passive des cellules ou encore par une stimulation antigénique en

réponse à un autre pathogène à un instant donné. Comme SFV infecte majoritairement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Rua et al., 2014), la réplication de certains clones peut être favorisée par la stimulation de la réponse CTL médiée par la présence de STLV-1. Ici, l'une de nos hypothèses était que STLV-1 pouvait médier l'augmentation de la PVL de SFV via la transactivation du LTR proviral de SFV par la protéine Tax soluble ou non de STLV-1. Une seconde hypothèse était que l'expansion clonale de la cellule médiée par STLV-1 favorise cette augmentation de la PVL dans le cas où cette cellule est co-infectée par les 2 provirus. Cependant, les 2 mécanismes ne sont pas exclusifs et il est possible de penser qu'au sein d'une même cellule co-infectée il y ait aussi des co-transactivations par la protéine Tax et Tas (l'équivalent de Tax pour SFV) sur les LTR proviraux ce qui pourrait induire une synergie de l'activité de réplication rétrovirale. De plus, des études ont montrés que la protéine Tas pouvait transactiver le LTR d'HTLV-1 et du VIH-1 (De Celis et al., 1994; Keller et al., 1992; Lee et al., 1992) et, de la même façon, nous avons montré que la protéine Tax peut activer le LTR de SFV de manière dose-dépendante (Alais et al., 2018). Dans ce contexte, il est possible d'imaginer un processus complexe et dynamique où la dissémination des rétrovirus par expansion clonale mais aussi par la production de particules virales (infection *de novo*) puissent se dérouler ensemble. Bien que nous ne sachions pas si une cellule unique peut être co-infectée par plusieurs rétrovirus, nos premiers résultats *in vitro* montre la présence d'intégrations provirales multiples d'HTLV-1 dans une lignée cellulaire chroniquement infectée par ce virus.

De plus, différentes études ont montré l'apparition d'intégrations multiples *in vitro* et *in vivo* pour HTLV-1/STLV-1 mais aussi pour SFV bien que la proportion de génome défectueux ne soit pas connue (Hashikura et al., 2016; Kobayashi et al., 1984; Manivannan et al., 2016; Meiering et al., 2000; Meissner et al., 2017; Turpin et al., 2017). L'étude d'Artesi et al a cependant montré la présence de 3 intégrations provirales d'HTLV-1 (génome complet) au sein d'un clone provenant d'un patient ATL (Artesi et al., 2019). Par ailleurs, dans l'étude de Turpin et al, la quantification de la PVL de STLV-1 dans les lymphocytes du babouin ATL varie de 68.34% à 113.87% ce qui signifie que, pour 100 cellules, il peut y avoir plus de 100 intégrations provirales (Turpin et al., 2017). Cela sous-entend que certaines cellules possèdent plusieurs intégrations provirales du même virus *in vivo*. Cependant, il existe des mécanismes cellulaires permettant de contrecarrer ces évènements de surinfection cellulaire (Nethe et al., 2005). Par exemple, dans le cas du virus foamy, une surexpression de la protéine d'enveloppe virale *in vitro* conduit à une diminution de la régulation des récepteurs cellulaires rendant ainsi la cellule résistante à l'entrée du virus (Moebes et al., 1997). De la même façon pour le VIH-1 et SIV, la protéine virale Nef participe à l'endocytose du récepteur CD4 des lymphocytes T ce qui rend les cellules résistantes à l'infection. En parallèle de Nef, les protéines virales de l'enveloppe et Vpu vont inhiber le transport intracellulaire des molécules CD4 néo-synthétisées (Lama, 2003; Oldridge and Marsh, 1998). Grâce au séquençage du génome complet de SFV chez le babouin, nous avons initié la mise au point d'un clone moléculaire du virus

SFV afin d'étudier la co-infection rétrovirale *in vitro*. Si une production des particules virales est possible, nous pourrions réaliser des infections cellulaires par un, deux ou trois virus avec des clones moléculaires d'HTLV-1 et du VIH-1 afin d'analyser et de comparer l'aspect dynamique des interactions qu'il peut y avoir entre les différents virus au cours du temps.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence de la co-infection de STLV-1 et SFV sur la clonalité rétrovirale. L'analyse des sites d'intégrations des provirus dans le sang des babouins est en cours et nous permettra de savoir s'il existe des zones préférentielles comme dans le cas du PFV, d'HTLV-1 et d'HTLV-2 ou encore des sites récurrents (cas du BLV, voir introduction chapitre 5-E.I). De plus, nous souhaitons comparer nos données avec celles obtenues pour STLV-1 afin d'émettre des hypothèses sur les mécanismes utilisés par SFV pour se propager. Bien que nous ayons démontré que ce dernier peut se répliquer par expansion clonale des cellules infectée dans le sang (chez les babouins mono- et co-infectés), comme mentionné plus haut, il est possible que la réplication active du virus soit aussi favorisée même à bas bruit. En revanche, nos résultats préliminaires suggèrent que STLV-1 pourrait influencer la réplication *de novo* du virus SFV. Son influence sur l'expansion clonale n'est en revanche pas à exclure et de nouvelles analyses sont nécessaires pour le vérifier. De plus, la prolifération clonale induite par SFV pourrait être amplifiée par la reconnaissance d'un antigène par la cellule à un temps donné mais aussi par STLV-1 dans le contexte d'une ATL. Les données provenant d'une analyse de transcriptomique sur

le génome du babouin obtenues par *RNA-sequencing* (Tung et al., 2015), nous permettrons de vérifier si les sites d'intégrations proviraux sont présents dans des régions plus ou moins exprimées du génome cellulaire. De la même façon, il serait intéressant de regarder l'expression du génome provirale de SFV et STLV-1 dans nos échantillons par RNA-seq et qPCR pour vérifier si le provirus est latent ou s'il est exprimé. Nous pourrions aussi regarder la contribution de chacune des souches de SFV (5'-TGACA-3' et 5'-CGACA-3') sur l'expansion clonale du virus.

Concernant la présence de SFV et STLV-1 dans le sang et la salive, le mécanisme qui permet le passage du virus de la salive vers le sang (ou l'inverse) est encore inconnu (voir introduction chapitre 4-D). De plus, les caractéristiques qui expliquent l'expansion clonale des cellules infectées par SFV dans le sang et l'infection *de novo* dans la salive ne sont pas encore connues. Une première approche serait d'utiliser nos données obtenues dans le sang des babouins uniquement infectés par SFV et de le comparer avec celles provenant de la salive chez ces mêmes animaux. Par la suite, et comme la salive est constituée de différentes populations cellulaires, notamment les cellules épithéliales et les lymphocytes (Theda et al., 2018), il serait intéressant de séparer ces populations à partir de nos échantillons afin de réaliser une analyse de la clonalité de SFV et STLV-1. Dans le cas de SFV, nous pourrions comparer les UIS proviraux dans les 2 populations cellulaires, les cellules épithéliales connues comme étant un site de répllication active du virus et les lymphocytes dont l'expansion clonale semble être favorisée par le virus (du moins dans le sang), bien qu'une répllication active soit

aussi possible. Ainsi, les sites identifiés dans chaque population nous donnerons des informations intéressantes sur le lien entre l'intégration provirale et la voie de propagation de SFV. Nous pourrions ainsi comparer les clones retrouvés dans les PBMC avec ceux des lymphocytes de la salive et vérifier si des clones sont identifiés dans les 2 compartiments (salive et sang) et si l'abondance d'un clone donné est corrélée ou non pour un animal donné. Dans le cas de STLV-1, nous pourrions comparer les UIS du sang et de la salive et déterminer pourquoi la charge provirale de STLV-1 dans la salive est très faible. Cependant, les quantités d'ADN cellulaire provenant de la salive des babouins sont trop faibles pour faire de telles analyses.

À plus long terme, et grâce à une collaboration avec les Drs Barthélémy Ngoubangoye et Augustin Mouinga-Ondémé au Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) au Gabon, nous avons à notre disposition des échantillons de sang et de salive provenant de mandrills (*Mandrillus sphinx*) naturellement et uniquement infectés par SFV, co-infectés par SFV/ STLV-1 ou SFV/SIV ou encore triplement infectés par les 3 rétrovirus. Le SIV se réplique majoritairement par infection *de novo* bien que certaines études ont montrés qu'il peut se propager par expansion clonale des cellules infectées chez des macaques infectés sous traitement ART (Ferris et al., 2019). À l'instar du VIH-1, une infection par le SIV aura pour conséquence d'induire une déplétion des lymphocytes T CD4+ et une évolution vers un stade apparenté au SIDA chez les macaques (hôtes non-naturels). En revanche, dans le cas des mandrills (hôtes



naturels), l'infection par le SIV reste asymptomatique malgré une réplication active du virus (Souquière et al., 2014). Il serait alors intéressant d'analyser la clonalité rétrovirale de SFV et STLV-1 dans le sang et la salive en présence et en absence du SIV dans les différentes cohortes. De plus, nous disposons d'échantillons prélevés à différents temps pour un animal donné ce qui nous permettrait de regarder l'évolution de la clonalité de SFV et STLV-1 au cours du temps. Dans le cadre d'un modèle évolutif, les données obtenues sur les mandrills permettront par la suite de mettre au point un modèle statistique de la dynamique de la clonalité rétrovirale en collaboration avec le Dr David Fouchet au laboratoire de biologie et biométrie évolutive à Lyon dirigé par le Pr Dominique Pontier. Cette étape est basée sur le modèle de capture-recapture (Fouchet et al., 2015) et a pour objectif de représenter une estimation de la fréquence de distribution des clones dans une population à un temps donné.

En conclusion, l'ensemble de mon travail de thèse, bien que non terminé, a permis de fournir des informations supplémentaires sur l'influence des co-infections rétrovirales par les virus SFV et STLV-1 sur leur dissémination et leur persistance mais aussi sur la transmission intra- ou inter-espèces. Nous avons montré pour la première fois que le virus SFV chez les babouins naturellement infectés est capable de se répliquer par expansion clonale des cellules infectées *in vivo* et que la présence de STLV-1 semble favoriser la réplication de SFV. Cependant, il reste à déterminer plus clairement si STLV-1 influence la production

de particules virales ou l'expansion clonale liée à SFV. Par la suite, il sera important de caractériser les sites d'intégrations dans la salive des babouins afin de comparer nos résultats obtenus sur les échantillons de sang pour expliquer d'une part, la réplication active de SFV dans la salive et à l'inverse, le fait que STLV-1 soit minoritairement présent puis, d'autre part, d'obtenir des informations supplémentaires sur le passage du virus du sang vers la salive (ou inversement). Les études *in vitro*, quant à elles, seront indispensables à l'analyse des interactions qu'il peut y avoir entre les différents rétrovirus dans les cellules infectées.

# **Bibliographie**

- Achong, B.G., Mansell, P.W., and Epstein, M.A. (1971a). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 103, P18.
- Achong, B.G., Mansell, P.W., Epstein, M.A., and Clifford, P. (1971b). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 46, 299-307.
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B.A., et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46, W537-W544.
- Afonso, P.V., Mekaouche, M., Mortreux, F., Toulza, F., Moriceau, A., Wattel, E., Gessain, A., Bangham, C.R.M., Dubreuil, G., Plumelle, Y., et al. (2010). Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* 116, 3802-3808.
- Afonso, P.V., Fagrouch, Z., Deijs, M., Niphuis, H., Bogers, W., Gessain, A., van der Hoek, L., and Verschoor, E.J. (2019). Absence of accessory genes in a divergent simian T-lymphotropic virus type 1 isolated from a bonnet macaque (*Macaca radiata*). *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007521.
- Aiewsakun, P., Richard, L., Gessain, A., Mouinga-Ondémé, A., Vicente Afonso, P., and Katzourakis, A. (2019). Modular nature of simian foamy virus genomes and their evolutionary history. *Virus Evolution* 5, vez032.
- Alais, S., Pasquier, A., Jegado, B., Journo, C., Rua, R., Gessain, A., Tobaly-Tapiero, J., Lacoste, R., Turpin, J., and Mahieux, R. (2018). STLV-1 co-infection is correlated with an increased SFV proviral load in the peripheral blood of SFV/STLV-1 naturally infected non-human primates. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006812.
- Allan, J.S., Leland, M., Broussard, S., Mone, J., and Hubbard, G. (2001). Simian T-cell lymphotropic Viruses (STLVs) and lymphomas in African nonhuman primates. *Cancer Invest.* 19, 383-395.
- Alves Dos Santos, E., and Fink, K. (2018). Animal Models for Dengue and Zika Vaccine Development. *Adv Exp Med Biol* 1062, 215-239.
- Anderson, E.M., and Maldarelli, F. (2018). The role of integration and clonal expansion in HIV infection: live long and prosper. *Retrovirology* 15, 71.
- Angelopoulou, K., Poutahidis, T., Brellou, G.D., Greenland, T., and Vlemmas, I. (2008). A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *The Veterinary Journal* 175, 346-355.
- Anupam, R., Doueiri, R., and Green, P.L. (2013). The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Front Microbiol* 4, 275.

- de Arellano, E.R., Alcamí, J., López, M., Soriano, V., and Holguín, A. (2010). Drastic decrease of transcription activity due to hypermutated long terminal repeat (LTR) region in different HIV-1 subtypes and recombinants. *Antiviral Res* 88, 152-159.
- Arnason, G. (2018). The ethical justification for the use of non-human primates in research: the Weatherall report revisited. *J Med Ethics* 44, 328-331.
- Artesi, M., Marçais, A., Durkin, K., Rosewick, N., Hahaut, V., Suarez, F., Trinquand, A., Lhermitte, L., Asnafi, V., Avettand-Fenoel, V., et al. (2017). Monitoring molecular response in adult T-cell leukemia by high-throughput sequencing analysis of HTLV-1 clonality. *Leukemia* 31, 2532-2535.
- Artesi, M., Hahaut, V., Ashrafi, F., Marçais, A., Hermine, O., Griebel, P., Arsic, N., van der Meer, F., Burny, A., Bron, D., et al. (2019). Pooled CRISPR Inverse PCR sequencing (PCIP-seq): simultaneous sequencing of retroviral insertion points and the associated provirus in thousands of cells with long reads (Genomics).
- Ayouba, A., Duval, L., Liégeois, F., Ngin, S., Ahuka-Mundeke, S., Switzer, W.M., Delaporte, E., Ariey, F., Peeters, M., and Nerrienet, E. (2013). Nonhuman primate retroviruses from Cambodia: High simian foamy virus prevalence, identification of divergent STLV-1 strains and no evidence of SIV infection. *Infection, Genetics and Evolution* 18, 325-334.
- Ayouba, A., Michem, A., Peeters, M., and Vercammen, F. (2017). Full-Genome Characterization of Simian T-Cell Leukemia Virus Type 1 Subtype b from a Wild-Born Captive Gorilla *gorilla gorilla* with T-Cell Lymphoma. *Genome Announc* 5.
- Bai, X.T., and Nicot, C. (2012). Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Front Microbiol* 3, 400.
- Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P.A., Hahn, B.H., and Sharp, P.M. (2003). Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300, 1713.
- Bangham, C.R.M., Meekings, K., Toulza, F., Nejmeddine, M., Majorovits, E., Asquith, B., and Taylor, G.P. (2009). The immune control of HTLV-1 infection: selection forces and dynamics. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 2889-2903.
- Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Seminars in Cancer Biology* 26, 89-98.
- Barbeau, B., Peloponese, J.-M., and Mesnard, J.-M. (2013). Functional

- comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. *Front Microbiol* 4, 226.
- 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.
  - Barros, S.C., Andr sd ttir, V., and Fevereiro, M. (2005). Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150, 201-213.
  - Basler, C.F. (2017). Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Semin Immunopathol* 39, 551-561.
  - Bauer, A.M., Ziani, W., Lindemuth, E., Kuri-Cervantes, L., Li, H., Lee, F.-H., Watkins, M., Ding, W., Xu, H., Veazey, R., et al. (2020). Novel Transmitted/Founder Simian-Human Immunodeficiency Viruses for Human Immunodeficiency Virus Latency and Cure Research. *J Virol* 94, e01659-19, /jvi/94/8/JVI.01659-19.atom.
  - Becker, W.B., Becker, M.L., Homma, T., Brede, H.D., and Kurth, R. (1985). Serum antibodies to human T-cell leukaemia virus type I in different ethnic groups and in non-human primates in South Africa. *S. Afr. Med. J.* 67, 445-449.
  - Beilke, M.A., Theall, K.P., O'Brien, M., Clayton, J.L., Benjamin, S.M., Winsor, E.L., and Kissinger, P.J. (2004). Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin. Infect. Dis.* 39, 256-263.
  - Beilke, M.A., Japa, S., Moeller-Hadi, C., and Martin-Schild, S. (2005). Tropical spastic paraparesis/human T leukemia virus type 1-associated myelopathy in HIV type 1-coinfecting patients. *Clin. Infect. Dis.* 41, e57-63.
  - Beilke, M.A., Traina-Dorge, V.L., Sirois, M., Bhuiyan, A., Murphy, E.L., Walls, J.M., Fagan, R., Winsor, E.L., and Kissinger, P.J. (2007). Relationship between human T lymphotropic virus (HTLV) type 1/2 viral burden and clinical and treatment parameters among patients with HIV type 1 and HTLV-1/2 coinfection. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1229-1234.
  - Benachenhou, F., Sperber, G., and Blomberg, J. (2009). LTRs; Universal structure, detection and phylogeny. *Retrovirology* 6, P15.
  - Berry, C.C., Gillet, N.A., Melamed, A., Gormley, N., Bangham, C.R.M., and Bushman, F.D. (2012). Estimating abundances of retroviral insertion sites from DNA fragment length data. *Bioinformatics* 28, 755-762.
  - Besson, G.J., Lalama, C.M., Bosch, R.J., Gandhi, R.T., Bedison, M.A., Aga, E., Riddler, S.A., McMahon, D.K., Hong, F., and Mellors, J.W. (2014). HIV-1 DNA decay dynamics in blood during more than a decade of suppressive

antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 59, 1312-1321.

- Betsem, E., Rua, R., Tortevoeye, P., Froment, A., and Gessain, A. (2011). Frequent and Recent Human Acquisition of Simian Foamy Viruses Through Apes' Bites in Central Africa. *PLoS Pathog* 7, e1002306.
- Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Douek, D.C., Bonhoeffer, S., Brenchley, J.M., Casazza, J.P., Koup, R.A., and Picker, L.J. (2001). Analysis of Total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Responses: Relationship to Viral Load in Untreated HIV Infection. *J. Virol.* 75, 11983-11991.
- Bieniasz, P.D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M.D., Chrystie, I., and McClure, M.O. (1995). A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* 207, 217-228.
- Blasse, A., Calvignac-Spencer, S., Merkel, K., Goffe, A.S., Boesch, C., Mundry, R., and Leendertz, F.H. (2013). Mother-Offspring Transmission and Age-Dependent Accumulation of Simian Foamy Virus in Wild Chimpanzees. *Journal of Virology* 87, 5193-5204.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., and Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1925-1930.
- Blewett, E.L., Black, D.H., Lerche, N.W., White, G., and Eberle, R. (2000). Simian foamy virus infections in a baboon breeding colony. *Virology* 278, 183-193.
- Bodem, J. (2011). Regulation of foamy viral transcription and RNA export. *Adv Virus Res* 81, 1-31.
- Boneva, R.S., Grindon, A.J., Orton, S.L., Switzer, W.M., Shanmugam, V., Hussain, A.I., Bhullar, V.B., Chamberland, M.E., Heneine, W., Folks, T.M., et al. (2002). Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* 42, 886-891.
- Botha, M.C., Jones, M., de Klerk, W.A., and Yamamoto, N. (1985). Spread and distribution of human T-cell leukaemia virus type I-reactive antibody among baboons and monkeys in the northern and eastern Transvaal. *S. Afr. Med. J.* 67, 665-668.
- Boxus, M., and Willems, L. (2009). Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *Br J Cancer* 101, 1497-1501.
- Brianti, P., De Flammoneis, E., and Mercuri, S.R. (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol* 40, 80-85.
- Broussard, S.R., Comuzzie, A.G., Leighton, K.L., Leland, M.M., Whitehead, E.M., and Allan, J.S. (1997). Characterization of new simian foamy viruses from African nonhuman primates. *Virology* 237, 349-359.

- Brown, P.O., Bowerman, B., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1987). Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49, 347-356.
- Bruner, K.M., Murray, A.J., Pollack, R.A., Soliman, M.G., Laskey, S.B., Capoferri, A.A., Lai, J., Strain, M.C., Lada, S.M., Hoh, R., et al. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22, 1043-1049.
- Brussel, A., and Sonigo, P. (2004). Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol* 78, 11263-11271.
- Bui, J.K., Sobolewski, M.D., Keele, B.F., Spindler, J., Musick, A., Wiegand, A., Luke, B.T., Shao, W., Hughes, S.H., Coffin, J.M., et al. (2017). Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog* 13, e1006283.
- 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.
- Burm, R., Collignon, L., Mesalam, A.A., and Meuleman, P. (2018). Animal Models to Study Hepatitis C Virus Infection. *Front Immunol* 9, 1032.
- Buseyne, F. (2019). Les rétrovirus foamy zoonotiques : une première étude médicale chez les personnes infectées. *Med Sci (Paris)* 35, 298-301.
- Cacho, A., Smirnova, E., Huzurbazar, S., and Cui, X. (2016). A Comparison of Base-calling Algorithms for Illumina Sequencing Technology. *Brief Bioinform* 17, 786-795.
- Calattini, S., Nerrienet, E., Mauclère, P., Georges-Courbot, M.-C., Saïb, A., and Gessain, A. (2004). Natural simian foamy virus infection in wild-caught gorillas, mandrills and drills from Cameroon and Gabon. *J Gen Virol* 85, 3313-3317.
- Calattini, S., Nerrienet, E., Mauclère, P., Georges-Courbot, M.-C., Saib, A., and Gessain, A. (2006a). Detection and molecular characterization of foamy viruses in Central African chimpanzees of the *Pan troglodytes troglodytes* and *Pan troglodytes vellerosus* subspecies. *J Med Primatol* 35, 59-66.
- Calattini, S., Wanert, F., Thierry, B., Schmitt, C., Bassot, S., Saib, A., Herrenschildt, N., and Gessain, A. (2006b). Modes of transmission and genetic diversity of foamy viruses in a *Macaca tonkeana* colony. *Retrovirology* 3, 23.
- Calattini, S., Betsem, E.B.A., Froment, A., Mauclère, P., Tortevoeye, P., Schmitt, C., Njouom, R., Saib, A., and Gessain, A. (2007). Simian foamy virus transmission from apes to humans, rural Cameroon. *Emerg Infect Dis* 13, 1314-1320.
- Calvignac, S., Terme, J.-M., Hensley, S.M., Jalinet, P., Greenwood, A.D., and



Hänni, C. (2008). Ancient DNA identification of early 20th century simian T-cell leukemia virus type 1. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1093-1098.

- Campbell, J.H., Rataj, E.-M., Autissier, P., Nolan, D.J., Tse, S., Miller, A.D., González, R.G., Salemi, M., Burdo, T.H., and Williams, K.C. (2014). Anti- $\alpha$ 4 antibody treatment blocks virus traffic to the brain and gut early, and stabilizes CNS injury late in infection. *PLoS Pathog* 10, e1004533.
- Campos, K.R., Alves, F.A., Lemos, M.F., Moreira, R.C., Marcusso, R.M.N., and Caterino-de-Araujo, A. (2020). The reasons to include the serology of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in the clinical follow-up of patients with viral hepatitis B and C in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 14, e0008245.
- Casoli, C., Pilotti, E., and Bertazzoni, U. (2007). Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev* 9, 140-149.
- Casseb, J., Posada-Vergara, M.P., Montanheiro, P., Fukumori, L.M.I., Olah, I., Smid, J., Duarte, A.J. da S., and Penalva de Oliveira, A.C. (2007). T CD4+ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 231-233.
- Casseb, J., de Oliveira, A.C.P., Vergara, M.P.P., Montanheiro, P., Bonasser, F., Meilman Ferreira, C., Smid, J., and Duarte, A.J. da S. (2008). Presence of tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy (TSP/HAM)-like among HIV-1-infected patients. *J. Med. Virol.* 80, 392-398.
- Castro, I., Giret, T.M., Magnani, D.M., Maxwell, H.S., Umland, O., Perry, J.K., Pecotte, J.K., Brasky, K.M., Barber, G.N., Desrosiers, R.C., et al. (2016). Cellular Immune Responses against Simian T-Lymphotropic Virus Type 1 Target Tax in Infected Baboons. *J. Virol.* 90, 5280-5291.
- Catez, F., Rousseau, A., Labetoulle, M., and Lomonte, P. (2014). Detection of the genome and transcripts of a persistent DNA virus in neuronal tissues by fluorescent in situ hybridization combined with immunostaining. *J Vis Exp* e51091.
- Chavan, S.J., Tamma, S.L., Kaplan, M., Gersten, M., and Pahwa, S.G. (1999). Reduction in T Cell Apoptosis in Patients with HIV Disease Following Antiretroviral Therapy. *Clinical Immunology* 93, 24-33.
- Chen, I.S., Quan, S.G., and Golde, D.W. (1983). Human T-cell leukemia virus type II transforms normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80,

7006-7009.

- Choudhary, A., Galvin, T.A., Williams, D.K., Beren, J., Bryant, M.A., and Khan, A.S. (2013). Influence of naturally occurring simian foamy viruses (SFVs) on SIV disease progression in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model. *Viruses* 5, 1414-1430.
- Choy, E.Y.-W., Siu, K.-L., Kok, K.-H., Lung, R.W.-M., Tsang, C.M., To, K.-F., Kwong, D.L.-W., Tsao, S.W., and Jin, D.-Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205, 2551-2560.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8869-8873.
- Cimarelli, A., Duclos, C.A., Gessain, A., Casoli, C., and Bertazzoni, U. (1996). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. *Virology* 223, 362-364.
- Clerc, I., Polakowski, N., André-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Lemasson, I. (2008). An Interaction between the Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Basic Leucine Zipper Factor (HBZ) and the KIX Domain of p300/CBP Contributes to the Down-regulation of Tax-dependent Viral Transcription by HBZ. *J. Biol. Chem.* 283, 23903-23913.
- Cook, L.B., Rowan, A.G., Melamed, A., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2012). HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* 120, 3488-3490.
- Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., and Bangham, C.R.M. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 123, 3925-3931.
- Cosnefroy, O., Murray, P.J., and Bishop, K.N. (2016). HIV-1 capsid uncoating initiates after the first strand transfer of reverse transcription. *Retrovirology* 13, 58.
- Courgnaud, V., Van Dooren, S., Liegeois, F., Pourrut, X., Abela, B., Loul, S., Mpoudi-Ngole, E., Vandamme, A., Delaporte, E., and Peeters, M. (2004). Simian T-cell leukemia virus (STLV) infection in wild primate populations in Cameroon: evidence for dual STLV type 1 and type 3 infection in agile mangabeys (*Cercocebus agilis*). *J. Virol.* 78, 4700-4709.
- Coursaget, P., Barres, J.L., Yvonnet, B., Chiron, J.P., Cornet, M., Ferrara, L., and Eyraud, M. (1985). Antibodies to human T-cell leukemia virus (HTLV-1) in non human primates from Senegal. *Biomed. Pharmacother.* 39, 198-199.
- Crooks, A.M., Bateson, R., Cope, A.B., Dahl, N.P., Griggs, M.K., Kuruc, J.D.,

Gay, C.L., Eron, J.J., Margolis, D.M., Bosch, R.J., et al. (2015). Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis* 212, 1361-1365.

- Cumont, M.-C., Diop, O., Vaslin, B., Elbim, C., Viollet, L., Monceaux, V., Lay, S., Silvestri, G., Le Grand, R., Müller-Trutwin, M., et al. (2008). Early Divergence in Lymphoid Tissue Apoptosis between Pathogenic and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections of Nonhuman Primates. *JVI* 82, 1175-1184.
- Daniel, M.D., Letvin, N.L., Sehgal, P.K., Schmidt, D.K., Silva, D.P., Solomon, K.R., Hodi, F.S., Ringler, D.J., Hunt, R.D., and King, N.W. (1988). Prevalence of antibodies to 3 retroviruses in a captive colony of macaque monkeys. *Int. J. Cancer* 41, 601-608.
- Datta, A., Bellon, M., Sinha-Datta, U., Bazarbachi, A., Lepelletier, Y., Canioni, D., Waldmann, T.A., Hermine, O., and Nicot, C. (2006). Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence. *Blood* 108, 1021-1029.
- Davey, R.T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.-W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., et al. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 15109-15114.
- De Celis, J., Tobaly-Tapiero, J., Hampe, A., and Emanoil-Ravier, R. (1994). Structure and function of the long terminal repeat of the chimpanzee foamy virus isolates (SFV-6). *Archives of Virology* 138, 345-355.
- De Celis-Kosmas, J., Coronel, A., Grigorian, I., Emanoil-Ravier, R., and Tobaly-Tapiero, J. (1997). Non-random deletions in human foamy virus long terminal repeat during viral infection. *Archives of Virology* 142, 1237-1246.
- Debacq, C., Héraud, J.-M., Asquith, B., Bangham, C., Merien, F., Moules, V., Mortreux, F., Wattel, E., Burny, A., Kettmann, R., et al. (2005). Reduced cell turnover in lymphocytic monkeys infected by human T-lymphotropic virus type 1. *Oncogene* 24, 7514-7523.
- Del Prete, G.Q., and Lifson, J.D. (2018). Nonhuman Primate Models for Studies of AIDS Virus Persistence During Suppressive Combination Antiretroviral Therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 417, 69-109.
- Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Pique, C., Pham, D., Callebaut, I., and Dokh elar, M.C. (1996). The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1, S85-91.
- Delelis, O., Petit, C., Leh, H., Mbemba, G., Mouscadet, F., and Sonigo, P.

- (2005). A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. 18.
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J.-F. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114.
  - Demeulemeester, J., De Rijck, J., Gijssbers, R., and Debyser, Z. (2015). Retroviral integration: Site matters: Mechanisms and consequences of retroviral integration site selection. *Bioessays* 37, 1202-1214.
  - Demontis, M.A., Hilburn, S., and Taylor, G.P. (2013). Human T cell lymphotropic virus type 1 viral load variability and long-term trends in asymptomatic carriers and in patients with human T cell lymphotropic virus type 1-related diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29, 359-364.
  - Demontis, M.A., Sadiq, M.T., Golz, S., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J Med Virol* 87, 2130-2134.
  - Deng, H.K., Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., and Littman, D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388, 296-300.
  - Derse, D., Hill, S.A., Lloyd, P.A., Chung Hk, null, and Morse, B.A. (2001). Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol* 75, 8461-8468.
  - Domingo, E., and Perales, C. (2018). Quasispecies and virus. *Eur Biophys J* 47, 443-457.
  - Donegan, E., Lee, H., Operskalski, E.A., Shaw, G.M., Kleinman, S.H., Busch, M.P., Stevens, C.E., Schiff, E.R., Nowicki, M.J., and Hollingsworth, C.G. (1994). Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion* 34, 478-483.
  - Dracopoli, N.C., Turner, T.R., Else, J.G., Jolly, C.J., Anthony, R., Gallo, R.C., and Saxinger, W.C. (1986). STLV-I antibodies in feral populations of East African vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Int. J. Cancer* 38, 523-529.
  - Dube, S., Saksena, N., Spicer, T., Healey, J., Benz, P., Dube, D.K., and Poiesz, B.J. (2013). Delayed seroconversion to STLV-1 infection is associated with mutations in the pol and rex genes. *Viol. J.* 10, 282.
  - Durand, J.P., Tuppin, P., Maison, P., Galat, G., Galat-Luong, A., Jeannel, D., and De Thé, G. (1995). Increased risk for a second retroviral infection (SIV or STLV type I) for wild African green monkeys already infected by one retrovirus in Senegal (West Africa). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 985-988.
  - Durkin, K., Rosewick, N., Artesi, M., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Burny,

A., Georges, M., and Van den Broeke, A. (2016). Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology* 13, 33.

- Dutartre, H., Clavière, M., Journo, C., and Mahieux, R. (2016). Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication. *J Virol* 90, 7607-7617.
- Duyk, G., Longiaru, M., Cobrinik, D., Kowal, R., deHaset, P., Skalka, A.M., and Leis, J. (1985). Circles with two tandem long terminal repeats are specifically cleaved by pol gene-associated endonuclease from avian sarcoma and leukosis viruses: nucleotide sequences required for site-specific cleavage. *J. Virol.* 56, 589-599.
- Einsiedel, L., Cassar, O., Bardy, P., Kearney, D., and Gessain, A. (2013). Variant human T-cell lymphotropic virus type 1c and adult T-cell leukemia, Australia. *Emerging Infect. Dis.* 19, 1639-1641.
- Elliott, S.T.C., Wetzel, K.S., Francella, N., Bryan, S., Romero, D.C., Riddick, N.E., Shaheen, F., Vanderford, T., Derdeyn, C.A., Silvestri, G., et al. (2015). Dualtropic CXCR6/CCR5 Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Sooty Mangabey Primary Lymphocytes: Distinct Coreceptor Use in Natural versus Pathogenic Hosts of SIV. *J. Virol.* 89, 9252-9261.
- Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in Tissue Cultures of Cytopathogenic Agents from Patients with Measles. *Experimental Biology and Medicine* 86, 277-286.
- Engel, G., Hungerford, L.L., Jones-Engel, L., Travis, D., Eberle, R., Fuentes, A., Grant, R., Kyes, R., and Schillaci, M. (2006). Risk assessment: A model for predicting cross-species transmission of simian foamy virus from macaques (*M. fascicularis*) to humans at a monkey temple in Bali, Indonesia. *Am J Primatol* 68, 934-948.
- Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J.M., Martin, M.A., and Craigie, R. (1995). Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* 69, 2729-2736.
- Enose-Akahata, Y., Caruso, B., Haner, B., Charlip, E., Nair, G., Massoud, R., Billioux, B.J., Ohayon, J., Switzer, W.M., and Jacobson, S. (2016). Development of neurologic diseases in a patient with primate T lymphotropic virus type 1 (PTLV-1). *Retrovirology* 13, 56.
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer,

- M., Neumann-Haefelin, D., and Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* 80 ( Pt 6), 1445-1452.
- Estaquier, J., Peeters, M., Bedjabaga, L., Honoré, C., Bussi, P., Dixon, A., and Delaporte, E. (1991). Prevalence and transmission of simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus in a semi-free-range breeding colony of mandrills in Gabon. *AIDS* 5, 1385-1386.
  - Estaquier, J., Rodrigues, V., Silvestre, R., Estaquier, R., Krust, B., and Laforge, M. (2013). Apoptose et Sida, une affaire d'intégration ? *Med Sci (Paris)* 29, 1094-1096.
  - Estes, J.D., Wong, S.W., and Brenchley, J.M. (2018). Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat Rev Immunol* 18, 390-404.
  - Etienne, L., Hahn, B.H., Sharp, P.M., Matsen, F.A., and Emerman, M. (2013). Gene Loss and Adaptation to Hominids Underlie the Ancient Origin of HIV-1. *Cell Host & Microbe* 14, 85-92.
  - Etoh, K., Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. (1997). Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 57, 4862-4867.
  - Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenröder, O., Spatz, W., Volk, B., Böhm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., et al. (1999). Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14.
  - Farmanbar, A., Firouzi, S., Makałowski, W., Iwanaga, M., Uchamaru, K., Utsunomiya, A., Watanabe, T., and Nakai, K. (2017). Inferring clonal structure in HTLV-1-infected individuals: towards bridging the gap between analysis and visualization. *Hum Genomics* 11, 15.
  - Faure, A., Calmels, C., Desjobert, C., Castroviejo, M., Caumont-Sarcos, A., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S., and Parissi, V. (2005). HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro. *Nucleic Acids Res* 33, 977-986.
  - Feeroz, M.M., Soliven, K., Small, C.T., Engel, G.A., Andreina Pacheco, M., Yee, J.L., Wang, X., Kamrul Hasan, M., Oh, G., Levine, K.L., et al. (2013). Population dynamics of rhesus macaques and associated foamy virus in Bangladesh. *Emerging Microbes & Infections* 2, 1-14.
  - Fennessey, C.M., Camus, C., Immonen, T.T., Reid, C., Maldarelli, F., Lifson, J.D., and Keele, B.F. (2019). Low-level alternative tRNA priming of reverse transcription of HIV-1 and SIV in vivo. *Retrovirology* 16, 11.
  - Ferris, A.L., Wells, D.W., Guo, S., Del Prete, G.Q., Swanstrom, A.E., Coffin, J.M., Wu, X., Lifson, J.D., and Hughes, S.H. (2019). Clonal expansion of SIV-

infected cells in macaques on antiretroviral therapy is similar to that of HIV-infected cells in humans. *PLoS Pathog* 15, e1007869.

- Filippone, C., Betsem, E., Tortevoeye, P., Cassar, O., Bassot, S., Froment, A., Fontanet, A., and Gessain, A. (2015). A Severe Bite From a Nonhuman Primate Is a Major Risk Factor for HTLV-1 Infection in Hunters From Central Africa. *Clin. Infect. Dis.* 60, 1667-1676.
- Filippone, C., de Oliveira, F., Betsem, E., Schaeffer, L., Fontanet, A., Lemée, V., Gessain, A., and Plantier, J.-C. (2017). Simian Immunodeficiency Virus seroreactivity in inhabitants from rural Cameroon frequently in contact with non-human primates. *Virology* 503, 76-82.
- Finkel, T.H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., and Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* 1, 129-134.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295-1300.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., et al. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5, 512-517.
- Fogarty, K.H., Chen, Y., Grigsby, I.F., Macdonald, P.J., Smith, E.M., Johnson, J.L., Rawson, J.M., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2011). Analysis of the HTLV-1 Gag assembly pathway by biophysical fluorescence. *Retrovirology* 8, A206.
- Fouchet, D., Verrier, D., Ngoubangoye, B., Souquière, S., Makuwa, M., Kazanji, M., Gonzalez, J.-P., and Pontier, D. (2012). Natural simian immunodeficiency virus transmission in mandrills: a family affair? *Proc. R. Soc. B.* 279, 3426-3435.
- Fouchet, D., Santin-Janin, H., Sauvage, F., Yoccoz, N.G., and Pontier, D. (2015). Data from: An R package for analyzing survival using continuous-time open capture-recapture models (Dryad).
- Fuentes, S.M., Bae, E.H., Nandakumar, S., Williams, D.K., and Khan, A.S. (2020). Genome Analysis and Replication Studies of the African Green Monkey Simian Foamy Virus Serotype 3 Strain FV2014. *Viruses* 12, 403.
- Fujiwara, S. (2018). Animal Models of Human Gammaherpesvirus Infections. *Adv Exp Med Biol* 1045, 413-436.

- Fujiwara, T., and Mizuuchi, K. (1988). Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* 54, 497-504.
- Fultz, P.N., Gordon, T.P., Anderson, D.C., and McClure, H.M. (1990). Prevalence of natural infection with simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus type I in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. *AIDS* 4, 619-625.
- Fultz, P.N., Su, L., May, P., and West, J.T. (1997). Isolation of sooty mangabey simian T-cell leukemia virus type I [STLV-I(sm)] and characterization of a mangabey T-cell line coinfecting with STLV-I(sm) and simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14. *Virology* 235, 271-285.
- Furukawa, Y., Fujisawa, J., Osame, M., Toita, M., Sonoda, S., Kubota, R., Ijichi, S., and Yoshida, M. (1992). Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* 80, 1012-1016.
- Furuta, R., Yasunaga, J.-I., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J.-I., Koh, K.-R., et al. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog.* 13, e1006722.
- Futsch, N., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2017). HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses* 10, 1.
- Gabet, A.-S., Gessain, A., and Wattel, E. (2003). High simian T-cell leukemia virus type 1 proviral loads combined with genetic stability as a result of cell-associated provirus replication in naturally infected, asymptomatic monkeys. *Int J Cancer* 107, 74-83.
- Gabet, A.-S., Moulés, V., Sibon, D., Nass, C.C., Mortreux, F., Mauclère, P., Gessain, A., Murphy, E.L., and Wattel, E. (2006). Endemic versus epidemic viral spreads display distinct patterns of HTLV-2b replication. *Virology* 345, 13-21.
- Gallo, R.C. (2005). History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5926-5930.
- Galvin, T.A., Ahmed, I.A., Shahabuddin, M., Bryan, T., and Khan, A.S. (2013). Identification of Recombination in the Envelope Gene of Simian Foamy Virus Serotype 2 Isolated from *Macaca cyclopis*. *Journal of Virology* 87, 8792-8797.
- Gama, L., Abreu, C., Shirk, E.N., Queen, S.E., Beck, S.E., Metcalf Pate, K.A., Bullock, B.T., Zink, M.C., Mankowski, J.L., and Clements, J.E. (2018). SIV Latency in Macrophages in the CNS. In *HIV-1 Latency*, G. Silvestri, and M. Lichterfeld, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 111-130.
- Garcia-Tellez, T., Huot, N., Ploquin, M.J., Rascle, P., Jacquelin, B., and Müller-Trutwin, M. (2016). Non-human primates in HIV research: Achievements, limits



and alternatives. *Infect Genet Evol* 46, 324-332.

- Garg, H., and Joshi, A. (2017). Host and Viral Factors in HIV-Mediated Bystander Apoptosis. *Viruses* 9, 237.
- Garrison, A.R., Smith, D.R., and Golden, J.W. (2019). Animal Models for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Human Disease. *Viruses* 11.
- Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Park, J., Mergia, A., Rethwilm, A., and Scheller, C. (2009). Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology* 6, 32.
- Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* 76, 12813-12822.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3, 388.
- Gessain, A., Francis, H., Sonan, T., Giordano, C., Akani, F., Piquemal, M., Caudie, C., Malone, G., Essex, M., and de-Thé, G. (1986). HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Africa. *Lancet* 2, 698.
- Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 66, 2288-2295.
- Gessain, A., Rua, R., Betsem, E., Turpin, J., and Mahieux, R. (2013). HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: Discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology* 435, 187-199.
- Gessain, A., Montange, T., Betsem, E., Bilounga Ndongo, C., Njouom, R., and Buseyne, F. (2020). Case-Control Study of the Immune Status of Humans Infected With Zoonotic Gorilla Simian Foamy Viruses. *J Infect Dis* 221, 1724-1733.
- Gherzi, B.M., Jia, H., Aiewsakun, P., Katzourakis, A., Mendoza, P., Bausch, D.G., Kasper, M.R., Montgomery, J.M., and Switzer, W.M. (2015). Wide distribution and ancient evolutionary history of simian foamy viruses in New World primates. *Retrovirology* 12, 89.
- Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 117, 3113-3122.
- Gillet, N.A., Cook, L., Laydon, D.J., Hlela, C., Verdonck, K., Alvarez, C.,

Gotuzzo, E., Clark, D., Farré, L., Bittencourt, A., et al. (2013a). Strongyloidiasis and Infective Dermatitis Alter Human T Lymphotropic Virus-1 Clonality in vivo. *PLoS Pathog* 9, e1003263.

- Gillet, N.A., Gutiérrez, G., Rodríguez, S.M., de Brogniez, A., Renotte, N., Alvarez, I., Trono, K., and Willems, L. (2013b). Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. *PLoS Pathogens* 9, e1003687.
- Gillet, N.A., Melamed, A., and Bangham, C.R.M. (2017). High-Throughput Mapping and Clonal Quantification of Retroviral Integration Sites. In *Human T-Lymphotropic Viruses*, C. Casoli, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 127-141.
- Gillim-Ross, L., Cara, A., and Klotman, M.E. (2005). HIV-1 Extrachromosomal 2-LTR Circular DNA Is Long-Lived in Human Macrophages. *Viral Immunology* 18, 190-196.
- Goldberg, T.L., Sintasath, D.M., Chapman, C.A., Cameron, K.M., Karesh, W.B., Tang, S., Wolfe, N.D., Rwego, I.B., Ting, N., and Switzer, W.M. (2009). Coinfection of Ugandan red colobus (*Procolobus [Piliocolobus] rufomitratus tephrosceles*) with novel, divergent delta-, lenti-, and spumaretroviruses. *J. Virol.* 83, 11318-11329.
- Goldstein, G., Manson, K., Tribbick, G., and Smith, R. (2000). Minimization of chronic plasma viremia in rhesus macaques immunized with synthetic HIV-1 Tat peptides and infected with a chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV33). *Vaccine* 18, 2789-2795.
- Goodman, M.A., Arumugam, P., Pillis, D.M., Loberg, A., Nasimuzzaman, M., Lynn, D., van der Loo, J.C.M., Dexheimer, P.J., Keddache, M., Bauer, T.R., et al. (2017). Foamy Virus Vector Carries a Strong Insulator in Its Long Terminal Repeat Which Reduces Its Genotoxic Potential. *J Virol* 92, e01639-17.
- Guiot, E., Carayon, K., Delelis, O., Simon, F., Tauc, P., Zubin, E., Gottikh, M., Mouscadet, J.-F., Brochon, J.-C., and Deprez, E. (2006). Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity. *J Biol Chem* 281, 22707-22719.
- Guo, H.G., Wong-Stall, F., and Gallo, R.C. (1984). Novel viral sequences related to human T-cell leukemia virus in T cells of a seropositive baboon. *Science* 223, 1195-1197.
- Hamann, M.V., and Lindemann, D. (2016). Foamy Virus Protein-Nucleic Acid Interactions during Particle Morphogenesis. *Viruses* 8.
- 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.
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson,

T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F., and Siliciano, J.D. (2004). Resting CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Individuals Carry Integrated HIV-1 Genomes within Actively Transcribed Host Genes. *JVI* 78, 6122-6133.

- Harrison, L.H., Quinn, T.C., and Schechter, M. (1997). Human T cell lymphotropic virus type I does not increase human immunodeficiency virus viral load in vivo. *J. Infect. Dis.* 175, 438-440.
- Harrod, R., Kuo, Y.L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (2000). p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem* 275, 11852-11857.
- Hashikura, Y., Umeki, K., Umekita, K., Nomura, H., Yamamoto, I., Hasegawa, H., Yanagihara, K., and Okayama, A. (2016). The diversity of the structure and genomic integration sites of HTLV-1 provirus in MT-2 cell lines. *Human Cell* 29, 122-129.
- Hashimoto-Gotoh, A., Yoshikawa, R., Nakagawa, S., Okamoto, M., and Miyazawa, T. (2020). Phylogenetic analyses reveal that simian foamy virus isolated from Japanese Yakushima macaques (*Macaca fuscata yakui*) is distinct from most of Japanese Hondo macaques (*Macaca fuscata fuscata*). *Gene* 734, 144382.
- Hayami, M., Ishikawa, K., Komuro, A., Kawamoto, Y., Nozawa, K., Yamamoto, K., Ishida, T., and Hinuma, Y. (1983). ATLV antibody in cynomolgus monkeys in the wild. *Lancet* 2, 620.
- Hayami, M., Komuro, A., Nozawa, K., Shotake, T., Ishikawa, K., Yamamoto, K., Ishida, T., Honjo, S., and Hinuma, Y. (1984). Prevalence of antibody to adult T-cell leukemia virus-associated antigens (ATLA) in Japanese monkeys and other non-human primates. *Int. J. Cancer* 33, 179-183.
- Hemelaar, J. (2013). Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *Journal of Infection* 66, 391-400.
- Henrich, T.J., Hatano, H., Bacon, O., Hogan, L.E., Rutishauser, R., Hill, A., Kearney, M.F., Anderson, E.M., Buchbinder, S.P., Cohen, S.E., et al. (2017). HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLoS Med* 14, e1002417.
- Heraud, J.M., Mortreux, F., Merien, F., Contamin, H., Mahieux, R., Pouliquen, J.F., Wattel, E., Gessain, A., de Thé, H., Bazarbachi, A., et al. (2006). The efficacy of combined therapy of arsenic trioxide and alpha interferon in human T-cell

- leukemia virus type-1-infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Antiviral Res.* 70, 132-139.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P.A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201, 187-199.
  - Higuchi, M., and Fujii, M. (2009). Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* 6, 117.
  - Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N., and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol* 125, 568-575.
  - Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, N.N., Wang, J., Laskey, S.B., Rosenbloom, D.I.S., Lai, J., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155, 540-551.
  - Hokello, J., Sharma, A.L., Dimri, M., and Tyagi, M. (2019). Insights into the HIV Latency and the Role of Cytokines. *Pathogens* 8, 137.
  - Homma, T., Kanki, P.J., King, N.W., Hunt, R.D., O'Connell, M.J., Letvin, N.L., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Yang, C.S., and Essex, M. (1984). Lymphoma in macaques: association with virus of human T lymphotropic family. *Science* 225, 716-718.
  - Hood, S., Mitchell, J.L., Sethi, M., Almond, N.M., Cutler, K.L., and Rose, N.J. (2013). Horizontal acquisition and a broad biodistribution typify simian foamy virus infection in a cohort of *Macaca fascicularis*. *Virol J* 10, 326.
  - Hooks, J.J., and Gibbs, C.J. (1975). The foamy viruses. *Bacteriol Rev* 39, 169-185.
  - Hosmane, N.N., Kwon, K.J., Bruner, K.M., Capoferri, A.A., Beg, S., Rosenbloom, D.I.S., Keele, B.F., Ho, Y.-C., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2017). Proliferation of latently infected CD4+ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J Exp Med* 214, 959-972.
  - Huang, F., Wang, H., Jing, S., and Zeng, W. (2012). Simian Foamy Virus Prevalence in *Macaca mulatta* and Zookeepers. *AIDS Research and Human Retroviruses* 28, 591-593.
  - Hubbard, G.B., Moné, J.P., Allan, J.S., Davis, K.J., Leland, M.M., Banks, P.M., and Smir, B. (1993). Spontaneously generated non-Hodgkin's lymphoma in twenty-seven simian T-cell leukemia virus type 1 antibody-positive baboons (*Papio* species). *Lab. Anim. Sci.* 43, 301-309.

- Hulme, A.E., Perez, O., and Hope, T.J. (2011). Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9975-9980.
- Hunsmann, G., Schneider, J., Schmitt, J., and Yamamoto, N. (1983). Detection of serum antibodies to adult T-cell leukemia virus in non-human primates and in people from Africa. *Int. J. Cancer* 32, 329-332.
- Hussain, A.I., Shanmugam, V., Bhullar, V.B., Beer, B.E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., Wolfe, N.D., Karesh, W.B., Kilbourn, A.M., Tooze, Z., et al. (2003). Screening for simian foamy virus infection by using a combined antigen Western blot assay: evidence for a wide distribution among Old World primates and identification of four new divergent viruses. *Virology* 309, 248-257.
- Ibrahim, F., de Thé, G., and Gessain, A. (1995). Isolation and characterization of a new simian T-cell leukemia virus type 1 from naturally infected cebeles macaques (*Macaca tonkeana*): complete nucleotide sequence and phylogenetic relationship with the Australo-Melanesian human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* 69, 6980-6993.
- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299, 1713-1716.
- Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, A., and Matsushita, S. (2007). Recurrent HIV-1 Integration at the *BACH2* Locus in Resting CD4 + T Cell Populations during Effective Highly Active Antiretroviral Therapy. *J INFECT DIS* 195, 716-725.
- Imamichi, H., Dewar, R.L., Adelsberger, J.W., Rehm, C.A., O'Doherty, U., Paxinos, E.E., Fauci, A.S., and Lane, H.C. (2016). Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 8783-8788.
- Ishida, T., Yamamoto, K., Shotake, T., Nozawa, K., Hayami, M., and Hinuma, Y. (1986). A field study of infection with human T-cell leukemia virus among African primates. *Microbiol. Immunol.* 30, 315-321.
- Ishikawa, K., Fukasawa, M., Tsujimoto, H., Else, J.G., Isahakia, M., Ubhi, N.K., Ishida, T., Takenaka, O., Kawamoto, Y., and Shotake, T. (1987). Serological survey and virus isolation of simian T-cell leukemia/T-lymphotropic virus type I (STLV-I) in non-human primates in their native countries. *Int. J. Cancer* 40, 233-239.
- Iwanaga, M., Watanabe, T., Utsunomiya, A., Okayama, A., Uchimar, K., Koh,

K.-R., Ogata, M., Kikuchi, H., Sagara, Y., Uozumi, K., et al. (2010). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* 116, 1211-1219.

- Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D.E., Fauci, A.S., and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348, 245-248.
- Jacquet, S., Jegado, B., Picard, L., Moratorio, G., and Etienne, L. (2018). Évolution virale lors de changements d'environnement ou d'hôte : points clés du symposium « Evolution virale ». *Virologie* 22, 273-276.
- Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 83, 10908-10921.
- Jegado, B., and Mahieux, R. (2019). Complete Genome Sequence of a Papio anubis Simian Foamy Provirus. *Microbiol Resour Announc* 8.
- Jégado, B., Kashanchi, F., Dutartre, H., and Mahieux, R. (2019). STLV-1 as a model for studying HTLV-1 infection. *Retrovirology* 16, 41.
- Jin, D., and Musier-Forsyth, K. (2019). Role of host tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases in retroviral replication. *J. Biol. Chem.* 294, 5352-5364.
- Jones-Engel, L., Engel, G.A., Schillaci, M.A., Rompis, A., Putra, A., Suaryana, K.G., Fuentes, A., Beer, B., Hicks, S., White, R., et al. (2005). Primate-to-human retroviral transmission in Asia. *Emerg Infect Dis* 11, 1028-1035.
- Jones-Engel, L., Engel, G.A., Heidrich, J., Chalise, M., Poudel, N., Viscidi, R., Barry, P.A., Allan, J.S., Grant, R., and Kyes, R. (2006). Temple monkeys and health implications of commensalism, Kathmandu, Nepal. *Emerg Infect Dis* 12, 900-906.
- Jones-Engel, L., Steinkraus, K.A., Murray, S.M., Engel, G.A., Grant, R., Aggimarangsee, N., Lee, B.P.Y.-H., May, C., Schillaci, M.A., Somgird, C., et al. (2007). Sensitive Assays for Simian Foamy Viruses Reveal a High Prevalence of Infection in Commensal, Free-Ranging Asian Monkeys. *JVI* 81, 7330-7337.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11199-11204.
- Juretzek, T., Holm, T., Gärtner, K., Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenröder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2004). Foamy virus integration. *J Virol* 78, 2472-2477.
- Kandathil, A.J., Sugawara, S., and Balagopal, A. (2016). Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* 13, 86.

- Kannian, P., Yin, H., Doueiri, R., Lairmore, M.D., Fernandez, S., and Green, P.L. (2012). Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J Virol* 86, 3757-3766.
- Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet* 47, 1304-1315.
- Katsuya, H., Islam, S., Tan, B.J.Y., Ito, J., Miyazato, P., Matsuo, M., Inada, Y., Iwase, S.C., Uchiyama, Y., Hata, H., et al. (2019). The Nature of the HTLV-1 Provirus in Naturally Infected Individuals Analyzed by the Viral DNA-Capture-Seq Approach. *Cell Reports* 29, 724-735.e4.
- Kaul, A., Schönmann, U., and Pöhlmann, S. (2019). Seroprevalence of viral infections in captive rhesus and cynomolgus macaques. *Primate Biol.* 6, 1-6.
- Kazanji, M., Moreau, J.P., Mahieux, R., Bonnemains, B., Bomford, R., Gessain, A., and de Thé, G. (1997). HTLV-I infection in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) using autologous, homologous, or heterologous HTLV-I-transformed cell lines. *Virology* 231, 258-266.
- Kazanji, M., Ureta-Vidal, A., Ozden, S., Tangy, F., de Thoisy, B., Fiette, L., Talarmin, A., Gessain, A., and de Thé, G. (2000). Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. *J. Virol.* 74, 4860-4867.
- Kazanji, M., Heraud, J.-M., Merien, F., Pique, C., de Thé, G., Gessain, A., and Jacobson, S. (2006). Chimeric peptide vaccine composed of B- and T-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 induces humoral and cellular immune responses and reduces the proviral load in immunized squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Gen. Virol.* 87, 1331-1337.
- Kazanji, M., Mouinga-Ondémé, A., Lekana-Douki-Etenna, S., Caron, M., Makuwa, M., Mahieux, R., and Gessain, A. (2015). Origin of HTLV-1 in hunters of nonhuman primates in Central Africa. *J. Infect. Dis.* 211, 361-365.
- Kearney, M.F., Spindler, J., Shao, W., Yu, S., Anderson, E.M., O'Shea, A., Rehm, C., Poethke, C., Kovacs, N., Mellors, J.W., et al. (2014). Lack of Detectable HIV-1 Molecular Evolution during Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog* 10, e1004010.
- Kearney, M.F., Anderson, E.M., Coomer, C., Smith, L., Shao, W., Johnson, N., Kline, C., Spindler, J., Mellors, J.W., Coffin, J.M., et al. (2015). Well-mixed plasma

- and tissue viral populations in RT-SHIV-infected macaques implies a lack of viral replication in the tissues during antiretroviral therapy. *Retrovirology* 12, 93.
- Keele, B.F., Jones, J.H., Terio, K.A., Estes, J.D., Rudicell, R.S., Wilson, M.L., Li, Y., Learn, G.H., Beasley, T.M., Schumacher-Stankey, J., et al. (2009). Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* 460, 515-519.
  - Keller, A., Garrett, E.D., and Cullen, B.R. (1992). The Bel-1 protein of human foamy virus activates human immunodeficiency virus type 1 gene expression via a novel DNA target site. *J Virol* 66, 3946-3949.
  - Kelly, J., Beddall, M.H., Yu, D., Iyer, S.R., Marsh, J.W., and Wu, Y. (2008). Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 372, 300-312.
  - Khan, A.S., Bodem, J., Buseyne, F., Gessain, A., Johnson, W., Kuhn, J.H., Kuzmak, J., Lindemann, D., Linial, M.L., Löchelt, M., et al. (2018). Spumaretroviruses: Updated taxonomy and nomenclature. *Virology* 516, 158-164.
  - Kim, F.J., Lavanya, M., Gessain, A., Gallego, S., Battini, J.-L., Sitbon, M., and Courgnaud, V. (2006). Intrahost variations in the envelope receptor-binding domain (RBD) of HTLV-1 and STLV-1 primary isolates. *Retrovirology* 3, 29.
  - Kinpara, S., Ito, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., et al. (2015). Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NF $\kappa$ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia* 29, 1425-1429.
  - Kobayashi, N., Konishi, H., Sabe, H., Shigesada, K., Noma, T., Honjo, T., and Hatanaka, M. (1984). Genomic structure of HTLV (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and its amplification in MT-2 cells. *EMBO J* 3, 1339-1343.
  - Koiwa, T., Hamano-Usami, A., Ishida, T., Okayama, A., Yamaguchi, K., Kamihira, S., and Watanabe, T. (2002). 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol* 76, 9389-9397.
  - Komuro, A., Watanabe, T., Miyoshi, I., Hayami, M., Tsujimoto, H., Seiki, M., and Yoshida, M. (1984). Detection and characterization of simian retroviruses homologous to human T-cell leukemia virus type I. *Virology* 138, 373-378.
  - Koralnik, I.J., Boeri, E., Saxinger, W.C., Monico, A.L., Fullen, J., Gessain, A., Guo, H.G., Gallo, R.C., Markham, P., and Kalyanaraman, V. (1994). Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 68, 2693-2707.



- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25-33.
- Kulkarni, A., and Bangham, C.R.M. (2018). HTLV-1: Regulating the Balance Between Proviral Latency and Reactivation. *Front. Microbiol.* 9, 449.
- von Laer, D., Neumann-Haefelin, D., Heeney, J.L., and Schweizer, M. (1996). Lymphocytes are the major reservoir for foamy viruses in peripheral blood. *Virology* 221, 240-244.
- Lama, J. (2003). The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr HIV Res* 1, 167-184.
- Landry, S., Halin, M., Vargas, A., Lemasson, I., Mesnard, J.-M., and Barbeau, B. (2009). Upregulation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Antisense Transcription by the Viral Tax Protein. *JVI* 83, 2048-2054.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357-359.
- Laydon, D.J., Melamed, A., Sim, A., Gillet, N.A., Sim, K., Darko, S., Kroll, J.S., Douek, D.C., Price, D.A., Bangham, C.R.M., et al. (2014). Quantification of HTLV-1 Clonality and TCR Diversity. *PLoS Comput Biol* 10, e1003646.
- Laydon, D.J., Sunkara, V., Boelen, L., Bangham, C.R.M., and Asquith, B. (2020). The relative contributions of infectious and mitotic spread to HTLV-1 persistence. *PLoS Comput Biol* 16, e1007470.
- LeBreton, M., Switzer, W.M., Djoko, C.F., Gillis, A., Jia, H., Sturgeon, M.M., Shankar, A., Zheng, H., Nkeunen, G., Tamoufe, U., et al. (2014). A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4. *Emerging Microbes & Infections* 3, 1-12.
- Lee, A.H., Lee, K.J., Kim, S., and Sung, Y.C. (1992). Transactivation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by the human foamy virus bel1 protein requires a specific DNA sequence. *J Virol* 66, 3236-3240.
- Lee, G.-E., Mauro, E., Parissi, V., Shin, C.-G., and Lesbats, P. (2019). Structural Insights on Retroviral DNA Integration: Learning from Foamy Viruses. *Viruses* 11, 770.
- Leendertz, F.H., Junglen, S., Boesch, C., Formenty, P., Couacy-Hymann, E., Courgnaud, V., Pauli, G., and Ellerbrok, H. (2004). High variety of different simian T-cell leukemia virus type 1 strains in chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) of the Tai National Park, Côte d'Ivoire. *J. Virol.* 78, 4352-4356.
- Leendertz, F.H., Zirkel, F., Couacy-Hymann, E., Ellerbrok, H., Morozov, V.A.,

- Pauli, G., Hedemann, C., Formenty, P., Jensen, S.A., Boesch, C., et al. (2008). Interspecies Transmission of Simian Foamy Virus in a Natural Predator-Prey System. *J. Virol.* *82*, 7741-7744.
- Leendertz, S.A.J., Junglen, S., Hedemann, C., Goffe, A., Calvignac, S., Boesch, C., and Leendertz, F.H. (2010). High Prevalence, Coinfection Rate, and Genetic Diversity of Retroviruses in Wild Red Colobus Monkeys (*Ptilinopus badius badius*) in Tai National Park, Côte d'Ivoire. *JVI* *84*, 7427-7436.
  - Lemasson, I., Lewis, M.R., Polakowski, N., Hivin, P., Cavanagh, M.-H., Thébault, S., Barbeau, B., Nyborg, J.K., and Mesnard, J.-M. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J Virol* *81*, 1543-1553.
  - Lesbats, P., Engelman, A.N., and Cherepanov, P. (2016). Retroviral DNA Integration. *Chem. Rev.* *116*, 12730-12757.
  - Lesbats, P., Serrao, E., Maskell, D.P., Pye, V.E., O'Reilly, N., Lindemann, D., Engelman, A.N., and Cherepanov, P. (2017). Structural basis for spumavirus GAG tethering to chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* *114*, 5509-5514.
  - Li, X., Liu, Z., Li, Q., Hu, R., Zhao, L., Yang, Y., Zhao, J., Huang, Z., Gao, H., Li, L., et al. (2019). CD161+ CD4+ T Cells Harbor Clonally Expanded Replication-Competent HIV-1 in Antiretroviral Therapy-Suppressed Individuals. *MBio* *10*.
  - Liégeois, F., Lafay, B., Switzer, W.M., Locatelli, S., Mpoudi-Ngolé, E., Loul, S., Heneine, W., Delaporte, E., and Peeters, M. (2008). Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. *Virology* *371*, 405-417.
  - Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2011). Foamy virus biology and its application for vector development. *Viruses* *3*, 561-585.
  - Lindholm, P.F., Marriott, S.J., Gitlin, S.D., Bohan, C.A., and Brady, J.N. (1990). Induction of nuclear NF-kappa B DNA binding activity after exposure of lymphoid cells to soluble tax1 protein. *New Biol* *2*, 1034-1043.
  - Liu, R., Simonetti, F.R., and Ho, Y.-C. (2020). The forces driving clonal expansion of the HIV-1 latent reservoir. *Virol J* *17*, 4.
  - Liu, W., Worobey, M., Li, Y., Keele, B.F., Bibollet-Ruche, F., Guo, Y., Goepfert, P.A., Santiago, M.L., Ndjango, J.-B.N., Neel, C., et al. (2008). Molecular Ecology and Natural History of Simian Foamy Virus Infection in Wild-Living Chimpanzees. *PLoS Pathog* *4*, e1000097.
  - Lobel, L.I., Murphy, J.E., and Goff, S.P. (1989). The palindromic LTR-LTR junction of Moloney murine leukemia virus is not an efficient substrate for proviral integration. *J Virol* *63*, 2629-2637.
  - Locatelli, S., and Peeters, M. (2012). Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in

the human population. *AIDS* 26, 659-673.

- Locatelli, S., Harrigan, R.J., Sesink Clee, P.R., Mitchell, M.W., McKean, K.A., Smith, T.B., and Gonder, M.K. (2016). Why Are Nigeria-Cameroon Chimpanzees (*Pan troglodytes ellioti*) Free of SIVcpz Infection? *PLoS ONE* 11, e0160788.
- Locher, C.P., Witt, S.A., Herndier, B.G., Tenner-Racz, K., Racz, P., and Levy, J.A. (2001). Baboons as an animal model for human immunodeficiency virus pathogenesis and vaccine development. *Immunol Rev* 183, 127-140.
- Lorenzi, J.C.C., Cohen, Y.Z., Cohn, L.B., Kreider, E.F., Barton, J.P., Learn, G.H., Oliveira, T., Lavine, C.L., Horwitz, J.A., Settler, A., et al. (2016). Paired quantitative and qualitative assessment of the replication-competent HIV-1 reservoir and comparison with integrated proviral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E7908-E7916.
- Lowenstine, L.J., Pedersen, N.C., Higgins, J., Pallis, K.C., Uyeda, A., Marx, P., Lerche, N.W., Munn, R.J., and Gardner, M.B. (1986). Seroepidemiologic survey of captive Old-World primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*). *Int. J. Cancer* 38, 563-574.
- Ma, G., Yasunaga, J., Akari, H., and Matsuoka, M. (2015). TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 2216-2221.
- Macatonia, S.E., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Knight, S.C. (1992). Dendritic Cells from Patients with Tropical Spastic Paraparesis Are Infected with HTLV-1 and Stimulate Autologous Lymphocyte Proliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8, 1699-1706.
- Mackler, R.M., Lopez, M.A., Osterhage, M.J., and Yoder, K.E. (2018). Prototype foamy virus integrase is promiscuous for target choice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503, 1241-1246.
- MacNamara, A., Rowan, A., Hilburn, S., Kadolsky, U., Fujiwara, H., Suemori, K., Yasukawa, M., Taylor, G., Bangham, C.R.M., and Asquith, B. (2010). HLA Class I Binding of HBZ Determines Outcome in HTLV-1 Infection. *PLoS Pathog* 6, e1001117.
- Mahieux, R., and Gessain, A. (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* 3, 1074-1090.
- Mahieux, R., Ibrahim, F., Mauclore, P., Herve, V., Michel, P., Tekaiia, F., Chappey, C., Garin, B., Van Der Ryst, E., Guillemain, B., et al. (1997a). Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)

- strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J. Virol.* *71*, 1317-1333.
- Mahieux, R., Pecon-Slattey, J., and Gessain, A. (1997b). Molecular characterization and phylogenetic analyses of a new, highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 (STLV-1marc1) in *Macaca arctoides*. *J. Virol.* *71*, 6253-6258.
  - Mahieux, R., Pecon-Slattey, J., Chen, G.M., and Gessain, A. (1998a). Evolutionary inferences of novel simian T lymphotropic virus type 1 from wild-caught chacma (*Papio ursinus*) and olive baboons (*Papio anubis*). *Virology* *251*, 71-84.
  - Mahieux, R., Chappey, C., Georges-Courbot, M.C., Dubreuil, G., Mauclere, P., Georges, A., and Gessain, A. (1998b). Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J. Virol.* *72*, 10316-10322.
  - Mailler, E., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.-C., Vivet-Boudou, V., and Smyth, R.P. (2016). The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. *Viruses* *8*.
  - Makuwa, M., Souquière, S., Clifford, S.L., Telfer, P.T., Sallé, B., Bourry, O., Onanga, R., Mouinga-Ondeme, A., Wickings, E.J., Abernethy, K.A., et al. (2004). Two distinct STLV-1 subtypes infecting *Mandrillus sphinx* follow the geographic distribution of their hosts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *20*, 1137-1143.
  - Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F.R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A.L., Mellors, J.W., Kearney, M.F., et al. (2014). HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* *345*, 179-183.
  - Mallard, J., and Williams, K.C. (2018). Animal models of HIV-associated disease of the central nervous system. *Handb Clin Neurol* *152*, 41-53.
  - Manickam, C., Shah, S.V., Lucar, O., Ram, D.R., and Reeves, R.K. (2018). Cytokine-Mediated Tissue Injury in Non-human Primate Models of Viral Infections. *Front. Immunol.* *9*, 2862.
  - Manivannan, K., Rowan, A.G., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2016). CADM1/TSLC1 Identifies HTLV-1-Infected Cells and Determines Their Susceptibility to CTL-Mediated Lysis. *PLoS Pathog* *12*, e1005560.
  - Mansky, L.M. (2000). In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J Virol* *74*, 9525-9531.
  - Marçais, A., Lhermitte, L., Artesi, M., Laurent, C., Durkin, K., Hahaut, V., Rosewick, N., Suarez, F., Sibon, D., Cheminant, M., et al. (2020). Targeted deep sequencing reveals clonal and subclonal mutational signatures in Adult T-cell leukemia/lymphoma and defines an unfavorable indolent subtype. *Leukemia*.
  - Marriott, S.J., Lindholm, P.F., Reid, R.L., and Brady, J.N. (1991). Soluble

HTLV-I Tax1 protein stimulates proliferation of human peripheral blood lymphocytes. *New Biol* 3, 678-686.

- Martin, J., Maldonado, J., Mueller, J., Zhang, W., and Mansky, L. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* 8, 31.
- Maskell, D.P., Renault, L., Serrao, E., Lesbats, P., Matadeen, R., Hare, S., Lindemann, D., Engelman, A.N., Costa, A., and Cherepanov, P. (2015). Structural basis for retroviral integration into nucleosomes. *Nature* 523, 366-369.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* 30, 1379-1389.
- Matsuzaki, T., Nakagawa, M., Nagai, M., Usuku, K., Higuchi, I., Arimura, K., Kubota, H., Izumo, S., Akiba, S., and Osame, M. (2001). HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol* 7, 228-234.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* 6, e1000788.
- McCarthy, T.J., Kennedy, J.L., Blakeslee, J.R., and Bennett, B.T. (1990). Spontaneous malignant lymphoma and leukemia in a simian T-lymphotropic virus type I (STLV-I) antibody positive olive baboon. *Lab. Anim. Sci.* 40, 79-81.
- McClure, M.O., Bieniasz, P.D., Schulz, T.F., Chrystie, I.L., Simpson, G., Aguzzi, A., Hoad, J.G., Cunningham, A., Kirkwood, J., and Weiss, R.A. (1994). Isolation of a new foamy retrovirus from orangutans. *J Virol* 68, 7124-7130.
- McGary, C.S., Deleage, C., Harper, J., Micci, L., Ribeiro, S.P., Paganini, S., Kuri-Cervantes, L., Benne, C., Ryan, E.S., Balderas, R., et al. (2017). CTLA-4+PD-1- Memory CD4+ T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity* 47, 776-788.e5.
- McGinn, T.M., Tao, B., Cartner, S., Schoeb, T., Davis, I., Ratner, L., and Fultz, P.N. (2002). Association of primate T-cell lymphotropic virus infection of pig-tailed macaques with high mortality. *Virology* 304, 364-378.
- McGinn, T.M., Wei, Q., Stallworth, J., and Fultz, P.N. (2004). Immune responses to HTLV-I(ACH) during acute infection of pig-tailed macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 443-456.
- Mcllroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J.P., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of

- dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 69, 4737-4745.
- Meekings, K.N., Leipzig, J., Bushman, F.D., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2008). HTLV-1 Integration into Transcriptionally Active Genomic Regions Is Associated with Proviral Expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog* 4, e1000027.
  - Meertens, L., Rigoulet, J., Mauclère, P., Van Beveren, M., Chen, G.M., Diop, O., Dubreuil, G., Georges-Goubot, M.C., Berthier, J.L., Lewis, J., et al. (2001). Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: close relationship of STLV-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. *Virology* 287, 275-285.
  - Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.
  - Meiering, C.D., Comstock, K.E., and Linial, M.L. (2000). Multiple Integrations of Human Foamy Virus in Persistently Infected Human Erythroleukemia Cells. *Journal of Virology* 74, 1718-1726.
  - Meissner, M.E., Mendonça, L.M., Zhang, W., and Mansky, L.M. (2017). Polymorphic Nature of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Cores as Revealed through Characterization of a Chronically Infected Cell Line. *J Virol* 91.
  - Melamed, A., Laydon, D.J., Gillet, N.A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2013). Genome-wide Determinants of Proviral Targeting, Clonal Abundance and Expression in Natural HTLV-1 Infection. *PLoS Pathog* 9, e1003271.
  - Melamed, A., Witkover, A.D., Laydon, D.J., Brown, R., Ladell, K., Miners, K., Rowan, A.G., Gormley, N., Price, D.A., Taylor, G.P., et al. (2014). Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog* 10, e1004006.
  - Melamed, A., Laydon, D.J., Al Khatib, H., Rowan, A.G., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2015). HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8<sup>+</sup> T cells in natural infection. *Retrovirology* 12, 91.
  - Melamed, A., Yaguchi, H., Miura, M., Witkover, A., Fitzgerald, T.W., Birney, E., and Bangham, C.R. (2018). The human leukemia virus HTLV-1 alters the structure and transcription of host chromatin in cis. *Elife* 7.
  - Meyerhans, A., Breinig, T., Vartanian, J.-P., and Wain-Hobson, S. (2004). Forms and Function of Intracellular HIV DNA.
  - Meythaler, M., Martinot, A., Wang, Z., Pryputniewicz, S., Kasheta, M., Ling, B., Marx, P.A., O'Neil, S., and Kaur, A. (2009). Differential CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyte Apoptosis and Bystander T-Cell Activation in Rhesus Macaques and Sooty Mangabeys during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *JVI* 83, 572-583.

- Mifsud, E.J., Tai, C.M., and Hurt, A.C. (2018). Animal models used to assess influenza antivirals. *Expert Opin Drug Discov* 13, 1131–1139.
- Miranda, Muniz, Moreira, Bueno, Kierulff, Molina, Catão-Dias, Pissinatti, Soares, and Santos (2019). Eco-Epidemiological Profile and Molecular Characterization of Simian Foamy Virus in a Recently-Captured Invasive Population of *Leontopithecus chrysomelas* (Golden-Headed Lion Tamarin) in Rio de Janeiro, Brazil. *Viruses* 11, 931.
- Mitobe, Y., Yasunaga, J. -i., Furuta, R., and Matsuoka, M. (2015). HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival. *Cancer Research* 75, 4143-4152.
- Miura, M., Yasunaga, J., Tanabe, J., Sugata, K., Zhao, T., Ma, G., Miyazato, P., Ohshima, K., Kaneko, A., Watanabe, A., et al. (2013). Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology* 10, 118.
- Miyazaki, M., Yasunaga, J.-I., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T., and Matsuoka, M. (2007). Preferential Selection of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Provirus Lacking the 5' Long Terminal Repeat during Oncogenesis. *Journal of Virology* 81, 5714-5723.
- Miyazaki, Y., Miyake, A., Nomaguchi, M., and Adachi, A. (2011). Structural Dynamics of Retroviral Genome and the Packaging. *Front. Microbio.* 2.
- Miyoshi, I., Taguchi, H., Fujishita, M., Yoshimoto, S., Kubonishi, I., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., and Akagi, T. (1982a). Transformation of monkey lymphocytes with adult T-cell leukaemia virus. *Lancet* 1, 1016.
- Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujishita, M., Taguchi, H., Kubonishi, I., Niiya, K., and Minezawa, M. (1982b). Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet* 2, 658.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O., and Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71, 7305-7311.
- Moné, J., Whitehead, E., Leland, M., Hubbard, G., and Allan, J.S. (1992). Simian T-cell leukemia virus type I infection in captive baboons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1653-1661.
- Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D.W., and Yamamoto, N. (1999). Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93, 2360-2368.
- Morozov, V.A., Leendertz, F.H., Junglen, S., Boesch, C., Pauli, G., and Ellerbrok, H. (2009). Frequent foamy virus infection in free-living chimpanzees of

the Taï National Park (Côte d'Ivoire). *Journal of General Virology* 90, 500-506.

- Mortreux, F., Kazanji, M., Gabet, A.S., de Thoisy, B., and Wattel, E. (2001). Two-step nature of human T-cell leukemia virus type 1 replication in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Virol.* 75, 1083-1089.
- Mossoun, A., Calvignac-Spencer, S., Anoh, A.E., Pauly, M.S., Driscoll, D.A., Michel, A.O., Nazaire, L.G., Pfister, S., Sabwe, P., Thiesen, U., et al. (2017). Bushmeat Hunting and Zoonotic Transmission of Simian T-Lymphotropic Virus 1 in Tropical West and Central Africa. *J. Virol.* 91.
- Mouinga-Ondémé, A., Betsem, E., Caron, M., Makuwa, M., Sallé, B., Renault, N., Saib, A., Telfer, P., Marx, P., Gessain, A., et al. (2010). Two distinct variants of simian foamy virus in naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*) and cross-species transmission to humans. *Retrovirology* 7, 105.
- Mouinga-Ondémé, A., Caron, M., Gessain, A., and Kazanji, M. (2011). High level of inter-species transmission of simian foamy virus from non-human primates to humans in Gabon, central Africa. *Retrovirology* 8, A229.
- Mueller, N., Pasternak, A.O., Klaver, B., Cornelissen, M., Berkhout, B., and Das, A.T. (2018). The HIV-1 Tat Protein Enhances Splicing at the Major Splice Donor Site. *J Virol* 92, e01855-17, /jvi/92/14/e01855-17.atom.
- 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.
- Muniz, C.P., Troncoso, L.L., Moreira, M.A., Soares, E.A., Pissinatti, A., Bonvicino, C.R., Seuánez, H.N., Sharma, B., Jia, H., Shankar, A., et al. (2013). Identification and characterization of highly divergent simian foamy viruses in a wide range of new world primates from Brazil. *PLoS One* 8, e67568.
- Muniz, C.P., Jia, H., Shankar, A., Troncoso, L.L., Augusto, A.M., Farias, E., Pissinatti, A., Fedullo, L.P., Santos, A.F., Soares, M.A., et al. (2015). An expanded search for simian foamy viruses (SFV) in Brazilian New World primates identifies novel SFV lineages and host age-related infections. *Retrovirology* 12, 94.
- Muniz, C.P., Zheng, H., Jia, H., Cavalcante, L.T.F., Augusto, A.M., Fedullo, L.P., Pissinatti, A., Soares, M.A., Switzer, W.M., and Santos, A.F. (2017). A non-invasive specimen collection method and a novel simian foamy virus (SFV) DNA quantification assay in New World primates reveal aspects of tissue tropism and improved SFV detection. *PLoS One* 12, e0184251.
- Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., Yamamoto, T., and Tsutsui, T. (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology* 148, 84-88.
- Murray, S.M., and Linial, M.L. (2019). Simian Foamy Virus Co-Infections.



Viruses 11, 902.

- Murray, A.J., Kwon, K.J., Farber, D.L., and Siliciano, R.F. (2016). The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *J Immunol* 197, 407-417.
- Murray, S.M., Picker, L.J., Axthelm, M.K., and Linial, M.L. (2006). Expanded Tissue Targets for Foamy Virus Replication with Simian Immunodeficiency Virus-Induced Immunosuppression. *Journal of Virology* 80, 663-670.
- Murray, S.M., Picker, L.J., Axthelm, M.K., Hudkins, K., Alpers, C.E., and Linial, M.L. (2008). Replication in a Superficial Epithelial Cell Niche Explains the Lack of Pathogenicity of Primate Foamy Virus Infections. *Journal of Virology* 82, 5981-5985.
- Nagai, M., Brennan, M.B., Sakai, J.A., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* 98, 1858-1861.
- Napolitano, L.A., Grant, R.M., Deeks, S.G., Schmidt, D., De Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herndier, B.G., Andersson, J., and McCune, J.M. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 7, 73-79.
- Narat, V., Kampo, M., Heyer, T., Rupp, S., Ambata, P., Njouom, R., and Giles-Vernick, T. (2018). Using physical contact heterogeneity and frequency to characterize dynamics of human exposure to nonhuman primate bodily fluids in central Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006976.
- Ne, E., Palstra, R.-J., and Mahmoudi, T. (2018). Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 191-243.
- Nerrienet, E., Amouretti, X., Müller-Trutwin, M.C., Poaty-Mavoungou, V., Bedjebaga, I., Nguyen, H.T., Dubreuil, G., Corbet, S., Wickings, E.J., Barre-Sinoussi, F., et al. (1998). Phylogenetic analysis of SIV and STLV type I in mandrills (*Mandrillus sphinx*): indications that intracolony transmissions are predominantly the result of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 785-796.
- Nethe, M., Berkhout, B., and van der Kuyl, A.C. (2005). Retroviral superinfection resistance. *Retrovirology* 2, 52.
- Niederer, H., and Bangham, C. (2014). Integration Site and Clonal Expansion in Human Chronic Retroviral Infection and Gene Therapy. *Viruses* 6, 4140-4164.
- Niederer, H.A., Laydon, D.J., Melamed, A., Elemans, M., Asquith, B., Matsuoka, M., and Bangham, C.R. (2014). HTLV-1 proviral integration sites differ

between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology* 11, 172.

- Niewiesk, S., and Bangham, C.R.M. (1996). Evolution in a chronic RNA virus infection: selection on HTLV-I tax protein differs between healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. *J Mol Evol* 42, 452-458.
- Niphuis, H., Verschoor, E.J., Bontjer, I., Peeters, M., and Heeney, J.L. (2003). Reduced transmission and prevalence of simian T-cell lymphotropic virus in a closed breeding colony of chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *J. Gen. Virol.* 84, 615-620.
- Noda, Y., Ishikawa, K., Sasagawa, A., Honjo, S., Mori, S., Tsujimoto, H., and Hayami, M. (1986). Hematologic abnormalities similar to the preleukemic state of adult T-cell leukemia in African green monkeys naturally infected with simian T-cell leukemia virus. *Jpn. J. Cancer Res.* 77, 1227-1234.
- Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., von Kalle, C., and Rethwilm, A. (2006). Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *Journal of General Virology* 87, 1339-1347.
- Nyamota, R., Owino, V., Murungi, E.K., Villinger, J., Otiende, M., Masiga, D., Thuita, J., Lekool, I., and Jeneby, M. (2020). Broad diversity of simian immunodeficiency virus infecting *Chlorocebus* species (African green monkey) and evidence of cross-species infection in *Papio anubis* (olive baboon) in Kenya. *J Med Primatol* 49, 165-178.
- d'Offay, J.M., Eberle, R., Sucol, Y., Schoelkopf, L., White, M.A., Valentine, B.D., White, G.L., and Lerche, N.W. (2007). Transmission dynamics of simian T-lymphotropic virus type 1 (STLV1) in a baboon breeding colony: predominance of female-to-female transmission. *Comp. Med.* 57, 105-114.
- d'Offay, J.M., Eberle, R., Wolf, R.F., Kosanke, S.D., Doocy, K.R., Ayalew, S., Mansfield, K.G., and White, G.L. (2013). Simian T-lymphotropic Virus-associated lymphoma in 2 naturally infected baboons: T-cell clonal expansion and immune response during tumor development. *Comp. Med.* 63, 288-294.
- Okoye, A.A., Hansen, S.G., Vaidya, M., Fukazawa, Y., Park, H., Duell, D.M., Lum, R., Hughes, C.M., Ventura, A.B., Ainslie, E., et al. (2018). Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound. *Nat Med* 24, 1430-1440.
- Oldridge, J., and Marsh, M. (1998). Nef--an adaptor adaptor? *Trends Cell Biol* 8, 302-305.
- Oo, Z., Barrios, C.S., Castillo, L., and Beilke, M.A. (2015). k. *J. Med. Virol.* 87, 790-797.
- Ouwendijk, W.J.D., and Verjans, G.M.G.M. (2015). Pathogenesis of varicelloviruses in primates. *J Pathol* 235, 298-311.

- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16, 83–89.
- Palermo, R.E., Tisoncik-Go, J., Korth, M.J., and Katze, M.G. (2013). Old world monkeys and new age science: the evolution of nonhuman primate systems virology. *ILAR J* 54, 166–180.
- Palmer, M.T., Kirkman, R., Kosloff, B.R., Eipers, P.G., and Morrow, C.D. (2007). tRNA Isoacceptor Preference prior to Retrovirus Gag-Pol Junction Links Primer Selection and Viral Translation. *JVI* 81, 4397–4404.
- Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G.J., Brun, S.C., Kempf, D.J., Mellors, J.W., Coffin, J.M., and King, M.S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3879–3884.
- Panganiban, A.T., and Temin, H.M. (1984). The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7885–7889.
- Passos, D.O., Li, M., Yang, R., Rebensburg, S.V., Ghirlando, R., Jeon, Y., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Craigie, R., and Lyumkis, D. (2017). Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome. *Science* 355, 89–92.
- Pedro, K.D., Henderson, A.J., and Agosto, L.M. (2019). Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. *Virus Research* 265, 115–121.
- Peeters, M., D’Arc, M., and Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev* 16, 23–34.
- Pena, L.J., Miranda Guarines, K., Duarte Silva, A.J., Sales Leal, L.R., Mendes Félix, D., Silva, A., de Oliveira, S.A., Junqueira Ayres, C.F., Júnior, A.S., and de Freitas, A.C. (2018). In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol* 99, 1529–1550.
- Perelman, P., Johnson, W.E., Roos, C., Seuánez, H.N., Horvath, J.E., Moreira, M.A.M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpler, Y., et al. (2011). A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7, e1001342.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722–4730.
- Piedade, D., and Azevedo-Pereira, J.M. (2016). The Role of microRNAs in the

Pathogenesis of Herpesvirus Infection. *Viruses* 8.

- Pinto-Santini, D.M., Stenbak, C.R., and Linial, M.L. (2017). Foamy virus zoonotic infections. *Retrovirology* 14.
- Pinzone, M.R., VanBelzen, D.J., Weissman, S., Bertuccio, M.P., Cannon, L., Venanzi-Rullo, E., Migueles, S., Jones, R.B., Mota, T., Joseph, S.B., et al. (2019). Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nat Commun* 10, 728.
- Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* 3, 378.
- Pise-Masison, C.A., de Castro-Amarante, M.F., Enose-Akahata, Y., Buchmann, R.C., Fenizia, C., Washington Parks, R., Edwards, D., Fiocchi, M., Alcantara, L.C., Bialuk, I., et al. (2014). Co-dependence of HTLV-1 p12 and p8 functions in virus persistence. *PLoS Pathog.* 10, e1004454.
- Pitcher, C.J., Quittner, C., Peterson, D.M., Connors, M., Koup, R.A., Maino, V.C., and Picker, L.J. (1999). HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 5, 518-525.
- Plochmann, K., Horn, A., Gschmack, E., Armbruster, N., Krieg, J., Wiktorowicz, T., Weber, C., Stirnagel, K., Lindemann, D., Rethwilm, A., et al. (2012). Heparan Sulfate Is an Attachment Factor for Foamy Virus Entry. *J. Virol.* 86, 10028-10035.
- Pluta, A., Rola-Łuszczak, M., Douville, R.N., and Kuźmak, J. (2018). Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. *Virol J* 15, 165.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7415-7419.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., and Gallo, R.C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268-271.
- Poletti, V., and Mavilio, F. (2018). Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 8, 31-41.
- Policicchio, B.B., Cardozo, E.F., Sette, P., Xu, C., Haret-Richter, G., Dunsmore, T., Apetrei, C., Pandrea, I., and Ribeiro, R.M. (2018). Dynamics of Simian Immunodeficiency Virus Two-Long-Terminal-Repeat Circles in the Presence and Absence of CD8+ Cells. *J Virol* 92.
- Pollack, R.A., Jones, R.B., Perteau, M., Bruner, K.M., Martin, A.R., Thomas, A.S.,

Capoferri, A.A., Beg, S.A., Huang, S.-H., Karandish, S., et al. (2017). Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape. *Cell Host Microbe* 21, 494-506.e4.

- Pope, M., Gezelter, S., Gallo, N., Hoffman, L., and Steinman, R.M. (1995). Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med* 182, 2045-2056.
- Rahimi, H., Rezaee, S.A., Valizade, N., Vakili, R., and Rafatpanah, H. (2014). Assessment of HTLV-I proviral load, HIV viral load and CD4 T cell count in infected subjects; with an emphasis on viral replication in co-infection. *Iran J Basic Med Sci* 17, 49-54.
- Reid, M.J.C., Switzer, W.M., Schillaci, M.A., Klegarth, A.R., Campbell, E., Ragonnet-Cronin, M., Joanisse, I., Caminiti, K., Lowenberger, C.A., Galdikas, B.M.F., et al. (2017). Bayesian inference reveals ancient origin of simian foamy virus in orangutans. *Infection, Genetics and Evolution* 51, 54-66.
- Rethwilm, A. (1995). Regulation of foamy virus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 193, 1-24.
- Rethwilm, A. (2010). Molecular biology of foamy viruses. *Med Microbiol Immunol* 199, 197-207.
- Richard, L., Rua, R., Betsem, E., Mouinga-Ondémé, A., Kazanji, M., Leroy, E., Njouom, R., Buseyne, F., Afonso, P.V., and Gessain, A. (2015). Cocirculation of Two *env* Molecular Variants, of Possible Recombinant Origin, in Gorilla and Chimpanzee Simian Foamy Virus Strains from Central Africa. *J. Virol.* 89, 12480-12491.
- Riddick, N.E., Wu, F., Matsuda, K., Whitted, S., Ourmanov, I., Goldstein, S., Goeken, R.M., Plishka, R.J., Buckler-White, A., Brenchley, J.M., et al. (2015). Simian Immunodeficiency Virus SIVagm Efficiently Utilizes Non-CCR5 Entry Pathways in African Green Monkey Lymphocytes: Potential Role for GPR15 and CXCR6 as Viral Coreceptors. *J Virol* 90, 2316-2331.
- Rodrigues, E.S., do Carmo Favarin, M., de Macedo, M.D., Otaguiri, K.K., Orellana, M.D., Takayanagui, O.M., Palma, P.V.B., Slavov, S.N., Covas, D.T., and Kashima, S. (2018). Detection of HTLV-1 proviral DNA in BM mononuclear cells and cultured mesenchymal stromal cells isolated from patients with HTLV-1 infection. *Virology* 519, 145-155.
- Rose, N.J., Desselberger, U., Richardson, J.H., and Lever, A.M.L. (2000). Virus inactivation in a proportion of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell clones arises through naturally occurring mutations. *Journal of General*

Virology 81, 97-104.

- Rosewick, N., Durkin, K., Artesi, M., Marçais, A., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Avettand-Fenoel, V., Burny, A., Charlier, C., et al. (2017). Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat Commun* 8, 15264.
- Roth, M.J., Schwartzberg, P.L., and Goff, S.P. (1989). Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: Dependence on IN function and terminal DNA sequence. *Cell* 58, 47-54.
- Roussel, M., Pontier, D., Ngoubangoye, B., Kazanji, M., Verrier, D., and Fouchet, D. (2015a). Modes of transmission of Simian T-lymphotropic Virus Type 1 in semi-captive mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Vet. Microbiol.* 179, 155-161.
- Roussel, M., Pontier, D., Kazanji, M., Ngoubangoye, B., Mahieux, R., Verrier, D., and Fouchet, D. (2015b). Quantifying transmission by stage of infection in the field: The example of SIV-1 and STLV-1 infecting mandrills: Transmission by Stage of Infection. *Am. J. Primatol.* 77, 309-318.
- Rowan, A.G., Dillon, R., Witkover, A., Melamed, A., Demontis, M.-A., Gillet, N.A., Mun, L.J., Bangham, C.R.M., Cook, L.B., Fields, P.A., et al. (2020). Evolution of retrovirus-infected premalignant T-cell clones prior to adult T-cell leukemia/lymphoma diagnosis. *Blood* 135, 2023-2032.
- Rua, R., and Gessain, A. (2015). Origin, evolution and innate immune control of simian foamy viruses in humans. *Current Opinion in Virology* 10, 47-55.
- Rua, R., Betsem, E., Calattini, S., Saib, A., and Gessain, A. (2012). Genetic Characterization of Simian Foamy Viruses Infecting Humans. *Journal of Virology* 86, 13350-13359.
- Rua, R., Betsem, E., and Gessain, A. (2013). Viral Latency in Blood and Saliva of Simian Foamy Virus-Infected Humans. *PLoS ONE* 8, e77072.
- Rua, R., Betsem, E., Montange, T., Buseyne, F., and Gessain, A. (2014). In Vivo Cellular Tropism of Gorilla Simian Foamy Virus in Blood of Infected Humans. *Journal of Virology* 88, 13429-13435.
- Sakakibara, I., Sugimoto, Y., Sasagawa, A., Honjo, S., Tsujimoto, H., Nakamura, H., and Hayami, M. (1986). Spontaneous malignant lymphoma in an African green monkey naturally infected with simian T-lymphotropic virus (STLV). *J. Med. Primatol.* 15, 311-318.
- Saksena, N.K., Herve, V., Durand, J.P., Leguenno, B., Diop, O.M., Digouette, J.P., Mathiot, C., Muller, M.C., Love, J.L., and Dube, S. (1994). Seroepidemiologic, molecular, and phylogenetic analyses of simian T-cell leukemia viruses (STLV-I) from various naturally infected monkey species from central and western Africa. *Virology* 198, 297-310.
- Salemi, M., Van Dooren, S., Audenaert, E., Delaporte, E., Goubau, P.,

Desmyter, J., and Vandamme, A.M. (1998). Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. *Virology* 246, 277-287.

- Salvetti, A., and Baize, S. (2015). [Viral zoonoses and emergence: research is just starting]. *Med Sci (Paris)* 31, 1055-1056.
- Sanjuán, R., and Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci* 73, 4433-4448.
- Santos, A.F., Cavalcante, L.T.F., Muniz, C.P., Switzer, W.M., and Soares, M.A. (2019). Simian Foamy Viruses in Central and South America: A New World of Discovery. *Viruses* 11, 967.
- Sasaki, D., Doi, Y., Hasegawa, H., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Iwanaga, M., Yamada, Y., Watanabe, T., and Kamihira, S. (2010). High human T cell leukemia virus type-1(HTLV-1) provirus load in patients with HTLV-1 carriers complicated with HTLV-1-unrelated disorders. *Virol J* 7, 81.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 720-725.
- Satou, Y., Miyazato, P., Ishihara, K., Yaguchi, H., Melamed, A., Miura, M., Fukuda, A., Nosaka, K., Watanabe, T., Rowan, A.G., et al. (2016). The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 3054-3059.
- Schatzl, H., Yakovleva, L., Lapin, B., Rose, D., Inzhiiia, L., Gaedigk-Nitschko, K., Deinhardt, F., and von der Helm, K. (1992). Detection and characterization of T-cell leukemia virus-like proviral sequences in PBL and tissues of baboons by PCR. *Leukemia* 6 Suppl 3, 158S-160S.
- Schiffer, C., Lecellier, C.-H., Mannioui, A., Felix, N., Nelson, E., Lehmann-Che, J., Giron, M.-L., Gluckman, J.C., Saib, A., and Canque, B. (2004). Persistent Infection with Primate Foamy Virus Type 1 Increases Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cell Binding via a Bet-Independent Mechanism. *JVI* 78, 11405-11410.
- Schillaci, M.A., Jones-Engel, L., Engel, G.A., Paramastri, Y., Iskandar, E., Wilson, B., Allan, J.S., Kyes, R.C., Watanabe, R., and Grant, R. (2005). Prevalence of enzootic simian viruses among urban performance monkeys in Indonesia: Simian Viruses in Urban Performance Monkeys. *Tropical Medicine & International Health* 10, 1305-1314.
- Schneider, H. (2000). The current status of the New World monkey

phylogeny. *An Acad Bras Cienc* 72, 165–172.

- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521–529.
- Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (1995). Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of pol sequences. *Virology* 207, 577–582.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gänge, J., Turek, R., and Neumann-Haefelin, D. (1997). Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* 71, 4821–4824.
- Schweizer, M., Schleer, H., Pietrek, M., Liegibel, J., Falcone, V., and Neumann-Haefelin, D. (1999). Genetic stability of foamy viruses: long-term study in an African green monkey population. *J Virol* 73, 9256–9265.
- Schwob, A., Teruel, E., Dubuisson, L., Lormières, F., Verlhac, P., Abudu, Y.P., Gauthier, J., Naoumenko, M., Cloarec-Ung, F.-M., Faure, M., et al. (2019). SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF- $\kappa$ B activation through its ubiquitin binding function. *Sci Rep* 9, 16014.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3618–3622.
- Sestak, K. (2018). Non-Human Primate Models of Enteric Viral Infections. *Viruses* 10.
- Shan, L., Yang, H.-C., Rabi, S.A., Bravo, H.C., Shroff, N.S., Irizarry, R.A., Zhang, H., Margolick, J.B., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2011). Influence of Host Gene Transcription Level and Orientation on HIV-1 Latency in a Primary-Cell Model. *Journal of Virology* 85, 5384–5393.
- Shankar, A., Sibley, S.D., Goldberg, T.L., and Switzer, W.M. (2019). Molecular Analysis of the Complete Genome of a Simian Foamy Virus Infecting *Hylobates pileatus* (pileated gibbon) Reveals Ancient Co-Evolution with Lesser Apes. *Viruses* 11, 605.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1, a006841–a006841.
- Sherman, M.P., Saksena, N.K., Dube, D.K., Yanagihara, R., and Poiesz, B.J. (1992). Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J. Virol.* 66, 2556–2563.
- Shinagawa, M., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Roy, B.B., Shimizu, A., Hoque, S.A., and Hoshino, H. (2012). Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J Gen Virol* 93, 608–617.
- Sibon, D. (2006). HTLV-1 propels untransformed CD4+ lymphocytes into the



cell cycle while protecting CD8<sup>+</sup> cells from death. *Journal of Clinical Investigation* 116, 974-983.

- Sibon, D., Zane, L., Idrissi, M.E., Delfau-Larue, M.-H., Gessain, A., Gout, O., Mortreux, F., and Wattel, E. (2013). Mosaicism of HTLV-1 5' LTR CpG methylation in the absence of malignancy. *Virus Research* 178, 452-461.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med* 9, 727-728.
- Silvestri, G., Sodora, D.L., Koup, R.A., Paiardini, M., O'Neil, S.P., McClure, H.M., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2003). Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18, 441-452.
- Simonetti, F.R., Sobolewski, M.D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., Anderson, E.M., Watters, S.A., Hill, S., Wu, X., et al. (2016). Clonally expanded CD4<sup>+</sup> T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1883-1888.
- Sintasath, D.M., Wolfe, N.D., Lebreton, M., Jia, H., Garcia, A.D., Le Doux-Diffo, J., Tamoufe, U., Carr, J.K., Folks, T.M., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2009). Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon. *Emerging Infect. Dis.* 15, 175-184.
- Siragam, V., Wong, G., and Qiu, X.-G. (2018). Animal models for filovirus infections. *Zool Res* 39, 15-24.
- Sodora, D.L., Allan, J.S., Apetrei, C., Brenchley, J.M., Douek, D.C., Else, J.G., Estes, J.D., Hahn, B.H., Hirsch, V.M., Kaur, A., et al. (2009). Toward an AIDS vaccine: lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nat Med* 15, 861-865.
- Soliven, K., Wang, X., Small, C.T., Feeroz, M.M., Lee, E.-G., Craig, K.L., Hasan, K., Engel, G.A., Jones-Engel, L., Matsen, F.A., et al. (2013). Simian foamy virus infection of rhesus macaques in Bangladesh: relationship of latent proviruses and transcriptionally active viruses. *J Virol* 87, 13628-13639.
- Souquière, S., Mouinga-Ondemé, A., Makuwa, M., Hermine, O., and Kazanji, M. (2009a). Dynamic interaction between STLV-1 proviral load and T-cell response during chronic infection and after immunosuppression in non-human primates. *PLoS ONE* 4, e6050.
- Souquière, S., Mouinga-Ondemé, A., Makuwa, M., Beggio, P., Radaelli, A., De Giuli Morghen, C., Mortreux, F., and Kazanji, M. (2009b). T-cell tropism of

simian T-cell leukaemia virus type 1 and cytokine profiles in relation to proviral load and immunological changes during chronic infection of naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*). *J. Med. Primatol.* 38, 279-289.

- Souquière, S., Makuwa, M., Sallé, B., Lepelletier, Y., Mortreux, F., Hermine, O., and Kazanji, M. (2014). Immunological alterations and associated diseases in mandrills (*Mandrillus sphinx*) naturally co-infected with SIV and STLV. *Virology* 454-455, 184-196.
- Srivastava, B.I., Wong-Staal, F., and Getchell, J.P. (1986). Human T-cell leukemia virus I provirus and antibodies in a captive gorilla with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 46, 4756-4758.
- St Claire, M.C., Ragland, D.R., Bollinger, L., and Jahrling, P.B. (2017). Animal Models of Ebolavirus Infection. *Comp Med* 67, 253-262.
- Stein, J., Storcksdieck Genannt Bonsmann, M., and Streeck, H. (2016). Barriers to HIV Cure. *HLA* 88, 155-163.
- Stenbak, C.R., Craig, K.L., Ivanov, S.B., Wang, X., Soliven, K.C., Jackson, D.L., Gutierrez, G.A., Engel, G., Jones-Engel, L., and Linial, M.L. (2014). New World Simian Foamy Virus Infections In Vivo and In Vitro. *Journal of Virology* 88, 982-991.
- Sternfeld, T., Tischleder, A., Schuster, M., and Bogner, J. (2009). Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1 infected patients. *HIV Medicine* 10, 512-519.
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T.K., Hein, M.Y., Huang, S.-X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.-B., Hengel, H., et al. (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338, 1088-1093.
- Stewart, C.B., and Disotell, T.R. (1998). Primate evolution - in and out of Africa. *Curr Biol* 8, R582-588.
- Sugata, K., Yasunaga, J.-I., Miura, M., Akari, H., Utsunomiya, A., Nosaka, K., Watanabe, Y., Suzushima, H., Koh, K.-R., Nakagawa, M., et al. (2016). Enhancement of anti-STLV-1/HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. *Sci Rep* 6, 27150.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., and Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435, 682-686.
- Swanstrom, A.E., Del Prete, G.Q., Deleage, C., Elser, S.E., Lackner, A.A., and Hoxie, J.A. (2018). The SIV Envelope Glycoprotein, Viral Tropism, and Pathogenesis: Novel Insights from Nonhuman Primate Models of AIDS. *CHR* 16, 29-40.
- Swiggard, W.J., O'Doherty, U., McGain, D., Jeyakumar, D., and Malim, M.H. (2004). Long HIV type 1 reverse transcripts can accumulate stably within resting

CD4+ T cells while short ones are degraded. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20, 285-295.

- Switzer, W.M., Salemi, M., Shanmugam, V., Gao, F., Cong, M.-E., Kuiken, C., Bhullar, V., Beer, B.E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., et al. (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* 434, 376-380.
- Switzer, W.M., Garcia, A.D., Yang, C., Wright, A., Kalish, M.L., Folks, T.M., and Heneine, W. (2008). Coinfection with HIV-1 and Simian Foamy Virus in West Central Africans. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1389-1393.
- Switzer, W.M., Tang, S., Zheng, H., Shankar, A., Sprinkle, P.S., Sullivan, V., Granade, T.C., and Heneine, W. (2016). Dual Simian Foamy Virus/Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections in Persons from Côte d'Ivoire. *PLOS ONE* 11, e0157709.
- Symons, J., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. (2018). HIV integration sites and implications for maintenance of the reservoir. *Curr Opin HIV AIDS* 13, 152-159.
- Takatsuki, K., Uchiyama, T., Sagawa, K., and Hattori, T. (1977). [Lymphoma and immunoglobulin abnormalities, with special reference to M proteinemia]. *Nippon Rinsho* 35, 3757-3767.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 109, 559-567.
- Tanaka, G., Okayama, A., Watanabe, T., Aizawa, S., Stuver, S., Mueller, N., Hsieh, C.-C., and Tsubouchi, H. (2005). The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J Infect Dis* 191, 1140-1147.
- Tang-Huau, T.-L., Feldmann, H., and Rosenke, K. (2019). Animal models for Lassa virus infection. *Curr Opin Virol* 37, 112-117.
- Tarsis, S.L., Yu, M.T., Parks, E.S., Persaud, D., Muñoz, J.L., and Parks, W.P. (1998). Human T-lymphocyte transformation with human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol* 72, 841-846.
- Tateno, M., Kondo, N., Itoh, T., Chubachi, T., Togashi, T., and Yoshiki, T. (1984). Rat lymphoid cell lines with human T cell leukemia virus production. I. Biological and serological characterization. *Journal of Experimental Medicine* 159, 1105-1116.
- Termini, J.M., Magnani, D.M., Maxwell, H.S., Lauer, W., Castro, I., Pecotte, J., Barber, G.N., Watkins, D.I., and Desrosiers, R.C. (2017). Simian T Lymphotropic Virus 1 Infection of *Papio anubis*: tax Sequence Heterogeneity and T Cell Recognition. *J. Virol.* 91.

- Theda, C., Hwang, S.H., Czajko, A., Loke, Y.J., Leong, P., and Craig, J.M. (2018). Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Sci Rep* 8, 6944.
- Thierry, S., Munir, S., Thierry, E., Subra, F., Leh, H., Zamborlini, A., Saenz, D., Levy, D.N., Lesbats, P., Saïb, A., et al. (2015). Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 12, 24.
- Thierry, S., Thierry, E., Subra, F., Deprez, E., Leh, H., Bury-Moné, S., and Delelis, O. (2016). Opposite transcriptional regulation of integrated vs unintegrated HIV genomes by the NF- $\kappa$ B pathway. *Sci Rep* 6, 25678.
- Thomas, J.S., Lacour, N., Kozlowski, P.A., Nelson, S., Bagby, G.J., and Amedee, A.M. (2010). Characterization of SIV in the Oral Cavity and *in Vitro* Inhibition of SIV by Rhesus Macaque Saliva. *AIDS Research and Human Retroviruses* 26, 901-911.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., and Saïb, A. (2005). Isolation of Foamy Viruses From Peripheral Blood Lymphocytes. In *Human Retrovirus Protocols*, (New Jersey: Humana Press), pp. 125-138.
- Touzé, E., Gessain, A., Lyon-Caen, O., and Gout, O. (1996). Tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy in Europe and in Africa: clinical and epidemiologic aspects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13 *Suppl 1*, S38-45.
- Traina-Dorge, V., Blanchard, J., Martin, L., and Murphey-Corb, M. (1992). Immunodeficiency and Lymphoproliferative Disease in an African Green Monkey Dually Infected with SIV and STLV-I. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8, 97-100.
- Traina-Dorge, V.L., Martin, L.N., Lorino, R., Winsor, E.L., and Beilke, M.A. (2007). Human T cell leukemia virus type 1 up-regulation after simian immunodeficiency virus-1 coinfection in the nonhuman primate. *J. Infect. Dis.* 195, 562-571.
- Trobridge, G.D., Miller, D.G., Jacobs, M.A., Allen, J.M., Kiem, H.-P., Kaul, R., and Russell, D.W. (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1498-1503.
- Tsujimoto, H., Noda, Y., Ishikawa, K., Nakamura, H., Fukasawa, M., Sakakibara, I., Sasagawa, A., Honjo, S., and Hayami, M. (1987). Development of adult T-cell leukemia-like disease in African green monkey associated with clonal integration of simian T-cell leukemia virus type I. *Cancer Res.* 47, 269-274.
- Tung, J., Zhou, X., Alberts, S.C., Stephens, M., and Gilad, Y. (2015). The genetic architecture of gene expression levels in wild baboons. *ELife* 4, e04729.
- Turpin, J., Alais, S., Marçais, A., Bruneau, J., Melamed, A., Gadot, N., Tanaka,

- Y., Hermine, O., Melot, S., Lacoste, R., et al. (2017). Whole body clonality analysis in an aggressive STLV-1 associated leukemia (ATLL) reveals an unexpected clonal complexity. *Cancer Lett.* 389, 78-85.
- Turpin, J., Yurick, D., Khoury, G., Pham, H., Locarnini, S., Melamed, A., Witkover, A., Wilson, K., Purcell, D., Bangham, C.R.M., et al. (2019). Impact of Hepatitis B Virus Coinfection on Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Clonality in an Indigenous Population of Central Australia. *The Journal of Infectious Diseases* 219, 562-567.
  - Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481-492.
  - Valentine, M.J., Murdock, C.C., and Kelly, P.J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors* 12, 463.
  - Valeri, V.W., Hryniewicz, A., Andresen, V., Jones, K., Fenizia, C., Bialuk, I., Chung, H.K., Fukumoto, R., Parks, R.W., Ferrari, M.G., et al. (2010). Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* 116, 3809-3817.
  - Valkov, E., Gupta, S.S., Hare, S., Helander, A., Roversi, P., McClure, M., and Cherepanov, P. (2009). Functional and structural characterization of the integrase from the prototype foamy virus. *Nucleic Acids Research* 37, 243-255.
  - Van den Broeke, A., Oumouna, M., Beskorwayne, T., Szydal, M., Cleuter, Y., Babiuk, S., Bagnis, C., Martiat, P., Burny, A., and Griebel, P. (2010). Cytotoxic responses to BLV tax oncoprotein do not prevent leukemogenesis in sheep. *Leukemia Research* 34, 1663-1669.
  - Van Dooren, S., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2001). Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 18, 661-671.
  - Van Dooren, S., Meertens, L., Lemey, P., Gessain, A., and Vandamme, A.-M. (2005). Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in *Macaca arctoides*. *J. Gen. Virol.* 86, 1953-1959.
  - Van Dooren, S., Verschoor, E.J., Fagrouch, Z., and Vandamme, A.-M. (2007). Phylogeny of primate T lymphotropic virus type 1 (PTLV-1) including various new Asian and African non-human primate strains. *Infect. Genet. Evol.* 7, 374-381.
  - Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus

transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20738–20743.

- Van Zyl, G.U., Katusiime, M.G., Wiegand, A., McManus, W.R., Bale, M.J., Halvas, E.K., Luke, B., Boltz, V.F., Spindler, J., Laughton, B., et al. (2017). No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Investigation* 127, 3827–3834.
- Vandergeeten, C., Fromentin, R., DaFonseca, S., Lawani, M.B., Sereti, I., Lederman, M.M., Ramgopal, M., Routy, J.-P., Sékaly, R.-P., and Chomont, N. (2013). Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy. *Blood* 121, 4321–4329.
- Veenhuis, R.T., Kwaa, A.K., Garliss, C.C., Latanich, R., Salgado, M., Pohlmeier, C.W., Nobles, C.L., Gregg, J., Scully, E.P., Bailey, J.R., et al. (2018). Long-term remission despite clonal expansion of replication-competent HIV-1 isolates. *JCI Insight* 3.
- van der Velden, G.J., Vink, M.A., Berkhout, B., and Das, A.T. (2012). Tat has a dual role in simian immunodeficiency virus transcription. *Journal of General Virology* 93, 2279–2289.
- Verschoor, E.J., Langenhuijzen, S., Bontjer, I., Fagrouch, Z., Niphuis, H., Warren, K.S., Eulenberger, K., and Heeney, J.L. (2004). The phylogeography of orangutan foamy viruses supports the theory of ancient repopulation of Sumatra. *J Virol* 78, 12712–12716.
- Voevodin, A., Samilchuk, E., Schätzl, H., Boeri, E., and Franchini, G. (1996). Interspecies transmission of macaque simian T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in baboons resulted in an outbreak of malignant lymphoma. *J. Virol.* 70, 1633–1639.
- Voevodin, A., Samilchuk, E., Allan, J., Rogers, J., and Broussard, S. (1997a). Simian T-lymphotropic virus type 1 (STLV-1) infection in wild yellow baboons (*Papio hamadryas cynocephalus*) from Mikumi National Park, Tanzania. *Virology* 228, 350–359.
- Voevodin, A.F., Lapin, B.A., Yakovleva, L.A., Ponomaryeva, T.I., Oganyan, T.E., and Razmadze, E.N. (1985). Antibodies reacting with human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-I) or related antigens in lymphomatous and healthy hamadryas baboons. *Int. J. Cancer* 36, 579–584.
- Voevodin, A.F., Johnson, B.K., Samilchuk, E.I., Stone, G.A., Druilhet, R., Greer, W.J., and Gibbs, C.J. (1997b). Phylogenetic analysis of simian T-lymphotropic virus Type I (STLV-I) in common chimpanzees (*Pan troglodytes*): evidence for interspecies transmission of the virus between chimpanzees and humans in Central Africa. *Virology* 238, 212–220.
- Wagner, T.A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C.Y.K., Larsen, B.B., Styrchak, S., Huang, H.C., Edlefsen, P.T., Mullins, J.I., and Frenkel, L.M. (2014).

Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 345, 570-573.

- Wain-Hobson, S., Alizon, M., and Montagnier, L. (1985). Relationship of AIDS to other retroviruses. *Nature* 313, 743-743.
- Watanabe, T., Seiki, M., and Yoshida, M. (1984). HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology* 133, 238-241.
- Watanabe, T., Seiki, M., Tsujimoto, H., Miyoshi, I., Hayami, M., and Yoshida, M. (1985). Sequence homology of the simian retrovirus genome with human T-cell leukemia virus type I. *Virology* 144, 59-65.
- Watanabe, T., Seiki, M., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1986). Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* 148, 385-388.
- Waters, L., and Smit, E. (2012). HIV-1 superinfection. *Curr Opin Infect Dis* 25, 42-50.
- Wattel, E., Vartanian, J.P., Pannetier, C., and Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* 69, 2863-2868.
- Wattel, E., Cavrois, M., Gessain, A., and Wain-Hobson, S. (1996). Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1, S92-99.
- Weiss, R.A. (1996). Retrovirus classification and cell interactions. *J Antimicrob Chemother* 37 Suppl B, 1-11.
- Wetzel, K.S., Elliott, S.T.C., and Collman, R.G. (2018). SIV Coreceptor Specificity in Natural and Non-Natural Host Infection: Implications for Cell Targeting and Differential Outcomes from Infection. *CHR* 16, 41-51.
- Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., et al. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512, 74-77.
- Willems, L., Portetelle, D., Kerkhofs, P., Chen, G., Burny, A., Mammerickx, M., and Kettmann, R. (1992). In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep. *Virology* 189, 775-777.
- Wilson, M.D., Renault, L., Maskell, D.P., Ghoneim, M., Pye, V.E., Nans, A., Rueda, D.S., Cherepanov, P., and Costa, A. (2019). Retroviral integration into nucleosomes through DNA looping and sliding along the histone octamer. *Nat Commun* 10, 4189.

- Wiskerchen, M., and Muesing, M.A. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol* 69, 376–386.
- Wolfe, N.D., Switzer, W.M., Carr, J.K., Bhullar, V.B., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Prosser, A.T., Torimiro, J.N., Wright, A., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2004). Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* 363, 932–937.
- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., and Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279–283.
- Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291–1295.
- von Wyl, V., Gianella, S., Fischer, M., Niederoest, B., Kuster, H., Battegay, M., Bernasconi, E., Cavassini, M., Rauch, A., Hirschel, B., et al. (2011). Early Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection Results in a Transient Reduction of the Viral Setpoint upon Treatment Interruption. *PLoS ONE* 6, e27463.
- Yamamoto, N., Hinuma, Y., zur Hausen, H., Schneider, J., and Hunsmann, G. (1983). African green monkeys are infected with adult T-cell leukaemia virus or closely related agent. *Lancet* 1, 240–241.
- Yamamoto, N., Kobayashi, N., Takeuchi, K., Koyanagi, Y., Hatanaka, M., Hinuma, Y., Chosa, T., Schneider, J., and Hunsmann, G. (1984a). Characterization of African green monkey B-cell lines releasing an adult T-cell leukemia-virus-related agent. *Int. J. Cancer* 34, 77–82.
- Yamamoto, N., Okada, M., Hinuma, Y., Hirsch, F.W., Chosa, T., Schneider, J., and Hunsmann, G. (1984b). Human adult T-cell leukaemia virus is distinct from a similar isolate of Japanese monkeys. *J. Gen. Virol.* 65 ( Pt 12), 2259–2264.
- Yamano, Y., and Sato, T. (2012). Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Front Microbiol* 3, 389.
- Yee, J.L., Montiel, N.A., Ardeshir, A., Ardeshir, A., and Lerche, N.W. (2013). Constitutive release of IFN $\gamma$  and IL2 from peripheral blood mononuclear cells of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) infected with simian T-lymphotropic virus type 1. *Comp. Med.* 63, 508–514.
- Yerly, S., Jost, S., Monnat, M., Telenti, A., Cavassini, M., Chave, J.-P., Kaiser, L., Burgisser, P., Perrin, L., and Swiss HIV Cohort Study (2004). HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. *AIDS* 18, 1413–1421.
- Yoshida, M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of



cell growth control. *Annu Rev Immunol* 19, 475–496.

- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. *JVI* 82, 9359–9368.
- Yu, S.F., Baldwin, D.N., Gwynn, S.R., Yendapalli, S., and Linial, M.L. (1996). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, 1579–1582.
- Zane, L., Sibon, D., Legras, C., Lachuer, J., Wierinckx, A., Mehlen, P., Delfau-Larue, M.-H., Gessain, A., Gout, O., Pinatel, C., et al. (2010). Clonal expansion of HTLV-1 positive CD8+ cells relies on cIAP-2 but not on c-FLIP expression. *Virology* 407, 341–351.
- Zhang, W., Cao, S., Martin, J.L., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2015). Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys* 2, 343–369.

# **Annexes**

**Annexe 1. Données relatives aux primates non-humains naturellement (co-)infectés par SFV et STLV-1.** Les 2 cohortes de babouins naturellement infectés par SFV (n=17) ou co-infectés par SFV et STLV-1 (n=19) sont hébergés au centre de primatologie de Rousset-sur-Arc en France. Chaque animal possède un tatouage propre à l'individu qui a plusieurs significations. La première lettre indique l'origine des animaux, au Kenya en Afrique ou le parc zoologique de St. Vrain en France. Quand un « / » est présent, l'animal est né dans la station de primatologie et est la descendance de la femelle correspondante au code avant le « / » (exemple : V915 et V915/06G respectivement pour Hilna et Brigitte). Les deux chiffres situés après le « / » signifie l'année de naissance de l'animal et la lettre indique l'ordre de naissance. Tous les animaux sauf deux, Gaspard et Gim, sont des femelles.

Cohortes	N°	Nom	Tatouage	Année de naissance	Sexe	Origine
PNH mono-infectés par SFV	1	Amélie	V913/05G	2005	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	2	Baby	V936/06F	2006	F	
	3	Brigitte	V915/06G	2006	F	
	4	Céline	V902/07G	2007	F	
	5	Chantal	V908/07I	2007	F	
	6	Clara	V984/07H	2007	F	
	7	Gaspard	V905	1990	M	
	8	Hilna	V915	1991	F	
	9	Jula	V935	1993	F	
	10	Sophie	V896/01B	2001	F	
	11	Taline	V908/02E	2002	F	
	12	Tassadite	V893/02E	2002	F	
	13	Uta	V898/03B	2003	F	
	14	Vanessa	V908/04G	2004	F	
	15	Vernie	V903/04D	2004	F	
	16	Victoire	V896/04E	2004	F	
	17	Virginie	V913/04F	2004	F	
PNH co-infectés par SFV et STLV-1	18	Barcelone	V924/06I	2006	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	19	Brouette	V987/06G	2006	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	20	Gim	V964B	1993	M	Parc zoologique de St. Vrain, France
	21	Grenade	K931	1993	F	Kenya, Afrique
	22	Kobe	K30	1993	F	Kenya, Afrique
	23	Lassa	K9	1995	F	Kenya, Afrique
	24	Nelly	V975	1997	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	25	Pupu	V995	1998	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	26	Sidonie	K9333/01B	2001	F	Kenya, Afrique
	27	Tania	K9/02C	2002	F	Kenya, Afrique
	28	Tea	V975/02A	2002	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	29	Toinette	V9110/01C	2001	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	30	Umbrella	V975/03B	2003	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	31	Utopia	V909/03F	2003	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	32	Hanja	V911	1990	F	Parc zoologique de St. Vrain, France
	33	Raga	K27/00A	2000	F	Kenya, Afrique
	34	Sanita	K934/01B	2001	F	Kenya, Afrique
	35	Suif	K13/01C	2001	F	Kenya, Afrique
	Babouin_ATL	Umera	V932/04E	2004	F	Parc zoologique de St. Vrain, France

**Annexe 2. Code-barres Illumina à 8 nucléotides (nt) utilisés pour l'ensemble des 57 adaptateurs.**

<b>Nom de l'adaptateur</b>	<b>Séquence 5'-3' du code-barre (8nt)</b>
Linker_Ind1	CTCTCTAT
Linker_Ind2	TATCCTCT
Linker_Ind3	GTAAGGAG
Linker_Ind4	ACTGCATA
Linker_Ind5	AAGGAGTA
Linker_Ind6	CTAAGCCT
Linker_Ind7	CGTCTAAT
Linker_Ind8	TTACCGAC
Linker_Ind9	TCGTCTGA
Linker_Ind10	TTCTAGCT
Linker_Ind11	TACGGTCT
Linker_Ind12	AAGACCGT
Linker_Ind13	CAGGTTCA
Linker_Ind14	AAGGCTAT
Linker_Ind15	TAGGAGCT
Linker_Ind16	TACTCCAG
Linker_Ind17	AGCCTATC
Linker_Ind18	TCATCTCC
Linker_Ind19	GAACGAAG
Linker_Ind20	CGAATTGC
Linker_Ind21	GGAAGAGA
Linker_Ind22	TCGGATTC
Linker_Ind23	CTGTACCA
Linker_Ind24	GAGAGTAC
Linker_Ind25	TCTACGCA
Linker_Ind26	GCAATTCC
Linker_Ind27	CTCAGAAG
Linker_Ind28	GCGTTAGA
Linker_Ind29	CAAGGTAC
Linker_Ind30	AGACCTTG
Linker_Ind31	GTCGTTAC
Linker_Ind32	GTAACCGA
Linker_Ind33	GAATCCGT
Linker_Ind34	CATGAGCA
Linker_Ind35	CTTAGGAC
Linker_Ind36	ATCTGACC
Linker_Ind37	AGGATAGC
Linker_Ind38	GGAGGAAT
Linker_Ind39	GACGTCAT
Linker_Ind40	CCGCTTAA
Linker_Ind41	GACGAACT
Linker_Ind42	TCCACGTT
Linker_Ind43	AACCAGAG
Linker_Ind44	GTCAGTCA
Linker_Ind45	CCTTCCAT
Linker_Ind46	AGGAACAC
Linker_Ind47	TACCTGCA
Linker_Ind48	AGACGCTA
Linker_Ind49	CAACACAG
Linker_Ind50	GTACCACA
Linker_Ind51	CGAATACG
Linker_Ind52	GTCCTTGA
Linker_Ind53	CAGTGCTT
Linker_Ind54	GTCCGATTG
Linker_Ind55	ATAACGCC
Linker_Ind56	GGTATAGG
Linker_Ind57	TCTAGGAG

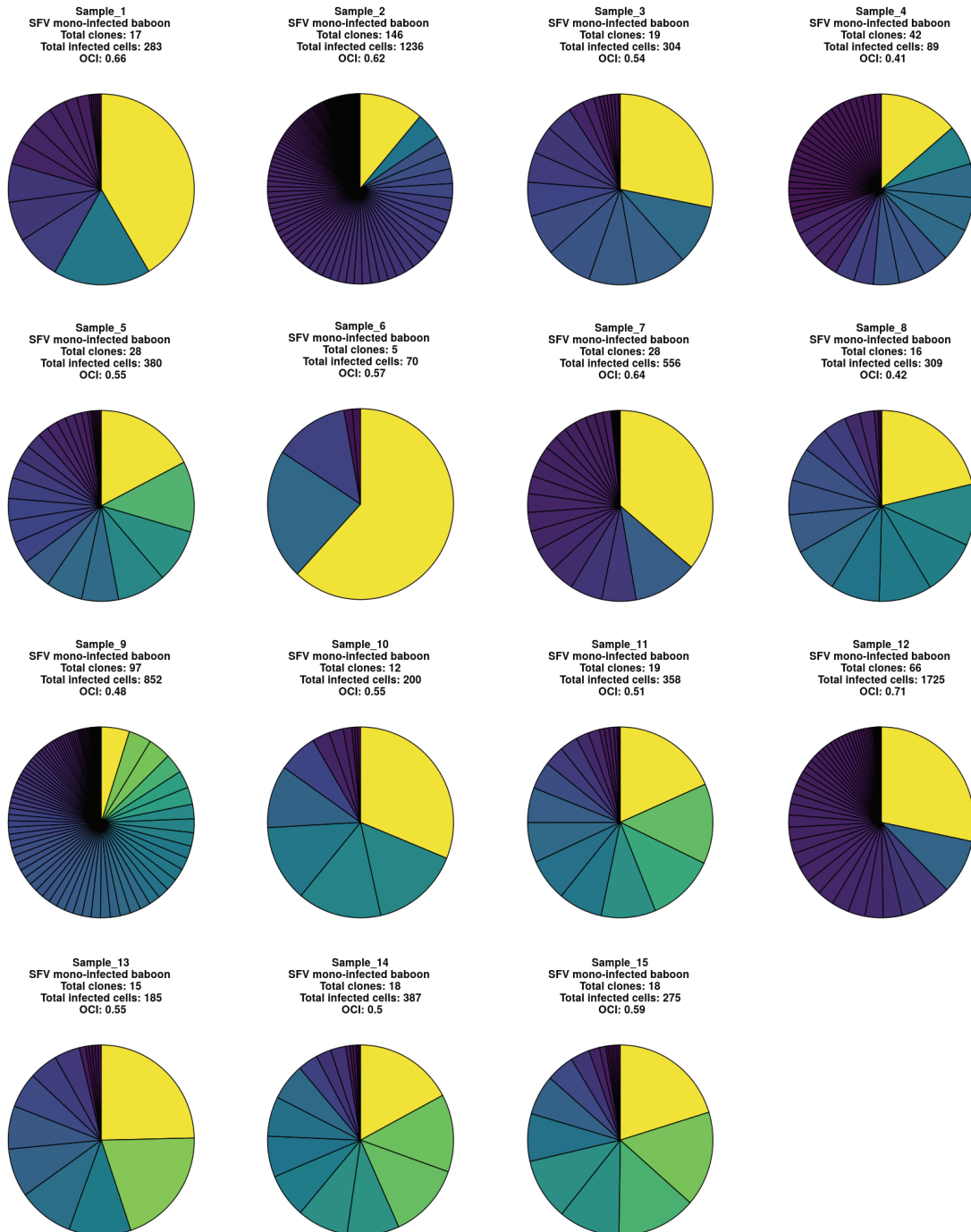
**Annexe 3. Tableau résumant les données obtenues pour les échantillons de chaque cohorte.** Pour chaque échantillon est répertorié la charge provirale (pour  $10^5$  cellules) de SFV et/ou STLV-1 mesurée dans l'étude d'Alais et al ainsi que le nombre total de clones, de cellules sœurs et l'index d'oligoclonalité associés aux virus.

Cohortes	Numéro d'échantillon	PVL SFV (pour $10^5$ cellules)	PVL STLV-1 (pour $10^5$ cellules)	Total de clones SFV	Total de clones STLV-1	Total de cellules infectées par SFV	Total de cellules infectées par STLV-1	OCI SFV	OCI STLV-1
<b>Babouins mono-infectés par SFV</b>	1	Positif-NQ	-	17	-	57	-	0,66	-
	2	Positif-NQ	-	146	-	247	-	0,62	-
	3	Positif-NQ	-	19	-	61	-	0,54	-
	4	Négatif	-	42	-	18	-	0,41	-
	5	Positif-NQ	-	28	-	76	-	0,55	-
	6	Positif-NQ	-	5	-	14	-	0,57	-
	7	Positif-NQ	-	28	-	111	-	0,64	-
	8	Négatif	-	16	-	62	-	0,42	-
	9	Positif-NQ	-	97	-	170	-	0,48	-
	10	Négatif	-	12	-	40	-	0,55	-
	11	Positif-NQ	-	19	-	72	-	0,51	-
	12	Positif-NQ	-	66	-	345	-	0,71	-
	13	Négatif	-	15	-	37	-	0,55	-
	14	Positif-NQ	-	18	-	77	-	0,5	-
	15	Positif-NQ	-	18	-	55	-	0,59	-
<b>Babouins co-infectés par SFV et STLV-1</b>	16	N'était pas inclus dans l'étude d'Alais et al	-	13	18	121	20	0,72	0,6
	17	15,66	16,15	50	13	131	11	0,47	0,45
	18	26,9	3062	14	50	52	138	0,52	0,53
	19	Négatif	66,47	29	122	65	160	0,52	0,6
	20	66,47	1434	8	141	2	562	0,15	0,64
	21	22,07	1464	4	43	3	38	0,5	0,61
	22	113,98	112,7	36	33	102	25	0,6	0,57
	23	154,1	217	12	17	48	7	0,78	0,48
	24	14,67	746,6	17	100	36	189	0,36	0,6
	25	7,08	15,15	6	25	37	13	0,23	0,49
	26	102,25	416,4	39	103	245	127	0,69	0,59
	27	Négatif	310,9	45	66	54	108	0,56	0,55
	28	378,27	2014,2	52	253	142	360	0,51	0,55
	29	121,67	3670	25	89	108	108	0,75	0,56
	30	Positif-NQ	49,2	-	-	101	-	0,51	-
	31	9,28	6751,4	-	159	-	194	-	0,55
	32	10,26	1289,5	-	38	-	36	-	0,64
	33	Positif-NQ	14,8	-	-	37	-	46	-
Babouin ATL	30%	>68%	-	110	761	895	2249	0,83	0,83

Positif-NQ : Positif mais non quantifiable

**Annexe 4. Profils de clonalité rétrovirale de SFV et STLV-1 obtenus dans l'ensemble de nos échantillons de babouins mono- et co-infectés. A) profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins mono-infectés. B) profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins co-infectés. C) profils obtenus pour STLV-1 dans la cohorte de babouins mono-infectés. D) profils obtenus pour SFV et STLV-1 chez le babouin ATL. OCI = index d'oligoclonalité. Chaque part du graphique représente un clone. La taille de chaque part proportionnelle à l'abondance du clone.**

**A**



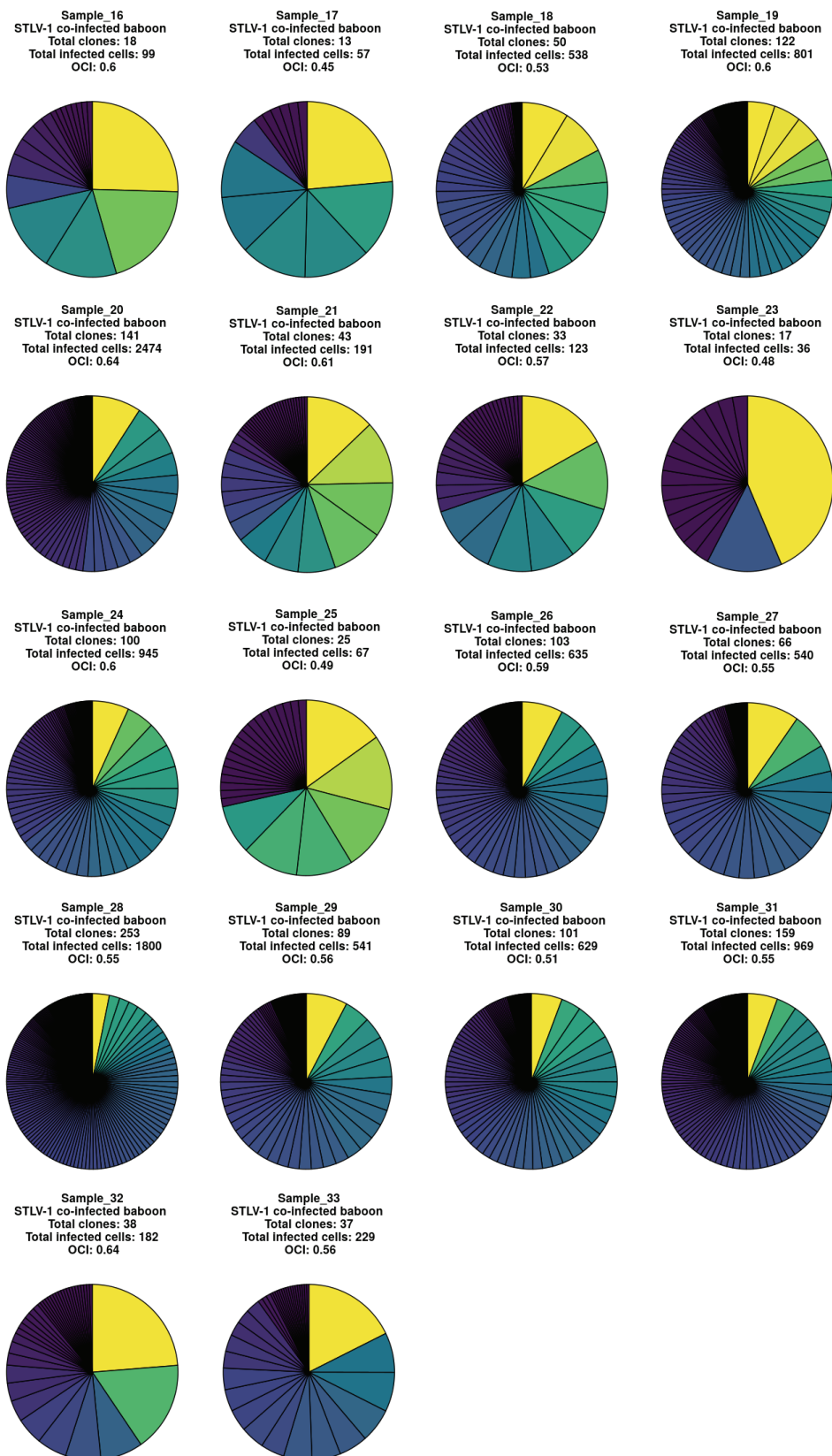
**Annexe 4 (suite). Profils de clonalité rétrovirale de SFV et STLV-1 obtenus dans l'ensemble de nos échantillons de babouins mono- et co-infectés. A)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins mono-infectés. **B)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins co-infectés. **C)** profils obtenus pour STLV-1 dans la cohorte de babouins mono-infectés. **D)** profils obtenus pour SFV et STLV-1 chez le babouin ATL. OCI = index d'oligoclonalité. Chaque part du graphique représente un clone. La taille de chaque part proportionnelle à l'abondance du clone.

**B**



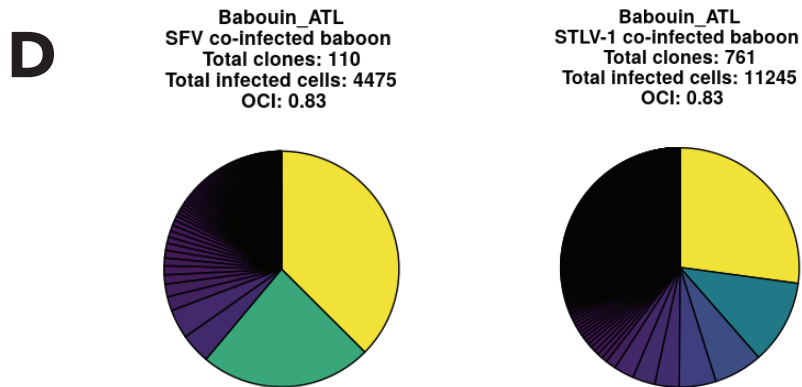
**Annexe 4 (suite). Profils de clonalité rétrovirale de SFV et STLV-1 obtenus dans l'ensemble de nos échantillons de babouins mono- et co-infectés. A)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins mono-infectés. **B)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins co-infectés. **C)** profils obtenus pour STLV-1 dans la cohorte de babouins mono-infectés. **D)** profils obtenus pour SFV et STLV-1 chez le babouin ATL. OCI = index d'oligoclonalité. Chaque part du graphique représente un clone. La taille de chaque part proportionnelle à l'abondance du clone.

**C**





**Annexe 4 (suite). Profil de clonalité rétrovirale de SFV et STLV-1 obtenus dans l'ensemble de nos échantillons de babouins mono- et co-infectés. A)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins mono-infectés. **B)** profils obtenus pour SFV dans la cohorte de babouins co-infectés. **C)** profils obtenus pour STLV-1 dans la cohorte de babouins mono-infectés. **D)** profils obtenus pour SFV et STLV-1 chez le babouin ATL. OCI = index d'oligoclonalité. Chaque part du graphique représente un clone. La taille de chaque part proportionnelle à l'abondance du clone.



## REVIEW

## Open Access



# STLV-1 as a model for studying HTLV-1 infection

Brice Jégado<sup>1</sup>, Fatah Kashanchi<sup>2</sup>, Hélène Dutartre<sup>1</sup> and Renaud Mahieux<sup>1\*</sup> **Abstract**

Few years after HTLV-1 identification and isolation in humans, STLV-1, its simian counterpart, was discovered. It then became clear that STLV-1 is present almost in all simian species. Subsequent molecular epidemiology studies demonstrated that, apart from HTLV-1 subtype A, all human subtypes have a simian homolog. As HTLV-1, STLV-1 is the etiological agent of ATL, while no case of TSP/HAM has been described. Given its similarities with HTLV-1, STLV-1 represents a unique tool used for performing clinical studies, vaccine studies as well as basic science.

**Keywords:** HTLV-1, STLV-1, ATL, Prevalence, Interspecies transmission, Animal model, Therapy

**Background**

The first human oncogenic retrovirus was discovered in the USA, in a T cell line obtained from blood cells of a patient suffering from a disease then called "cutaneous T-cell lymphoma" [1, 2]. Few years earlier, Adult T-cell Leukemia/Lymphoma or ATLL (i.e. an aggressive malignancy of CD4+ T-cells) had been described in Japan [3, 4]. In 1982, Japanese researchers also reported the presence of a retrovirus among ATLL patients. They named it Adult T cell leukemia virus (ATLV). Further work demonstrated that HTLV-1 specific antibodies were present among Japanese ATLL patients, thus allowing identification of the first HTLV-1 endemic area [5]. Later, it was decided to name this virus HTLV-1 for Human T-cell Leukemia Virus type 1.

Few years later, Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (TSP/HAM), a severe neuromyelopathy, was also identified as another disease caused by HTLV-1 [6]. Thus, ATLL and TSP/HAM are the main pathologies present among HTLV-1 infected individuals. It was recently estimated that 5 to 10 million people are infected by HTLV-1 worldwide, although HTLV-1

prevalence is likely to be underestimated. Two to 4% of HTLV-1 carriers will develop either ATLL or TSP/HAM, while most of them will remain asymptomatic [7]. HTLV-1 is endemic in areas such as Japan, central Africa, the Caribbean region and South America [8]. Because HTLV-1 mostly replicates through clonal expansion of infected cells even in asymptomatic carriers [9], its retroviral genome displays a remarkable genetic stability. HTLV-1 molecular epidemiology studies have been carried out throughout the world. The very low genetic variability allowed identification of different HTLV-1 subtypes. All but one of these subtypes, i.e. Cosmopolitan subtype A that is present all over the world, are specific to a given African or Asian region [8]. ATL cases were described in HTLV-1 carriers infected by HTLV-1 subtype A but also subtype B and subtype C [10, 11], thus suggesting that ATL occurrence is not linked to the most frequent HTLV-1 subtype. Of note, HTLV-1 subtype B and subtype C lack p12 and/or p30 auxiliary protein. Whether the lower ATL frequency in type B and C infected individuals is linked to the absence of these proteins remains to be determined.

In 1982, lymphocytes from a Japanese monkey (*Macaca fuscata*) were co-cultured with chronically and productively infected T-cells from the MT-2 cells, an HTLV-1-transformed cell line. This allowed the authors to obtain a simian cell line persistently infected by

\*Correspondence: renaud.mahieux@ens-lyon.fr

<sup>1</sup> International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111 - Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Fondation pour la Recherche Médicale, Labex Ecofect, Lyon, France  
Full list of author information is available at the end of the article



  The Author(s) 2019. 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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

HTLV-1, thus suggesting that Japanese monkeys might be susceptible to HTLV-1 natural infection [12]. Later, seroepidemiological studies were performed in Japan and demonstrated that many Japanese monkeys were infected by HTLV-1-like viruses [13]. Sera from New World Monkeys (NWM), Old World Monkeys (OWM) and Apes were then tested and revealed the presence of antibodies reacting against HTLV-1 antigens. Such antibodies were detected in OWM and Apes, but not in NWM, suggesting endemicity of HTLV-1-related viruses in African and Asian monkeys, but not in American animals [14]. Sequence analyses characterized these viruses as Simian T-cell Leukemia Viruses (STLVs) [15, 16]. To date, it is well established that Old World Non-Human Primates (NHPs) and Apes are naturally infected with a great variety of STLV-1 viruses and that HTLV-1 appeared in Humans following STLV-1 cross-species transmission approximately 27,300 years ago (95% CI 19,100–35,500) in Africa, even if interspecies transmission episodes still occur [17–19]. Given the high degree of similarity between HTLV-1 and STLV-1 sequences, it was suggested to cluster these viruses in the single PTLV (Primate T lymphotropic virus) family [20–22]. Because STLV-1 induces ATLL in naturally infected NHPs [23, 24], and even if some auxiliary proteins are lacking [25], it represents a suitable tool that contributes to our understanding of HTLV-1 pathogenesis. This review will compare HTLV-1 and STLV-1 retroviruses from different aspects and will focus on the use of STLV-1 as a model of HTLV-1 infection.

#### STLV-1 epidemiology

Around 132 non-human primate species represent Old World Monkeys (OWM). They are divided in two sub-families, *Cercopithecinae* and *Colobinae*, distributed in African and Asian continents [26].

To determine which simian species carry STLV-1, seroepidemiological studies were performed using kits that had been previously developed for the detection of anti-HTLV-1 human antibodies, as well as by PCR (Fig. 1). Sera from Japanese monkeys were tested, and 25% scored seropositive. As in humans, STLV-1 incidence increased with age and was higher in females than males. Other species were tested later. A high seroprevalence was observed in African Green monkeys (AGM). Two studies then reported STLV-1 infection in captive Old World NHPs and Apes [27, 28]. Ishikawa et al. [29] performed an STLV-1 survey using 567 NHPs' blood samples covering 30 species caught in the wild or kept in zoos, institutes or private owners from Kenya, Gabon, Ghana, Cameroon, Ethiopia and Indonesia. STLV-1 was detected in African Green monkeys and Sykes' monkeys, in Olive baboons, Patas monkeys, Mandrills and Gorillas.

STLV-1 was also found in different species of macaques from Indonesia, with a seroprevalence ranging from 11 to 25%. Other studies reported natural STLV-1 infections in AGM, Vervet monkeys and among baboon species (*Papio anubis*, *Papio hamadryas*, *Papio papio* and *Papio cynocephalus*) originating from South Africa and Ethiopia [30–33]. As in Japan, the infection status positively correlates with age, and disease incidence is higher in females than males. Other seroepidemiological studies were also performed [34–44] (Fig. 1). Thirty-one Old World NHP species were reported as naturally infected with STLV-1 [33, 45–50].

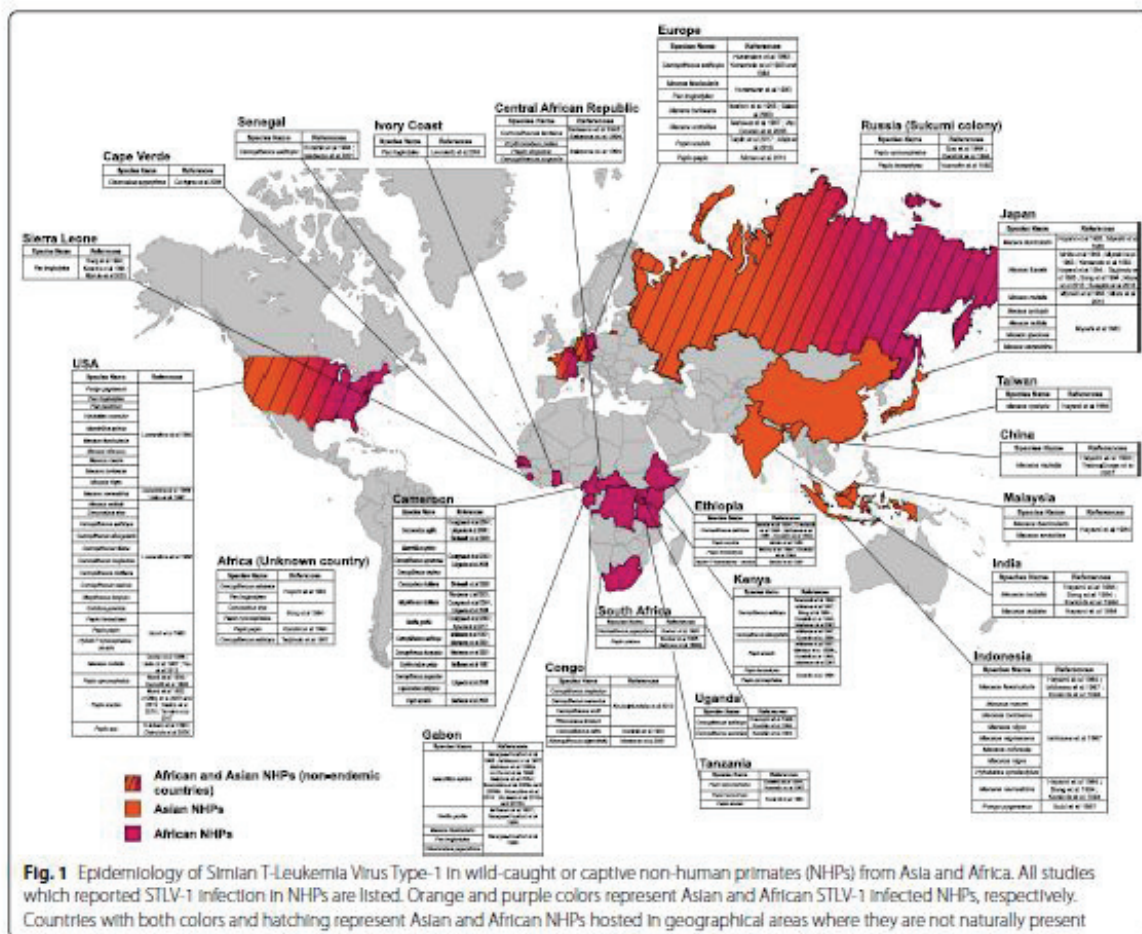
STLV-1 sequence analyses were then performed in order to determine relationship between STLV-1 and HTLV-1 and whether HTLV-1 originated from a non-human primate virus.

#### STLV-1 phylogeny

Since the first publication of a complete HTLV-1 proviral genome [51], phylogenetic studies enabled to identify several HTLV-1 subtypes: Cosmopolitan subtype A, which is found all over the world; subtypes B, D, E, F, G, which are restricted to Central Africa; and Australo-Melanesian subtype C which is the most divergent HTLV-1 subtype [8]. Based on molecular clock and phylogenetic analyses, origin of HTLV-1 subtypes A, B, D, E was inferred in a time frame of  $27,300 \pm 8200$  years, whereas subtype F arose more than 10,000 years ago.

In 1984, Watanabe et al. [52] demonstrated similarities between restriction maps obtained using HTLV-1 from Robert Gallo's laboratory or using Japanese simian Adult T-cell Leukemia Virus (ATLV). These results suggested that HTLV-1 and simian ATLV shared a common ancestor. Other studies reported that HTLV-1 and STLV-1 from Japanese monkeys, Red-faced monkeys, Pig-tailed monkeys, AGM, Chimpanzees and baboons (*Papio cynocephalus*) had the same genomic organization i.e. *LTR-gag-pol-env-pX-LTR* [15, 20]. Sequence analyses comparing Pig-tailed (Asian NHP) and AGM (African NHP) STLV-1 sequences to HTLV-1 revealed 90% and 95% identity respectively. These results suggested that (1) STLV-1 could be separated into two subgroups: Asian and African and that (2) HTLV-1 originated from the African STLV-1 subgroup [16].

Phylogenetic studies revealed that HTLV-1 subtype B is very closely related to STLV-1 strains infecting chimpanzees (98% identity), Allen's swamp monkeys (around 96% identity) and gorillas from Zaïre, Central African Republic and Cameroon [45, 53–55]. STLV-1 strains infecting *Mandrillus sphinx*, *Cercopithecus cephus*, *C. agilis*, *C. pogonias*, *G. agilis* and *C. nictitans* share close relationships with HTLV-1D and -F from Cameroon and Gabon [49, 56–58]. Regarding HTLV-1 subtype E,



the *Env* region clusters with STLV-1 isolated from two baboon species, *Papio ursinus* and *Papio cynocephalus* [59]. No data has been so far reported about a simian counterpart of HTLV-1G and HTLV-1A. Altogether, the diversity of STLV-1 strains found in different NHPs species and related to a given HTLV-1 subtype from the same geographical areas is strongly supporting the concept of multiple cross-species transmissions between NHPs but also from NHPs to humans.

Most divergent STLV-1 strains were described in Asian *Macaca tonkeana* (living in Indonesia) and *Macaca arctoides* (living in India, Thailand and China) [60–62]. *Macaca tonkeana* virus is related to the most divergent HTLV-1 subtype C that is present in Melanesia and Australia. Molecular clock data inferred STLV-1 introduction around 156,000 to 269,000 years ago on the Asian continent [59]. These results suggest that macaque infection with STLV-1 might have led to the emergence of HTLV-1 in Asian human population.

Finally, Calvignac et al. [63] demonstrated that STLV-1 sequences could be amplified from bones samples originating from an early 20th century *Chlorocebus pygerythrus* sample. Therefore, it should now be possible to use this technique to determine STLV-1 virus evolution over time using available Egyptian or Asian NHP mummies.

**STLV-1 interspecies transmission**

Prevalence of HTLV-1 may reach 1 to 40% in adults depending on age, sex and geographic location [8]. It is well known that HTLV-1 can be transmitted under different routes: sexual, mother-to-child and contact with infected blood. However, STLV-1 transmission occurs mostly through aggressive contacts instead of mother to infant or sexual transmissions [64–68], even if sexual transmission of STLV-1 is more important in NHPs such as vervet [40].

**STLV-1 associated-disease in naturally infected animals**

As it is the case for HTLV-1-infected individuals, most STLV-1-infected monkeys remain lifelong asymptomatic hosts [69]. For some unexplained reasons, TSP/HAM cases have never been observed in infected NHPs, even when those animals were living in animal facilities for a long period. Phylogenetic studies performed using samples from an African human TSP/HAM patient showed that the viral sequence was highly related to an STLV-1 sequence obtained from asymptomatic West-African sooty mangabey [70]. Other strains obtained from HTLV-1 African TSP/HAM patients also clustered with STLV-1 strains obtained from asymptomatic animals [71, 72]. It is well established that there is no specific mutation in HTLV-1 genome that would be associated with a given disease. Altogether, these data suggest that the lack of TSP/HAM described cases in NHPs might only be linked to the mode of viral transmission rather than the age of infection.

On the contrary, a number of ATLL-like diseases sharing clinical and pathological features with human ATLL were reported in NHPs [24, 69, 73–79]. The first report was made in STLV-1 infected macaques which developed malignant lymphoma [80]. Subsequent studies reported similar symptoms in captive *Papio anubis*, Gorillas and AGM [75–78, 81, 82]. In a recent study, Tax-positive cells were detected in lymphoid and non-lymphoid organs, mesenteric and axillary lymph nodes and lung, but not in the blood from an infected *Papio anubis* suffering from ATL [24]. In that case, skin lesion biopsies also showed a massive dermal, hypodermic

**Table 2 Amino acid sequence comparison of HTLV-1 HBZ vs. STLV-1 SBZ**

	HTLV-1a ATK	HTLV-1b EL
HTLV-1a ATK	–	74.27%
HTLV-1b EL	74.27%	–
STLV-1 <i>Papio anubis</i>	83.01%	71.36%
STLV-1 Mf5	75.71%	61.43%

ATK belongs to HTLV-1 A cosmopolitan subtype, EL to HTLV-1 B subtype, STLV-1 *Papio anubis* was obtained from an African NHP, while STLV-1 Mf5 was obtained from an Asian NHP (*Macaca fuscata*)

and muscular cell infiltrates of positive CD3+ CD25+ T cells, as described in human ATL.

**Using STLV-1 infected animals**

**After natural STLV-1 Infection**

Given the high degree of sequence similarities between STLV-1 and HTLV-1 genomes and the fact that both viruses cause ATL, STLV-1 infected NHPs (Japanese macaques, *Mandrillus sphinx* and *Papio anubis*) have been used for performing molecular studies [79, 83–89] (Table 1). As HTLV-1, STLV-1 infection is mostly occurring in CD4+ T-cells, although STLV-1 Tax expression was also detected in bone marrow hematopoietic stem cells in vivo, and viral DNA was retrieved in all myeloid and lymphoid cells derived from these infected progenitors [86].

STLV-1 natural infection leads to Tax and SBZ (simian equivalent of HBZ) expression. Simian SBZ and Tax amino-acid sequences are highly similar to human HBZ and Tax (see Tables 2 and 3). These viral proteins also

**Table 1 STLV-1 naturally or experimentally infected non-human primates (NHPs) described in published biological studies**

Studies	Natural STLV-1 Infection	STLV-1 Inter-NHPs transmission	Experimental HTLV-1 Infection
Mechanisms of (co-)infection : retroviral replication	Miura et al. [79]	Dube et al. [94]	Kazanji et al. [96]
	Ma et al. [83]	Voevodin et al. [82]	Kazanji et al. [97]
	Castro et al. [84]	Voevodin et al. [93]	Kazanji et al. [98]
	Termini et al. [85]	Voevodin et al. [32]	Mortreux et al. [99]
	Furuta et al. [86]	Voevodin et al. [53]	Debacq et al. [100]
Drugs and vaccine treatments	Yee et al. [87]	McGinn et al. [95]	Heraud et al. [101]
	Souquière et al. [88]	Pise-Masison et al. [102]	
	Souquière et al. [90]	Valeri et al. [103]	
	Souquière et al. [111]	McGinn et al. [104]	
Cytotoxic response	Sugata et al. [89]		
	Turpin et al. [24]		
	Afonso et al. [92]		

STLV-1 infection mechanisms, experimental treatments and immune response were analyzed in several NHP species

**Table 3** Amino acid sequence comparison of HTLV-1 Tax vs. STLV-1 Tax

	HTLV-1a ATK	HTLV-1b EL
HTLV-1a ATK	–	97.26%
HTLV-1b EL	97.26%	–
STLV-1 <i>Papio anubis</i>	96.03%	95.74%
STLV-1 MF5	92.92%	93.31%

ATK belongs to HTLV-1 A cosmopolitan subtype, EL to HTLV-1 B subtype, STLV-1 *Papio anubis* was obtained from an African NHP, while STLV-1 MF5 was obtained from an Asian NHP (*Macaca fuscata*)

display activating properties on viral LTR and NF- $\kappa$ B signaling pathways. As an example, a high STLV-1 proviral load (PVL) is linked to IL-2, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  elevated expression in asymptomatic STLV-1-infected *Mandrillus sphinx* [90]. Given well-established results published in the HTLV-1 situation, this is likely due to STLV-1 Tax expression, although this hypothesis has not been formally demonstrated. IL-2 and IFN $\gamma$  results were also obtained in asymptomatic STLV-1-positive *Macaca mulatta* [87], while anti IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  responses against Tax expressing cells were also observed in STLV-1 infected baboons [85]. STLV-1 infection also promotes CTL response against STLV-1 Tax protein [84, 85].

Interestingly, TCF1 and LEF1, two T-cell specific proteins, prevent Tax effect on viral LTR. Their expression is high in thymocytes and thus counteract STLV-1 replication in thymus. On the opposite, their expression and thus their effect is down-regulated in peripheral blood T-cells (both in human and simian cells), thanks to a Tax effect on STAT5a. This might explain why Tax is more potent in these cells, and why HTLV-1 induces ATL in the periphery [83].

Depending upon STLV-1 strain, SBZ protein sequence is highly similar or contain insertions and deletion compared to HBZ (see Table 2). Nevertheless, in both cases, animals can develop ATL [24, 79]. This might be due to conservation of the N-terminal region as well as of C-terminus basic leucine zipper domain between human and simian viral proteins.

As its human counterpart, STLV-1 replication occurs through clonal expansion of infected cells, both in asymptomatic and ATL animals [24, 79]. Antiviral therapy based on the use of azidothymidine (AZT) combined with interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) improves the survival rate of ATL patients suffering from acute and chronic/smoldering forms. A confirmation clinical trial using these compounds was reported in an STLV-1 infected *Papio anubis* suffering from ATL. The animal was treated with a combination of AZT and interferon- $\alpha$ . However, and contrary to human ATL, no clinical

improvement was observed. It would now be interesting to determine post-mortem whether, this absence of remission was linked to *p53* mutation already present when treatment started as shown in human ATL cases who were not responding to AZT [91].

Given the fact that treating ATL patients is difficult, and because an elevated PVL is a characteristic of ATL, a study tested whether PVL decreases when valproate and AZT were delivered to asymptomatic STLV-1-infected animals [92]. This was indeed the case and it was associated to an increased anti-Tax CTL response, thus confirming the importance of immune response for controlling viral infection [92]. In another study, STLV-1 infected asymptomatic Japanese monkey were inoculated with mogamulizumab (anti-CCR4), a component that is also used for human relapsed ATL cases. This led to a strong reduction of STLV-1 proviral load [79, 89]. Altogether, these results support the fact that STLV-1 infected animals represent a useful tool for testing drugs.

Finally, a recent study was performed in two asymptomatic STLV-1-infected animals. This showed that immunization using recombinant vaccinia viruses expressing either Tax-22 (which cannot activate the NF- $\kappa$ B pathway) or an HBZ LL/AA mutant (which is partially impaired for blocking Tax ability to induce transcription) was linked to a temporary decrease of STLV-1 PVL [89].

#### After STLV-1 Interspecies transmission

A limited number of reports described STLV-1 inter-simian species transmission [32, 53, 93, 94] (Table 1). In one report and following an unknown mode of transmission, it was shown that baboons accidentally infected with a rhesus macaque STLV-1 virus, developed leukemia/lymphoma at a high frequency [93]. This is the only reported case suggesting that inter-simian species transmission might impact viral pathogenesis. Experimental infection of pig-tailed macaques with sooty mangabey STLV-1 was also tested. Animals maintained low antibody titers and displayed a high mortality rate without any identified cause [95]. Finally, another work reported tantalus and patas animals artificially infected with STLV-1 from other species. All animals became infected, as shown by PCR results, even if one stayed seronegative due to mutations in the genome [94]. Why were these *pol* mutant viruses still able to infect animals remains unexplained.

#### After artificial HTLV-1 Infection

Finally, given the high degree of similarity between HTLV-1 and STLV-1 genomes and the abundance of molecular tools available in the HTLV-1 field, some laboratories decided to use the HTLV-1 molecular clone or HTLV-1 infected cells to perform studies in non-human primates (Table 1). Artificial infection after inoculation

of HTLV-1 to primates provides an inestimable tool to study primo-infection and viral dissemination, in vivo, a process that is inaccessible in humans. HTLV-1 infection of *Saimiri sciureus*, i.e. non-human primates that are not naturally infected with STLV-1 [96], demonstrated that lymphoid organs represent the major viral reservoir [97]. As in HTLV-1 infected humans and STLV-1 naturally-infected animals, IL-2, IL-10, IFN $\gamma$  levels also increased after HTLV-1 infection [98]. In *Saimiri sciureus*, the virus also replicates through clonal expansion after having used reverse transcription (RT) at the initial stages [99] and it causes ATL [100]. As in baboons treated with AZT/IFN [24], arsenic combined to IFN- $\alpha$  was not able to lead to HTLV-1 proviral load reduction, even if the number of circulating ATL flower cells decreased for some unexplained reason [101].

Studies were also performed in pig-tailed and rhesus macaques inoculated with autologous cells previously transfected with the HTLV-1 ACH molecular clone [102–104]. Following infection with wild-type HTLV-1, pig-tailed macaques developed a series of extremely aggressive diseases that were different from ATL. These results therefore suggest that this animal model cannot be used for studying events that are resulting from HTLV-1 infection.

Consequences of rhesus macaque infection with the same molecular clone were different since animals remained asymptomatic. HTLV-1 p12 and p8 proteins have been shown previously to increase NFAT activity, IL-2 production and STAT-5 activity, while p30 controls viral expression at the post-transcriptional level in vitro (for a review, see [105, 106]). Thus, this simian model was useful to investigate the role of p12, p13, and p30 auxiliary proteins in vivo [102, 103]. This allowed researchers to show that p12 and p30 are required for allowing HTLV-1 presence and replication in dendritic cells [103], while p12 and p8 are necessary for allowing a viral resistance to CTL responses. These studies provided the first in vivo evidence on the mechanisms that HTLV-1 uses to establish chronic infection and on the crucial role of myeloid cells in that process.

Interestingly, the authors also demonstrated that the results obtained in rhesus macaques were different from those obtained in rabbits infected with the same viral clones, thus reinforcing the fact that NHPs are the more relevant system for studying HTLV-1 pathogenesis.

#### PTLV retroviral coinfection in NHPs and in humans

In addition to STLV-1, other retroviruses, i.e. Simian Immunodeficiency Virus (SIV) and Simian Foamy Virus (SFV) infect NHPs. Cases of natural coinfection have been reported both in humans and in NHPs: HTLV-1/HIV-1, HTLV-1/HEV, STLV-1/SFV or STLV-1/SIV-1

[67, 107–115]. HIV-1/HTLV-1 coinfection leads to significant increase of HTLV-1 PVL as well as on a possible delay in HIV-1 pathogenesis in humans [107, 108, 116]. Anti-HIV-1 therapy promotes an increase in HTLV-1 PVL in HIV-1/HTLV-1 coinfecting carriers. These results strongly suggest that both retroviruses compete for CD4+ T-cell infection. However, it is worth noting that opposite results were obtained in other studies [117–121].

Natural STLV-1/SIV-1 co-infection induces the development of a neoplastic disease in sooty mangabey [122] and of a lymphoproliferative disease in AGM [123]. Souquière et al. described pathological manifestations, i.e. infective dermatitis and scabies, in two STLV-1/SIV-1 co-infected mandrills [111], while no clinical sign has been reported previously in STLV-1 naturally infected mandrills [90]. Thus, these symptoms could be due to co-infection. Ongoing experiments should allow us to determine whether STLV-1 clonal expansion impacts SIV replication in vivo.

Finally, blood SFV proviral load from STLV-1/SFV naturally co-infected *Papio anubis*, was recently shown to be much higher compared to SFV mono-infected animals [124]. These results either suggest that cells might be co-infected with both retroviruses, with STLV-1 promoting clonal expansion, or that soluble STLV-1 Tax transactivator enters SFV-infected cells where it promotes viral replication. Ongoing experiments should allow us to answer this question.

Altogether, these data demonstrate that STLV-1 is a useful tool to understand mechanisms of HTLV-1 transmission and ATL pathogenesis. PTLV-1 mono-infected as well as SIV co-infected animals could also be used to develop possible new anti-HTLV-1 clinical approaches and to modify anti-HIV treatment.

#### Acknowledgements

BJ is supported by Labex Ecofect, RM is supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. RM is part of the French Laboratory of Excellence project ECOFECT (ANR-11-LABX-0048). The authors acknowledge the support Fondation pour la recherche médicale (équipe Labellisée). The authors thank Dr C. Journo for her helpful comments.

#### Authors' contributions

BJ, HD, FK and RM wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

RM is part of the French Laboratory of Excellence project ECOFECT (ANR-11-LABX-0048). The authors acknowledge the support Fondation pour la recherche médicale (équipe Labellisée DEQ20180339200). BJ is supported by Labex Ecofect, RM is supported by Ecole Normale Supérieure de Lyon. HD is funded by INSERM.

#### Availability of data and materials

Not applicable.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

Not applicable.

**Author details**

<sup>1</sup> International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111 - Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Fondation pour la Recherche Médicale, Labex Ecofect, Lyon, France. <sup>2</sup> Laboratory of Molecular Virology, George Mason University, Manassas, VA, USA.

Received: 24 July 2019 Accepted: 7 December 2019

Published online: 16 December 2019

**References**

- Polesz BJ, Ruscetti FW, Gardner AF, Burn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:7415–9.
- Polesz BJ, Ruscetti FW, Peltz MS, Kalyanaraman VS, Gallo RC. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature*. 1981;294:268–71.
- Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, Hattori T [Lymphoma and immunoglobulin abnormalities, with special reference to M proteinemia]. *Nippon Rinsho*. 1977;35:3757–67.
- Uchiyama T, Yodol J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50:481–92.
- Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. 2005;24:5926–30.
- Gessain A, Francis H, Sonan T, Giordano C, Akani F, Piquemal M, et al. HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Africa. *Lancet*. 1986;2:698.
- Futsch N, Mahieux R, Dutarre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. *Viruses*. 2017;10:1.
- Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388.
- Wattel E, Vartanian JP, Panneiter C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol*. 1995;69:2863–8.
- Mahieux R, Ibrahim F, Maudiere P, Herve V, Michel P, Tekala E, et al. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in pygmies. *J Virol*. 1997;71:17.
- Einsiedel L, Cassar O, Bady P, Kearney D, Gessain A. Variant human T-cell lymphotropic virus type 1c and adult T-cell leukemia, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1639–41.
- Miyoshi I, Taguchi H, Fujishita M, Yoshimoto S, Kubonishi I, Ohtsuki Y, et al. Transformation of monkey lymphocytes with adult T-cell leukemia virus. *Lancet*. 1982;1:1016.
- Miyoshi I, Yoshimoto S, Fujishita M, Taguchi H, Kubonishi I, Niya K, et al. Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet*. 1982;2:658.
- Hayami M, Komuro A, Nozawa K, Shotake T, Ishikawa K, Yamamoto K, et al. Prevalence of antibody to adult T-cell leukemia virus-associated antigens (ATLA) in Japanese monkeys and other non-human primates. *Int J Cancer*. 1984;33:179–83.
- Komuro A, Watanabe T, Miyoshi I, Hayami M, Tsujimoto H, Selki M, et al. Detection and characterization of simian retroviruses homologous to human T-cell leukemia virus type I. *Virology*. 1984;138:373–8.
- Watanabe T, Selki M, Hirayama Y, Yoshida M. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology*. 1986;148:385–8.
- Mossoun A, Calvignac-Spencer S, Anoh AE, Pauly MS, Driscoll DA, Michel AQ, et al. Bushmeat hunting and zoonotic transmission of simian T-lymphotropic virus 1 in tropical West and Central Africa. *J Virol*. 2017;91:e02479-16.
- Kazanji M, Mouinga-Ondémé A, Lekana-Douki-Etenna S, Caron M, Makuwa M, Mahieux R, et al. Origin of HTLV-1 in hunters of nonhuman primates in Central Africa. *J Infect Dis*. 2015;211:361–5.
- Filippone C, Betsem E, Tortelovoy P, Cassar O, Bassot S, Froment A, et al. A severe bite from a nonhuman primate is a major risk factor for HTLV-1 infection in hunters from Central Africa. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1667–76.
- Guo HG, Wong-Stall F, Gallo RC. Novel viral sequences related to human T-cell leukemia virus in T cells of a seropositive baboon. *Science*. 1984;223:1195–7.
- Watanabe T, Selki M, Tsujimoto H, Miyoshi I, Hayami M, Yoshida M. Sequence homology of the simian retrovirus genome with human T-cell leukemia virus type I. *Virology*. 1985;144:59–65.
- Sherman MP, Saksena NK, Dube DK, Yanagihara R, Polesz BJ. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J Virol*. 1992;66:2556–63.
- Locatelli S, Peeters M. Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS*. 2012;26:659–73.
- Turpin J, Alais S, Marçais A, Bruneau J, Melamed A, Gadot N, et al. Whole body clonality analysis in an aggressive STLV-1 associated leukemia (ATLL) reveals an unexpected clonal complexity. *Cancer Lett*. 2017;389:78–85.
- Afonso PV, Fagrouch Z, DeJis M, Niphuts H, Bogers W, Gessain A, et al. Absence of accessory genes in a divergent simian T-lymphotropic virus type 1 isolated from a bonnet macaque (*Macaca radiata*). *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0007521.
- Lawrence JM, Cords M. Old World Monkeys. *Nat Educ Knowl*. 2012;3(7):13.
- Lowenstine LJ, Pedersen NC, Higgins J, Palls KC, Uyeda A, Marx P, et al. Seroepidemiologic survey of captive Old-World primates for antibodies to human and simian retroviruses, and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercocebus atys*). *Int J Cancer*. 1986;38:563–74.
- Hunsmann G, Schneider J, Schmitt J, Yamamoto N. Detection of serum antibodies to adult T-cell leukemia virus in non-human primates and in people from Africa. *Int J Cancer*. 1983;32:329–32.
- Ishikawa K, Fukasawa M, Tsujimoto H, Else JG, Isahakia M, Ubhi NK, et al. Serological survey and virus isolation of simian T-cell leukemia/T-lymphotropic virus type I (STLV-I) in non-human primates in their native countries. *Int J Cancer*. 1987;40:233–9.
- Becker WB, Becker ML, Homma T, Brede HD, Kurth R. Serum antibodies to human T-cell leukaemia virus type I in different ethnic groups and in non-human primates in South Africa. *S Afr Med J*. 1985;67:445–9.
- Ishida T, Yamamoto K, Shotake T, Nozawa K, Hayami M, Hinuma Y. A field study of infection with human T-cell leukemia virus among African primates. *Microbiol Immunol*. 1986;30:315–21.
- Voevodin A, Samilchuk E, Allan J, Rogers J, Broussard S. Simian T-lymphotropic virus type 1 (STLV-1) infection in wild yellow baboons (*Papio hamadryas cynocephalus*) from Mikumi National Park, Tanzania. *Virology*. 1997;228:350–9.
- Moné J, Whitehead E, Leland M, Hubbard G, Allan JS. Simian T-cell leukemia virus type I infection in captive baboons. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8:1653–61.
- Hayami M, Ishikawa K, Komuro A, Kawamoto Y, Nozawa K, Yamamoto K, et al. ATL antibody in cynomolgus monkeys in the wild. *Lancet*. 1983;2:620.
- Yamamoto N, Hinuma Y, zur Hausen H, Schneider J, Hunsmann G. African green monkeys are infected with adult T-cell leukaemia virus or closely related agent. *Lancet*. 1983;1:240–1.
- Yamamoto N, Okada M, Hinuma Y, Hirsch FW, Chosa T, Schneider J, et al. Human adult T-cell leukaemia virus is distinct from a similar isolate of Japanese monkeys. *J Gen Virol*. 1984;65(Pt 12):2259–64.
- Yamamoto N, Kobayashi N, Takeuchi K, Koyanagi Y, Hatanaka M, Hinuma Y, et al. Characterization of African green monkey B-cell lines releasing an adult T-cell leukemia-virus-related agent. *Int J Cancer*. 1984;34:77–82.
- Botha MC, Jones M, de Klerk WA, Yamamoto N. Spread and distribution of human T-cell leukaemia virus type I-reactive antibody among baboons and monkeys in the northern and eastern Transvaal. *S Afr Med J*. 1985;67:665–8.



39. Coursaget P, Barres JL, Yvonnet B, Chiron JP, Cornet M, Ferrara L, et al. Antibodies to human T-cell leukemia virus (HTLV-1) in non human primates from Senegal. *Biomed Pharmacother*. 1985;39:198–9.
40. Dracopoli NC, Turner TR, Else JG, Jolly CJ, Anthony R, Gallo RC, et al. STLV-1 antibodies in feral populations of East African vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Int J Cancer*. 1986;38:523–9.
41. Daniel MD, Letvin NL, Sehgal PK, Schmidt DK, Silva DP, Solomon KR, et al. Prevalence of antibodies to 3 retroviruses in a captive colony of macaque monkeys. *Int J Cancer*. 1988;41:601–8.
42. Fultz PN, Gordon TP, Anderson DC, McClure HM. Prevalence of natural infection with simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus type 1 in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. *AIDS*. 1990;4:619–25.
43. Estaquier J, Peeters M, Bedjabaga L, Honoré C, Bussi P, Dixon A, et al. Prevalence and transmission of simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus in a semi-free-range breeding colony of mandrills in Gabon. *AIDS*. 1991;5:1385–6.
44. Cournaud V, Van Dooren S, Liegeois F, Pourrut X, Abela B, Louf S, et al. Simian T-cell leukemia virus (STLV) infection in wild primate populations in Cameroon: evidence for dual STLV type 1 and type 3 infection in agile mangabeys (*Cercocebus agilis*). *J Virol*. 2004;78:4700–9.
45. Koránik IJ, Boerl E, Saxinger WC, Monaco AL, Fullen J, Gessain A, et al. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol*. 1994;68:2693–707.
46. Mahieux R, Pecon-Slattery J, Chen GM, Gessain A. Evolutionary inferences of novel simian T lymphotropic virus type 1 from Wild-Caught Chacma (*Papio ursinus*) and olive baboons (*Papio anubis*). *Virology*. 1998;251:71–84.
47. Saksena NK, Herve V, Durand JP, Leguenno B, Diop OM, Digouette JP, et al. Seroepidemiologic, molecular, and phylogenetic analyses of simian T-cell leukemia viruses (STLV-I) from various naturally infected monkey species from central and western Africa. *Virology*. 1994;198:297–310.
48. Schatzl H, Yakovleva L, Lapin B, Rose D, Inzhila L, Gaedigk-Nitschko K, et al. Detection and characterization of T-cell leukemia virus-like proviral sequences in PB1 and tissues of baboons by PCR. *Leukemia*. 1992;6(Suppl 3):1585–605.
49. Sintasath DM, Wolfe ND, LeBreton M, Jia H, Garcia AD, Diffo JLD, et al. Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:175–84.
50. Van Dooren S, Verschoor EJ, Fagrouch Z, Vandamme A-M. Phylogeny of primate T lymphotropic virus type 1 (PTLV-1) including various new Asian and African non-human primate strains. *Infect Genet Evol*. 2007;7:374–81.
51. Seki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:3618–22.
52. Watanabe T, Seki M, Yoshida M. HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology*. 1984;133:238–41.
53. Voevodin AF, Johnson BK, Samilchuk EI, Stone GA, Druilhet R, Greer WJ, et al. Phylogenetic analysis of simian T-lymphotropic virus type I (STLV-I) in common chimpanzees (*Pan troglodytes*): evidence for interspecies transmission of the virus between chimpanzees and humans in Central Africa. *Virology*. 1997;238:212–20.
54. Meertens L, Rigoulet J, Maucière P, Van Beveren M, Chen GM, Diop O, et al. Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: close relationship of STLV-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. *Virology*. 2001;287:275–85.
55. Ayoub A, Michem A, Peeters M, Vercammen F. Full-genome characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 subtype b from a wild-born captive gorilla gorilla gorilla with T-cell lymphoma. *Genome Announc*. 2017;5:e01117-17.
56. Mahieux R, Chappay C, Georges-Courbot MC, Dubreuil G, Maucière P, Georges A, et al. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J Virol*. 1998;72:10316–22.
57. Makuwa M, Souquière S, Clifford SL, Telfer PT, Sallé B, Bourry C, et al. Two distinct STLV-1 subtypes infecting *Mandrillus sphinx* follow the geographic distribution of their hosts. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:1137–43.
58. Liegeois F, Lafay B, Switzer WM, Locatelli S, Mpoudi-Ngolé E, Louf S, et al. Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. *Virology*. 2008;371:405–17.
59. Van Dooren S, Salemi M, Vandamme AM. Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) subtypes. *Mol Biol Evol*. 2001;18:661–71.
60. Mahieux R, Pecon-Slattery J, Gessain A. Molecular characterization and phylogenetic analyses of a new, highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 (STLV-1marc1) in Macaca arctoides. *J Virol*. 1997;71:6253–8.
61. Ibrahim F, de Thé G, Gessain A. Isolation and characterization of a new simian T-cell leukemia virus type 1 from naturally infected cebeles macaques (*Macaca tonkeana*): complete nucleotide sequence and phylogenetic relationship with the Australo-Melanesian human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 1995;69:6980–93.
62. Van Dooren S, Meertens L, Lemey P, Gessain A, Vandamme A-M. Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in *Macaca arctoides*. *J Gen Virol*. 2005;86:1953–9.
63. Calvignac S, Terme J-M, Hensley SM, Jalilou P, Greenwood AD, Hänni C. Ancient DNA identification of early 20th century simian T-cell leukemia virus type 1. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1093–8.
64. Niphuis H, Verschoor EJ, Bontjer I, Peeters M, Heeney JL. Reduced transmission and prevalence of simian T-cell lymphotropic virus in a closed breeding colony of chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *J Gen Virol*. 2003;84:615–20.
65. Leendertz FH, Junglen S, Boesch C, Formenty P, Couacy-Hymann E, Cournaud V, et al. High variety of different simian T-cell leukemia virus type 1 strains in chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) of the Tai National Park, Côte d'Ivoire. *J Virol*. 2004;78:4352–6.
66. d'Offay JM, Eberle R, Sucol Y, Schoelkopf L, White MA, Valentine BD, et al. Transmission dynamics of simian T-lymphotropic virus type 1 (STLV1) in a baboon breeding colony: predominance of female-to-female transmission. *Comp Med*. 2007;57:105–14.
67. Nerrienet E, Amouretti X, Müller-Trutwin MC, Poaty-Mavoungou V, Bedjabaga I, Nguyen HT, et al. Phylogenetic analysis of STLV and STLV type I in mandrills (*Mandrillus sphinx*): indications that intracolony transmissions are predominantly the result of male-to-male aggressive contacts. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14:785–96.
68. Roussel M, Pontier D, Ngoubangoye B, Kazanjji M, Verrier D, Fouchet D. Modes of transmission of simian T-lymphotropic virus type 1 in semi-captive mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Vet Microbiol*. 2015;179:155–61.
69. Allan JS, Leland M, Broussard S, Mone J, Hubbard G. Simian T-cell lymphotropic viruses (STLVs) and lymphomas in African nonhuman primates. *Cancer Invest*. 2001;19:383–95.
70. Enose-Akahata Y, Caruso B, Haner B, Charlip E, Nair G, Massoud R, et al. Development of neurologic diseases in a patient with primate T lymphotropic virus type 1 (PTLV-1). *Retrovirology*. 2016;13:56.
71. Salemi M, Van Dooren S, Audenaert E, Delaporte E, Goubau P, Desmyter J, et al. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. *Virology*. 1998;246:277–87.
72. Touzé E, Gessain A, Lyon-Caen O, Gout O. Tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy in Europe and in Africa: clinical and epidemiologic aspects. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro*. 1996;13(Suppl 1):S38–45.
73. Noda Y, Ishikawa K, Sasagawa A, Honjo S, Mori S, Tsujimoto H, et al. Hematologic abnormalities similar to the preleukemic state of adult T-cell leukemia in African green monkeys naturally infected with simian T-cell leukemia virus. *Jpn J Cancer Res*. 1986;77:1227–34.
74. Sakakibara I, Sugimoto Y, Sasagawa A, Honjo S, Tsujimoto H, Nakamura H, et al. Spontaneous malignant lymphoma in an African green monkey naturally infected with simian T-lymphotropic virus (STLV). *J Med Primatol*. 1986;15:311–8.
75. Tsujimoto H, Noda Y, Ishikawa K, Nakamura H, Fukasawa M, Sakakibara I, et al. Development of adult T-cell leukemia-like disease in African green monkey associated with clonal integration of simian T-cell leukemia virus type I. *Cancer Res*. 1987;47:269–74.

76. McCarthy TJ, Kennedy JL, Blakeslee JR, Bennett BT. Spontaneous malignant lymphoma and leukemia in a simian T-lymphotropic virus type I (STLV-I) antibody positive olive baboon. *Lab Anim Sci.* 1990;40:79–81.
77. Hubbard GB, Moné JP, Allan JS, Davis KJ, Leland MM, Banks PM, et al. Spontaneously generated non-Hodgkin's lymphoma in twenty-seven simian T-cell leukemia virus type 1 antibody-positive baboons (Papio species). *Lab Anim Sci.* 1993;43:301–9.
78. d'Offay JM, Eberle R, Wolf RF, Kosanke SD, Doocy KR, Ayalew S, et al. Simian T-lymphotropic Virus-associated lymphoma in 2 naturally infected baboons: T-cell clonal expansion and immune response during tumor development. *Comp Med.* 2013;63:288–94.
79. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, et al. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology.* 2013;10:118.
80. Homma T, Kanki PJ, King NW, Hunt RD, O'Connell MJ, Letvin NL, et al. Lymphoma in macaques: association with virus of human T lymphotropic family. *Science.* 1984;225:716–8.
81. Srivastava BI, Wong-Staal F, Getchell JP. Human T-cell leukemia virus I provirus and antibodies in a captive gorilla with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 1986;46:4756–8.
82. Voevodin AF, Lapin BA, Yakovleva LA, Ponomareva TI, Oganyan TE, Razmadze EN. Antibodies reacting with human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-I) or related antigens in lymphomatous and healthy hamadryas baboons. *Int J Cancer.* 1985;36:579–84.
83. Ma G, Yasunaga J, Akari H, Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:2216–21.
84. Castro I, Giret TM, Magnani DM, Maxwell HS, Umland O, Perry JK, et al. Cellular immune responses against simian T-lymphotropic virus type 1 target tax in infected baboons. *J Virol.* 2016;90:5280–91.
85. Termini JM, Magnani DM, Maxwell HS, Lauer W, Castro I, Pecotte J, et al. Simian T lymphotropic virus 1 infection of *Papio anubis*: tax sequence heterogeneity and T cell recognition. *J Virol.* 2017;91:e00950-17.
86. Furuta R, Yasunaga J-H, Miura M, Sugata K, Saito A, Akari H, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006722.
87. Yee JL, Montiel NA, Ardeshr A, Ardeshr A, Lerche NW. Constitutive release of IFN $\gamma$  and IL2 from peripheral blood mononuclear cells of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) infected with simian T-lymphotropic virus type 1. *Comp Med.* 2013;63:508–14.
88. Souquière S, Moulinga-Ondeme A, Makuwa M, Hermine O, Kazanjli M. Dynamic interaction between STLV-1 proviral load and T-cell response during chronic infection and after immunosuppression in non-human primates. *PLoS ONE.* 2009;4:e6050.
89. Sugata K, Yasunaga J-H, Miura M, Akari H, Utsunomya A, Nisaka K, et al. Enhancement of anti-STLV-1/HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. *Sci Rep.* 2016;6:27150.
90. Souquière S, Moulinga-Ondeme A, Makuwa M, Beggio P, Radaelli A, De Giori Morghen C, et al. T-cell tropism of simian T-cell leukemia virus type 1 and cytokine profiles in relation to proviral load and immunological changes during chronic infection of naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*). *J Med Primatol.* 2009;38:279–89.
91. Datta A, Bellon M, Sinha-Datta U, Bazarbachi A, Lepelletier Y, Canonio D, et al. Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence. *Blood.* 2006;108:1021–9.
92. Afonso PV, Mekaouche M, Mortreux F, Toulza F, Moriceau A, Wattel E, et al. Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood.* 2010;116:3802–8.
93. Voevodin A, Samilkhuk E, Schätzl H, Boeri E, Franchini G. Interspecies transmission of macaque simian T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in baboons resulted in an outbreak of malignant lymphoma. *J Virol.* 1996;70:1633–9.
94. Dube S, Saksena N, Spicer T, Hesley J, Benz P, Dube DK, et al. Delayed seroconversion to STLV-1 infection is associated with mutations in the pol and rex genes. *Viral J.* 2013;10:282.
95. McGinn TM, Tao B, Cartner S, Schoeb T, Davis I, Ratner L, et al. Association of primate T-cell lymphotropic virus infection of pig-tailed macaques with high mortality. *Virology.* 2002;304:364–78.
96. Kazanjli M, Moreau JP, Mahieux R, Bonnemaïns B, Bomford R, Gessain A, et al. HTLV-1 infection in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) using autologous, homologous, or heterologous HTLV-1-transformed cell lines. *Virology.* 1997;231:258–66.
97. Kazanjli M, Ureta-Vidal A, Ozden S, Tangy F, de Tholsy B, Flette L, et al. Lymphoid organs as a major reservoir for human T-cell leukemia virus type 1 in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): provirus expression, persistence, and humoral and cellular immune responses. *J Virol.* 2000;74:4860–7.
98. Kazanjli M, Héraud J-M, Merien F, Plaque C, de Thé G, Gessain A, et al. Chimeric peptide vaccine composed of B- and T-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 induces humoral and cellular immune responses and reduces the proviral load in immunized squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Gen Virol.* 2006;87:1331–7.
99. Mortreux F, Kazanjli M, Gabet AS, de Tholsy B, Wattel E. Two-step nature of human T-cell leukemia virus type 1 replication in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol.* 2001;75:1083–9.
100. Debaq C, Héraud J-M, Asquith B, Bangham C, Merien F, Moules V, et al. Reduced cell turnover in lymphocytic monkeys infected by human T-lymphotropic virus type 1. *Oncogene.* 2005;24:7514–23.
101. Héraud JM, Mortreux F, Merien F, Contamin H, Mahieux R, Pouliquen JF, et al. The efficacy of combined therapy of arsenic trioxide and alpha interferon in human T-cell leukemia virus type-1-infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Antiviral Res.* 2006;70:132–9.
102. Pise-Masison CA, de Castro-Amarante MF, Enose-Akahata Y, Buchmann RC, Fenizia C, Washington Parks R, et al. Co-dependence of HTLV-1 p12 and p8 functions in virus persistence. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004454.
103. Valeri WW, Hryniewicz A, Andresen V, Jones K, Fenizia C, Baluk I, et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood.* 2010;116:3809–17.
104. McGinn TM, Wei Q, Stallworth J, Fultz PN. Immune responses to HTLV-1(ACh) during acute infection of pig-tailed macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004;20:443–56.
105. Bai XT, Nicot C. Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Front Microbiol.* 2012;3:400.
106. Anupam R, Doueliri R, Green PL. The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Front Microbiol.* 2013;4:275.
107. Belke MA, Theall KP, O'Brien M, Clayton JL, Benjamin SM, Winsor EL, et al. Clinical outcomes and disease progression among patients co-infected with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis.* 2004;39:256–63.
108. Oo Z, Barrios CS, Castillo L, Belke MA. High levels of CC-chemokine expression and downregulated levels of CCR5 during HIV-1/HTLV-1 and HIV-1/HTLV-2 coinfections: CC-chemokines and CCR5 levels during HIV/HTLV coinfections. *J Med Virol.* 2015;87:790–7.
109. Switzer WM, Garcia AD, Yang C, Wright A, Kalish ML, Folks TM, et al. Coinfection with HIV-1 and simian foamy virus in West Central Africans. *J Infect Dis.* 2008;197:1389–93.
110. Switzer WM, Tang S, Zheng H, Shankar A, Sprinkle PS, Sullivan V, et al. Dual simian foamy virus/human immunodeficiency virus type 1 infections in persons from Côte d'Ivoire. *PLoS ONE.* 2016;11:e0157709.
111. Souquière S, Makuwa M, Sallé B, Lepelletier Y, Mortreux F, Hermine O, et al. Immunological alterations and associated diseases in mandrills (*Mandrillus sphinx*) naturally co-infected with SIV and STLV. *Virology.* 2014;454–455:184–96.
112. Traña-Dorge VL, Martin LN, Lorino R, Winsor EL, Belke MA. Human T cell leukemia virus type 1 up-regulation after simian immunodeficiency virus-1 coinfection in the nonhuman primate. *J Infect Dis.* 2007;195:562–71.
113. Harrison LH, Quinn TC, Schechter M. Human T cell lymphotropic virus type I does not increase human immunodeficiency virus viral load in vivo. *J Infect Dis.* 1997;175:438–40.
114. Goldberg TL, Sintasath DM, Chapman CA, Cameron KM, Karesh WB, Tang S, et al. Coinfection of ugandan red colobus (*Procolobus (Ptilocolobus) rufomitratus tephrosceles*) with novel, divergent delta-, lenti-, and spumaretroviruses. *J Virol.* 2009;83:11318–29.

115. Durand JP, Tuppin P, Malson P, Galat G, Galat-Luong A, Jeannel D, et al. Increased risk for a second retroviral infection (SIV or STLV type I) for wild African green monkeys already infected by one retrovirus in Senegal (West Africa). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11:985–8.
116. Belke MA, Dorge VLT, Sirois M, Bhuiyan A, Murphy EL, Walls JM, et al. Relationship between human T lymphotropic virus (HTLV) type 1/2 viral burden and clinical and treatment parameters among patients with HIV type 1 and HTLV-1/2 coinfection. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1229–34.
117. Belke MA, Japa S, Moeller-Hadi C, Martin-Schild S. Tropical spastic paraparesis/human T leukemia virus type 1-associated myelopathy in HIV type 1-coinfected patients. *Clin Infect Dis*. 2005;41:e57–63.
118. Casseb J, Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI, Olah J, Smid J, et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2007;49:231–3.
119. Casseb J, de Oliveira ACP, Vergara MPP, Montanheiro P, Bonasser F, Mellman Ferreira C, et al. Presence of tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy (TSP/HAM)-like among HIV-1-infected patients. *J Med Virol*. 2008;80:392–8.
120. Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2007;9:140–9.
121. Rahimi H, Rezaee SA, Valizade N, Vakili R, Rafatpanah H. Assessment of HTLV-1 proviral load, HIV viral load and CD4 T cell count in infected subjects: with an emphasis on viral replication in co-infection. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17:49–54.
122. Fultz PN, Su L, May P, West JT. Isolation of sooty mangabey simian T-cell leukemia virus type I (STLV-I(sm)) and characterization of a mangabey T-cell line coinfecting with STLV-I(sm) and simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14. *Virology*. 1997;235:271–85.
123. Traña-Dorge V, Blanchard J, Martin L, Murphey-Corb M. Immunodeficiency and lymphoproliferative disease in an African green monkey dually infected with SIV and STLV-I. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8:97–100.
124. Alais S, Pasquier A, Jégado B, Journo C, Rua R, Gessain A, et al. STLV-1 co-infection is correlated with an increased SFV proviral load in the peripheral blood of SFV/STLV-1 naturally infected non-human primates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006812.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## NOUVELLE

### Un double effet antiviral des IFITM sur les virus enveloppés

Brice Jegado<sup>1-3</sup>, Chloé Journo<sup>1,2</sup>, Renaud Mahieux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre international de recherche en infectiologie, laboratoire d'oncogénèse rétrovirale, Inserm U1111, université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, université Lyon, 46, allée d'Italie, F-69007, Lyon, France.

<sup>2</sup>Équipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer.

<sup>3</sup>Labex Écofect.

[renaud.mahieux@ens-lyon.fr](mailto:renaud.mahieux@ens-lyon.fr)

» Au cours d'une infection virale, le virus, « parasite » intracellulaire obligatoire, se multiplie au sein des cellules hôtes. Il libère son génome dans la cellule hôte et détourne les machineries moléculaires de celle-ci afin de se répliquer et de produire de nouvelles particules virales, ou virions, qui infecteront, par la suite, d'autres cellules. Certaines cellules ont cependant la capacité d'interférer avec la réplication virale en exprimant des protéines jouant le rôle de facteurs de restriction. L'expression de ces facteurs est constitutive mais pour la plupart d'entre eux, elle est accrue au cours de la réponse immunitaire antivirale innée. La reconnaissance de motifs viraux par des récepteurs cellulaires de l'immunité innée (ou senseurs) induit, en effet, une

réponse interféron de type I qui, elle-même, gouverne l'expression de nombreux facteurs de restriction.

Une grande diversité de facteurs de restriction a été décrite. Ils agissent sur différents composants du virus comme le génome ou les protéines virales. Ces facteurs peuvent agir sur un virus en particulier, ou sur différentes familles de virus. Par exemple, les facteurs APO-BEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G*) et SAMHD1 (*sterile alpha motif and HD domain 1*) inhibent la transcription inverse du rétrovirus VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) en causant, respectivement, des mutations de glycine en alanine lors de la transcription inverse [1], ou une dimi-

nution de la quantité de dNTP (désoxy-nucléotides triphosphates) cellulaires disponibles [2]. Le facteur MxA (*myxovirus resistance gene A*) agit, quant à lui, sur un large spectre de virus à ARN négatif (comme le bunyavirus, l'hantavirus, l'orthomyxovirus, le paramyxovirus, le rhabdovirus et l'alphavirus) en ciblant les nucléoprotéines qui permettent l'encapsidation du génome viral assurant la réplication et la transcription du virus ; MxA, en formant des oligomères entourant les nucléoprotéines virales, inhibe ces fonctions [3, 4].

Les protéines transmembranaires IFITM (*interferon-induced transmembrane protein*), que nous décrivons par la suite, exercent un effet inhibiteur sur différents virus enveloppés (c'est-à-dire délimités



par une bicouche lipidique dérivée des membranes cellulaires) issus de familles diverses telles les orthomyxovirus, les rétrovirus, les filovirus, les coronavirus, etc. [5] (→).

Ces virus se sont cependant adaptés

au cours de l'évolution et ont développé des mécanismes qui leur permettent d'outrepasser ces facteurs de restriction. Ainsi, le virus VIH-1 exprime des protéines dites auxiliaires, comme Vif (*viral infectivity factor*) qui inhibe APO-BEC3G. De même, les rétrovirus VIH-2 (virus de l'immunodéficience humaine de type 2) et SIVMAC (virus de l'immunodéficience simienne du macaque) produisent la protéine Vpx (*viral protein x*) qui inhibe SAMHD1.

Chez l'homme, trois membres de la famille des IFITM assurent cette action antivirale : les IFITM-1, -2 et -3. Une première série d'études a mis en évidence le mécanisme par lequel ces IFITM peuvent interférer avec la réplication des virus enveloppés. Les IFITM, présents dans la membrane cellulaire, préviennent la libération du virus dans le cytoplasme en inhibant l'étape de fusion entre membranes virales et cellulaires. Des études récentes ont cependant identifié, dans le cas du rétrovirus VIH-1, un mécanisme antiviral supplémentaire pour les facteurs IFITM, notamment pour IFITM-3. IFITM-3 est en effet incorporée dans l'enveloppe des virions, engendrant ainsi une réduction de la capacité fusogène des particules virales et donc de leur pouvoir infectieux [6-8]. Le virus VIH-1 peut toutefois acquérir une résistance à l'action de l'IFITM-3 par des variations de séquence de sa glycoprotéine d'enveloppe gp120 [9].

Se fondant sur ces données, une étude récente collaborative menée par les équipes du centre international de recherche en infectiologie de Lyon (CIRI, U1111), de Tours (U966) et de Paris (UMR955) a cherché à déterminer si la réduction du pouvoir infectieux des virions par les IFITM, identifiée dans le

(→) Voir la Synthèse de K. Tatour et A. Cimarelli, *m/s* n° 4, avril 2015, page 377

cas du VIH-1, pouvait être conservée et rester efficace sur un panel de virus différant en termes de génome, de cycle de réplication et de mode d'assemblage des virions (Figure 1) [10]. Pour cela, l'effet des IFITM a été examiné sur le pouvoir infectieux de quatorze virus regroupant des virus à ARN négatif (le virus de la stomatite vésiculaire, VSV ; le virus de la rougeole, MeV ; le virus Ebola, EBOV ; le virus Dugbe, DUGV ; le virus de la fièvre de la vallée du Rift, RVFV et le virus Mopeia, MOPV), des virus à ARN positif (le virus West Nile, WNV et le virus de l'hépatite C, HCV), des rétrovirus (le virus de l'immunodéficience simienne du macaque, SIVMAC ; le virus de la leucémie murine, MLV ; le virus simien Mason-Pfizer, MPMV) et des virus à ADN (le virus Epstein-Barr, EBV et le virus adéno-associé, AAV). Le rétrovirus VIH-1 a été utilisé comme contrôle de l'action anti-infectieuse des IFITM dans cette étude. Notons que l'ensemble de ces virus, à l'exception d'AAV, possède une enveloppe, ce qui pourrait moduler l'action des IFITM sur ces virus.

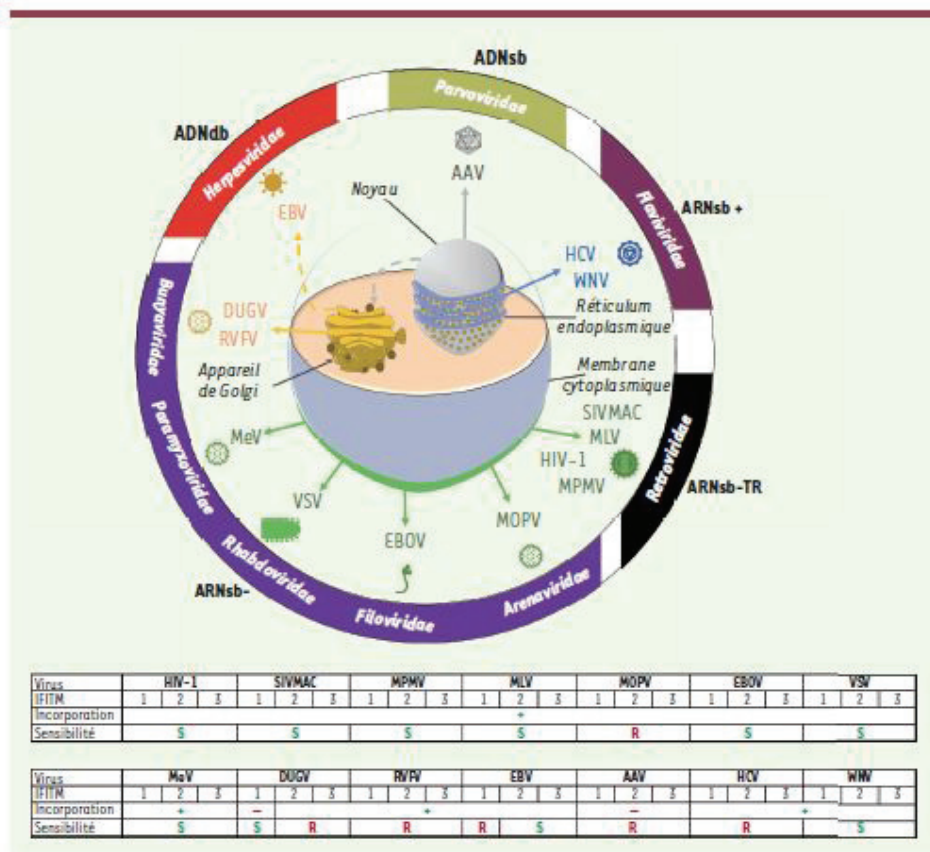
Afin de déterminer l'influence des IFITM sur l'ensemble de ces virus, les particules virales ont été produites dans des cellules qui expriment ou n'expriment pas ces protéines. Le génome viral a été cloné puis éventuellement co-transfecté avec les gènes codant les IFITM. Alternativement, les cellules ont été infectées après transfection d'un IFITM particulier dans des conditions qui s'affranchissent d'une inhibition de l'entrée virale par les IFITM, ce qui permet d'analyser leur impact uniquement sur la production des particules virales infectieuses. Les virions produits dans les cellules exprimant ou non les IFITM ont été ensuite purifiés et quantifiés. À noter que la présence des IFITM n'influence pas la quantité de particules virales produites. L'incorporation des IFITM dans les virions a été détectée par analyse protéique (par *western blot*) pour l'ensemble des virus de l'étude (à l'exception du virus DUGV). Aucune incorporation n'a été détectée pour le virus AAV non-enve-

loppé. L'association d'IFITM aux virions a été confirmée par microscopie électronique pour sept virus (SIVMAC, MLV, MPMV, VSV, MeV et EBV).

Une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 et les protéines IFITM-1, -2 et -3, conduisant à une diminution de l'incorporation des glycoprotéines virales lors de l'assemblage des virions avait été montrée [8]. Contrastant avec ces résultats concernant le VIH-1, aucune diminution de l'incorporation des glycoprotéines virales dans les particules n'a été observée avec les virus enveloppés SIVMAC, MLV, MPMV, VSV, EBOV, MeV et RVFV.

Une diminution du pouvoir infectieux des virions produits par les cellules exprimant les IFITM a été confirmée pour les rétrovirus VIH-1 et SIVMAC (Figure 1). Cette inhibition a également été observée pour d'autres virus comme MLV, MPMV, VSV, MeV, EBOV et WNV. Pour les virus VSV, MeV et EBOV, les résultats des expériences d'inhibition de l'expression des facteurs IFITM endogènes (par *knockdown*) ont confirmé l'effet antiviral des IFITM. Certains virus ne sont cependant pas sensibles à l'action des trois IFITM, mais seulement à l'un ou plusieurs d'entre eux. Les virus HCV, RVFV, MOPV et AAV ne sont par contre pas sensibles à l'influence des IFITM. Il faut toutefois rappeler que la résistance d'AAV aux IFITM n'est pas surprenante du fait de l'absence d'enveloppe virale.

L'incorporation des IFITM dans les virions ne prédit en fait pas un effet antiviral. En effet, les virus qui résistent aux IFITM (à l'exception d'AAV) incorporent également ces protéines dans leur propre enveloppe virale, suggérant que la présence de ces protéines dans les particules néoformées n'est pas suffisante pour réduire le pouvoir infectieux des virions. Inversement, un effet antiviral lié aux IFITM peut s'exercer en l'absence même d'incorporation d'IFITM dans les particules, comme dans le cas du virus DUGV en présence d'IFITM-1. Les IFITM pourraient donc laisser une « empreinte négative » sur les particules virales lors



**Figure 1.** Mode d'assemblage des virions et influence des protéines IFITM sur le pouvoir infectieux des particules virales néoformées. Les différents virus sont représentés avec leur caractéristique génomique et leur groupe d'appartenance. ARNs- : génome à ARN simple brin de polarité négative ; ARNs-TR : génome à ARN simple brin et nécessitant une transcriptase inverse ; ARNs+ : génome à ARN simple brin de polarité positive ; ADNs : génome à ADN simple brin ; ADNsdb : génome à ADN double brin. Les virus étudiés sont indiqués. VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ; SIVMAC : virus de l'immunodéficience

simienne du macaque ; MPMV : virus simien Mason-Pfizer ; MLV : virus de la leucémie murine ; MOPV : virus Mopeia ; EBOV : virus Ebola ; VSV : virus de la stomatite vésiculaire ; MeV : virus de la rougeole ; DUGV : virus Dugbe ; RVFV : virus de la fièvre de la vallée du Rift ; EBV : virus Epstein-Barr ; AAV : virus adéno-associé ; HCV : virus de l'hépatite C ; WNV : virus West Nile. Les tableaux récapitulent le rôle des IFITM pour chaque virus, à savoir leur incorporation dans les particules virales (indiquée par + ou -) ; La résistance ou la sensibilité des virus aux IFITM sont notées respectivement par R et S (adapté de [10]).

de leur assemblage dans les cellules productrices, et cela indépendamment de leur incorporation dans les particules virales. Des études antérieures avaient montré, dans le cas du rétrovirus VIH-1, que les glycoprotéines d'enveloppe virale pouvaient être impliquées dans la sensibilité des virions aux IFITM [9, 11, 12]. Le mode d'assemblage des virions pourrait ainsi moduler l'effet antiviral des IFITM. Afin d'identifier le facteur déterminant la sensibilité des virus aux IFITM, des permutations génétiques ont été réalisées entre les séquences nucléotidiques des capsides des virus sensibles (VIH-1

et VSV) et celles des glycoprotéines d'enveloppe des virus résistants (HCV et RVFV), produisant ainsi des virus pseudotypés. Le pouvoir infectieux des virions a été évalué et les résultats obtenus suggèrent que la nature de la capside, donc le mode d'assemblage des virions, et non celle de la glycoprotéine d'enveloppe, détermine la sensibilité d'un virus aux protéines IFITM. Les protéines IFITM agissent sur le pouvoir infectieux des particules virales néoformées mais elles protègent également les cellules d'une nouvelle infection. Il était donc intéressant d'examiner si ces deux mécanismes coexistaient

au sein d'une même cellule infectée. Pour cela, des cellules exprimant la protéine IFITM-3 de façon inducible ont été infectées par différents virus et la capacité d'IFITM-3 à protéger les cellules a été évaluée peu après l'infection afin d'analyser l'efficacité du premier cycle de la réplication virale. En parallèle, des infections à long terme ont été réalisées afin d'étudier le pouvoir infectieux des virions nouvellement produits par la cellule en présence ou en l'absence d'expression d'IFITM-3. Ces deux analyses montrent à la fois une protection des cellules cibles en présence d'IFITM-3, et une réduction du pouvoir infectieux des



virions produits, et cela pour des virus aussi différents que le VIH-1 et l'EBOV. L'IFITM reste actuellement le seul facteur connu pour présenter une capacité d'altérer le cycle viral à deux étapes distinctes. Cette inhibition bimodale du pouvoir infectieux des virus par les protéines IFITM, lors de l'entrée virale, d'une part, et lors de la production de virions, d'autre part, est conservée pour un très large panel de virus. Pourtant, peu de données existent concernant les partenaires cellulaires d'IFITM qui participeraient à cette activité antivirale. Des travaux se sont intéressés aux cofacteurs cellulaires qui pourraient participer à l'activité antivirale des protéines IFITM. Lors de l'entrée virale, IFITM-3 pourrait ainsi interagir avec la protéine VAPA (*vesicle-associated membrane protein [VAMP]-associated protein A*) dans les endosomes et inhiber son interaction avec OSBP (*oxysterol-binding protein*). Ceci affecterait la régulation intracellulaire du cholestérol, engendrant son accumulation dans la membrane de l'endosome, ce qui interférerait avec la fusion des membranes virales et cellulaires [13]. Les souris déficientes pour la protéine ZMPSTE24 (*zinc metalloproteinase STE24*), une

métalloprotéase transmembranaire qui peut être co-immunoprécipitée avec les IFITM, présentent, après infection par le virus Influenza, une charge virale plus importante et un taux de mortalité plus élevé que les souris sauvages [14], suggérant que ZMPSTE24 pourrait contribuer à l'activité antivirale des IFITM.

Les rôles des cofacteurs cellulaires dans l'activité antivirale des IFITM restent donc à étudier. Nous pouvons cependant concevoir que les modifications des membranes endosomales ou virales pourraient interférer avec les cycles de réplication d'un grand nombre de virus enveloppés. ♦

#### The double antiviral effect of IFITM is conserved in many species of enveloped viruses

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Mallim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002; 418: 646-50.
2. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpr. *Nature* 2011; 474: 654-7.

3. Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31: 79-87.
4. Matzinger SR, Carroll TD, Dutra JC, et al. Myxovirus resistance gene A (MxA) expression suppresses influenza A virus replication in alpha interferon-treated primate cells. *J Virol* 2013; 87: 1150-8.
5. Tartour K, Gimarelli A. Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *Med Sci (Paris)* 2015; 31: 377-82.
6. Compton AA, Bruel T, Parrot F, et al. IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* 2014; 16: 736-47.
7. Tartour K, Appourchaux R, Gaillard J, et al. IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* 2014; 11: 103.
8. Yu J, Li M, Wilkins J, et al. IFITM proteins restrict HIV-1 infection by antagonizing the envelope glycoprotein. *Cell Rep* 2015; 13: 145-56.
9. Wang Y, Pan Q, Ding S, et al. The VS loop of HIV-1 Env determines viral susceptibility to IFITM3 impairment of viral infectivity. *J Virol* 2017; 91: e02441-16.
10. Tartour K, Nguyen XN, Appourchaux R, et al. Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006610.
11. Foster TL, Wilson H, Iyer SS, et al. Resistance of transmitted founder HIV-1 to IFITM-mediated restriction. *Cell Host Microbe* 2016; 20: 429-42.
12. Wu WL, Grafefend CR, Tsai MT, et al. Delta20 IFITM2 differentially restricts X4 and R5 HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 7112-7.
13. Amini-Bavil-Olyaei S, Choi YJ, Lee JH, et al. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 452-64.
14. Fu B, Wang L, Li S, Dorf ME. ZMPSTE24 defends against influenza and other pathogenic viruses. *J Exp Med* 2017; 214: 919-29.

## La réplication virale par expansion clonale a-t-elle un lien avec le cancer viro-induit ?

Brice Jegado<sup>1,2</sup>  
Renaud Mahieux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> International Center for Research in Infectiology, laboratoire Oncogénèse Rétrovirale, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Université Lyon, 69007, Lyon, France  
<sup>2</sup> Équipe labellisée « Fondation pour la Recherche Médicale » et Labex Ecofect  
<renaud.mahieux@ens-lyon.fr>

Il y a quelques années, l'équipe de Simon Wain-Hobson expliquait enfin à la communauté comment l'infection par le rétrovirus oncogène humain HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus type 1*) pouvait associer une forte charge provirale, *i.e.* un nombre élevé de copies du virus intégrées dans le génome cellulaire, et une faible variabilité génétique. Le travail, mené par Eric Wattel, démontrait clairement que le virus promeut la division des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés, un processus nommé « expansion clonale ». Ainsi, le nombre de copies virales peut augmenter indépendamment de l'activité de la transcriptase inverse virale [1]. Un groupe anglais développa ensuite un protocole de séquençage massif des sites d'intégration virale [2]. Il confirma d'abord les résultats initialement obtenus, et démontra ensuite qu'HTLV-1 provoquait aussi l'expansion clonale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infectés, dans lesquels, cependant, la diversité de clones est plus grande et l'abondance clonale plus faible [3].

Un autre rétrovirus BLV, qui infecte naturellement les bovins et provoque chez eux une leucémie, peut être utilisé pour infecter expérimentalement des moutons, chez lesquels il induit rapidement des tumeurs. Il apparaissait donc logique de tester si ce virus pouvait aussi provoquer l'expansion clonale des cellules qu'il infecte. Les données démontrèrent rapidement et de manière claire que comme HTLV-1, BLV pouvait provoquer l'expansion clonale des cellules infectées chez le mouton. Une information supplémentaire et importante apportée par ce papier [5] qui démontrait que la sélection naturelle favorisait le maintien de clones dans lesquels l'insertion provirale est localisée dans des régions transcrites du génome du mouton, notamment dans les régions promotrices et régulatrices [4]. Des travaux récents ont démontré que BLV et HTLV-1 avaient une certaine tendance à s'intégrer à proximité de gènes dits « cancer drivers » à la fois chez les humains souffrant d'ATL (*Adult T-cell Leukemia*), chez les moutons artificiellement infectés par BLV et ayant développé un lymphome, mais aussi chez les individus infectés mais asymptomatiques, suggérant par là-même que des altérations supplémentaires sont requises pour promouvoir le cancer [5].

À l'issue de ce travail, la communauté s'est intéressée à ce concept, et a cherché à déterminer si un rétrovirus apparenté à HTLV-1, *i.e.* HTLV-2, pouvait aussi provoquer une expansion clonale des cellules infectées. *In vivo*, HTLV-2 infecte les cellules T CD8<sup>+</sup> principalement mais ne cause pas de leucémie. L'on pouvait alors se demander si l'une des différences entre HTLV-1 et BLV d'une part et HTLV-2 d'autre part ne résidait pas dans l'incapacité de ce dernier à provoquer l'expansion clonale des cellules infectées. De façon surprenante, il fut cependant démontré qu'HTLV-2 aussi pouvait provoquer l'expansion clonale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infectés, un argument allant à l'encontre de l'hypothèse selon les cancers viro-induits pourraient être uniquement une conséquence de l'expansion clonale induite par ces rétrovirus. Il existe cependant des différences notables entre les résultats obtenus pour ces deux virus. D'une part, le profil oligoclonal révèle un nombre de sites uniques d'intégration (*i.e.* un nombre de clones identifiés) inférieur dans le cas d'HTLV-2. D'autre part, la distribution clonale d'HTLV-2 n'est pas modifiée au cours du temps [6].

doi:10.1684/vic.2018.0746

Tirés à part : R. Mahieux



Un autre contre-exemple à la théorie selon laquelle l'expansion clonale était une marque du cancer fut plus récemment apporté par les équipes de S. Hugues et de K. Sato [7, 8]. Leurs travaux démontrèrent en effet que l'infection par le VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) était, elle aussi, associée à ce phénomène d'expansion clonale chez des patients infectés ou dans un modèle murin, contribuant à la persistance des cellules infectées, notamment dans le cas d'un traitement antirétroviral.

Enfin, nos travaux (Jegado, *et al.* *HTLV European Research Network, HERN*, Beyrouth 29-30 juin 2018) prouvent que l'infection par le spumavirus, qui est asymptomatique, est, elle aussi, associée à une expansion clonale des cellules infectées.

Ainsi, comme ces différentes études l'ont démontré, la seule expansion clonale des cellules infectées par un rétrovirus n'est pas nécessairement corrélée au profil symptomatique ou non de l'hôte, et n'est donc pas suffisante pour déclencher un cancer. De ce fait, ces données nous permettent de supposer que l'expansion clonale des cellules infectées n'est pas directement liée à l'apparition d'un cancer viro-induit chez l'hôte, mais que des événements perturbateurs additionnels et ultérieurs sont à l'origine de cette évolution vers le stade tumoral.

L'hypothèse selon laquelle l'expansion clonale de cellules infectées par un virus était une marque de cancer était donc simpliste et fautive, mais a néanmoins permis de faire émerger des nouvelles données qui ont fait progresser notre compréhension de la biologie des rétrovirus.

**Remerciements.** Hélène Dutartre (PhD) et Chloé Journo (PhD) pour leur relecture et leurs conseils.

**Liens d'intérêts** des auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

### Références

1. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 1995; 69(5): 2863-8.
2. Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, *et al.* The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 2011; 117(11): 3113-22.
3. Melamed A, Laydon DJ, Al Khatib H, Rowan AG, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8(+) T cells in natural infection. *Retrovirology* 2015; 12: 91.
4. Gillet NA, Cook L, Laydon DJ, Hlela C, Verdonck K, Alvarez C, *et al.* Strongyloidiasis and infective dermatitis alter human T lymphotropic virus-1 clonality in vivo. *PLoS Pathog* 2013; 9(4): e1003263.
5. Rosewick N, Durkin K, Artesi M, Marçais A, Hahaut V, Griebel P, *et al.* Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat Commun* 2017; 8: 15264.
6. Melamed A, Witkover AD, Laydon DJ, Brown R, Ladell K, Miners K, *et al.* Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog* 2014; 10(3): e1004006.
7. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, *et al.* HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 2014; 345(6193): 179-83.
8. Satou Y, Katsuya H, Fukuda A, Misawa N, Ito J, Uchiyama Y, *et al.* Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Sci Rep* 2017; 7(1): 6913.

## Évolution virale lors de changements d'environnement ou d'hôte : points clés du symposium « *Evolution virale* »

Stéphanie Jacquet<sup>1,2,a</sup>

Brice Jegado<sup>1,3,a</sup>

Léa Picard<sup>1,2,a</sup>

Gonzalo Moratorio<sup>4,5</sup>

Lucie Etienne<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIRI, Centre international de recherche en infectiologie, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France <Lucie.etienne@ens-lyon.fr>

<sup>2</sup> Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de biométrie et biologie évolutive UMR 5558, F-69622, Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Équipe oncogénèse rétrovirale, labellisée « Ligue nationale contre le cancer » et Labex Ecofect, Lyon, France

<sup>4</sup> Viral Populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Paris, France

<sup>5</sup> Molecular Virology Laboratory, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>a</sup> Contribution égale des auteurs

Les virus évoluent dans un environnement en perpétuel changement. Ils circulent d'un hôte à un autre, font face à différents types de tissus ou de cellules chez l'hôte qu'ils infectent et sont constamment déifiés par des réponses immunitaires diverses. Ils sont donc continuellement soumis à des pressions de sélection pour « survivre » et exploiter les ressources cellulaires de leurs hôtes. De manière générale, leur réplication souvent rapide combinée à la grande taille de leurs populations et à un taux de mutation parfois élevé confèrent à certains virus un degré de variabilité important, qui leur permet, en retour, une adaptation à ces nouveaux environnements. Ceci représente un problème majeur pour notre société, tant les dernières avancées préventives et thérapeutiques sont mises à l'épreuve par les virus (ré)-émergents (ex. Ebola, SARS, grippe) ou résistants aux traitements. Dans le contexte d'émergence de maladies infectieuses, la caractérisation des changements génomiques ayant permis une adaptation virale à un nouvel environnement/hôte est primordiale pour comprendre les mécanismes et facteurs sous-jacents de l'émergence de nouveaux virus. L'obtention de données conséquentes sur les génomes viraux, notamment via le développement de techniques de séquençage haut débit, ainsi que les récentes expériences d'évolution virale expérimentale, ont permis de mettre en lumière les différents processus évolutifs impliqués. Ces processus incluent, notamment, l'apparition de mutations ponctuelles maintenues par une sélection positive, l'acquisition de nouveaux gènes au cours de transferts horizontaux entre hôte et virus, et la variation du nombre de copies des gènes viraux. Ces trois mécanismes (figure 1) ont notamment été discutés au Symposium S72 « *Evolution virale* » lors de la conférence internationale « *Evolution* » qui s'est tenue à Montpellier au mois d'août 2018. Les présentations sur ces processus évolutifs sont résumées ici.

### Adaptation par l'apparition de mutations ponctuelles

La confrontation des virus à des pressions de sélection induites par des environnements variables va impacter la diversité génétique des populations virales par l'apparition de mutations ponctuelles au sein du génome viral. Ce type d'évolution virale a été discuté lors du symposium dans différents contextes. Les mutations ponctuelles correspondent à des altérations nucléotidiques dans la séquence virale après un cycle de réplication. Ainsi, le génome présent dans les particules virales néoformées diffère du génome initial. Les variants conférant un avantage sélectif peuvent ensuite augmenter en fréquence dans la population et être fixés par sélection positive.

\*Ce symposium s'est tenu lors de la conférence internationale « *Evolution* », Montpellier, août 2018.

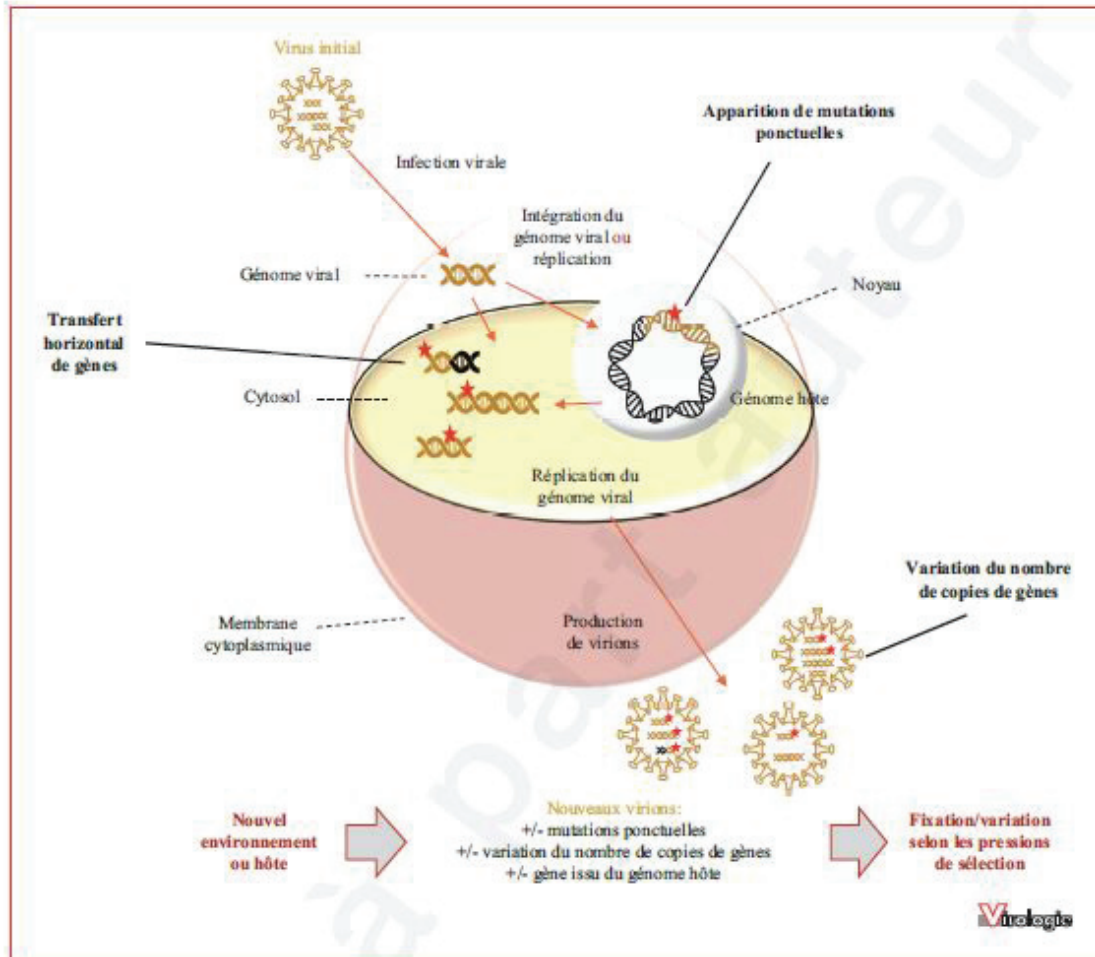


Figure 1. Exemples de mécanismes d'évolution virale liés aux changements d'environnement ou d'hôte qui ont été discutés lors du symposium « Evolution virale » au congrès international « Evolution » se tenant à Montpellier (2018) : acquisition de mutations ponctuelles, transfert horizontal de gènes et variation du nombre de copies de gènes. Une cellule eucaryote est schématisée mais le processus peut également être appliqué aux procaryotes et archées.

Si l'on compare le génome d'une population virale ancestrale (ou de référence) à celui d'une population virale adaptée à un hôte spécifique ou à des hôtes multiples, la diversité génétique sera plus importante pour une population ayant la capacité de se répliquer chez plusieurs hôtes. En outre, en utilisant les baculovirus comme modèles, Herniou *et al.* (2018) [1] montrent que plus un hôte est sensible à une infection virale plus la diversité génétique virale sera faible. Par ailleurs, il apparaît que certains virus développent un ensemble de mutations spécifiques, leur permettant de se

répliquer chez un ou plusieurs hôtes susceptibles. Ceci a, par exemple, été montré par Ayansola *et al.* (2018) [2] pour le bactériophage ØX174 lors de passages successifs chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. L'analyse du génome du bactériophage après séquençage haut débit a permis de caractériser des mutations ponctuelles et spécifiques d'un hôte donné, mais aussi des mutations partagées et retrouvées après des passages successifs entre ces deux hôtes. La diversité au sein du génome viral peut être favorisée lors de multiples infections virales au sein d'un même hôte.

Dans certains cas, la présence de différents génomes viraux au sein de cellules hôtes infectées conduit à une potentialisation de la production de virions. Des modèles d'analyses et des simulations informatiques ont montré que cette diversité est dépendante de la synergie de production de virions, de la fréquence d'apparition d'une co-infection, de l'influence des pressions de sélection et aussi de la compétition entre les virus pour les ressources cellulaires (Leeks *et al.*, 2018) [3].

### Adaptation par transfert horizontal de gènes

Le transfert horizontal de gènes – processus dans lequel une espèce acquiert du matériel génétique provenant d'une autre espèce par des moyens asexués – est un deuxième puissant mécanisme évolutif permettant aux virus de s'adapter à un nouvel environnement/hôte. En intégrant l'information génétique d'un hôte, un virus augmente son répertoire génétique et peut acquérir *de novo* des fonctions ou des propriétés métaboliques ; un mécanisme pour s'adapter rapidement à de nouveaux environnements. L'intégration puis le maintien d'un gène ou d'un élément transposable de l'hôte dans le génome viral semble relativement fréquent chez plusieurs familles virales.

Par exemple, Loiseau *et al.* (2018) [4] ont mis en évidence pas moins de 68 000 gènes provenant d'hôtes lépidoptères au sein d'une population de baculovirus AcMNPV (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*). La moitié de ces gènes représente des éléments transposables. Si cela témoigne de la fréquence des transferts horizontaux, le rôle potentiel des virus en tant que transporteurs de gènes entre différentes espèces hôtes est aussi mis en exergue.

De même, il a été montré qu'une grande fraction des gènes codés par les grands virus nucléocytoplasmiques à ADN, comme les *Poxviridae*, est d'origine eucaryote. De manière intéressante, la plupart de ces gènes sont des modulateurs du système immunitaire de l'hôte. Les transferts horizontaux de gènes chez ces virus apparaissent donc comme une véritable stratégie d'adaptation pour contrer les défenses immunitaires. Néanmoins, les mécanismes régissant ces transferts sont peu connus. Elde *et al.* (2018) [5] se sont intéressés à la question en utilisant le virus *Vaccinia* (*Poxviridae*). Via une démarche intégrative combinant des analyses évolutives expérimentales à des approches de génomique, les auteurs ont mis en évidence l'action d'éléments transposables (LINE-1 en particulier) dans l'acquisition de gènes d'hôtes par le virus *Vaccinia*. D'autre part, l'insertion de ces nouveaux gènes dans le

génome viral se ferait préférentiellement dans les régions flanquantes, et non dans la région des gènes « core », n'altérant donc pas les fonctions virales essentielles.

### Adaptation par variation du nombre de copies de gènes

Un autre mécanisme d'adaptation virale discutée lors du symposium repose sur une base quantitative au cours de laquelle le nombre de copies de chacun des gènes viraux varie. Les virus à génome segmenté exploitent particulièrement ce mécanisme, en variant le nombre de copies des segments (et donc *in fine* des gènes) et en échangeant en outre du matériel génétique entre eux. Les profils et niveaux d'expression des gènes sont variables entre différents hôtes, impactant ainsi les phénotypes. Par exemple, chez l'arbovirus de la fièvre catarrhale ovine (FCO), les résultats préliminaires de Moreau et collègues (2018) [6] suggèrent que les proportions des segments pourraient être un élément clé à l'alternance entre deux hôtes très dissemblables. Ce mécanisme serait donc majeur pour l'adaptabilité des virus à des environnements différents.

Les pressions de sélection seraient également variables entre segments, selon les gènes qu'ils portent et leurs rôles au cours de l'infection. Dans le cas du virus de la FCO, Jacquot et collègues (2018) [7] observent que les gènes relatifs à l'immunité ont été particulièrement soumis à une sélection diversifiante, *i.e.* sélection naturelle qui favorise plusieurs allèles/variants dans la population. Des événements de balayage sélectif, qui correspondent à la fixation d'une mutation avantageuse au détriment de tout autre type de mutation, peuvent notamment permettre à des gènes de s'imposer dans tous les fonds génétiques des souches circulantes.

Alors que de nombreux virus présentent des génomes segmentés, certains vont également encapsider les segments de manière indépendante, ce que nous pourrions considérer instinctivement comme pouvant provoquer une perte importante de fitness. Toutefois, cette organisation, appelée « multipartite », est très fréquente chez les virus de plantes (40 % du genre). Récemment, il a également été identifié chez les moustiques le premier virus animal multipartite, le virus Guaico *Culex* (GCXV) (Ladner *et al.*, 2016) [8]. Ainsi, deux questions majeures se posent : quel est le coût de ce phénomène pour le virus ? Pour quelles raisons une caractéristique apparemment aussi coûteuse existe-t-elle ? En utilisant un système expérimental, Zwart et collègues [9] montrent qu'une relation proportionnelle entre le niveau d'expression d'un gène et le nombre de copies apparaît tout particulièrement quand le

nombre de segments viraux indépendants augmente (Zwart *et al.*, 2018). Toutefois, la fréquence de chaque segment est variable et la perturbation d'une des fréquences conduit à un nouvel équilibre entre ces fréquences. Cet équilibre des fréquences est extrêmement dépendant du système hôte-virus. Ceci suggère que la fréquence de chaque segment empaqueté est un facteur important pour l'adaptabilité des virus multipartites à des environnements variables. En effet, les virus multipartites peuvent s'adapter rapidement et sans mutation à de nouveaux environnements, par des changements de proportions de chaque segment quand ils sont confrontés à un goulot d'étranglement. Ceci semble leur conférer un avantage compétitif dans des environnements extrêmement hétérogènes, par rapport aux virus monopartites qui seraient adaptés à l'ensemble de ces environnements.

Les différentes études présentées lors de ce symposium permettent de se rendre compte de la diversité des processus d'évolution virale, en particulier en contexte d'environnement/hôte changeant. Ces études, utilisant des approches expérimentales et des analyses variées, soutiennent qu'en dépit des contraintes (fonctions virales essentielles, taille de génome, taux d'erreur, etc.), les virus sont capables d'accumuler de la variabilité, de manière qualitative et quantitative (*i.e.*, mutations nucléotidiques et/ou augmentation du répertoire génomique) pour répondre avec efficacité aux pressions de sélection auxquelles ils font continuellement face.

**Remerciements.** Le symposium S72 « *Virus Evolution* » de la conférence internationale *Evolution Montpellier 2018* a reçu le soutien financier de la Société Française de Virologie, du Journal of General Virology, et de l'ANR LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048 de l'Université de Lyon, programme « Investissements d'Avenir » (ANR-11-

IDEX-0007) opéré par l'Agence nationale de la recherche française). Nous remercions Renaud Mahieux pour ses retours sur le manuscrit.

**Liens d'intérêts:** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet éditorial.

### Références

1. Herniou E, Chateigner A, Moreau Y. *Baculovirus adaptation in varying environment. Oral communication.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
2. Ayansola O, Dickins B. *Viral host adaptation: allelic and fitness variation during host switching. Oral communication.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
3. Leeks A, West S. *Synergistic coinfection and the diversity of viral infections. Poster.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
4. Loiseau V, Moreau Y, Labrousse C, Herniou E, Cordaux R, Gilbert C. *Long-read sequencing reveals the full diversity and structure of host sequences integrated into AcMNPV baculovirus genomes during infection. Oral communication.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
5. Elde N, Fixsen S, Cone K. *Evolution of large DNA viruses: The secrets of gene thieves. Oral communication.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
6. Moreau Y, Breard E, Cil P, Loire E, Gutiérrez S. *Variations of genes copy number in populations of Bluetongue-virus. Poster.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
7. Jacquot M, Yadav S, Nomikou K, Palmarini M, Rao PP, Biek R. *Contrasting selective patterns across the genome of a segmented vector-borne virus in a reassortment hotspot. Poster.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.
8. Ladner JT, Wiley MR, Beitzel B, *et al.* A Multicomponent Animal Virus Isolated from Mosquitoes. *Cell Host & Microbe* 2016; 20: 357-67.
9. Zwart M, Elena S. *On the evolution of multipartite viruses: genome segmentation as a mechanism for rapid adaptation to heterogeneous environments. Oral communication.* Montpellier: Symposium Virus Evolution S72, II Joint Congress in Evolutionary Biology, 2018.