



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Rémi Planès**

**le 28 octobre 2013**

**Titre :**

La protéine Tat du VIH-1 active la voie TLR4: Effets sur l'expression des facteurs immunosuppresseurs IL-10, PD-L1 et IDO

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Immunologie

**Unité de recherche :**

INSERM U1043 Equipe 8 (Davrinche/Izopet)

**Directeur(s) de Thèse :**

Elmostafa BAHRAOUI

**Jury :**

Pr HAZAN Uriel (Rapporteur)

Pr CORBEAU Pierre (Rapporteur)

Dr EMILIANI Stéphane (Examineur)

Pr PRATS Hervé (Examineur)

Pr CHAP Hugues (Président du jury)



# Résumé

---

## Introduction :

Au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) on observe une augmentation progressive de l'expression des molécules inhibitrices du système immunitaire (IL-10, PD-L1 et IDO) principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (DCs). Ces molécules agissent négativement sur la réponse immunitaire anti-VIH et sont associées à la persistance du virus et à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA. Une des protéines virales impliquée dans ce mécanisme est la protéine Tat. En plus de son rôle direct dans la transactivation du génome viral, Tat est sécrétée par les cellules infectées et se retrouve à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans le sérum des patients. Dans la circulation, Tat interagit avec les cellules immunitaires et module l'expression de nombreux facteurs incluant des facteurs immunosuppresseurs. Les travaux précédents du laboratoire, ont montré que Tat agit au niveau membranaire, par son domaine N-terminal 1-45, afin de stimuler l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , et immunosuppressives IL-10 par les monocytes et les macrophages humains. Plus récemment, la recherche du récepteur membranaire recruté par Tat a permis de mettre en évidence l'implication du TLR4/MD2 dans l'interaction avec Tat.

## Objectifs :

Mon projet de thèse qui s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire a pour objectif 1) de caractériser davantage le rôle du TLR4 comme récepteurs de Tat en utilisant une approche basée sur des modèles murins invalidés (KO) pour le TLR4 ou ses partenaires moléculaires (CD14, MD2, MyD88, TRIF) 2) d'étudier l'effet de la protéine Tat et de son interaction avec le TLR4 sur la modulation de la fonction des DCs incluant : la production de cytokines, la maturation, l'expression des facteurs immunosuppresseurs et la capacité à activer/inhiber les lymphocytes T.

## Résultats :

L'utilisation du modèle de souris KO nous a permis de confirmer le rôle central du TLR4/MD2 comme récepteur de la protéine Tat ainsi que de mieux comprendre le mécanisme moléculaire mis en jeu par Tat pour induire la production de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  impliquant le TLR4 mais également les cofacteurs CD14 et MD2 ainsi que l'activation des deux voies de signalisation MyD88 et TRIF dépendantes.

L'étude des effets de l'interaction Tat-TLR4 sur la modulation de la réponse immunitaire des DCs nous a permis de montrer que i) Tat induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12 et des IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  en plus de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  ; ii) Tat induit la maturation des DCs en augmentant l'expression de CD83, CD80, CD86 ; iii) Tat stimule l'expression des facteurs immunosuppresseurs IL-10, PD-L1 et IDO associées à une inhibition de la prolifération des LT ; iv) l'ensemble de ces effets sont abolis ou inhibés en bloquant l'interaction Tat-TLR4.

## Conclusions :

Nos résultats suggèrent que le VIH-1, par l'intermédiaire de sa protéine Tat, détourne le TLR4 à la surface des CPA pour induire la production de facteurs pro-inflammatoires et stimuler l'expression des molécules immunosuppressives directement associées à la perte de fonction du système immunitaire. Il n'est donc pas exclu que Tat, à cause de son expression précoce, contribue à instaurer un état immunosuppresseur très tôt après l'infection et serait aussi impliquée dans l'affaiblissement du système immunitaire et la persistance virale.

# Abstract

---

## Introduction:

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is associated with a gradual increase in the expression of inhibitory molecules including IL-10, PD-L1 and IDO essentially by antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DCs). These molecules act negatively on the anti-HIV immune response and are associated with viral persistence and disease progression towards AIDS. One of the viral protein involved in this mechanism is Tat. In HIV-1 infected patients, Tat is secreted in the sera at nanomolar levels. In addition to its role in viral cycle, Tat interacts with immune cells to modulate the expression of many host genes including immunosuppressive factors. Previous work from our laboratory have shown that Tat protein, by acting at the membrane level, via its 1-45 N-terminal domain, stimulates the expression of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , and immunosuppressive IL-10 production in human monocytes and macrophages. More recently, we have shown the involvement of TLR4/MD2 in the interaction with Tat.

## Objective:

The objective of my thesis was to 1) Further characterize the implication of TLR4/MD2 as potential receptor of Tat protein. To this end mouse models invalidated (KO) for TLR4 or its molecular partners (CD14, MD2, MyD88, TRIF) were used 2) Study the effect of Tat protein and its interaction with TLR4/MD2 on the modulation of DCs functions including cytokine production, maturation, and the expression of immunosuppressive factors and their effects on the stimulation or inhibition of T cells activation.

## Results:

The use of knockout mouse models has allowed us to confirm the central role of TLR4/MD2 as receptor for Tat protein and to better understand the signalling pathways recruited by Tat to stimulate the production of IL-10 and TNF- $\alpha$ . Our results showed the importance of CD14 and MD2 in addition to TLR4 and demonstrated that Tat activates both TRIF and MyD88-dependent pathways.

In parallel, the study of the effects of Tat-TLR4 interaction on the modulation of the immune response of DCs allowed us to show that i) Tat induces the production of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-12 and IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in addition to IL-10 and TNF- $\alpha$  ii) Tat induces the maturation of DCs by increasing the expression of CD83, CD80, CD86 and iii) Tat stimulates the expression of immunosuppressive factors IL-10, PD-L1 and IDO in association with the inhibition of T cells proliferation. iv) All these effects were abolished or inhibited following the blockade of Tat-TLR4 interaction.

## Conclusions:

Our results suggest that HIV-1 by its Tat protein hijacks TLR4 pathway in APCs to induce the production of pro-inflammatory and immunosuppressive factors which are associated with the impairment of immune functions. It is therefore possible that, because of its early expression, Tat may help to establish an immunosuppressive state early after infection and thus contributed in the weakening of the immune system and viral persistence.

# Sommaire

---

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I-LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) .....</b>	<b>1</b>
<b>A-Le VIH-1 parmi les virus et les rétrovirus.....</b>	<b>1</b>
1. Les virus.....	1
2. Les rétrovirus .....	2
a) Les rétrovirus endogènes et exogènes .....	2
b) Classification des rétrovirus exogènes.....	2
c) Le génome des rétrovirus .....	3
3. Les virus de l'immunodéficience humaine .....	4
a) Données épidémiologiques .....	4
b) Découverte des virus de l'immunodéficience humaine .....	5
c) Origine et diversité des virus de l'immunodéficience humaine.....	5
<b>B-Biologie du VIH-1.....</b>	<b>7</b>
1. Structure de la particule virale .....	7
2. Le génome.....	8
3. Les protéines virales .....	9
4. Le cycle viral .....	10
a) L'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible.....	11
Le récepteur CD4 .....	11
Les corécepteurs CCR5 et CXCR4.....	12
Le mécanisme de l'entrée du VIH-1.....	12
Le tropisme du VIH-1 .....	14
b) La décapsulation et la réverse transcription.....	15
c) Intégration dans le génome cellulaire .....	18
d) Transcription du provirus .....	18
Activation en <i>Cis</i> de la transcription .....	19
<i>Trans</i> -activation de la transcription par la protéine tat .....	19
Transcription du génome du VIH-1 .....	21
e) Traduction des protéines virales .....	22
f) Assemblage et bourgeonnement.....	24
g) Maturation des virions .....	25
<b>C-De l'infection au VIH-1 au Syndrome D'immunodéficience Acquise .....</b>	<b>26</b>
1. La primo-infection.....	26
2. La phase asymptomatique .....	27
3. Le stade SIDA.....	28

## **II-DETOURNEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFECTION AU VIH-1 ..... 29**

<b>A-Les cellules dendritiques .....</b>	<b>30</b>
1. Généralités.....	30
a) Les cellules dendritiques chez l'homme.....	31
b) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	31
c) Les cellules dendritiques myéloïdes .....	31
d) Les cellules dendritiques dérivées de monocyte (MoDC).....	31
2. La détection des signaux de danger .....	33
a) Les différents signaux de danger.....	33
b) Les récepteurs des motifs conservés des pathogènes (PRR).....	33
c) Les récepteurs « toll-like ».....	35
d) Le TLR4 et ses cofacteurs : CD14 et MD2.....	37
e) Détournement du TLR4 par les virus et par le VIH-1 .....	38
3. Capture des antigènes .....	39
4. Maturation des cellules dendritiques.....	39
5. Apprêtement et présentation des antigènes .....	40
a) Présentation par le CMH-I.....	40
b) Présentation par le CMH-II.....	41
c) La présentation croisée .....	42
d) Présentation par les molécules du CMH non-classique.....	42
6. Production de cytokines .....	42
a) Le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF- $\alpha$ ).....	42
b) L'interleukine 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) .....	43
c) L'interleukine 6 (IL-6).....	43
d) L'interleukine 12 (IL-12) .....	44
7. Activation et polarisation des lymphocytes T.....	44
8. Les facteurs immunosuppresseurs.....	50
a) L'interleukine 10 (IL-10).....	50
b) Le système PD-1/PD-L1 .....	51
c) L'indoléamine 2,3 dioxygénase .....	55
<b>B-Immunopathologie de l'infection au VIH-1.....</b>	<b>60</b>
1. La destruction des lymphocytes T CD4+ .....	60
a) Effets cytolytique direct du VIH-1 .....	61
b) Induction de la mort par apoptose .....	62
c) Destruction par la réponse antivirale.....	62
d) Formation de syncytia .....	62
2. Affaiblissement du système immunitaire .....	62
a) Le paradoxe de la réponse inflammatoire .....	63
Dérégulation du réseau de cytokines .....	63
Augmentation de l'IFN- $\alpha$ .....	64

Augmentation du TNF- $\alpha$ .....	65
Augmentation de l'IL-6 .....	65
b) L'augmentation des facteurs immunosuppresseurs .....	66
Augmentation de l'IL-10 .....	66
Augmentation du système PD-1/PD-L1 .....	67
Augmentation de IDO .....	71
Autres facteurs immunosuppresseurs .....	74
c) Dérégulation des réponses T auxiliaires .....	75
<b>C-Détournement des cellules dendritiques myéloïdes .....</b>	<b>77</b>
1. Le VIH-1 détourne les DCs pour atteindre ses cibles préférentielles les LT .....	78
a) La <i>cis</i> -infection .....	78
b) La <i>trans</i> -infection .....	78
2. Déplétion des cellules dendritiques.....	80
a) Déplétion via l'activation chronique .....	80
b) Déplétion via la lyse par les cellules NK .....	80
c) Déplétion via l'inhibition des précurseurs hématopoïétiques .....	81
3. Le VIH-1 détourne les DCs pour échapper au système immunitaire.....	81
a) Echappement du VIH-1 à la reconnaissance .....	81
b) Induction d'une tolérance au VIH-1 .....	83
<b>III-LA PROTEINE TAT DU VIH-1 .....</b>	<b>85</b>
<b>A-Structure de Tat : du gène à la protéine .....</b>	<b>85</b>
1. Le gène codant Tat.....	85
2. La protéine Tat .....	85
3. Structure de la protéine Tat.....	85
<b>B-Effets extracellulaires, intracellulaires et membranaires de Tat.....</b>	<b>87</b>
1. Sécrétion de Tat .....	87
2. Internalisation de Tat.....	87
3. Tat se fixe à des récepteurs membranaires.....	89
<b>C-Propriétés immuno-modulatrices de Tat.....</b>	<b>91</b>
1. Propriétés immunosuppressives de Tat .....	91
a) Tat inhibe la prolifération des lymphocytes T .....	91
b) Tat inhibe l'autophagie .....	91
c) Tat induit l'expression de facteurs immunosuppresseurs.....	92
d) Tat interfère avec la réponse immune antivirale <i>in vivo</i> .....	93
2. Tat : un activateur du système immunitaire.....	94
a) Tat stimule la production de cytokines pro-inflammatoires.....	94

b) Tat induit la production de chimiokines .....	94
c) Tat induit la maturation des cellules dendritiques.....	95
d) Propriétés adjuvantes de Tat .....	95
<b>D-Tat une cible thérapeutique .....</b>	<b>97</b>
<b>PROBLEMATIQUE .....</b>	<b>98</b>
<b>OBJECTIFS DE CETTE ETUDE .....</b>	<b>99</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>100</b>
<b>Article 1 : La protéine Tat du VIH-1 active la voie TLR4/MD2 pour induire la production d'IL-10 et de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>100</b>
<b>Article 2 : La protéine Tat du VIH-1 induit l'expression deIDO dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes via un mécanisme direct : effet sur la prolifération des lymphocytes T .....</b>	<b>131</b>
<b>Article 3 : La protéine Tat du VIH-1 augmente l'expression de PD-L1 à la surface des cellules dendritiques de manière TNF-<math>\alpha</math> dépendante : implication de la voie TLR4.....</b>	<b>166</b>
<b>DISCUSSION/CONCLUSION .....</b>	<b>193</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>204</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>230</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>231</b>
<b>1) POSTER présenté au congrès « frontières of retrovirology » : La protéine Tat du VIH-1 induit la production deIDO dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes via un mécanisme direct : effet sur la prolifération des lymphocytes T .....</b>	<b>231</b>
<b>2) REVUE : La protéine Tat du VIH-1 induit la production d'IL-10 et de TNF-<math>\alpha</math> dans les monocytes et les macrophages humains .....</b>	<b>233</b>



# Introduction

## I-LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

### A-Le VIH-1 parmi les virus et les rétrovirus

#### 1. Les virus

Les virus sont des particules inertes qui contiennent une information génétique sous forme d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou d'acides ribonucléiques (ARN). Ce génome est protégé par un assemblage de protéines, la capsid. Certains virus contiennent en plus une enveloppe composée par une bicouche lipidique empruntée à leurs cellules hôte. Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui détournent la machinerie cellulaire de leur hôte à leur profit afin d'assurer leurs multiplication par réplication. Parmi les différentes familles de virus connus, les Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) appartiennent à la famille des *Retroviridae*.

Classification criteria	RNA														DNA							
	Icosahedral							Helical							Icosahedral		Helical		Complex			
Symmetry of capsid	Naked							Enveloped							Naked		Enveloped		Enveloped (cytoplasmic)			
Naked or enveloped	Naked							Enveloped							Naked		Enveloped		Enveloped (cytoplasmic)			
Genome architecture	ds 10-18 seg.	ds 2 seg.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss cont.	(+) ss 2 copies	(+) ss cont.	(-) ss cont.	(-) ss cont.	(-) ss 3 seg.	(-) ss 8 seg.	(-) ss cont.	(-) ss 2 seg.	ss linear (+) or (-)	ds circular	ds linear	ds circle gapped	ds linear	ds linear	ds circular	ds linear (x linked)
Baltimore class	III	III	IV	IV	IV	IV	VI	IV	V	V	V	V	V	V	II	I	I	I	I	I	I	I
Properties	Reo	Birna	Calici	Picorna	Flavi	Toga	Retro	Corona	Filo	Rhabdo	Bunya	Orthomyxo	Paramyxo	Arena	Parvo	Papova	Adeno	Hepadna	Herpes	Irido	Baculo	Pox
Virion polymerase	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Virion diameter (nm)	60-80	60	35-40	28-30	40-50	60-70	80-130	80-160	80 x 790-14,000	70-85 x 130-380	90-120	90-120	150-300	50-300	18-26	45-55	70-90	42	150-200	125-300	60 x 300	170-200 x 300-450
Genome size (total in kb)	22-27	7	8	7.2-8.4	10	12	3.5-9	16-21	12.7	13-16	13.5-21	13.6	16-20	10-14	5	5-8	36-38	3.2	120-200	150-350	100	130-280

Figure 1 Diversité et classification des virus.

Ce tableau se propose de hiérarchiser les virus selon cinq caractéristiques principales incluant : 1) La nature de l'acide nucléique (ARN ou ADN) ; 2) la symétrie de la capsid ; 3) la présence ou non d'une enveloppe ; 4) l'architecture du génome viral ; 5) la stratégie de réplication des virus proposée selon D. Baltimore qui est elle-même divisée en 7 groupes I) ADN double brins; II) ADN simple brin de polarité +; III) ARN double brins ; IV) ARN simple brin de polarité +; V) ARN simple brin de polarité - VI) ARN simple brin de polarité + avec une étape de réverse transcription pour former un ADN double brins au cours du cycle viral ; VII) ADN double brins avec formation d'un intermédiaire ARN au cours du cycle viral. Les propriétés des virus sont également indiquées incluant la famille des virus (suivie par le suffixe -viridae), la présence ou non d'une polymérase virale, les dimensions du virus et de la capsid, et la taille du génome en kb. D'après (<http://www.nlv.ch/Virologytutorials/Classification.htm>).

## 2. Les rétrovirus

### a) Les rétrovirus endogènes et exogènes

Les rétrovirus appartiennent à une grande famille de virus portant un génome diploïde sous forme d'ARN simple brin, linéaire, non-segmenté, et de polarité positive. Contrairement aux autres familles de virus à ARN de polarité positive où l'ARN génomique est directement pris en charge par la machinerie cellulaire comme un ARN messager afin d'assurer la production des protéines virales (Picorna, Flavi, Calici, Astro, Toga, Corona, arteri, noda, tetravirus), la stratégie de répllication des rétrovirus repose sur la transcription inverse (retro-transcription). Cette étape est assurée par une enzyme virale, la reverse transcriptase, qui possède une activité ADN polymérase ARN-dépendante. Elle convertit l'ARN viral simple brin en ADN double brin ([Baltimore 1970](#)). Cet ADN migre ensuite dans le noyau où il est intégré au génome de la cellule hôte sous forme de provirus. Le provirus, sert ensuite de matrice pour la formation de l'ARN et des protéines virales qui vont s'assembler pour former de nouveaux virions ([Hu and Hughes 2012](#)). Cette stratégie répllicative propre aux rétrovirus permet au virus intégré d'assurer sa persistance qui est alors étroitement liée à la survie de la cellule infectée. Les rétrovirus peuvent également s'insérer dans la lignée germinale puis être transmis par voie verticale à la descendance. En plus des rétrovirus exogènes, l'analyse de génomes des vertébrés a permis de mettre en évidence la présence de séquences de rétrovirus endogènes (ERV), résultats de l'intégration de rétrovirus, qui persistent comme des vestiges d'infections ancestrales. Chez l'homme, ces rétrovirus endogènes (HERV) représentent plus de 8 % du génome humain ([van der Kuyl 2012](#)). Ces séquences ont probablement joué un rôle important au cours de l'évolution, avec pour exemple le processus de placentation qui est réalisé grâce à l'expression de gènes rétroviraux ([Haig 2012](#)). Les rétrovirus exogènes, eux, ne sont pas présents naturellement dans l'organisme. Pour se multiplier ils ont besoin d'infecter une cellule hôte. Le premier rétrovirus exogène humain, impliqué dans le développement d'une leucémie des lymphocytes T, a été isolé par l'équipe de Robert Gallo en 1980 et nommé le HTLV-1 (human T cell leukemia virus) ([Gallo and Reitz 1985](#)).

### b) Classification des rétrovirus exogènes

Les rétrovirus exogènes sont groupés à l'intérieur de la grande famille des *Retroviridae*. Cette famille se divise phylogénétiquement en deux sous-familles, les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae*.

**Les *Orthoretrovirinae*** se composent de six genres : Alpharetrovirus (ex: Virus du Sarcome de Rous), Betaretrovirus (ex: Virus de la Tumeur Mammaire de la Souris), Gammaretrovirus (ex: Virus de la Leucémie Murine), Deltaretrovirus (ex: Virus T-Lymphotrope Humain), Epsilonretrovirus (ex: Walley Dermal Sarcoma Virus) et Lentivirus auxquels appartiennent les Virus de l'Immunodéficience Humaine. L'infection par les lentivirus se caractérise par des maladies chroniques à évolution lente. Parmi les lentivirus, on retrouve différents groupes de virus infectant chacun une espèce particulière de mammifères : les bovins par le « bovine immunodeficiency virus » (BIV), les équidés par le « equine infectious anemia virus » (EIAV), les félins par le « feline immunodeficiency virus (FIV), les caprins par les virus « caprine arthritis-encephalitis virus » (CAEV) et « Maedi-visna virus » (MVV)

infectant respectivement les chèvres et les moutons et les primates par les Virus de l'Immunodéficience Humaine/Simienne (VIH et VIS).

**Les *Spumaretrovirinae*** ne se composent que du genre spumavirus dont les virus types sont le « human » et « simian foamy virus » (HFV et SFV). Ils sont responsables d'infections persistantes dans de nombreuses espèces animales. Ils ont été isolés chez les primates (y compris les humains), les bovins, les chats, les hamsters, et les chevaux mais ils n'ont aucun pouvoir pathogène connu. Cette famille de virus tient son nom du terme latin spuma, l'écume, en raison de l'apparition d'un aspect de mousseux dans des cultures cellulaires infectées *in vitro* du à l'effet cytopathique du virus.

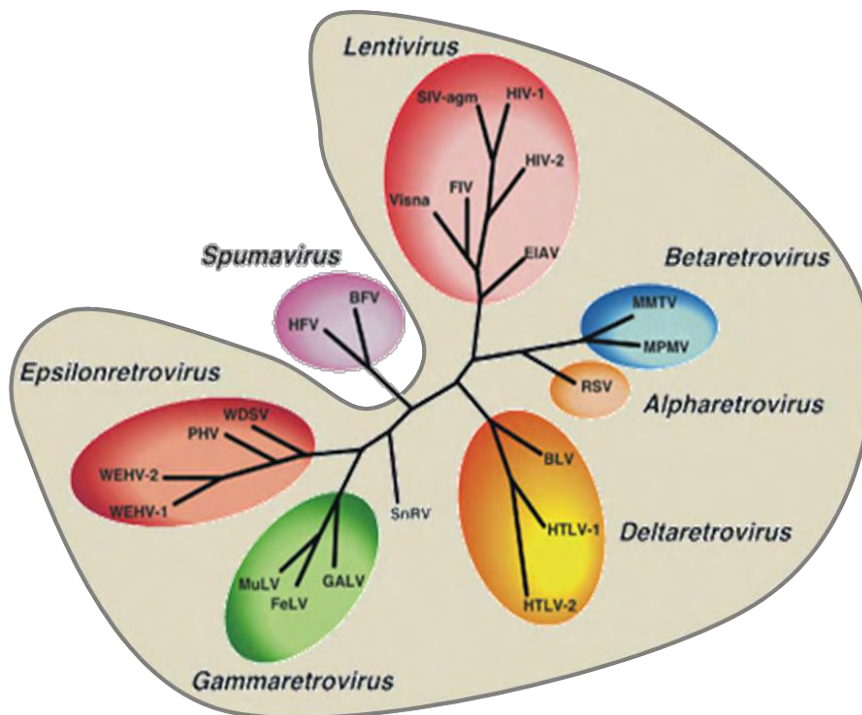


Figure 2 Phylogénie des rétrovirus exogènes.

Données basées sur la comparaison de la séquence en acides aminés de la transcriptase inverse de différents rétrovirus. D'après « virus Classification » by Claude M. Fauquet et John R. Schrock disponible sur le site (<http://www.emporia.edu/ksn/v53n1-april2006/>).

### c) Le génome des rétrovirus

Selon la complexité de leur génome, les rétrovirus ont été divisés en deux classes : les rétrovirus simples et complexes. Les rétrovirus simples possèdent une structure génomique qui comprend trois gènes de base communs à l'ensemble des rétrovirus. Les gènes *gag*, *pol* et *env*. Ils permettent la synthèse des différentes protéines structurales et enzymes essentielles à l'infection et à la réplication du virus. Le gène *gag*, code pour les protéines de structures du virus telles que la matrice, la capside et la nucléocapside. Le gène *pol* fournit l'information nécessaire à l'expression de la transcriptase inverse (RT) et de l'intégrase (IN). Le gène *env* code pour les protéines transmembranaires de l'enveloppe telles que les glycoprotéines gp120 et gp41 pour le VIH-1. De plus, tous les rétrovirus contiennent une petite séquence codante qui contient l'information pour la

synthèse de la protéase du virion (PR). Dans le cas du VIH-1, cette séquence est située au sein du gène *pol*. Le génome des rétrovirus est flanqué à ses deux extrémités 5' et 3' par de longues séquences répétées « long terminal repeat » (LTR). En plus de ces quatre gènes fondamentaux, les rétrovirus « complexes » dont fait partie le VIH codent pour une batterie supplémentaire de protéines régulatrices et accessoires qui participent à différentes étapes du cycle viral et favorisent l'infectivité, la pathogénèse et la persistance virale ([Johri, Mishra et al.](#)).

### 3. Les Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine (VIH)

#### a) Données épidémiologies

Le Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis (SIDA) est un problème majeur de santé publique. Plus de 60 millions de personnes ont été infectées par le VIH-1 depuis le début de l'épidémie. 25 millions de personnes en sont décédées dont 1.7 millions en 2011 (ONUSIDA 2012). L'épidémie touche l'ensemble de la planète. D'après les données de l'ONUSIDA, on estime que 34 millions de personnes sont porteuses du VIH à travers le monde en 2011 dont près de 24 millions sur le continent Africain. En France, on dénombre 150 000 cas (Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'InVS du 20 novembre 2012). Malgré les politiques de prévention et le développement de nouvelles thérapies antirétrovirales, le SIDA reste l'une des maladies infectieuses la plus meurtrière du XXI<sup>ème</sup> siècle.

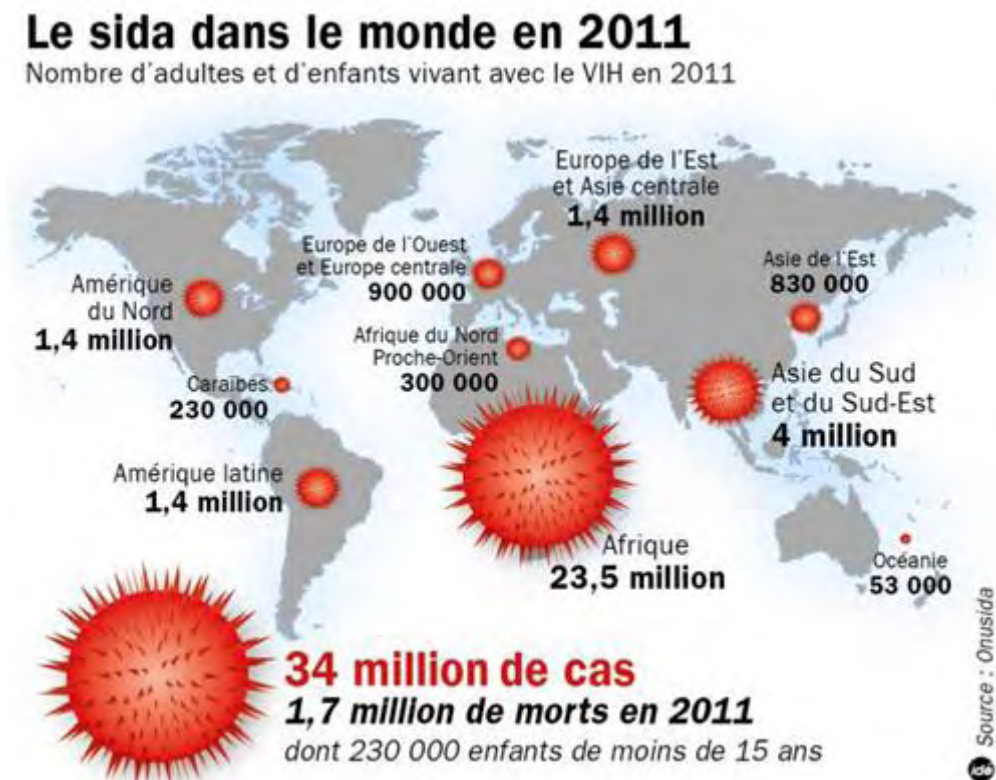


Figure 3 Le SIDA dans le monde en 2011.

Représentation schématique de la pandémie du SIDA dans le monde en 2011 d'après les derniers rapports de l'Onusida. Les chiffres indiquent le nombre de personnes infectées par le VIH dans les différentes régions du globe. Données Onusida.

## **b) Découverte des virus de l'immunodéficience humaine**

Les premiers cas de SIDA ont été rapportés au début des années 1980. Cette pathologie s'accompagne par le développement d'infections rares et généralement bénignes telles que des pneumocystoses à *pneumocystis jirovici*, des candidoses à *candida albicans*, des toxoplasmoses à *toxoplasma gondii* ainsi que des proliférations tumorales (sarcome de Kaposi, lymphomes non Hodgkiniens) et des réactivations de virus latents (CMV, EBV et VZV). Cette nouvelle pathologie a une incidence particulièrement élevée chez des patients polytransfusés, des homosexuels, ou des toxicomanes. Dès lors, la communauté scientifique s'est lancée à la recherche d'un agent transmissible par voie sexuelle et par voie sanguine.

C'est en 1983, dans l'équipe du professeur Montagnier à l'institut Pasteur de Paris que fut apporté la première démonstration de la nature virale de l'agent responsable du SIDA ([Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983](#)). Ce nouveau virus présente un tropisme pour les lymphocytes T (LT) et fut nommé LAV (Lymphodénopathie associated virus). La même année, d'autres équipes rapportent également l'isolement d'un virus associé au SIDA, dont l'équipe du professeur Gallo pour le HTLV-III ([Sarngadharan, DeVico et al. 1984](#)), et l'équipe du professeur Levy pour le ARV (AIDS Related Virus) ([Luciw, Potter et al. 1984](#)). En 1985, l'équipe du Pr Gallo démontra qu'il s'agissait en réalité du même virus triplement nommé LAV, HTLV-III et ARV ([Ratner, Gallo et al. 1985](#)). Afin de clarifier la situation, la commission de nomenclature virologique se réunit en mai 1986 et nomma l'agent étiologique du SIDA le Virus de l'immunodéficience humaine VIH-1. La même année un second virus apparenté au VIH-1 fut isolé chez des patients atteints du SIDA originaires d'Afrique de l'ouest. Il a été nommé VIH-2 ([Clavel, Guetard et al. 1986](#)).

## **c) Origine et diversité des virus de l'immunodéficience humaine**

Les VIH-1 et VIH-2 trouvent leurs origines au sein des rétrovirus simiens du genre lentivirus les SIV (Simien Immunodeficiency Virus). Des études génétiques ont mis en évidence une organisation du génome similaire entre les SIV et les VIH. Les différents travaux ont pu mettre en évidence une très forte homologie de séquence entre les virus SIV des sooty mangabey (SIVsmm) de la côte ouest Africaine et le VIH-2 alors que le VIH-1 semble plus fortement apparenté au SIV des chimpanzés (SIVcpz) et plus particulièrement des chimpanzés *Pan troglodytes* du sud du Cameroun. Ainsi l'origine des VIH est le résultat d'un passage du SIV à l'homme, associé à des mutations qui ont favorisé leur adaptation chez leurs nouveaux hôtes humains. Cependant, l'introduction du VIH-1 à l'homme n'est pas le produit d'un évènement unique. Il semblerait que le passage de la barrière d'espèce a eu lieu plusieurs fois et de manière indépendante. Ces différents passages ont donné lieu à quatre groupes distincts de VIH-1 : les groupe M, N, O et P ([Sharp and Hahn 2011](#)).

Le groupe M est le groupe majoritaire, qui est à l'origine de la pandémie du VIH-1. La diversité génétique retrouvée aux seins du groupe M a donné lieu a une distinction en 11 sous-types (de A à K) regroupés en fonction de leur homologie de séquence. Le sous-type B est le plus répandu en occident, le sous-type C en inde, le sous-type E en Asie alors qu'en Afrique, tous les sous-types sont représentés. Le groupe O, est moins répandu. Il représente moins de 1% des infections mondiales au VIH-1 et se retrouve majoritairement au Cameroun, au Gabon et dans les pays

limitrophes. Le groupe N, est très rare et compte seulement 13 cas documentés au Cameroun. Le groupe P a été découvert chez une femme camerounaise vivant en France en 2009. Ce virus semble phylogénétiquement plus distant du SIVcpz mais plus étroitement lié au SIV des gorilles (SIVgor) ([Sharp and Hahn 2011](#)).

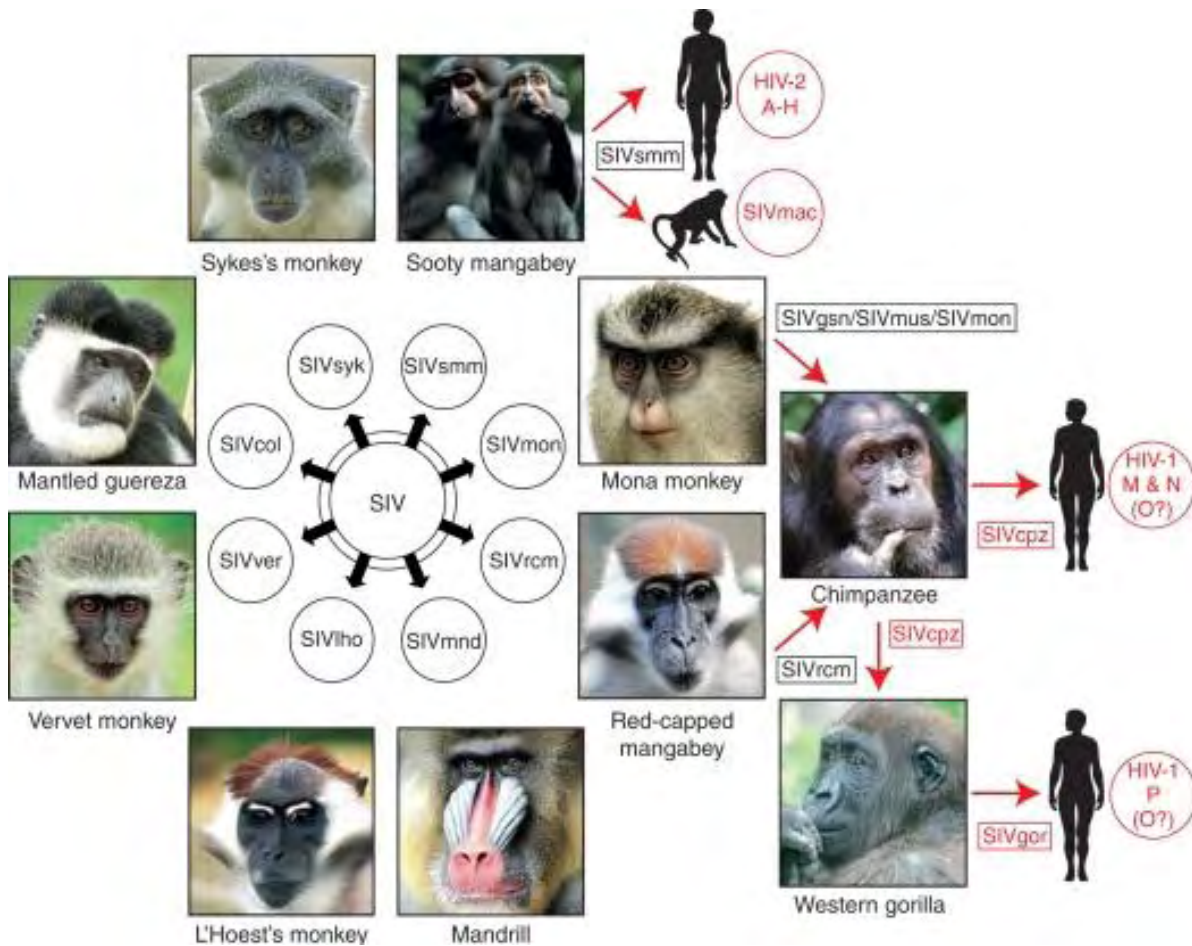


Figure 4 Origine et diversité des VIH.

Les primates non-humain sont naturellement infectés par différent lentivirus, appelé les « simian immunodeficiency viruses (SIVs) ». SIV est suivi par un suffixe qui désigne leurs hôtes de primate d'origine (par exemple, SIVsmm sooty mangabeys). Plusieurs de ces SIV ont franchi la barrière des espèces pour générer de nouveaux agents pathogènes chez l'homme. Des exemples connus de transmissions inter-espèces, sont surlignées en rouge. D'après ([Sharp and Hahn 2011](#)).

Sachant que les SIV sont endémiques aux singes depuis plusieurs milliers d'années, on peut s'interroger comment ces virus sont-ils passés chez l'homme pour donner lieu à une véritable pandémie à la fin du XXème siècle? Plusieurs hypothèses ont tenté d'expliquer ce passage de la barrière d'espèce comme la polémique concernant le vaccin contre la poliomyélite à la fin des années 1950 préparé sur des cellules de reins de singes qui auraient pu être contaminés par le SIV ou la théorie du chasseur qui à été exposé à du sang d'animaux porteurs du SIV. Quelles que soient les circonstances, il semble clair que selon la biologie du virus le passage du singe à l'homme a eu lieu suite à une exposition avec du sang ou des cellules d'animaux contaminés par le SIV. De manière intéressante, des mécanismes similaires de transmission zoonotique ont été rapporté pour un autre

rétrovirus, le Simian Foamy Virus. Ce virus a été détecté dans le plasma de donneurs vivant sur le continent Africain (République démocratique du Congo, Cameroun et Gabon) et la séroprévalence peut atteindre jusqu'à 10-18% chez les personnes qui affirment avoir été exposé à du sang de singe ([Switzer, Tang et al. 2012](#)). Les premières traces du VIH-1 ont été retrouvées chez l'homme en 1959 grâce à une étude rétrospective de banques de sang. Des études phylogénétiques et statistiques ont permis de dater l'émergence du VIH-1 groupe M entre 1910 et 1930. La zone géographique à l'origine de l'épidémie du VIH-1 a également pu être identifiée. Il semblerait que le virus ait émergé à l'ouest de l'Afrique centrale et plus particulièrement aux alentours de Kinshasa (anciennement Léopoldville). A cette époque la ville est en pleine expansion démographique et économique. C'est dans ce contexte que semble s'expliquer l'émergence de l'épidémie du SIDA qui s'étend désormais à toutes les régions du globe ([Sharp and Hahn 2011](#)).

## B-Biologie du VIH-1

### 1. Structure de la particule virale

La particule virale infectieuse mesure approximativement 100-120 nm de diamètre. Elle est composée d'une bicouche lipidique empruntée à la membrane plasmique de la cellule hôte et porte à sa surface les glycoprotéines d'enveloppe gp41 et gp120. D'autres protéines cellulaires se retrouvent également associées à la membrane virale suite au bourgeonnement des particules virales. Sous la membrane virale on retrouve une structure protéique sphérique, la matrice, composée de protéine p17 (MA). Au centre de la particule mature se trouve une structure conique condensée composée de protéine p24 de la capside (CA). L'intérieur de la capside renferme les enzymes virales reverse transcriptase (RT) et intégrase (IN) ainsi que le complexe de protéine de la nucléocapside (NC) étroitement associé avec l'ARN viral génomique.

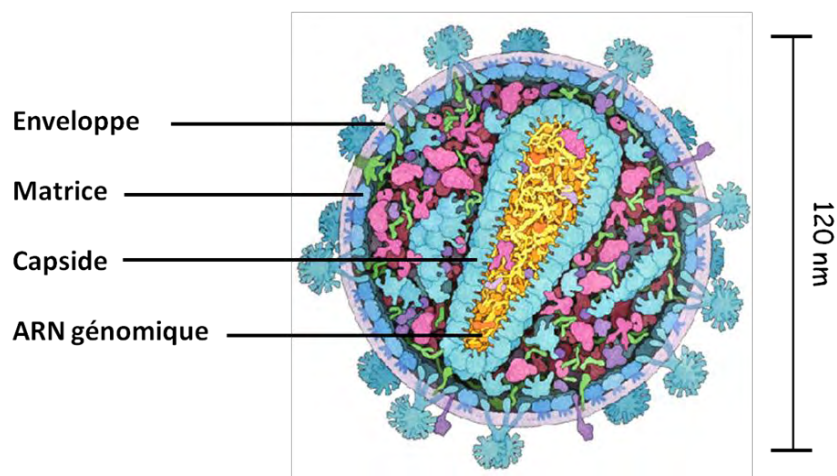


Figure 5 Structure de la particule du VIH-1.

Représentation schématique d'une particule de VIH-1. Les différents éléments sont détaillés dans le texte. D'après le site : <http://www.pdb.org>.

## 2. Le génome

Le matériel génétique du VIH-1 se compose de deux fragments identiques d'ARN simple brin de polarité positive mesurant chacun 9.7 kb. En partant de l'extrémité 5' de l'ARN viral linéaire, on retrouve : une coiffe de 7-méthylguanosine (m7G) ; la région 5' UTR (untranslated region) composée des séquences répétées R et de la séquence unique 5 (U5) ; le transcrit des gènes *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, et *nef* ; la région 3' UTR composée de la séquence unique 3 (U3) et de la seconde copie de la région R ; enfin, la région 3' de l'ARN viral comporte une queue poly adénosine.

La région 5'UTR de l'ARN viral contient des séquences importantes qui jouent un rôle clé dans les étapes de réverse transcription, transcription, traduction et encapsidation du génome viral. Ces séquences ARN se structurent en une série de tiges-boucles et se succèdent de 5' vers 3' de la manière suivante : la région TAR qui lie la protéine Tat ; la séquence signal de poly adénylation polyA, la région pbs qui fixe l'ARNt lysine afin d'initier la réverse transcription, la séquence « Dimer initiation site » (DIS) impliquée dans la dimérisation des deux molécules d'ARN génomiques, le site donneur d'épissage (SD), la séquence d'encapsidation  $\Psi$  (psi) et le codon d'initiation de la traduction AUG ([D'Souza and Summers 2005](#)).

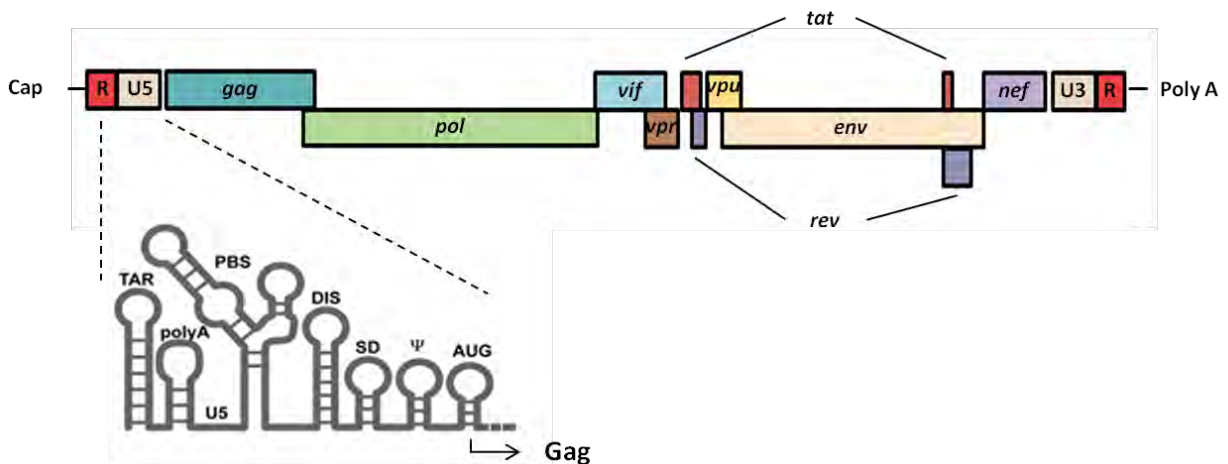


Figure 6 Organisation de l'ARN génomique du VIH-1.

Représentation schématique de l'ARN génomique du VIH-1 de 5' vers 3'. Les différentes régions sont détaillées dans le texte. Modifié d'après ([D'Souza and Summers 2005](#)).

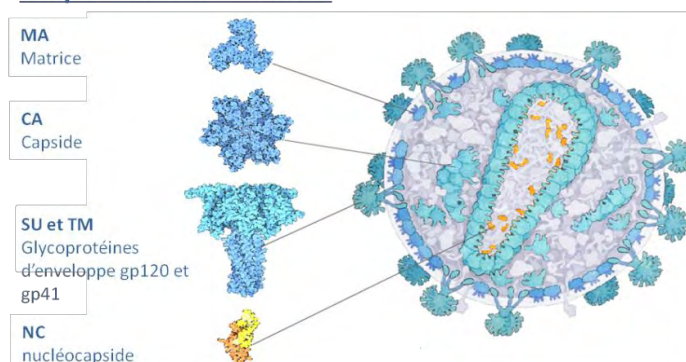


### 3. Les protéines virales

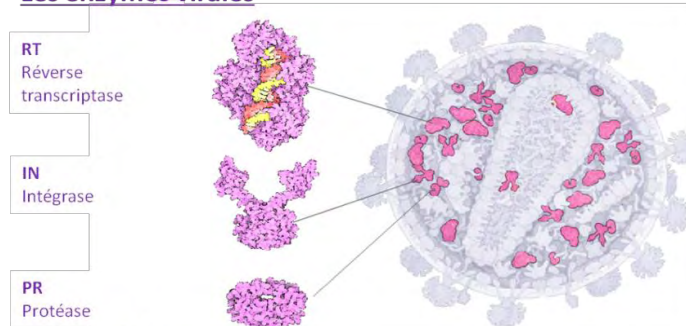
Le génome viral code pour trois grandes familles de protéines :

- Les protéines de structure qui déterminent le tropisme, assurent l'architecture du virus et protègent le matériel génétique.
- Les enzymes virales possèdent une activité enzymatique qui est absente de la cellule cible et dont le virus a besoin pour effectuer un cycle productif.
- Les protéines accessoires qui participent à différentes étapes du cycle viral et jouent un rôle majeur *in vivo* en augmentant l'infectivité et la pathogénicité du virus.

#### Les protéines de structure



#### Les enzymes virales



#### Les protéines accessoires

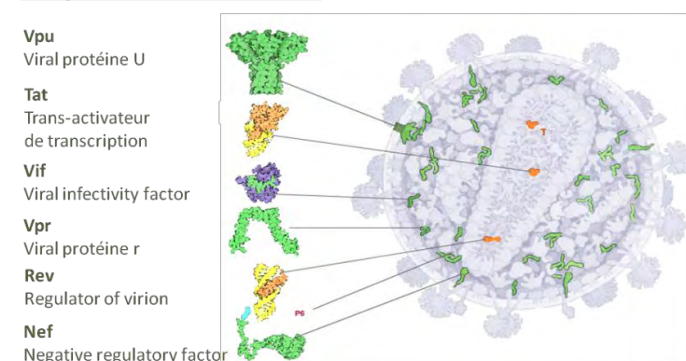


Figure 7 Les protéines Structurales, Accessoires, et Enzymes du VIH-1.

Représentation schématique d'une particule du VIH-1 et détail des différentes protéines qui la compose incluant les protéines structurales (en bleu), les enzymes virales (en rose), et les protéines accessoires (en vert). D'après le site : <http://www.pdb.org>.

#### 4. Le cycle viral

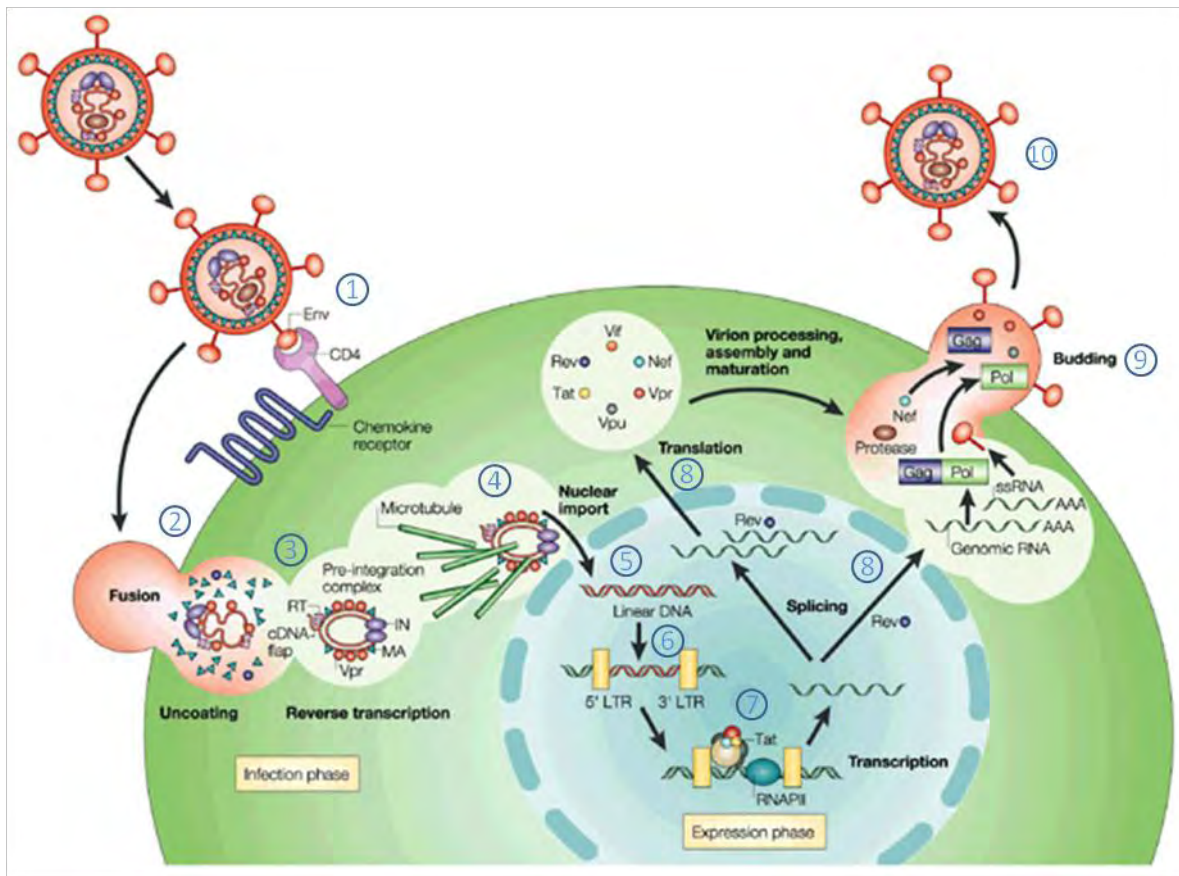


Figure 8 Cycle répliatif du VIH-1.

d'après (Peterlin and Trono 2003).

Il peut être décomposé en dix étapes suivantes :

- 1) Adsorption
- 2) Entrée du virus par fusion des membranes virales et cellulaires.
- 3) Transport à travers le cytoplasme de la capsid contenant l'ARN viral en cours de rétrotranscription, puis décapsidation.
- 4) Formation du complexe de pré-intégration et migration vers les pores nucléaires
- 5) Passage du pore nucléaire sans nécessité de rupture de l'enveloppe nucléaire
- 6) Intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte.
- 7) Transcription des ARN viraux, médiée par la protéine virale Tat
- 8) Expression des protéines virales précoces, dont Tat, Rev et Nef et des protéines tardives (Rev-dépendante) dont Gag, Gag-pol, Env, Vpr, Vpu et Vif
- 9) Assemblage, encapsidation des ARN génomiques (non épissés) et bourgeonnement des particules virales
- 10) Libération des virions, et maturation en virions infectieux.

### a) L'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible

L'étape d'entrée du virus dans la cellule est réalisée par les glycoprotéines virales gp120 et gp41. Celles-ci sont exprimées sous forme de trimère à la surface des virions. La protéine gp120 détourne deux protéines cellulaires afin de permettre l'entrée du VIH-1 dans la cellule le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4.

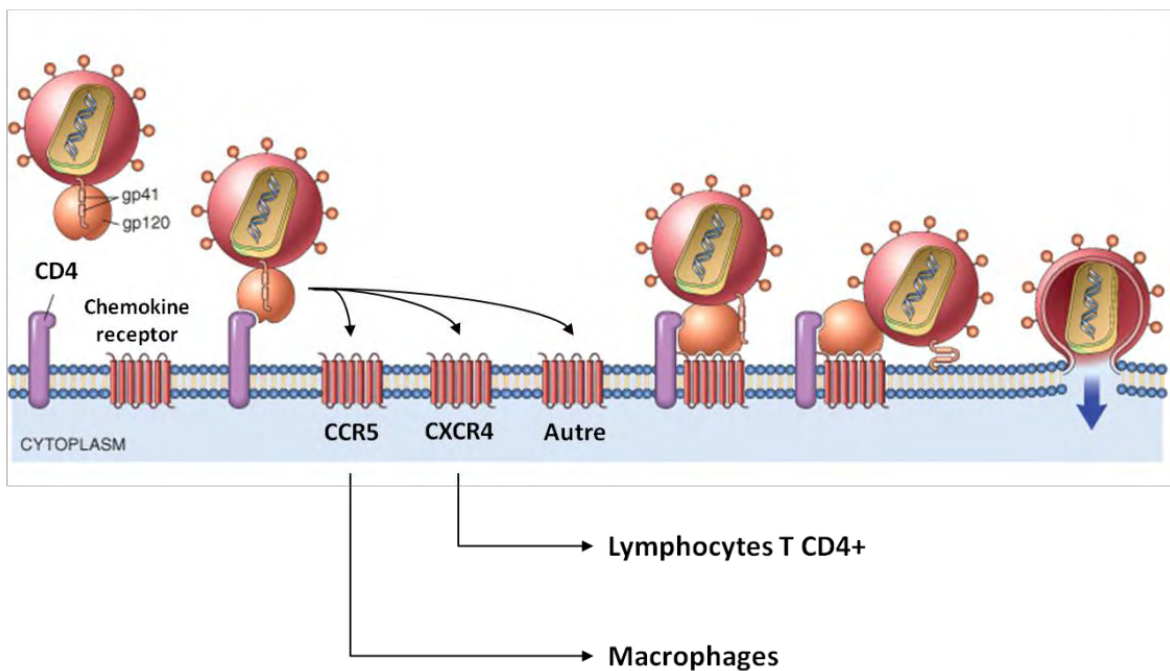


Figure 9 Tropisme du VIH-1

Représentation schématique du tropisme du VIH-1. Celui-ci est déterminé par la protéine virale gp120, exposée à la surface des virions. Cette protéine détourne deux protéines cellulaires afin de permettre l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible : le récepteur CD4 et un co-récepteurs CCR5 (utilisé par les virus macrophages-tropiques) ou CXCR4 (pour les virus lympho-tropiques) qui sont des récepteurs aux chimiokines. D'autres récepteurs aux chimiokines peuvent également servir de co-récepteur au VIH-1 dont CCR3, CCR8, CXCR1, CXCL16. Modifié d'après : Mitchell, R. N. (2007). Chapter 5 - Diseases of the Immune System. In Robbins Basic Pathology, 8th Edition (pp. 107 - 172). Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

#### Le récepteur CD4

La protéine CD4 est une protéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Elle est composée de différents domaines dont une partie intra-cytoplasmique, un domaine transmembranaire et une région extracellulaire elle-même divisée en 4 domaines (D1 à D4). Elle est exprimée principalement par les LT CD4+ et sa fonction principale est de stabiliser l'interaction du TCR avec le CMH de classe II au cours de la formation de la synapse immunologique. Le CD4 se retrouve également exprimé à des niveaux plus faibles sur d'autres types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les DCs, les Natural killer (NK) ([Bernstein, Plasterer et al. 2006](#)) et les neurones ([Omri, Crisanti et al. 1994](#)).

Le CD4 est le récepteur principal du VIH-1 ([Myszka, Sweet et al. 2000](#)). Il a été montré que la liaison avec le virus se fait suite à une interaction de forte affinité ( $K_d \approx \text{nM}$ ) entre la gp120 et le domaine D1 de la partie extracellulaire du CD4 ([Signoret, Poignard et al. 1993](#)).

#### *Les corécepteurs CCR5 et CXCR4*

Les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G ([Alkhatib 2009](#)). Ils jouent un rôle essentiel dans le recrutement par chimiotactisme des cellules du système immunitaire vers les sites inflammatoires. Le récepteur CCR5 fixe les  $\beta$ -chimiokines « Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted » RANTES (CCL5), et les « Macrophage Inflammatory Proteins » MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4). Il est exprimé à la surface des macrophages, des monocytes, des LT mémoires et naïfs ainsi que sur les DCs. Dans la population il existe un polymorphisme du gène CCR5, notamment le polymorphisme Delta32 qui se caractérise par une délétion de 32 paires de bases conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée qui présente un défaut d'expression à la surface des cellules. Les personnes homozygotes pour ce polymorphisme représentent 1% de la population caucasienne et sont naturellement protégées contre l'infection par les virus VIH-1 CCR5 tropiques (retrouvé dans la primo-infection dans la majorité des cas). Par contre ils restent sensibles aux virus CXCR4 tropiques et dual tropiques.

Contrairement à CCR5, le récepteur CXCR4 n'a qu'un seul ligand connu, l' $\alpha$ -chimiokine « stromal cell derived factor » (SDF) -1 ou CXCL12. Il est exprimé majoritairement sur les lymphocytes T mémoires centraux, effecteurs mémoires et les LT naïfs. Mais il se retrouve également à plus faible niveau sur les macrophages et les DCs.

#### *Le mécanisme d'entrée du VIH-1*

L'étape d'entrée du virus dans la cellule peut se décomposer en différents événements. Le premier événement est la fixation de la gp120 virale, présente sous forme de trimère à la surface du virion au récepteur CD4. Après cette fixation, la gp120 subit un changement de conformation qui conduit à l'exposition d'une région clé de la protéine, la boucle V3, qui va reconnaître un corécepteur cellulaire et s'y fixer. Il existe au moins deux corécepteurs pour le VIH-1, qui sont tous les deux des récepteurs aux chimiokines CCR5 et/ou CXCR4. En fonction de la souche virale la protéine gp120, et plus précisément, la boucle V3, possède une affinité pour le co-récepteur CCR5 (virus R5 tropique) ou bien pour le co-récepteur CXCR4 (virus X4 tropique) ou encore, elle peut lier indifféremment les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (virus dual tropiques). D'autres récepteurs aux chimiokines pouvant également servir de co-récepteur au VIH-1 ont été décrits (CCR3, CCR8, CXCR1, CXCL16). Généralement, la primo-infection au VIH-1 est réalisée par un virus de type R5 tropique puis au cours du temps, chez à peu près 50% des patients, le virus évolue vers un phénotype X4 tropique ou dual tropique ([Perez-Alvarez, Delgado et al. 2013](#)).

L'interaction gp120-corécepteur conduit à des modifications de structure de la gp41, qui se traduisent par l'exposition du domaine N-terminal hydrophobe contenant le peptide de fusion, qui va s'insérer dans la membrane de la cellule cible. Il s'ensuit un second changement de conformation de la gp41 au niveau de deux régions, les régions HR1 et HR2 (Heptad Repeat 1 et 2) qui vont interagir ensemble pour former une structure à six hélices (deux hélices par gp41 au sein d'un trimère). L'interaction des domaines HR1 et HR2 conduit au rapprochement des membranes virale et cellulaire

facilitant la fusion membranaire et la libération de la capside dans le cytoplasme de la cellule ([Este and Telenti 2007](#)). Récemment, il a été proposé un second mécanisme d'entrée du virus par endocytose avec une fusion membranaire au niveau des endosomes tardifs ([Miyachi, Kim et al. 2009](#)). La part de ce second mécanisme dans l'infection au VIH-1 reste cependant à préciser.

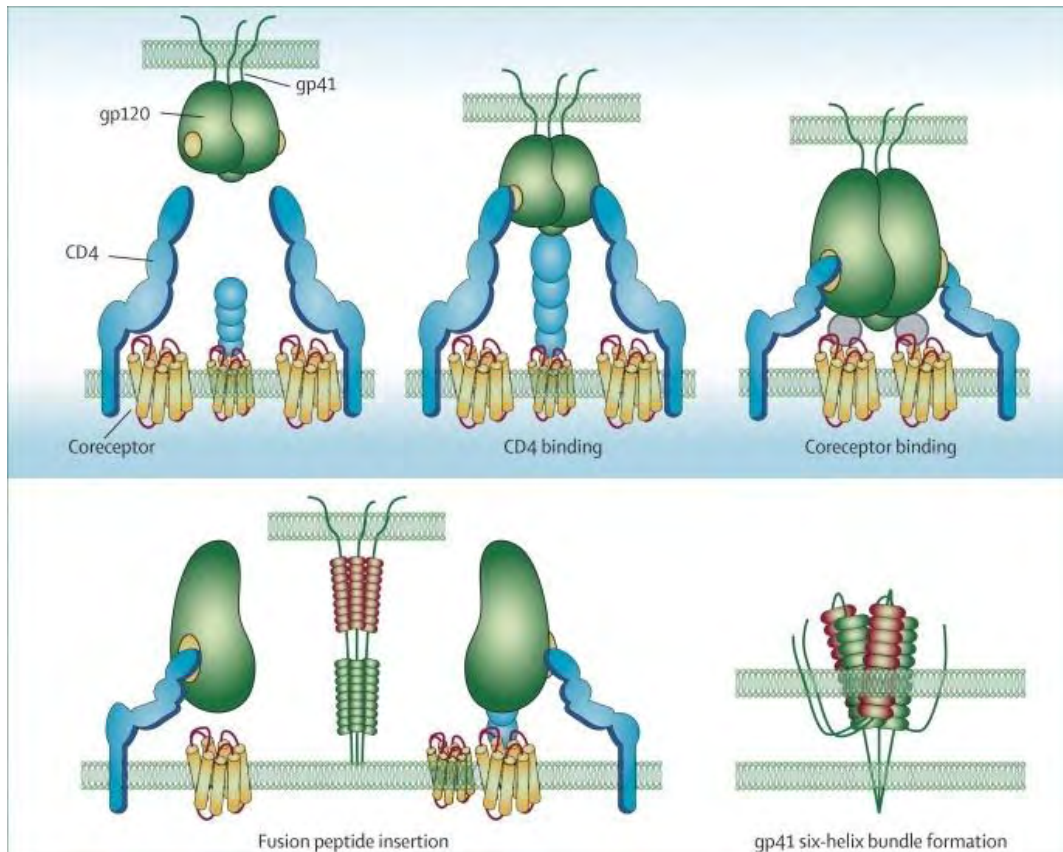


Figure 10 Mécanisme d'entrée du VIH dans les cellules cibles.

Représentation schématique du mécanisme de l'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible. Les différentes étapes du mécanisme sont détaillées dans le texte. Au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible, le récepteur CD4 est représenté en bleu et les récepteurs aux chimiokines sont représentés en jaune. Sur la membrane virale, les glycoprotéines gp120 et gp41 sont représentées en vert. Le domaine de la gp120 impliqué dans l'interaction avec le CD4 est indiqué en jaune et l'épitope CD4 induit impliqué dans l'interaction avec les co-récepteurs est indiqué en gris. Les domaines HR1 et HR2 de la gp41 sont représentés en rouge et en vert respectivement. D'après ([Este and Telenti 2007](#)).

## Le tropisme du VIH-1

Les cellules cibles du VIH-1 sont définies par l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et ou CXCR4. Ainsi le VIH-1 peut potentiellement infecter un large panel de cellules. *In vivo* on retrouve le virus majoritairement au niveau des LT CD4+, des monocytes, des macrophages, des DCs, et au niveau du système nerveux central dans les cellules de la microglie et les neurones. Les cellules à longues durées de vie comme les neurones, les macrophages et les lymphocytes T central mémoires et transitionnel mémoires constituent un réservoir pour le VIH ([Eisele and Siliciano 2012](#); [Lafeuillade 2012](#)).

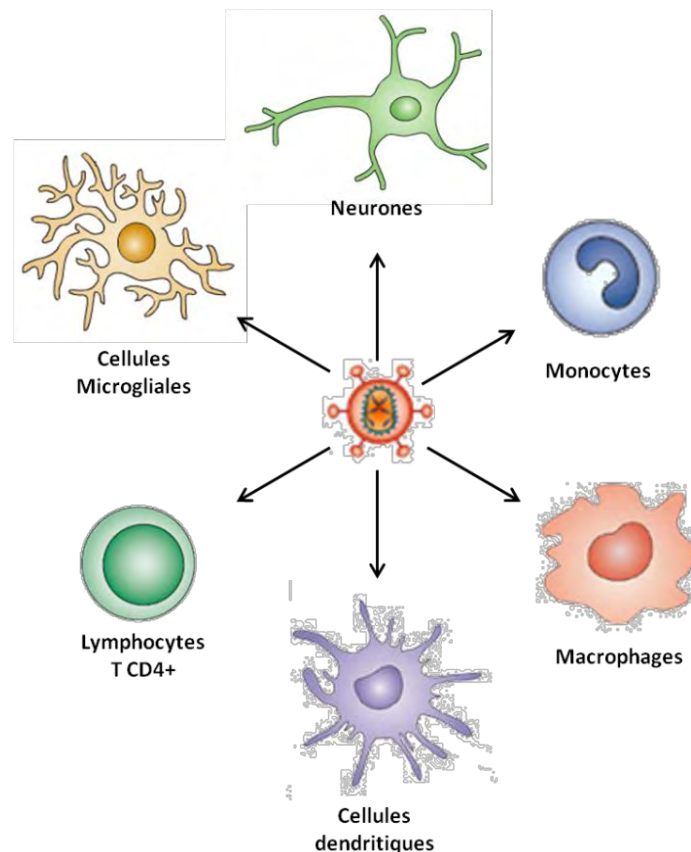


Figure 11 Le VIH-1 et ses principales cibles cellulaires.

Schéma illustrant le VIH-1 (au centre) et les différents types cellulaires infectés incluant les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+, les neurones et les cellules microgliales.

## **b) La décapsidation et la réverse transcription**

Suite à la pénétration du virus, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme. Le matériel viral est transporté via le réseau de microtubules vers le noyau de la cellule. En même temps, se déroulent les étapes de réverse transcription et de décapsidation, deux mécanismes étroitement liés. Différents modèles ont été proposés pour expliquer la dynamique de ces deux processus. i) Dans un premier modèle, il est proposé que la capsid virale est désassemblée à proximité de la membrane plasmique immédiatement après la fusion. Le changement de l'environnement dans lequel se retrouve le matériel viral constituerait la force motrice de la formation du complexe de réverse transcription ([Arhel 2010](#)). ii) Un deuxième modèle propose que la capsid reste intacte pendant un certain temps nécessaire pour l'initiation de la réverse transcription après l'entrée du virus, et que la décapsidation se produit progressivement au cours du transport vers le noyau, grâce à l'intervention séquentielle de différents facteurs cellulaires ([Arhel 2010](#)). iii) Un troisième modèle, soutenu par les travaux de ([Arhel 2010](#)), propose que la capsid reste intacte jusqu'à ce que le virus atteigne la membrane nucléaire. La décapsidation se produirait au niveau des pores nucléaires après l'achèvement des différentes étapes de la réverse transcription. Dans ce modèle, la capsid virale joue un rôle majeur dans le mécanisme de réverse transcription en permettant le maintien d'une concentration optimale de l'enzyme réverse transcriptase à proximité du génome viral ([Arhel 2010](#)).

La réverse transcription est le mécanisme au cours duquel l'ARN viral simple brin est converti en ADN double brin. Cette étape est assurée par une enzyme virale, la réverse transcriptase (RT) dotée d'une activité ADN polymérase sur une matrice d'ARN ou d'ADN ainsi que d'une activité RNase H qui dégrade les séquences ARN dans les hétéro-duplex ARN-ADN. Certaines études suggèrent que la réverse transcription est initiée à l'intérieur de la particule virale mais elle est rapidement bloquée par la limitation en substrat de base dNTP. Une fois dans le cytoplasme de la cellule infectée, l'activité RT peut se poursuivre grâce à la disponibilité des dNTP. Il en résulte un complexe de pré-intégration composé de protéines cellulaires et virales dont les protéines MA, CA, NC, IN, et Vpr.

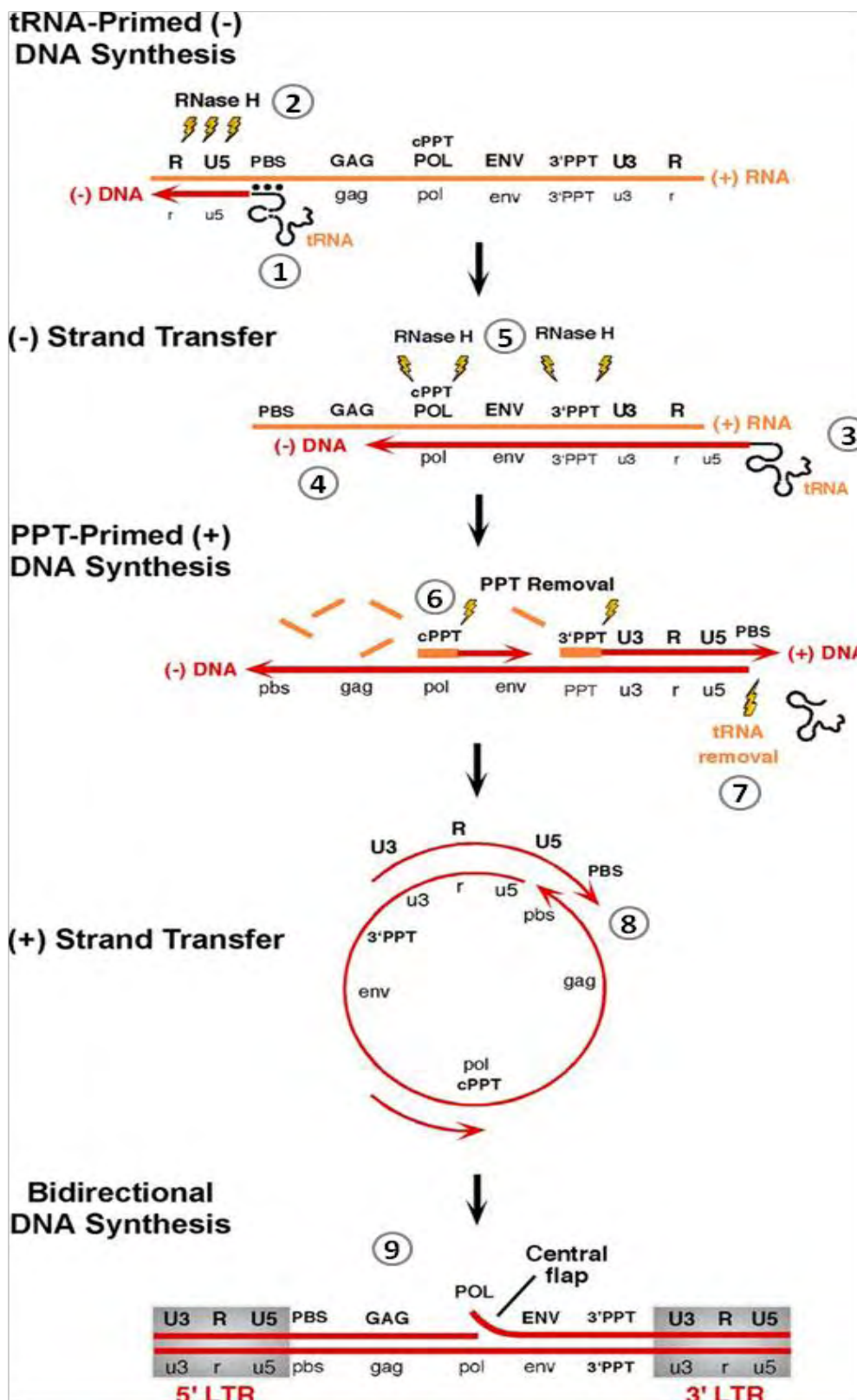


Figure 12 La réverse transcription.

Les différentes étapes de la réverse transcription sont détaillées dans le texte. D'après (Le Grice, 2012).



Au niveau mécanistique, la réaction de réverse transcription peut se diviser en neuf étapes.

(1) Elle débute suite à la fixation de l'ARN de transfert cellulaire (ARNt) ARNt lysine sur une séquence complémentaire portée par l'ARN viral génomique, la séquence pbs pour « primer binding site » ([Cen, Niu et al. 2004](#)). Cet ARNt est utilisé comme amorce par la RT pour réaliser la synthèse du premier fragment court d'ADN négatif. La RT copie donc le complémentaire des séquences U5 et R jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN viral. (2) Dans ce duplexe ARN-ADN, l'activité RNase H de la RT va dégrader le fragment d'ARN viral rétrotranscrit, ce qui conduit à l'exposition de la séquence répétée R de l'ADN- nouvellement synthétisé. (3) Ce court fragment d'ADN négatif est ensuite transféré à l'extrémité 3' de l'ARN viral où il va s'hybrider avec la séquence R de la région 3' de l'ARN viral. (4) Cette étape de transfert fournit alors une nouvelle amorce à la RT qui va pouvoir réaliser la synthèse de l'ADN- complémentaire sur toute la longueur de l'ARN génomique. (5) Suite à la synthèse de ce long fragment d'ADN moins, la RT par son activité RNase H procède à la dégradation de l'ARN viral. Cependant, deux séquences riches en purines, dites polypurines, ou ppt, résistent à la dégradation. La première ppt est située en 3' de l'ARN viral juste avant la séquence U3 et l'autre est située au centre du génome (cppt) (6) Ces séquences ppt et cppt servent alors d'amorce pour initier la synthèse du fragment d'ADN positif. A partir de l'amorce ppt, l'enzyme synthétise un court fragment d'ADN+ composé des séquences U3, R et U5 ainsi que du pbs correspondant au complémentaire de l'ARNt encore présent en 5' de l'ARN viral. (7) L'ARNt est ensuite éliminé par l'activité RNase H, ce qui conduit à l'exposition de la séquence pbs. (8) Ce court fragment d'ADN+ est transféré à l'extrémité 3' du fragment d'ADN- et la séquence pbs va s'apparier avec sa séquence complémentaire sur l'ADN moins. (9) Suite à cet appariement, la RT synthétise l'ADN- complémentaire qui formera le 5' LTR. A partir du fragment d'ADN+ transféré, la RT poursuit la synthèse de l'ADN+ jusqu'à la séquence cppt. L'élongation se poursuit sur une centaine de nucléotides jusqu'à ce que la RT rencontre une séquence CTS « central terminaison séquence » ce qui conduit au déplacement de la séquence cppt créant un chevauchement de fragments en triplex nommé « Central DNA flap ». En parallèle, l'amorce cppt permet la synthèse de l'ADN+ jusqu'à la séquence ppt qui est ensuite éliminée puis le fragment ADN+ se poursuit et la RT va copier les séquences U3 R et U5 qui vont former le 3' LTR. Le produit de cette étape de réverse transcription est donc un fragment d'ADN double brin flanqué par deux LTR et contenant un « DNA flap » en son centre ([Hu and Hughes 2012](#)).

Au cours de cette étape de réverse transcription, des erreurs peuvent être introduites et conduire à l'apparition de mutations. En effet, la RT ne possédant pas d'activité correctrice et une fidélité relativement faible, il est fréquent que cette enzyme introduise des mutations. Son taux d'erreur est approximativement de  $2 \times 10^{-5}$  par nucléotide et par cycle de réplication. Le génome viral étant long de 9750 nucléotides cela signifie qu'une erreur se glisse au cours de chaque cycle viral. Cette faible fidélité de la RT explique l'immense variabilité du VIH. Outre les erreurs de la RT, d'autres mécanismes peuvent également expliquer l'apparition de mutation comme 1) des erreurs commises par l'ARN polymérase II au cours de la transcription du génome viral ; 2) des erreurs introduites par l'ADN polymérase au cours de la division des cellules infectées ; 3) des réactions de recombinaison ; 4) des erreurs introduites par des facteurs de restrictions cellulaires en particulier les protéines APOBEC. L'association de l'ensemble de ces éléments, à une forte réplication virale de l'ordre de  $10^{10}$  particules par jours engendre une immense variabilité virale qui conduit à classer les virus en « quasi espèce ».

### c) Intégration dans le génome cellulaire

Une fois les étapes de réverse transcription et de décapsulation achevées, l'ADN double brin s'associe à des protéines virales et cellulaires formant le complexe de pré intégration (PIC). Le PIC constitué de l'ADN proviral associé aux protéines virales (MA, Vpr et RT) et des facteurs cellulaires (la cyclophiline A, les importines  $\alpha$  et  $\beta$  s'accumule à proximité du complexe de pore nucléaire et facilite le passage de l'ADN proviral dans le noyau. Le passage du pore nucléaire semble également associé à la présence du « DNA flap ». Une fois dans le noyau, le flap est enlevé par une endonucléase cellulaire et l'intégrase virale procède à l'insertion de l'ADN double brin dans le génome cellulaire pour former le provirus flanqué des deux séquences LTR.

Seul l'ADN viral linéaire peut s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Il arrive parfois que l'ADN viral ne s'intègre pas correctement au génome cellulaire. Cela se traduit par l'apparition d'ADN circulaire contenant les deux LTR (résultants de la liaison des deux extrémités de l'ADN proviral) ou contenant un seul LTR (issu de la recombinaison homologue du génome viral). Bien que ces formes d'ADN ne soient pas infectieuses elles constituent des marqueurs importants pour l'évaluation de l'import de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte.

### d) Transcription du provirus

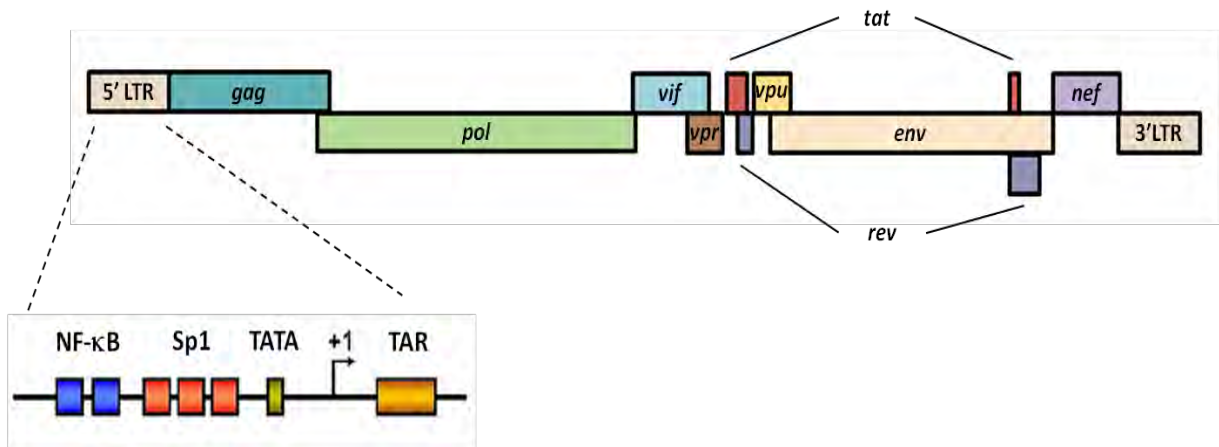


Figure 13 Organisation du provirus et du promoteur 5' LTR.

Représentation schématique de l'ADN proviral du VIH-1. Le génome viral ADN code pour les différentes protéines de structures et les enzymes virales (*gag*, *pol*, *env*), ainsi que les protéines de régulation et accessoires (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*). Le provirus est flanqué par deux LTR (5'LTR et 3'LTR). Le 5' LTR contient les différentes régions promotrices du VIH-1 incluant des sites de fixation pour les facteurs de transcriptions cellulaires NF- $\kappa$ B (deux sites) et Sp1 (trois sites) et une TATA box. D'après [\(Romani, Engelbrecht et al.\)](#).

### *Activation en cis de la transcription*

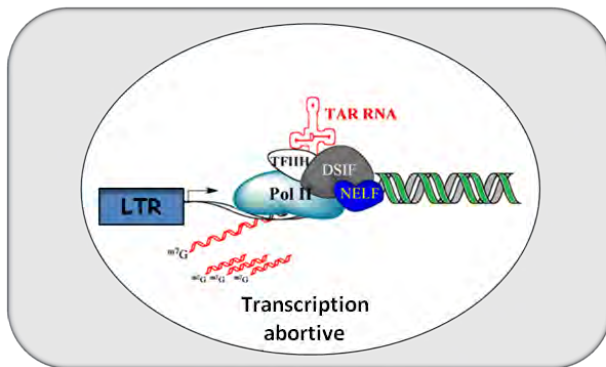
Une fois intégré au génome cellulaire, l'expression des gènes du VIH dépend de l'activité transcriptionnelle de la cellule hôte. Les facteurs de transcription cellulaires sont recrutés au niveau du promoteur du provirus LTR afin d'initier la transcription des gènes viraux. Typiquement, le LTR proviral du VIH-1 possède au moins deux sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires NF- $\kappa$ B et trois sites pour le facteur de transcription Sp1 en aval d'une TATA box. Ces sites sont nécessaires pour assurer une transcription basale des gènes viraux ([Marcello, Lusich et al. 2004](#)). Le LTR du VIH contient également des sites de liaison pour les facteurs de transcription inductibles NF-AT et AP-1. L'ensemble de ces facteurs de transcription sont activés suite à l'engagement du TCR au cours de la réponse T CD4 et permettent une activation optimale du LTR viral. Grâce à ces signaux d'activation en cis, l'ARN polymérase II (ARNpol II) est recrutée au niveau du LTR pour initier l'étape de transcription. Cependant, la seule activité transcriptionnelle basale de la cellule n'est pas suffisante pour la transcription des gènes viraux. Ceci est lié à l'action de deux facteurs négatifs de l'élongation de la transcription NELF « Negative ELongation Factor » et DSIF « DRB-Sensitivity-Inducing Factor ». Les ARN produits sont alors des transcrits courts, inachevés et non poly-adiénylés. Pour palier à cette répression des gènes viraux, le VIH code pour un facteur *Trans*-activateur de transcription : la protéine Tat. Notons que tous les lentivirus produisent un transactivateur de transcription. On retrouve une protéine nommée Tat chez les virus EIAV, SIV, BIV VMV, CAEV et FIV ([Shojania and O'Neil 2010](#)). Le rétrovirus HTLV-I exprime également un homologue de la protéine Tat nommé Tax ([Beimling and Moelling 1989](#)).

### *Trans-activation de la transcription par la protéine Tat*

Tat fonctionne comme un adaptateur moléculaire qui va recruter les éléments de la machinerie transcriptionnelle vers l'ARN viral en cours de synthèse. Elle se fixe sur une structure ARN en tige boucle présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits viraux naissants : la région TAR pour « Tat Associated Region ». La fixation de Tat sur TAR entraîne le recrutement par Tat du complexe positif d'élongation de la transcription p-TEFb composé de la cycline T1 et de la kinase CDK9. Ce complexe va hyperphosphoryler le domaine C-terminal de la grande sous unité de l'ARNpol II ce qui va conduire à l'élongation de la transcription et la production des ARN messagers subgénomiques et génomiques du VIH ([Brigati, Giacca et al. 2003](#)). Ces ARNm viraux seront alors pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire pour conduire à l'expression des protéines virales ou encapsidés sous forme d'ARN génomique pour donner de nouvelles particules virales.

Ainsi, la protéine Tat joue un rôle majeur dans la transactivation transcriptionnelle. Elle augmente la transcription des gènes viraux d'un facteur 100 ([Sodroski, Patarca et al. 1985](#)). Tat est d'ailleurs une protéine indispensable pour l'accomplissement d'un cycle viral productif. En l'absence de Tat le virus reste à l'état latent.

## Sans Tat



## Avec Tat

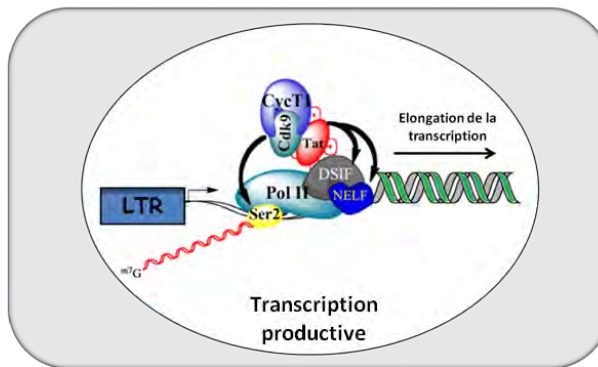


Figure 14 Rôle de Tat dans la transactivation du VIH-1

En l'absence de Tat la transcription des gènes du VIH-1 est abortive. Suite aux différentes étapes de la *cis*-activation de la transcription, le complexe de pré-initiation de la transcription (composé de différentes protéines cellulaires dont l'ARN polymérase II (ARNpol II) et les facteurs de transcription TFII (-A, -B, -D, -E, -F)) est assemblé au niveau de la TATA box. La synthèse du transcrit débute suite à la phosphorylation de la sérine 5 du domaine carboxy terminal (CTD) de l'ARN pol II. Cependant, après la synthèse de 20 à 30 nucléotides la transcription est bloquée suite au recrutement de deux facteurs négatifs de l'élongation de la transcription NELF et DCIF. Les ARN produits sont alors des transcrits courts, inachevés et non poly-adénylés.

En présence de Tat la transcription est productive. La relance de la transcription est assurée par la protéine Tat. Cette protéine interagit avec une structure « tige-boucle » nommée TAR présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits naissants du VIH-1. Tat recrute le complexe positif d'élongation de la transcription p-TEFb (composé entre autre de la cycline T1 et de la kinase CDK9). Ce complexe p-TEFb va phosphoryler les facteurs NELF et DCIF conduisant à leur libération du complexe de transcription. p-TEFb réalise également la phosphorylation de la sérine 2 du domaine CTD de l'ARN pol II ce qui permet d'activer sa fonction d'élongation de la transcription. Modifié d'après Benhajj et al INTECH 2011.

Puisque l'expression des gènes viraux est abortive en absence de la protéine Tat, nous pouvons nous demander comment se réalise le premier cycle viral ? Pour apporter un élément de réponse à cette question, certaines études suggèrent que la protéine Tat est incorporée dans la particule virale au cours du bourgeonnement ([Monini, Cafaro et al. 2012](#)). D'autres suggèrent que la transcription cellulaire basale pourrait permettre, dans certains cas, de conduire à la transcription de l'ARNm de Tat ([Rice 2010](#)). Une autre étude a mis en évidence un mécanisme Tat-indépendant qui pourrait expliquer l'initiation et l'élongation de la transcription dans les cellules qui expriment le TLR8. Ce mécanisme implique l'activation de la voie NF- $\kappa$ B suite à la reconnaissance de l'ARN viral par le TLR8, ce qui permet d'initier la transcription par l'ARNpol II. En effet, une activation est fournie par la signalisation du récepteur DC-SIGN suite à la fixation de la gp120. Cette signalisation va conduire à la phosphorylation de la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B, qui va recruter le p-TEFb au niveau des ARN naissants afin de conduire à l'élongation de la transcription des différents gènes viraux ([Gringhuis, van der Vlist et al.](#)). Le produit de la transcription du provirus est un pré-ARN messenger long de 9kb. Cet ARN est parsemé de multiples sites donneurs et accepteurs d'épissages. Selon l'utilisation de ces sites par le spliceosome cellulaire, le transcrit primaire peut être modifié pour donner trois types de transcrits : non-épissés, épissés et partiellement épissés. Les transcrits non épissés (9kb) peuvent être exprimés pour générer les polyprotéines précurseurs Gag et Gag-Pol ou peuvent servir d'ARN génomique pour les nouveaux virions. Les ARN partiellement épissés (4-5kb) donnent les protéines Env, Vif, Vpu, Vpr, et la forme mono-exon de Tat. Les transcrits entièrement épissés (2kb) codent pour les protéines Tat, Rev et Nef ([Kingsman and Kingsman 1996](#)).



Une fois la protéine Rev produite, celle-ci facilite l'export des transcrits non épissés et partiellement épissés et permet l'expression des gènes tardifs. Rev agit en interagissant physiquement avec les ARN viraux, au niveau d'une séquence RRE pour « rev responsive element » située dans la partie 3' de l'ARN du VIH au centre du gène *env*. Elle recrute aussi des composés cellulaires impliqués dans l'export du noyau des ARNm tels que la protéine CRM1 ([Bell and Lever 2013](#)). Cette association permet le transport des transcrits non-épissés, et partiellement épissés vers le cytosol. Après avoir délivré ces ARNm dans le cytosol, Rev retourne dans le noyau grâce à sa liaison avec l'importine- $\beta$ . Ainsi l'expression des protéines virales est finement régulée dans le temps grâce à l'action de deux protéines clés Tat et Rev. Ces deux protéines jouent un rôle important dans la régulation du passage de la phase de latence à l'infection productive.

#### **e) Traduction des protéines virales**

La traduction des protéines virales à partir des différents ARNm est réalisée dans le cytoplasme par la machinerie cellulaire. Au total la traduction des transcrits viraux permet la production d'au moins 17 protéines dont la dénomination et les fonctions principales sont décrites dans le tableau ci-après.

Les protéines tardives Gag, Gag-pol et Env sont synthétisées sous forme de polyprotéines. Les précurseurs Gag (pr55) et Gag-pol (pr160) contenant les protéines de structures et les enzymes virales seront maturés définitivement après le bourgeonnement dans la particule virale. Le produit du gène *env* gp160 est une polyprotéine clivée par des protéases cellulaires de la famille de la furine, pour donner les glycoprotéines de surface (SU) gp120 et transmembranaire (TM) gp41. L'une des particularités au cours de l'étape de traduction des transcrits viraux est l'expression du précurseur Gag-pol. En effet, les cadres ouverts de lectures de *gag* et *pol* sont décalées de 1 nucléotide. Généralement la traduction de Gag-pol s'arrête au codon stop après *gag* pour donner le précurseur protéique pr55. Cependant dans 5% des cas le ribosome « patine » sur une séquence nommé « frame shift stimulatory signal » qui provoque un changement du cadre de lecture « frame shift » et permet l'expression du précurseur pr160. Ce mécanisme permet au virus de produire de grandes quantités de protéines de structures et au contraire de produire peu d'enzymes dont le virus a besoin pour effectuer son cycle de réplication ([Bell and Lever 2013](#)).

Tableau 1 Les différentes protéines du VIH-1 et leurs fonctions principales.

Réalisé d'après les références ([Trono 1995](#); [Peterlin and Trono 2003](#)).

Gène	Protéine	Dénomination	Fonction(s) principale(s)
<i>gag</i>	p17	MA	Matrice
	p24	CA	Capside
	p6	NC	Assemblage
	P7		Nucléocapside
	Sp1		Assemblage
	sp2		Assemblage
<i>pol</i>	p10	PR	Aspartyl Protéase
	p51/66	RT	Transcriptase-inverse/RNase H
	P32	IN	Intégrase
<i>env</i>	gp120	SU	Liaison au CD4 et aux corécepteurs
	gp41	TM	Fusion membranaire
<i>tat</i>	p14	Tat	Transactivation de la transcription, augmentation de l'initiation et de l'élongation Modulation de réponse immunitaire
<i>rev</i>	p19	Rev	Export des ARNm non épissés et partiellement épissés
<i>nef</i>	p27	Nef	Internalisation du CD4 Augmentation de l'infectivité Altération de l'activation des LT
<i>vif</i>	p23	Vif	Augmentation de l'infectivité Neutralisation de APOBEC3G
<i>vpu</i>	p16	Vpu	Favorise la libération des virions néoformés Neutralisation de la Tetherine Diminution de l'expression du CD4
<i>vpr</i>	p15	Vpr	Transport du complexe de pré-intégration

## **f) Assemblage et bourgeonnement**

L'assemblage des particules virales est un processus complexe qui résulte d'un ensemble d'interactions protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide. La polyprotéine Gag (pr55) est l'acteur principal de cet assemblage. Gag est divisé en quatre grands domaines majeurs : la matrice (MA) en N-terminal, la capsid (CA), la (NC) bordée par les protéines « spacer » SP1 et SP2, et la protéine P6 en C-terminal. Chacun de ces domaines joue un rôle précis pour catalyser l'assemblage des composants viraux. La protéine de la matrice qui est myristilée à son extrémité N-terminale, est impliquée dans l'interaction avec la membrane plasmique et le domaine intra-cytoplasmique de la gp41. Le domaine CA permet l'assemblage en multimère des protéines Gag qui vont former la structure sphérique du nouveau virion immature. Ce domaine interagit également avec le précurseur Gag-Pol qui porte les enzymes virales. La nucléocapsid qui interagit avec l'ARN viral non épissé est importante pour l'encapsidation des deux fragments d'ARN qui constitueront le génome viral. La protéine P6 lie la protéine Vpr. L'ensemble de ces interactions permettent l'assemblage des différents composants viraux et conduisent à la formation de particules virales immatures qui bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique. Dans certains types cellulaires comme les monocytes et les macrophages, l'assemblage peut également se dérouler dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes tardifs et les corps multi-vésiculaires « multi-vesicular bodies » (MVB) ([Sundquist and Krausslich 2012](#)).

Afin de réaliser la dernière étape du bourgeonnement et la libération du virion, le VIH-1 détourne le système cellulaire ESCRT, impliqué dans la séparation des cellules filles au cours de la mitose. Pour cela, le domaine p6 de Gag interagit directement avec la sous-unité TSG101 du complexe ESCRT-I et avec la protéine ALIX. Ces interactions vont conduire à la formation de la machinerie ESCRT qui va catalyser la fission des membranes virales et cellulaires et conduire à la libération des virions immatures dans l'espace extracellulaire ([Sundquist and Krausslich 2012](#)).



### g) Maturation des virions

Après bourgeonnement, les virions libérés sont immatures. Ils doivent subir une dernière étape de maturation afin de devenir infectieux. Pour cela, les précurseurs polyprotéiques Gag (pr55) et Gag-pol (pr160) sont auto-clivés par la protéase virale pour donner neuf sous-unités comprenant les protéines de structure : la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC), la protéine p6 et les deux protéines « spaceur » SP1 et SP2 et les enzymes virales : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et la RNase H, l'intégrase (IN). Au cours de la maturation les différentes protéines vont se réorganiser au sein du virion afin de former un virion mature infectieux, caractérisé par une structure interne dense de forme conique ([Yeager 2011](#)).

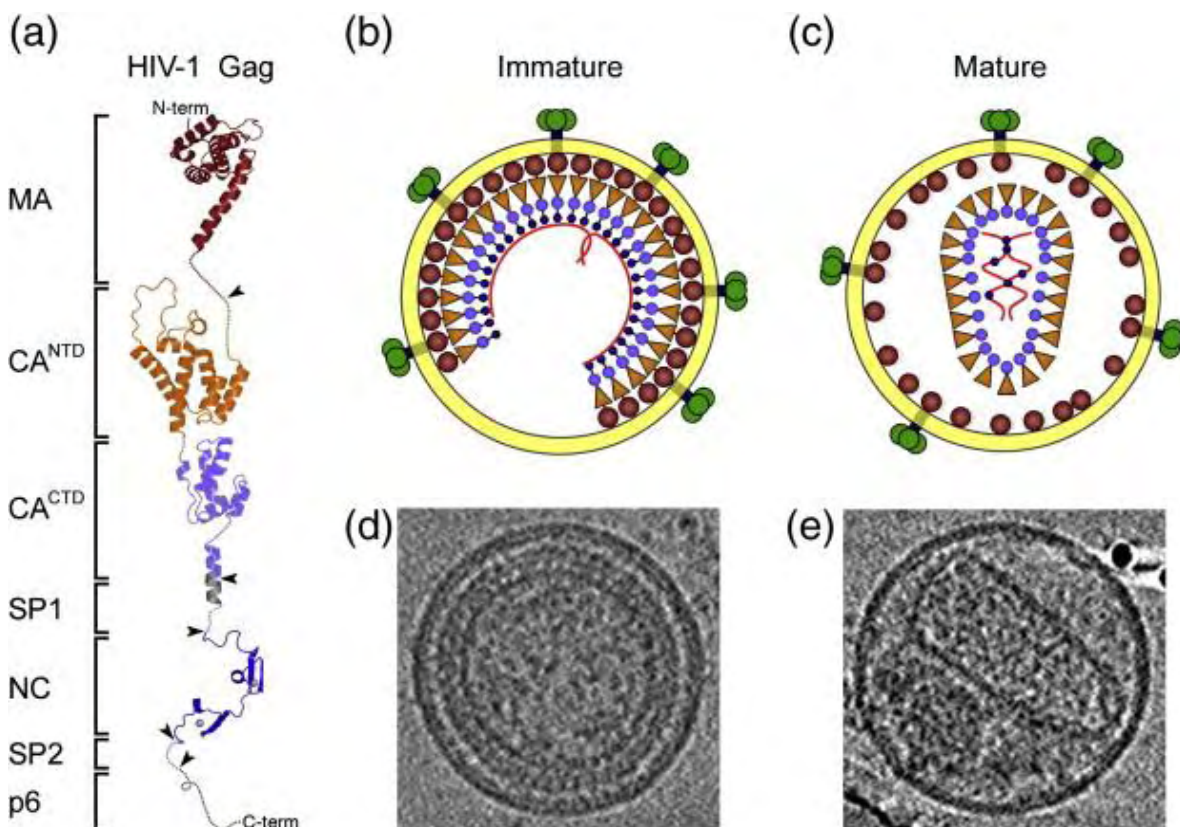


Figure 16 Maturation de la particule virale

(a) Représentation schématique de la protéine Gag du VIH-1, et modélisation de sa structure tertiaire. Les différents domaines de la protéine sont identifiés par différentes couleurs. Représentation schématique de (b) la particule virale immature et de (c) la particule mature. La réorganisation des différentes protéines au cours de la maturation peut être suivie grâce au code couleur. Images de microscopie électronique à transmission des particules virales (d) immatures et (e) matures. D'après ([Yeager 2011](#)).

## C-De l'infection au VIH-1 au Syndrome D'immunodéficience Acquise

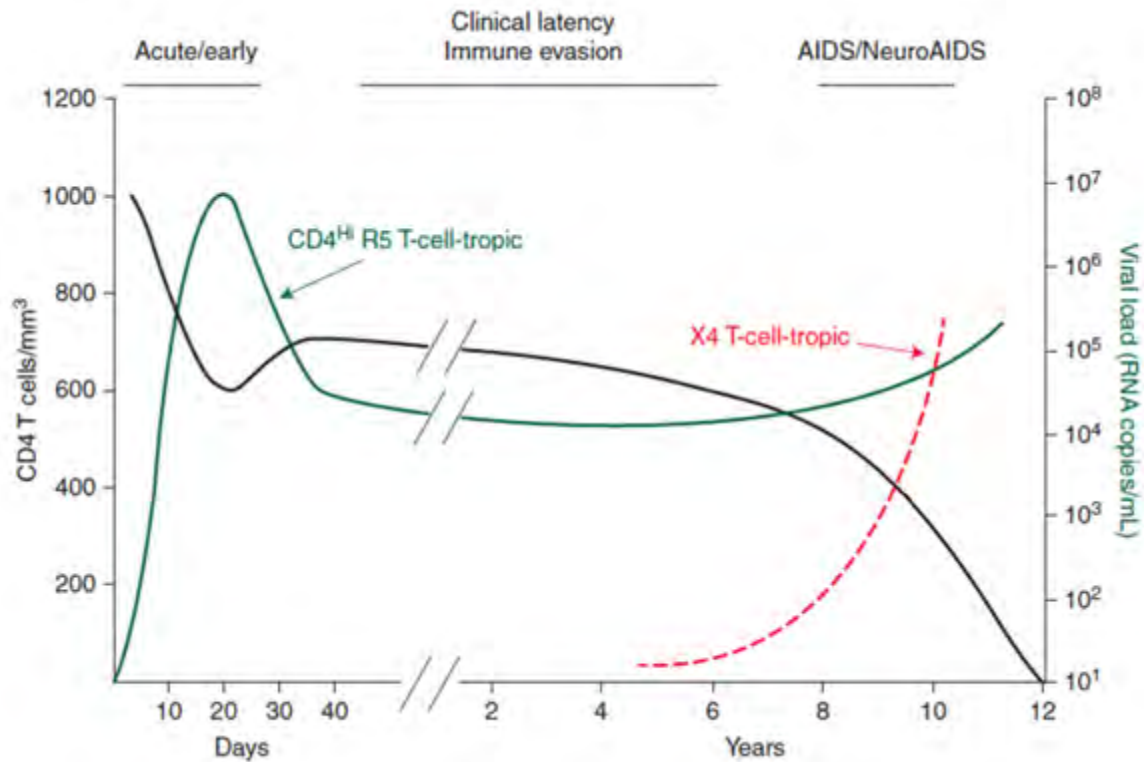


Figure 17 Histoire naturelle de l'infection au VIH-1.

L'évolution du nombre de LT CD4 dans le sang au cours du temps est représentée en noir. La courbe verte représente la charge virale. L'émergence des virus CXCR4 tropiques est indiquée en rouge. D'après (Swanstrom and Coffin 2012).

### 1. La primo-infection

Le VIH-1 se transmet au cours des rapports sexuels non protégés ou par contact sanguin avec du sang de patients séropositifs, des cellules infectées, ou des particules virales libres de phénotype R5 (virus qui utilisent CCR5 comme corécepteur). Les premières cellules ciblées par le VIH sont les cellules immunitaires résidentes des muqueuses anales et vaginales telles que les DCs, les macrophages, et les LT CD4+. Peu de temps après la primo-infection, le virus se dissémine dans l'organisme et atteint notamment certains organes stratégiques tels que les organes lymphoïdes secondaires (MALT « mucosa associated lymphoid tissue » et GALT « Gut associated lymphoid tissue ») où résident la majeure partie des cellules cibles du VIH. Les DCs agissent comme un « cheval de troie ». Elles transportent le virus du site de primo-infection vers les nœuds lymphatiques en le

fixant par le biais du récepteur DC-SIGN ([Coleman, Gelais et al. 2013](#)). Ensuite, elles le transfèrent aux LT. Récemment, il a été montré qu'une sous-population de LT CD4+ présente dans les muqueuses qui exprime fortement le récepteur de homing vers le tractus gastro-intestinal, les intégrines  $\alpha 4\beta 7$ , se révèle très sensible à l'infection par le VIH. En effet, elle peut fixer le virion par le biais de cette intégrine et faciliter sa dissémination ([Cicala, Arthos et al. 2011](#)). A ce stade de l'infection, le virus se réplique activement pendant une période de 6 à 12 semaines appelée la phase aigue. La charge virale atteint plusieurs millions de copies d'ARN viral par millilitre (ml) de plasma. Le nombre de LT CD4+ dans le sang et le tractus gastro-intestinal chute de manière drastique avec la réplication virale. Alors que les organes lymphoïdes centraux (Thymus) régénèrent le stock de LT dans le compartiment sanguin, les muqueuses gastro-intestinales elles sont peu ou pas repeuplées. A ce stade de l'infection, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs luttent activement contre l'infection et parviennent à contrôler la réplication du VIH pour abaisser la charge virale plasmatique à un taux compris entre  $10^3$  et  $10^6$  copies d'ARN par ml ([Coffin and Swanstrom 2013](#)). Parmi les réponses immunitaires impliquées on retrouve: la sécrétion de facteurs solubles tels que des lectines liant le mannose, les protéines du complément, des anticorps anti-VIH dirigés contre la protéine Tat ou les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 et qui neutralisent l'infection de nouvelles cellules. Les cellules NK détruisent également les cellules infectées qui sont détectées par une diminution de l'expression du CMH I ou grâce au mécanisme d'ADCC. La réponse T CD4+ est également opérationnelle pour aider à l'activation des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8 + cytotoxiques.

## 2. La phase asymptomatique

Malgré la résolution de la phase aigue, le virus persiste dans l'organisme et l'infection devient chronique. Au cours de cette période asymptomatique qui varie de 6 mois à plusieurs dizaines d'années en fonction des patients, le virus se réplique de manière continue, principalement au niveau des cellules réservoirs du virus : les LT CD4 mémoires, les LT régulateurs ([Tran, de Goer de Herve et al. 2008](#)), les macrophages et le système nerveux central ([Eisele and Siliciano 2012](#); [Lafeuillade 2012](#)). Alors que l'aide CD4+ diminue au cours du temps, le système immunitaire lutte activement contre la réplication virale via la réponse T cytotoxique et la production d'anticorps. Cependant, le virus va s'adapter à cette pression immunitaire grâce à des mutations qui vont conduire à l'apparition de nouveaux variants. L'une des émergences virales les plus dramatiques pour l'hôte est l'apparition des virus X4 tropique (virus qui utilisent le CXCR4 comme corécepteur) et des virus dual tropique R5/X4 qui se répliquent plus rapidement, produisent plus de nouveaux virions et qui sont plus cytopathiques ([Swanstrom and Coffin 2012](#)). En plus de la lyse directe des cellules infectées par le virus ou par les produits de la réponse immunitaire cette phase s'accompagne d'une dérégulation progressive des mécanismes immunitaires conduisant à l'épuisement général de la réponse immunitaire ([Swanstrom and Coffin 2012](#)). Cet affaiblissement du système immunitaire se caractérise par une activation chronique qui passe notamment par une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\alpha$  et l'IL-6. La production massive et continue de ces cytokines est associée au développement de nombreux troubles immunologiques et neurologiques associés à l'infection et augmente la mort cellulaire par apoptose. Malgré une

activation massive du système immunitaire, les cellules effectrices ne parviennent pas à monter une réponse efficace dans la lutte contre le VIH. Ce phénomène est expliqué par une augmentation de nombreux facteurs immunosuppresseurs qui inhibent la réponse T. Parmi ces mécanismes détaillés plus loin, on retrouve principalement a) une augmentation de la production de la cytokine immunosuppressive IL-10 ; b) une augmentation du récepteur inhibiteur programmed death 1 (PD-1) et du ligand PD-L1 ; c) une augmentation de l'expression de l'enzyme immunosuppressive indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) et de son activité et d) une augmentation de la génération et l'activation des LT régulateurs, une sous-population de lymphocytes T ayant une activité immunosuppressive. L'ensemble de ces facteurs immunosuppresseurs contribue à l'inactivation du système immunitaire et sont associés à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA.

### **3. Le stade SIDA**

Après plusieurs années d'infection chronique non résolue, le taux de LT CD4 + chute au dessous du seuil critique de 200 cellules par microlitre de sang ([Lackner, Lederman et al. 2012](#)). La destruction du thymus et des cellules pro génitrices clés de la moelle osseuse empêche la production de nouvelles cellules immunitaires et mène irrémédiablement à l'effondrement du système immunitaire. La charge virale augmente continuellement et coïncide avec l'apparition des premiers symptômes du SIDA tels que la fièvre, des sueurs nocturnes, une perte de poids, et un gonflement des ganglions. Cette phase SIDA, se caractérise également par le développement d'infections opportunistes rares. Les premiers opportunistes qui se développent à ce stade de l'immunosuppression sont les candidoses orales, les infections à pneumocoques, les infections mycobactériennes et la réactivation des virus herpès simplex et varicelle zoster. Cette phase se caractérise également par la prolifération de tumeurs telles que le sarcome de Kaposi, associé au virus de l'herpès humain 8, de lymphomes associés au virus d'Epstein-Barr et de cancers du col de l'utérus et de l'anus associée au papillomavirus humain. A mesure que le taux de LT continue de diminuer, d'autres pathogènes opportunistes se développent comme des pneumonies à pneumocystis carinii, des encéphalites à toxoplasmose et des méningites cryptococciques. Le CMV, Mycobacterium avium, et les infections à cryptosporidiose se produisent généralement lorsque le nombre de LT CD4 chute au-dessous des 50 par microlitre de sang. Ce dernier stade de l'infection au VIH, associé à une profonde immunosuppression conduit irrémédiablement à la mort du patient en quelques mois en l'absence de traitement.

## II-DETOURNEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFECTION AU VIH-1

Le système immunitaire est un réseau complexe de cellules dont la fonction est de protéger l'organisme contre les antigènes étrangers. Il peut être divisé en deux composantes, innée et adaptative, qui fonctionnent en synergie. Lors de l'intrusion d'un pathogène, les cellules de l'immunité innée sont les premières à intervenir. Elles répondent de manière rapide mais peu spécifique. Cette première ligne de défense peut parfois s'avérer insuffisante et nécessiter la mise en place d'une réponse adaptative. Pour cela, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les monocytes, les macrophages, et les DCs, jouent le rôle de relais de l'information. Elles sont capables de capturer et dégrader le pathogène puis de présenter les antigènes apprêtés aux cellules de l'immunité adaptative tel que les LT. Les LT possèdent un récepteur d'antigène « T cell Receptor » (TCR) spécifique pour un antigène. Lorsque les LT reconnaissent un antigène présenté par les CPA, ils s'activent pour organiser la réponse adaptative. Il existe deux types de réponses effectrices : une à médiation cellulaire et une à médiation humorale. Elles ont pour fonction de cibler et détruire spécifiquement les cellules portant cet antigène issu du pathogène tel que les cellules infectées ou de neutraliser directement les pathogènes eux-mêmes. La réponse à médiation cellulaire est essentiellement effectuée par les LT CD8+ cytotoxiques qui lysent de manière spécifique les cellules cibles. La réponse humorale est exécutée par les lymphocytes B (LB) qui secrètent des anticorps solubles capables de cibler spécifiquement un pathogène. Cette seconde ligne, de défense adaptative est contrôlée par les LT CD4+. Ces cellules sont également appelé LT « helper », ou auxiliaires qui, comme leur nom l'indique, aident à l'activation des LT CD8+ et LB. Ils sont divisés en différentes sous-populations Th1, Th2, Th17, T régulateurs, et Th folliculaires (TfH) qui régulent l'intensité et l'efficacité de la réponse effectrice. Ces cellules peuvent aussi constituer une population de cellules mémoires qui sont capables de répondre de manière plus rapide et plus efficace lors de réinfections par le même pathogène.

Malgré la présence de ces deux lignes de défense immunitaire, le VIH-1 parvient à instaurer une persistance à long terme. Il n'est jamais éliminé de l'organisme. La particularité de ce virus est qu'il s'attaque directement au système immunitaire, et provoque l'apparition de profonds dysfonctionnements immunologiques. Il infecte les LT CD4+ et conduit à leur destruction. Il pirate également les cellules présentatrices d'antigènes comme les DCs ([Lambotin, Raghuraman et al. 2010](#); [Miller and Bhardwaj 2013](#)). Ces cellules sont détournées de leurs fonctions protectrices pour assurer la dissémination du virus et sa persistance dans l'organisme. A terme, l'ensemble de ces troubles immunologiques conduisent à la phase finale de la maladie, le stade SIDA.

## A-Les cellules dendritiques

### 1. Généralités

Les DCs sont des cellules centrales du système immunitaire. Elles sont souvent qualifiées de « chef d'orchestre » du système immunitaire. Elles sont positionnées dans des sites stratégiques de l'organisme et jouent un rôle clé dans la détection lors de l'intrusion d'un pathogène. Elles ont la capacité de répondre rapidement à l'agression par un agent pathogène et à stimuler les cellules de l'immunité innée. Elles contrôlent également la mise en place et l'orientation de la réponse adaptative visant à éliminer les pathogènes grâce à une réponse spécifique. Ainsi elles jouent le rôle de relais de l'information, à l'interface de la réponse innée et adaptative. A l'inverse elles sont également dotées de nombreuses fonctions inhibitrices qui leur permettent de stopper les réponses immunitaires qui s'avèrent dangereuses pour l'organisme et régulent ainsi la tolérance antigénique. Tenant compte de leur rôle central dans la modulation des réponses immunitaires ces cellules sont largement détournées par les pathogènes afin d'assurer leurs persistance et d'échapper à la défense immunitaire. Les différentes fonctions des DCs ainsi que leur détournement par le VIH seront discutées dans ce second chapitre.

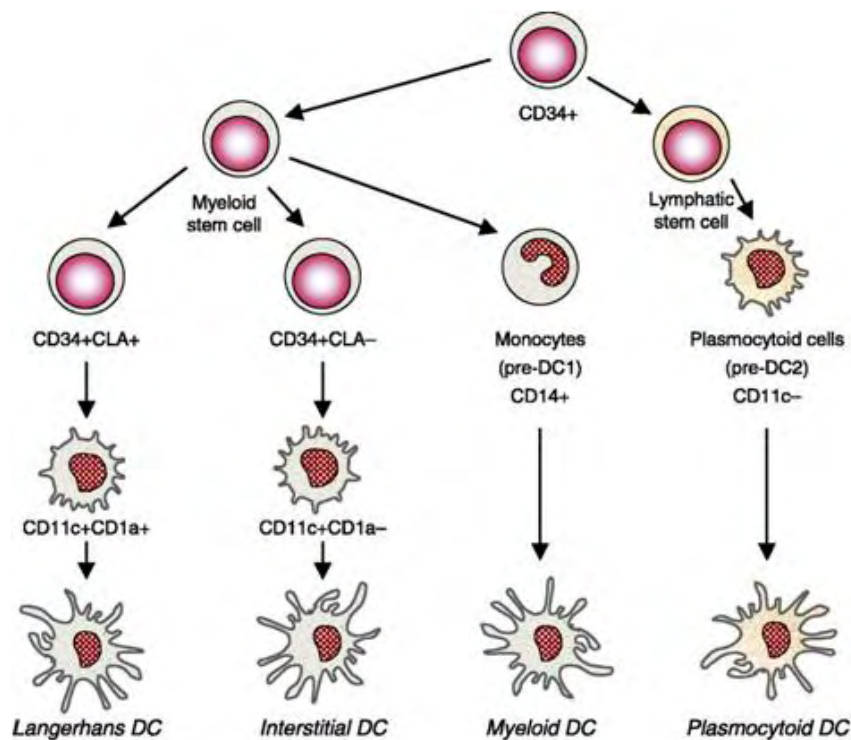


Figure 18 ontogénie des DCs humaines.

Les cellules dendritiques proviennent d'un précurseur hématopoïétique commun (CD34+) présent dans la moelle osseuse. Cette cellule progénitrice peut se différencier en différentes sous populations de cellules dendritiques. Deux principales voies de différenciation sont connues : la voie myéloïde qui conduit à la différenciation en cellules de Langerhans, en cellules dendritiques interstitielles ou en cellules dendritiques myéloïdes et la voie plasmacytoïde qui conduit à la différenciation en cellules dendritiques plasmacytoïdes. D'après [Schott 2006](#).

### **a) Les cellules dendritiques chez l'homme**

Chez l'homme il existe deux grandes populations de DCs, les DCs myéloïdes et les DCs plasmacytoïdes. Elles se différencient par leurs distributions anatomiques, leurs fonctions immunologiques, ainsi que par l'expression de différents marqueurs de surface. Toutes les populations de DCs dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes CD34+ qui se trouvent dans la moelle osseuse, mais également dans le sang de cordon et dans le sang périphérique.

### **b) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les DCs plasmacytoïdes se caractérisent par l'expression des marqueurs CD123 et CD45RA et par l'absence de CD11c. Elles expriment aussi de nombreux marqueurs lymphoïdes comme le CD4 et le pré-TCR, ce qui a longtemps laissé suggérer qu'elles étaient d'origine lymphoïdes. Ces cellules se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang circulant où elles représentent moins de 1% des leucocytes totaux. Elles sont connues pour produire de grandes quantités d'interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) lors d'une activation par un virus. Elles sont également impliquées dans l'activation des cellules NK et des LTh1 producteurs d'IFN- $\alpha$ . Ainsi, les DCs plasmacytoïdes jouent un rôle prépondérant dans la réponse antivirale et dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires.

### **c) Les cellules dendritiques myéloïdes**

Par opposition aux DCs plasmacytoïdes, les DCs myéloïdes aussi appelées les DCs conventionnelles expriment fortement CD11c et sont CD123 « low ». Ces cellules représentent en réalité plusieurs sous types de DCs en fonction de leur localisation tissulaire. Elles sont appelées les cellules de langerhans au niveau de l'épiderme, les DCs interstitielles au niveau du derme et du tissu interstitiel des organes et les DCs myéloïdes dans la circulation sanguine où elles représentent 0.5 à 2% des leucocytes. Ces cellules sont considérées comme les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, capables d'apprêter et de présenter les antigènes intracellulaires et extracellulaires, de sécréter de grandes quantités de cytokines dont l'IL-12 qui contrôle la différenciation des LT naïfs en LTh1. Elles sont capables d'interagir avec de nombreuses cellules de l'immunité tels que les LT CD4, LT CD8, NK, NKT, LT $\gamma\delta$  et LB. Elles expriment également des molécules de costimulation et disposent de toutes les caractéristiques nécessaires pour l'activation des LT CD4+ et CD8+.






### **d) Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC)**

Les monocytes sont également capables de se différencier en DCs myéloïdes *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4 ([Pickl, Majdic et al. 1996](#)) ou d'IL-13 ([Morse, Lysterly et al. 1999](#)). Ces cellules sont couramment utilisées pour générer des DCs et semblent posséder l'essentiel des caractéristiques fonctionnelles des DCs conventionnelles. Leur différenciation se caractérise au niveau phénotypique par la perte du marqueur CD14 et l'acquisition de CD1a. Plusieurs arguments

laissent supposer que la différenciation de monocytes en DCs survient également *in vivo*, sous l'influence de cytokines produites localement au niveau d'un site inflammatoire ([Schreiber and Sandor 2012](#)). Ainsi, les MoDC sont plutôt qualifiés de DCs inflammatoires bien qu'elles soient également capables d'induire une tolérance sous l'influence de certains signaux d'activation. Après différenciation, les MoDC ont un phénotype immature, c'est-à-dire qu'elles expriment faiblement le marqueur CD83, les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, et les molécules du CMH de classe II. Ces cellules ont une grande capacité de capture de l'Ag mais une faible capacité d'activer des LT à l'état immature. La maturation des MoDC peut être obtenue *in vitro* après stimulation par différents agents comme i) les ligands des TLRs dont le plus couramment utilisé est le LPS (ligand du TLR4) ; ii) les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  iii) les Interférons (IFN- $\alpha$ / $\beta$  ou  $-\gamma$ ) ou iv) des mélanges dont le plus couramment utilisé, connu sous le nom de « gold standard for maturation », est un cocktail composé des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et PGE 2 ([Trepikak, Pedersen et al. 2008](#)).

**Tableau 2 Les différentes populations de DCs humaines et leurs principales caractéristiques.**

D'après ([Lambotin, Raghuraman et al. 2010](#)).

	Myeloid subtypes				
	Plasmacytoid DCs	Myeloid DCs	Langerhans cells	Interstitial DCs	Monocyte-derived DCs
<b>Morphology</b>					
<b>Localization</b>	Blood	Blood	Epidermis	Dermis and other tissues	<i>In vitro</i>
<b>Phenotype</b>	CD11c <sup>-</sup> CD1a <sup>+</sup> CD1c <sup>-</sup> CD123 <sup>high</sup> CD304 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD1c <sup>+</sup> CD123 <sup>low</sup> CD304 <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD207 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> CD68 <sup>+</sup> and expresses coagulation factor XIII A chain	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD1c <sup>+</sup> CD123 <sup>low</sup>
<b>TLR expression</b>	TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 and TLR10	TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, TLR7 and TLR8	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 and TLR8,	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 and TLR10
<b>C-type lectin expression</b>	BDCA2 and DCIR	DCIR, DC-SIGN and MR	CD207	DC-SIGN and MR	DCIR, DC-SIGN and MR
<b>CD4<sup>+</sup> T cell priming</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>CD8<sup>+</sup> T cell priming</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>B cell activation</b>	Yes	Yes	Yes (weak)	Yes	Yes
<b>IFN<math>\alpha</math> production</b>	Yes (high)	Yes	Yes	Yes	Yes



## 2. La détection des signaux de danger

### a) Les différents signaux de danger

L'initiation de la réponse immunitaire nécessite dans un premier temps la détection de différents « signaux de danger » par les DCs. Ces signaux sont classés en deux catégories : les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) et les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern). Les PAMPs sont des molécules exprimées uniquement chez les pathogènes, les molécules du « non-soi infectieux » par opposition aux molécules naturellement produites par l'organisme en conditions non pathologiques, les molécules du « soi » ([Janeway 1989](#); [Janeway 1992](#)). Ces molécules présentent trois caractéristiques importantes : (i) elles sont produites exclusivement par les micro-organismes et sont absentes des cellules de l'hôte ; (ii) elles sont communes à de nombreuses espèces de micro-organismes potentiellement pathogènes et (iii) ces molécules sont très conservées et essentielles à la biologie des micro-organismes, limitant ainsi l'apparition de mutants d'échappements ([Janeway and Medzhitov 2002](#)). Les DAMPs sont plus largement des « signaux de danger » qui incluent également des molécules du « soi » qui se retrouvent dans des compartiments cellulaires non physiologiques ou relargués par les cellules endommagées, les cellules infectées, ou tumorales ([Matzinger 1994](#)). Ainsi, les DCs ne détectent pas seulement les micro-organismes pathogènes mais plus largement, l'ensemble des menaces qui mettent en péril la survie de l'organisme comme les infections par les bactéries, virus, champignons parasites ainsi que les dégâts causés par les pathogènes, les cellules tumorales ou des agents chimiques.

### b) Les récepteurs des motifs conservés des pathogènes (PRR)

Ces différents signaux sont reconnus par une diversité de récepteurs de l'immunité innée, les PRR (Patterns Recognition Receptor). Les PRR peuvent être différenciés en trois grandes classes de récepteurs i) les récepteurs « scavengers » et les lectines de type C dont les dectines -1/-2, DC-SIGN, le récepteur mannose, la famille des galectines, ainsi que le CD36. ii) Les récepteurs de signalisation qui regroupent les TLRs (Toll-like receptor), les NLRs (NOD-like receptor) et les RLRs (RIG-I-like receptor), et iii) les récepteurs solubles comprenant les collectines, ficolines et les pentraxines. Ainsi, les DCs sont capables d'intégrer une incroyable diversité de signaux qui leur permettent de mettre en place rapidement la réponse immunitaire nécessaire ([Palm and Medzhitov 2009](#)).

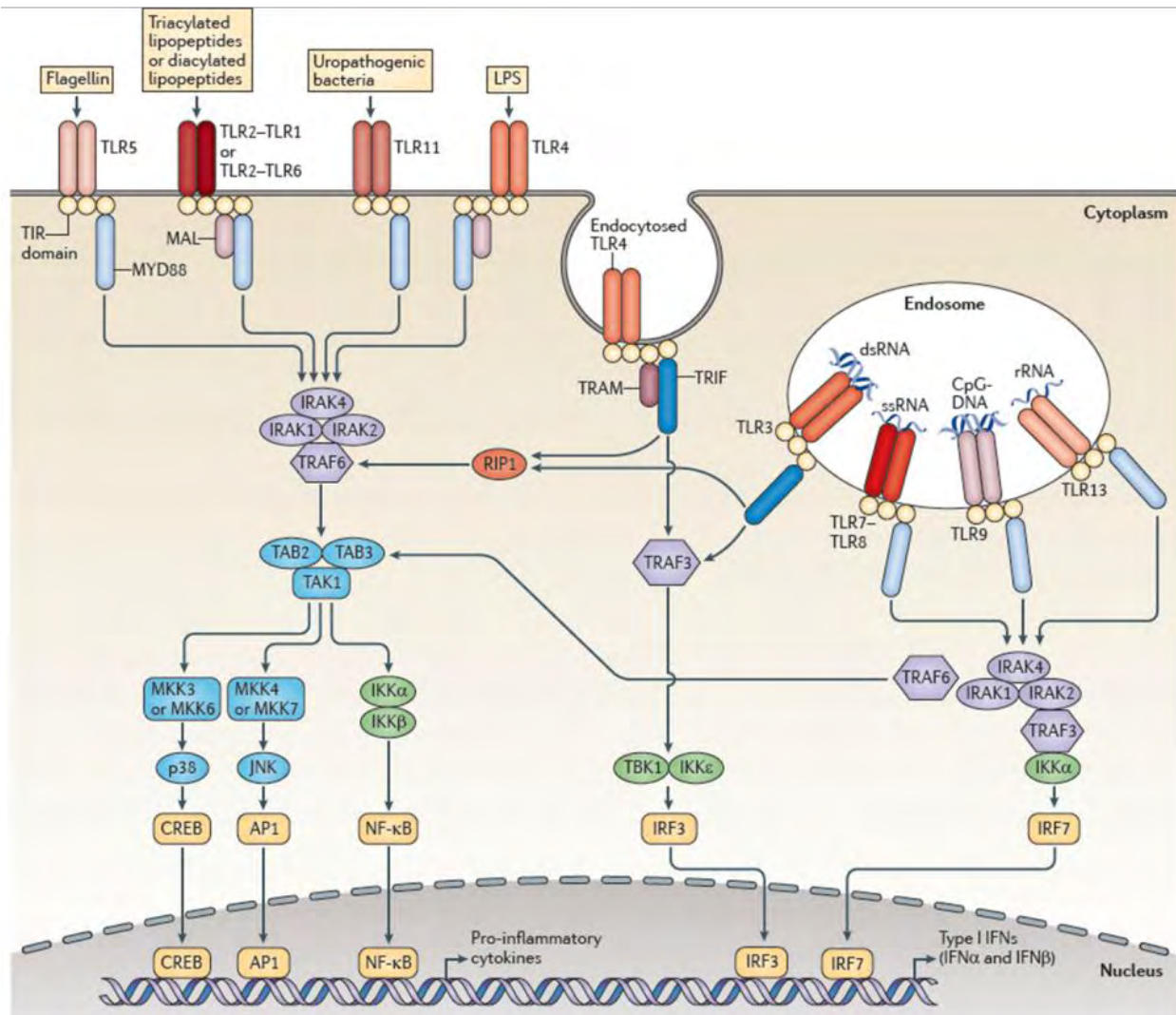


Figure 19 Les Toll-like receptor et leurs ligands.

Les Récepteurs Toll-like (TLR) reconnaissent des motifs moléculaires associés à des pathogènes distincts et jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires innées. Ils participent à la première ligne de défense contre les pathogènes et jouent un rôle important dans l'inflammation, la régulation des cellules immunitaires, la survie et la prolifération. À ce jour, 10 membres de la famille TLR ont été identifiés chez l'homme, dont les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6 sont situés sur la surface de la cellule et les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisées dans le compartiment endosomal / lysosomal. Le TLR2 agit sous forme homodimérique pour reconnaître le zymozan des levures, il agit également sous forme d'hétérodimère avec le TLR1 pour reconnaître les lipopeptides triacylés (Pam3CSK4) présents dans la paroi des bactéries Gram-positives ou avec le TLR6 pour reconnaître les lipopeptides diacylés (Pam2CSK4), le TLR10 semble également agir en hétérodimère avec le TLR2 et jouer un rôle à l'interface fœto-maternelle, le TLR5 reconnaît la flagelline des bactéries gram négatif, le TLR4 reconnaît le LPS des bactéries gram négatif ainsi que certaines protéines virales comme la protéine F du virus respiratoire syncytial (RSV), la protéine G du VSV ou encore la protéine Env du MMTV, le TLR3 est activé par l'ARN double brin viral ou son ligand synthétique le poly I :C, les TLR7 et TLR8 sont impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brins viraux, et le TLR9 reconnaît l'ADN bactériens présentant des motifs CpG non méthylés. Les TLR 11 et 13 sont connues uniquement chez la souris. Il existe deux voies de signalisation en aval des TLR : une voie Myd88 dépendante qui est activée par l'ensemble des TLR à l'exception du TLR3 et une voie TRIF dépendante (Myd88 indépendante) qui n'est présente que pour les TLR3 et TLR4. Le TLR4 active les deux voies de signalisation. L'engagement des TLR conduit principalement à l'activation du facteur NF- $\kappa$ B et des « interféron-regulatory factors » (IRFs) associées à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6) et des interférons de type I (IFN- $\alpha$ /- $\beta$ ), respectivement. D'après (O'Neill, Golenbock et al. 2013).

### c) Les récepteurs « Toll-Like »

La famille des PRR qui a été la plus étudiée est la famille des TLR. Les récepteurs Toll ont été initialement découverts chez la drosophile où ils jouent un rôle important dans la polarisation de l'axe dorso-ventral ([Anderson, Bokla et al. 1985](#)). Par la suite des homologues de ces récepteurs, les « Toll-like » ont été impliqués dans la réponse immunitaire dont le premier a également été identifié chez la drosophile, impliqué dans la résistance contre une infection fongique ([Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997](#)). Dix TLR différents ont été identifiés chez l'homme et treize sont connues chez la souris. Ils jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire et la détection des signaux de dangers. Ils peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur localisation subcellulaires. On retrouve des TLRs de surface (TLR1, 2, 4, 5, 6) et les TLR endosomaux (TLR3, 7, 8, 9). Chacun d'entre eux reconnaît des ligands très spécifiques ([O'Neill, Golenbock et al. 2013](#)).

La localisation de ces TLR est en relation directe avec leurs fonctions. Ainsi, les TLR extracellulaires permettent la détection de motifs de surfaces, ou sécrétés, des pathogènes alors que les récepteurs endosomaux sont principalement impliqués dans la reconnaissance de ligands internes des pathogènes comme les acides nucléiques. En plus d'une localisation subcellulaire différente, les TLR présentent un spectre d'expression différent en fonction des sous populations de DCs ([Iwasaki and Medzhitov 2004](#)). Cette diversité permet aux DCs d'induire une réponse adaptée, en fonction de l'agent pathogène.

Au niveau structural, les TLR se composent d'un ectodomaine exposé au milieu extracellulaire, ou à la lumière endosomale, d'un domaine transmembranaire et d'une région intracytoplasmique contenant un domaine Toll/IL-1 récepteur (TIR) qui est impliqué dans le recrutement des molécules de signalisation. Les domaines extracellulaires/endosomaux des TLR sont composés de séquences riches en leucines (LRR), structurées en « fer à cheval », directement impliquées dans la reconnaissance des PAMP. Ils agissent sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères. La plupart des TLR forment des homodimères, à quelques exceptions près. Par exemple, le TLR2 forme un hétérodimère avec le TLR1 pour la reconnaissance des lipopeptides triacylés (Pam3CSK4), ou bien avec le TLR6 pour répondre aux lipopeptides diacylés (Pam2CSK4) ([Lee, Avalos et al. 2012](#)).

L'interaction PAMP-TLR provoque la dimérisation du récepteur ce qui conduit au rapprochement des séquences TIR intra-cytoplasmique et déclenche une cascade de signalisation. Il existe deux voies de signalisation en aval des TLR : une voie Myd88 dépendante qui est activée par l'ensemble des TLR à l'exception du TLR3 et une voie TRIF dépendante (Myd88 indépendante) qui n'est présente que pour les TLR3 et TLR4. De manière intéressante le TLR4 active les deux voies de signalisation ([Akira and Takeda 2004](#)). L'engagement des TLR conduit principalement à l'activation du facteur NF- $\kappa$ B et des « interferon-regulatory factors » (IRFs) associées à la production de cytokines pro-inflammatoires et des interférons de type I (IFN), respectivement.

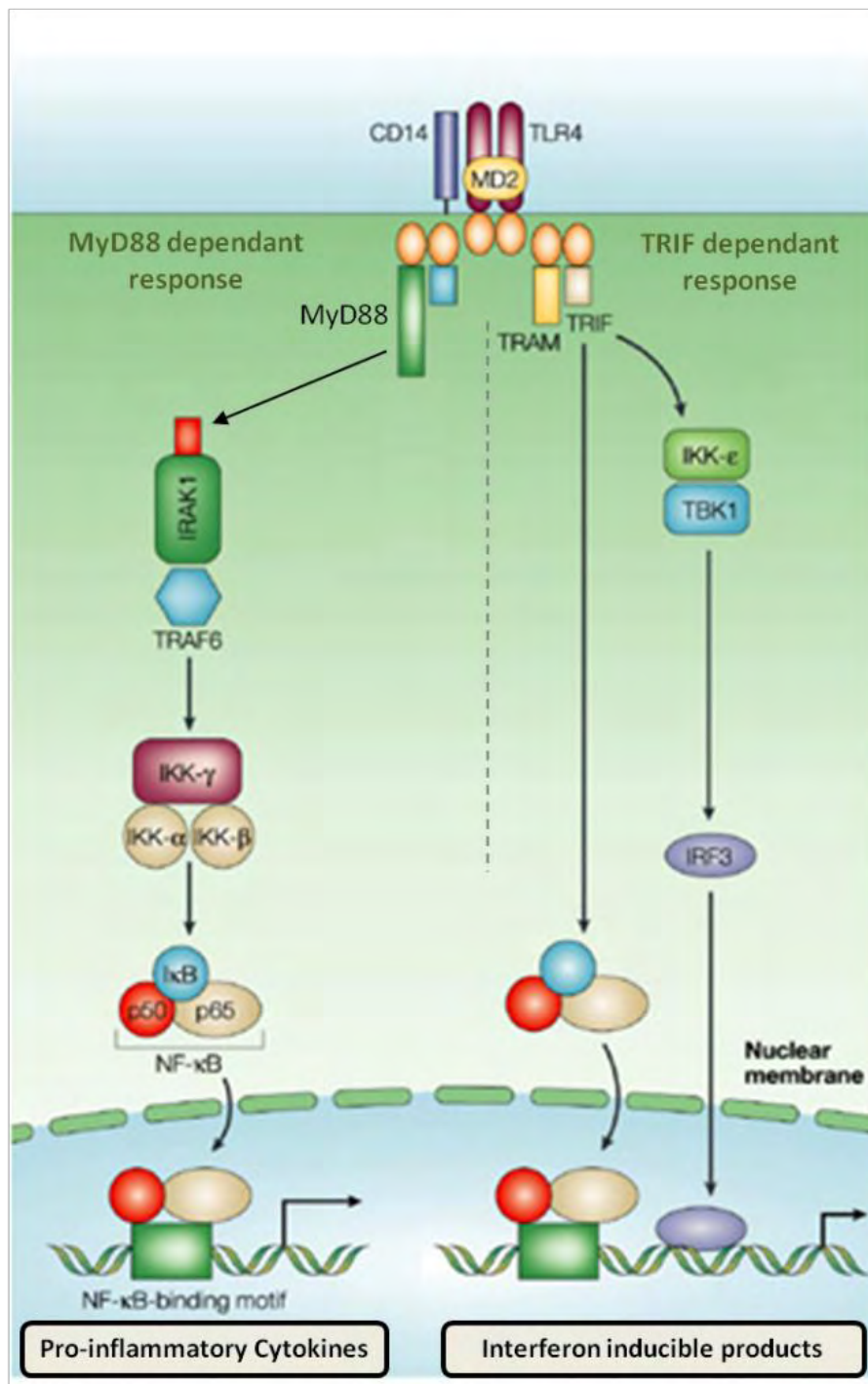


Figure 20 Le TLR4 et ses deux voies de signalisation.

Après fixation du ligand et dimérisation du récepteur TLR4 deux voies de signalisation sont activées en aval. 1) La voie Myd88 dépendante fait intervenir 4 adaptateurs fonctionnels : Mal (Tirap) Myd88, IRAK et TRAF6. Le recrutement de ces molécules conduit à l'activation du complexe IKK de la voie NF-κB et des Map kinases p38, ERK1/2 et JNK de la voie AP-1. Au final la voie Myd88 conduit à l'expression des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6, l'IL-1 et le TNF-α. 2) La voie TRIF dépendante (Myd88 indépendante) fait intervenir les adaptateurs TRAM et TRIF et permet l'activation des kinases IKK-ε et TBK1. Ces molécules mènent à l'activation du facteur de transcription IRF3, qui permet l'expression des interférons de type I α/β et des gènes associés. La voie TRIF dépendante conduit également à une activation tardive de la voie NF-κB et à l'expression des gènes en aval. D'après (Akira and Takeda 2004).

#### **d) Le TLR4 et ses cofacteurs : CD14 et MD2**

Au cours de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à un membre de la famille des TLR, le TLR4. C'est une protéine d'environ 96 kDa exprimée à la surface des cellules immunitaires telles que les monocytes, macrophages, DCs et LB. Son ligand principal est le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif. Ce dernier est un glycolipide qui se compose d'un lipide A constitué de nombreuses chaînes latérales d'acides gras dont le nombre varie selon les espèces (six chaînes pour le LPS de *Escherichia coli*), d'un cœur d'oligosaccharide et d'un antigène O ([Miller, Ernst et al. 2005](#)). La détection du LPS par le TLR4 permet l'induction de la réponse immunitaire antibactérienne. Les premières études ont montré que les souris TLR4 Ko sont plus sensibles aux infections par les bactéries gram négatives. Par ailleurs, une activation trop soutenue du TLR4 conduit également à des pathologies comme le shock septique. Une lignée de souris (C3H/HeJ) connue pour être naturellement résistante au shock septique induit par le LPS a notamment contribué à la découverte du gène codant pour le TLR4 ([O'Neill, Golenbock et al. 2013](#)). Par la suite il a été découvert que ces souris possèdent une mutation naturelle dans le domaine TIR du TLR4 qui abolit la signalisation en aval ([O'Neill, Golenbock et al. 2013](#)). Le mécanisme d'activation du TLR4 par le LPS est complexe et nécessite l'intervention successive d'au moins deux cofacteurs différents tels que CD14 et MD2 en plus de la protéine « LPS binding protein » LBP ([Jerala 2007](#)).

CD14 est une glycoprotéine d'environ 55 kDa qui existe sous forme soluble circulante dans le sérum mais aussi sous forme membranaire exprimée à la surface des monocytes, macrophages et LB, grâce à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). CD14 est capable de capturer le LPS et de le transférer au complexe TLR4/MD2 ([Jerala 2007](#)). Elle permet ainsi de faciliter la reconnaissance du LPS dit « smooth » caractérisé par la présence de l'antigène O par opposition au LPS dit « rough » dépourvu de l'antigène O qui est capable de fixer directement le récepteur TLR4/MD2 de manière CD14 indépendante ([Zanoni, Bodio et al. 2012](#)). D'autres travaux suggèrent également que cette protéine jouerait un rôle dans l'activation de la voie de signalisation MyD88 indépendante suite à l'internalisation du Complexe TLR4/MD2 dans la voie endosomale ([Jiang, Georgel et al. 2005](#)).

MD2 (Myeloïd differentiation 2) est une glycoprotéine d'environ 29 kDa associée à l'ectodomaine du TLR4 ([Jerala 2007](#)). Cette protéine est nécessaire à l'expression du TLR4 au niveau membranaire, elle est aussi essentielle pour la fixation du LPS. Elle possède une structure composée de deux feuillet- $\beta$  antiparallèles qui forment une large poche hydrophobe capable de lier directement le LPS ([Park, Song et al. 2009](#)). Après fixation du LPS au MD2, le complexe TLR4/MD2 se structure en homodimère. Cette dimérisation permet le recrutement de molécules de transduction du signal au niveau du domaine intracellulaire TIR du TLR4 et de déclencher les deux voies de signalisation MyD88 dépendante et indépendante ([Lu, Yeh et al. 2008](#)). Une étude récente a également montré que MD2 est phosphorylée suite à l'activation de la voie du TLR4 et que cette molécule pourrait jouer un rôle de signalisation dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B ([Gray, Dagvadori et al. 2011](#)).

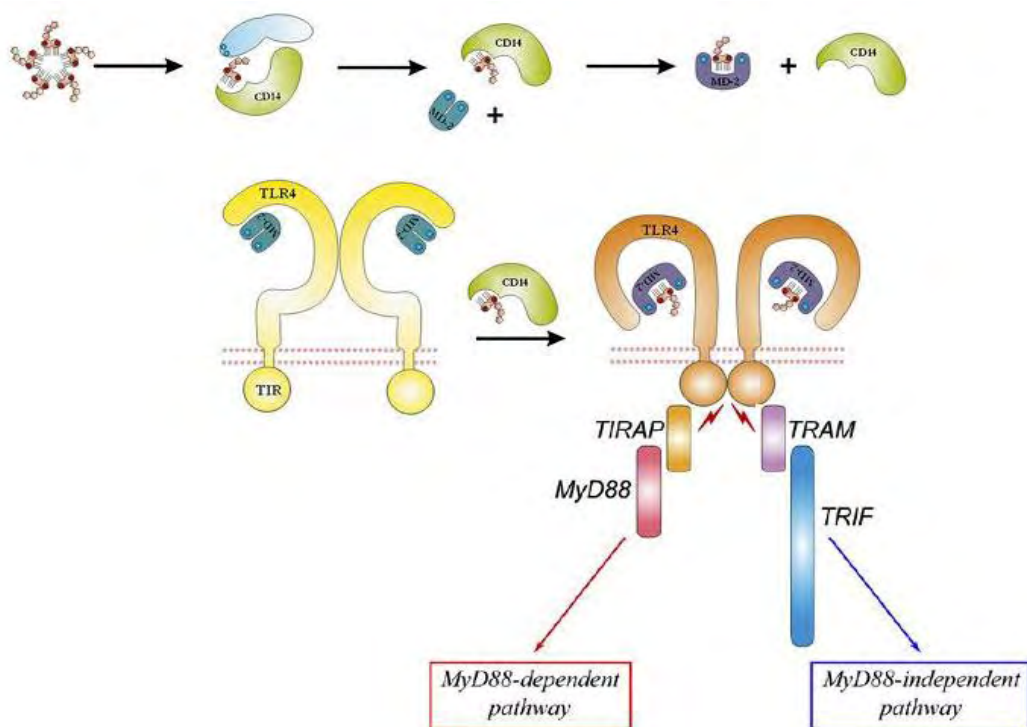


Figure 21 Le TLR4 et ses cofacteurs impliqués dans la reconnaissance du LPS.

Représentation schématique des différentes étapes de la reconnaissance du LPS par le TLR4, et des voies de signalisations activées, (modifié d'après [Jerala 2007](#); [Lu, Yeh et al. 2008](#)). Le LPS est reconnu par les cofacteurs LBP (en bleu) et CD14 (en vert) puis transféré à la protéine MD2 (en violet). Le complexe LPS-MD2 s'associe à l'ectodomaine du TLR4 et provoque la dimérisation du récepteur. Les domaines TIR intracytoplasmiques déclenchent alors une cascade de signalisation Myd88 dépendante et Myd88 indépendante. D'après [Jerala 2007](#)).

### e) Détournement du TLR4 par les virus et par le VIH-1

En plus de son rôle dans la détection du LPS bactérien, le TLR4 est également activé par certaines protéines virales comme la protéine F du virus respiratoire syncytial (RSV) ([Kurt-Jones, Popova et al. 2000](#)), la protéine G du VSV ([Schabbauer, Luyendyk et al. 2008](#)) ou encore la protéine Env du MMTV ([Jude, Pobežinskaya et al. 2003](#)). Cependant, dans le cas des infections virales, l'activation du TLR4 semble plutôt favorable au virus comme cela a été décrit pour le rétrovirus MMTV qui utilise le TLR4 pour induire la production d'IL-10 par les LB ([Jude, Pobežinskaya et al. 2003](#)), ce qui contribue à l'échappement viral en instaurant un état immunosuppresseur.

De nombreux travaux suggèrent que la voie du TLR4 joue également un rôle important au cours de l'infection par le VIH-1. L'expression de ce récepteur ([Hernandez, Arteaga et al. 2011](#); [Hernandez, Stevenson et al. 2012](#)) ainsi que de ses cofacteurs CD14 ([Lien, Aukrust et al. 1998](#)) et MD2 sont fortement augmentées au cours de l'infection et leur taux semblent corrélés avec la sévérité de la maladie ([Sandanger, Ryan et al. 2009](#)). Le TLR4 est également induit à la surface des LT ([Sanders, Cruse et al. 2008](#)). Des études *in vitro* ont montré que l'activation du TLR4 à la surface des cellules infectées conduit à l'activation du promoteur proviral LTR et stimule la réplication du VIH

([Equils, Faure et al. 2001](#); [Bafica, Scanga et al. 2004](#)). L'ensemble de ces données tendent à suggérer une implication de la voie TLR4 dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1.

### 3. Capture des antigènes

Les DCs jouent un rôle essentiel dans la détection aux portes d'entrée des pathogènes. Elles se trouvent généralement à l'état immature dans les organes périphériques. Elles surveillent en permanence les antigènes du milieu environnant. Elles sont dotées d'une importante capacité d'internalisation des antigènes qu'elles capturent afin de les présenter dans le contexte des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'internalisation des antigènes est réalisée par différentes voies d'entrée incluant i) la macropinocytose ii) l'endocytose médiée par différents récepteurs comme les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines (FcR), les récepteurs au complément (CR), les récepteurs PRR, les récepteurs scavenger (dont CD36) et les récepteurs des lectines de type C (dont DC-SIGN) et iii) la phagocytose est davantage utilisée dans l'internalisation d'antigènes plus gros comme les bactéries, les parasites, et les corps apoptotiques ou nécrotiques. Généralement, les antigènes capturés sont des molécules du soi qui ne déclenchent pas de réponse immunitaire, dans ce cas les DCs n'induisent pas l'activation des LT spécifiques mais contrôlent plutôt la tolérance périphérique. Cependant, lorsque la capture de l'antigène est accompagnée par un signal de danger détecté par les TLRs ou autres PRR, les DCs vont maturer et migrer vers les organes lymphoïdes drainants afin d'initier la réponse T.

### 4. Maturation des cellules dendritiques

La maturation des DCs est un processus complexe déclenché par l'intégration de signaux de danger qui peuvent être induits par différents acteurs comme 1) les DAMPS, 2) les PAMPS, 3) les cytokines pro-inflammatoires ou encore 4) des interactions cellulaires. Les voies de signalisation conduisant à la maturation des DCs sont des voies classiques qui passent notamment par l'activation des MAPK, NF- $\kappa$ B ou des IRF. L'étape de maturation conduit à l'activation de nombreux gènes (plus de 6000) et à des modifications phénotypiques des DCs visant à augmenter leur capacité à activer LT ([Macagno, Napolitani et al. 2007](#)). Elle conduit notamment à i) une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence (LFA-3, ICAM-1/-2 et DC-SIGN) participant à l'établissement de la synapse immunologique ii) une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation positive (CD80, CD86 et CD40) nécessaires à l'activation des LT iii) l'apparition du marqueur de surface CD83 spécifique de la maturation des DCs, iv) l'augmentation de l'expression à la surface du CMH-II v) l'apparition du récepteur CCR7 qui permet aux DCs de migrer vers les nœuds lymphatiques par chimiotactisme en réponse aux chimiokines CCL19, et CCL21 ainsi qu'à vi) la production de nombreuses cytokines (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ) et chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5). Enfin, la maturation s'accompagne également d'une diminution de la capacité de phagocytose associée à une augmentation de l'apprêtement et de la présentation antigénique.

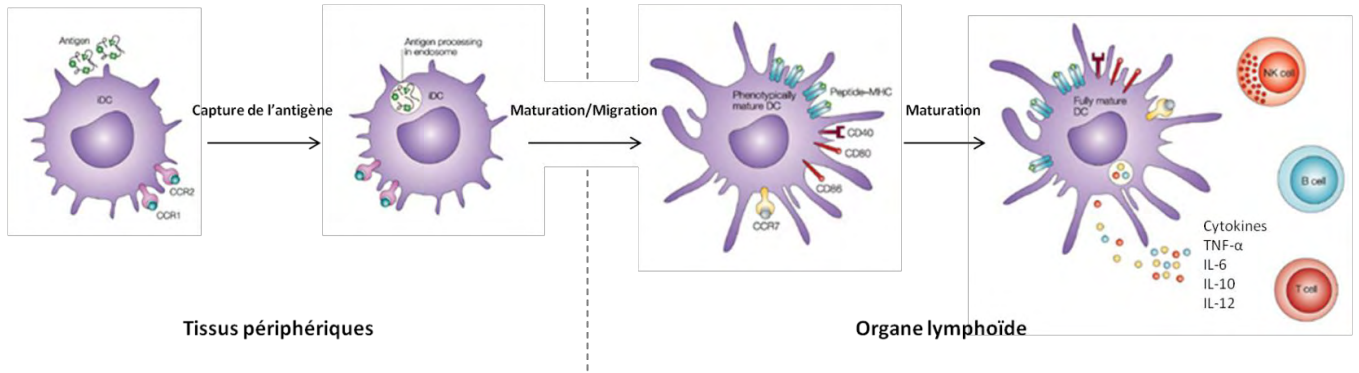


Figure 22 Les différentes étapes de la maturation des DCs.

Représentation schématique des différentes étapes de la vie d'une cellule dendritique : la capture de l'antigène dans les tissus périphériques, la maturation et la migration vers les organes lymphoïdes secondaires, l'interaction et l'activation des différents effecteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative. D'après (Hackstein and Thomson 2004).

## 5. Apprêtement et présentation des antigènes

Au terme de l'étape de maturation, les DCs se spécialisent dans la présentation des antigènes via les molécules du CMH-I et du CMH-II afin d'activer respectivement les LT CD8+ et les LT CD4+. La présentation des peptides via le CMH-I et le CMH-II résulte de deux voies distinctes ([Neefjes, Jongmsma et al. 2011](#)).

### a) Présentation par le CMH-I

Les antigènes présentés par le CMH-I sont généralement d'origine intracellulaires. Ils proviennent de protéines dégradées par le protéasome et il peut s'agir de protéines du « soi » comme les DRiPS (defective ribosomal products) ou du « non soi » comme des protéines virales. Ces produits de dégradation vont subir une série de modifications afin d'être chargés sur le CMH-I. Tout d'abord, ces produits peptidiques de 8 à 16 aa sont acheminés vers le réticulum endoplasmique (RE) par le transporteur (TAP). Une fois dans le RE, ils peuvent subir de nouvelles modifications par des aminopeptidases comme ERAP afin de générer des peptides de 8-9 acides aminés compatibles avec une association au CMH-I. Le CMH-I (codé par les gènes HLA-A, -B, et -C) est un complexe composé d'une chaîne lourde portant trois domaines ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) associée à une chaîne légère appelée  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2m$ ). Le troisième élément du complexe est le peptide. Celui-ci s'insère dans une poche à peptide présente au niveau des domaines  $\beta 2$  et  $\beta 3$  de la chaîne lourde. De nombreuses protéines chaperones interviennent dans ce mécanisme comme les calnexines, calréticulines, tapasines, et ERp57. Elles ont pour rôle de stabiliser le complexe antigène/CMH-I/ $\beta 2m$ . Lorsque le complexe est formé, les chaperones sont libérées et le CMH-I chargé avec l'antigène quitte le RE pour être présenté à la surface cellulaire. Afin d'augmenter leur capacité de présentation des antigènes intracellulaires, les DCs peuvent convertir leur protéasome en immunoprotéasome en réponse à certains signaux. Celui-ci correspond à une réorganisation du protéasome 26S classique avec l'assemblage de nouvelles sous unités. Il permet de générer plus de peptides spécifiques de la poche du CMH-I et augmenter la présentation des antigènes. La présentation par le CMH-I est un



mécanisme ubiquitaire réalisé par l'ensemble des cellules nucléées du corps. Cependant seules les CPA professionnelles sont capables d'activer les LT CD8+ en LT cytotoxiques ayant pour fonction de détruire les cellules infectées exposant des antigènes viraux.

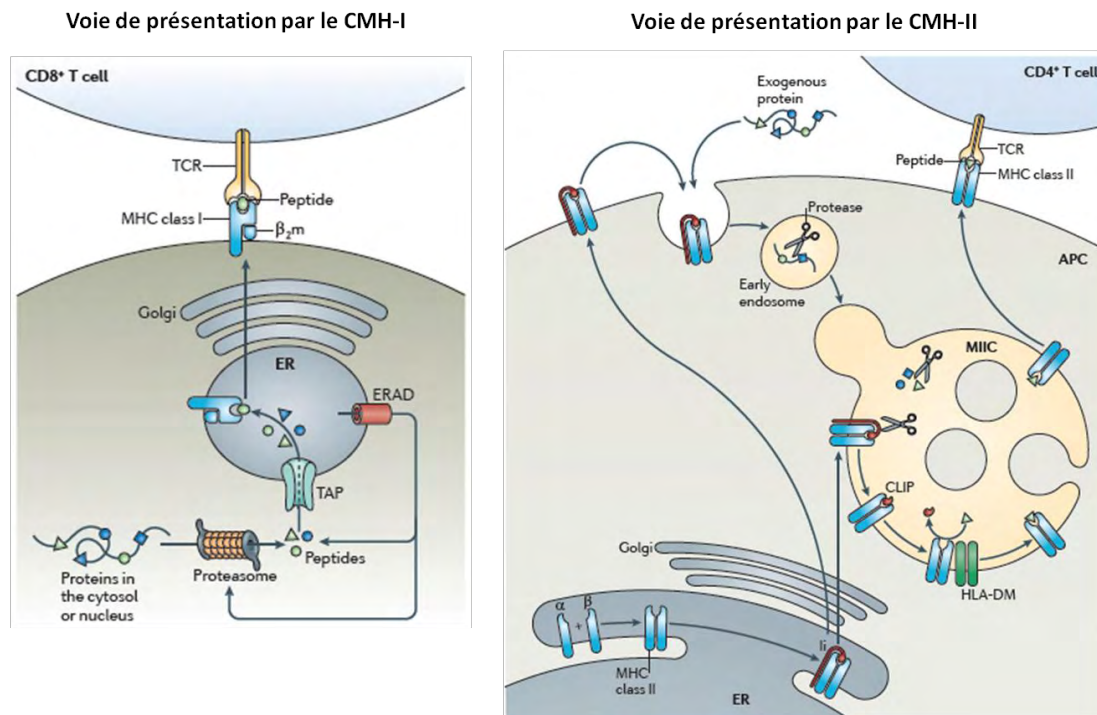


Figure 23 Voie de présentation des antigènes par le CMH-I et le CMH-II.

Représentation schématique de la voie d'apprêtement et de présentation des antigènes par le CMH-I (image de gauche) et par le CMH-II (Image de droite). Les différentes étapes sont détaillées dans le texte. D'après (Neeffjes, Jongmsa et al. 2011).

### b) Présentation par le CMH-II

Contrairement au CMH-I, la voie de présentation par le CMH-II permet la présentation des antigènes d'origine extracellulaire. Cette voie est réservée à une élite cellulaire nommée les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) monocytes, macrophages, DCs et LB. Le CMH-II (codé par les gènes HLA-DP, -DQ, et -DR) est composé de deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) qui sont assemblées dans le RE. Dans ce compartiment, le CMH-II s'associe avec une chaîne invariante (Ii) avant d'être transporté vers les endosomes tardifs. En parallèle, les antigènes d'origine extracellulaire capturés par les DCs sont dégradés dans les vésicules d'endocytoses en cours d'acidification par une série d'enzymes (cathepsines, asparaginyl endopeptidase). Dans les endosomes tardifs les antigènes dégradés rencontrent le complexe CMH-II/Ii. Dans ce compartiment, la chaîne invariante est dégradée par les cathepsines en laissant un peptide résiduel le peptide CLIP (class II associated li peptide) qui reste associé au CMH-II et bloque la poche à peptide. C'est alors qu'intervient une protéine nommée HLA-DM qui capture le peptide CLIP et libère la poche à peptide dans laquelle va se loger les peptides apprêtés long de 12 à 30 aa. Les molécules du CMH-II chargées avec l'antigène sont ensuite transportées vers la membrane plasmique afin de présenter leur cargaison aux LT CD4 +.

### **c) La présentation croisée**

En plus des voies classiques de présentation des antigènes, il existe une voie alternative appelée cross présentation qui permet aux DCs de présenter des antigènes d'origine exogène via le CMH-I. Cette voie, moins documentée, permet l'activation de la réponse CD8+ sans que la cellule présentatrice ne soit elle-même infectée. Ainsi, la présentation croisée joue un rôle essentiel dans la réponse antivirale.

### **d) Présentation d'antigènes par les molécules de CMH non classiques**

Enfin, il existe également d'autres voies de présentation des antigènes par des molécules du CMH non classiques telles que les molécules CD1 qui sont impliquées dans la présentation d'antigènes de nature lipidiques et glycolipidiques et qui sont reconnues par le TCR de sous population de LT telles que les NKT et LT- $\gamma\delta$  ([Barral and Brenner 2007](#)).

## **6. Production de cytokines**

La maturation des DCs s'accompagne de la production d'un vaste panel de cytokines. Les cytokines produites sont conditionnées par les signaux reçus par les DCs au cours de leur maturation. Elles jouent un rôle essentiel dans l'amplification de l'inflammation, l'orientation de la polarisation de la réponse T, et/ou dans la régulation de l'activation immunitaire. Les principales cytokines produites et leurs fonctions sont détaillées ci-dessous.

### **a) Le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF- $\alpha$ )**

Le TNF- $\alpha$  appartient à la superfamille des "tumor necrosis factor" qui est constituée de différents facteurs solubles ou membranaires ([Chu 2013](#)). Initialement, il a été découvert pour sa propriété de nécrose des tumeurs ([Carswell, Old et al. 1975](#)) mais on sait aujourd'hui qu'il présente un large spectre d'activités. Il est produit majoritairement par les monocytes, les macrophages, et les DCs, mais les neutrophiles, les cellules Natural killer (NK) et les LT en synthétisent également ([Skinner, MacIsaac et al. 2005](#); [Buscemi, Ramonet et al. 2007](#)). C'est un acteur essentiel de la réponse immunitaire innée et de la réponse inflammatoire. Il est produit très rapidement suite à l'activation cellulaire. Les niveaux d'ARNm augmentent brusquement en 15 à 30 minutes après activation. La protéine est produite sous forme de précurseurs transmembranaire de 26 kDa, avec un domaine cytoplasmique et une extrémité C-terminale à l'extérieur de la cellule. Elle peut être clivée par une métalloprotéase membranaire appelée TNF convertase enzyme (TACE) ([Gearing, Beckett et al. 1994](#)) pour donner un facteur soluble. Le TNF- $\alpha$  libéré (17 kDa) peut s'assembler en trimère, pour trouver sa forme biologiquement active ([Aggarwal and Kohr 1985](#)). Il peut donc exercer sa fonction, soit à distance par la forme soluble, soit lors de contact intercellulaire par la forme membranaire ([Kriegler, Perez et al. 1988](#)). Le TNF- $\alpha$  agit en se fixant sur son récepteur TNFR. Il

existe deux récepteurs connus TNFR1 et TNFR2. Cependant, la forme soluble du TNF- $\alpha$  ne semble activer efficacement que le TNFR1. Suite à sa fixation, le TNF- $\alpha$  active une cascade de signalisation complexe qui conduit principalement à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 ([Cabal-Hierro and Lazo 2012](#)). Ces facteurs, une fois transloqués dans le noyau vont pouvoir activer l'expression de nombreux gènes, impliqués dans la réponse immunitaire. Ainsi, le TNF- $\alpha$  induit la libération de molécules de la défense immédiate (radicaux libres, monoxyde d'azote, métalloprotéases, PGE2, PAF). Il active la production en cascade de nombreuses autres cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6,...) visant à amplifier la réponse inflammatoire. Il favorise également le recrutement et l'activation de cellules immunitaires effectrices. Il active également la production de son régulateur l'IL-10. Enfin, le TNF- $\alpha$  active de nombreux gènes impliqués dans la maturation des DCs comme les molécules de co-stimulation positives et le CMH-II. Ainsi, il joue un rôle essentiel dans la défense anti-infectieuse. Il est aussi impliqué dans des pathologies telles que l'asthme et le choc septique ([Skinner, Maclsaac et al. 2005](#)) en cas de dérégulation.

### **b) L'interleukine-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine clé dans le déclenchement de la réponse inflammatoire. Elle est produite par un nombre limité de cellules telles que les monocytes, les macrophages, les cellules microgliales et les DCs. Sa production est étroitement régulée. Elle est produite sous la forme de pro-IL-1 $\beta$  (31 kDa) et son activation est contrôlée par l'« IL-1 $\beta$  converting enzyme » également appelé la caspase 1. L'activation de la caspase 1 est elle-même contrôlée par un ensemble complexe de protéines intracellulaires appelé l'inflammasome. Suite à sa libération l'IL-1 $\beta$  va entraîner la production en cascade d'une série de médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et les chimiokines CXCL1 et CXCL2. L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pléiotrope, qui exerce un large spectre d'activité dont la plus part se recoupe avec les autres cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  ([Dinarello, Simon et al. 2012](#)).

### **c) L'Interleukine-6 (IL-6)**

L'IL-6 est une petite glycoprotéine de 21kDa. Elle est produite par de nombreux types cellulaires incluant des cellules immunitaires comme les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages et DCs), les lymphocytes (T, B, et NK) et non immunitaires comme les cellules endothéliales et les fibroblastes. Sa production est induite par de nombreux stimuli comme l'activation des TLRs tel que le TLR4 ou, sous l'effet d'autres cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Son récepteur : l'IL-6R est une protéine transmembranaire possédant une région intra-cytoplasmique très courte si bien que la liaison de l'IL-6 n'induit pas de réponse. Pour signaler, le complexe de IL-6/IL-6R doit s'associer avec une autre protéine transmembranaire, la gp130 ([Rose-John 2012](#)). Ce complexe de récepteur permet à l'IL-6 d'initier la signalisation intracellulaire via la voie JAK / STAT ([Rincon 2012](#)).

L'IL-6 possède un large spectre d'activités parmi lesquelles : l'activation des hépatocytes, des neutrophiles, des macrophages et des LT et LB. Au cours de la réponse innée, elle est le troisième acteur central de la réponse inflammatoire avec l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . L'IL-6 est à l'origine de la fièvre

avec l'IL-1 $\beta$ . En agissant sur les hépatocytes elle active la production des protéines de la phase aigue incluant la C-reactive protéine, le fibrinogène, et la serum amyloïde protéine A. Elle active également les LB et joue un rôle essentiel dans la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines. L'IL-6 est aussi une cytokine polarisante qui module la différenciation des LT auxiliaires. Elle favorise la différenciation des LTh2 en augmentant la production des cytokines pro-Th2 comme l'IL-4, et l'IL-13. En combinaison avec le TGF- $\beta$  elle est essentielle à la différenciation en Th17, et au contraire, elle inhibe la différenciation des LT régulateurs. Ainsi, l'IL-6 régule la balance entre tolérance et activation immunitaire. Enfin, l'IL-6 est également associée avec la différenciation des LT<sub>fh</sub> en activant le facteur de transcription BCL-6 essentiel à leur différenciation ([Swain, McKinstry et al. 2012](#)).

#### **d) L'interleukine-12 (IL-12)**

L'IL-12 est une glycoprotéine hétérodimérique de 70 kDa. Elle est constituée de deux sous-unités, une de 35 kDa (p35) et une de 40 kDa (p40) reliées par un pont disulfure. Les protéines p35 et p40 sont codées par deux gènes différents et leur expression est régulée de façon indépendante. Alors que p40 est inductible, p35 est exprimée de façon constitutive. Lorsque ces deux sous unités sont exprimées dans la même cellule, elles forment une protéine IL-12p70 active. Ces sous-unités forment aussi des hétérodimères avec d'autres protéines. Ainsi p40 s'associe avec p19 pour former l'IL-23 et p35 se lie avec Ebi3 pour former l'IL-35 mais ces deux autres cytokines de la famille de l'IL-12 ont des fonctions bien différentes ([Vignali and Kuchroo 2012](#)).

L'IL-12p70 est produite principalement par les cellules présentatrices d'antigènes dont les macrophages, et les DCs. Elle joue un rôle majeur dans la polarisation des LT vers le profil Th1 producteur d'IFN- $\gamma$ . Elle agit en se fixant à son récepteur présent sur les LT. Celui-ci est composé de deux sous-unités IL-12R $\beta$ 1 et IL-12R $\beta$ 2. L'interaction IL-12p70-récepteur induit une signalisation qui passe par les voies JAK/STAT. Au final, l'IL-12 augmente l'expression du facteur de transcription T-Bet, le régulateur majeur de la différenciation Th1, et inhibe la différenciation en Th2.

### **7. Activation et polarisation des lymphocytes T CD4+**

Au terme de l'étape de maturation les DCs se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, plaques de Peyer). Dans ce compartiment elles rencontrent les LT naïfs. Les cellules T possédant un TCR spécifique de l'antigène présenté sont activées dans l'objectif d'initier une réponse adaptative. L'activation des LT naïfs est appelée l'étape de « priming ». Les DCs sont les seules cellules du système immunitaire à pouvoir la réaliser.

Le « priming » des LT naïfs par les DCs nécessite un contact étroit entre les deux cellules et met en jeu l'engagement de nombreuses molécules dans un complexe appelé la synapse immunologique. Cette synapse comprend des molécules d'adhésion qui vont stabiliser le contact DC-LT ainsi que des molécules de signalisation. Comme molécules d'adhésion, on retrouve entre autres les molécules CD2, LFA-1, et ICAM-3 du côté LT, qui vont interagir respectivement avec LFA-3, ICAM-

1/-2 et DC-SIGN du côté de la DCs. Au cœur de cette synapse immunologique, la DC va fournir des signaux essentiels à l'activation du LT. Un modèle à trois signaux est couramment utilisé pour décrire l'étape de « priming » des LT naïfs par les DCs.

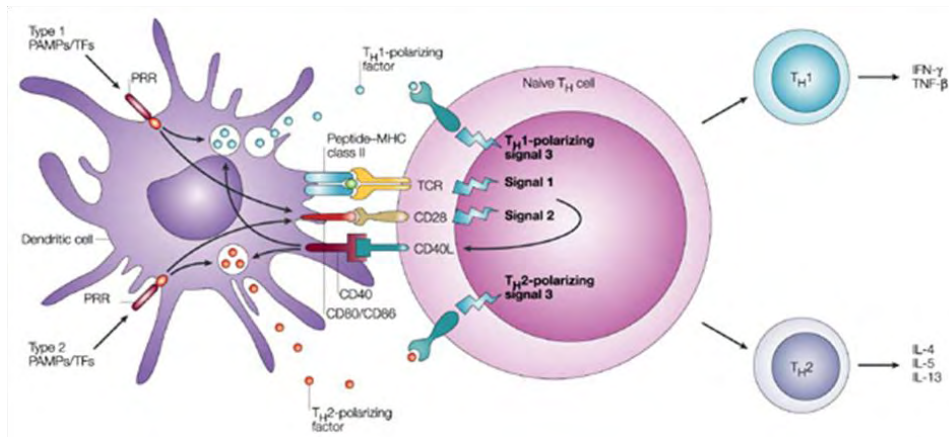


Figure 24 Le « priming » des LT naïfs par les DCs.

L'activation des LT naïfs par les DCs nécessite d'intégration de trois signaux d'activation. Le signal 1 est spécifique de l'antigène présenté par la DCs. Il est médié par l'engagement du TCR suite à la reconnaissance du complexe CMH-II peptide. Le signal 2 est fourni par la liaison des molécules de costimulation positives CD40 et CD80/CD86 aux molécules CD40L et CD28 respectivement. Le signal 3 est fourni par les cytokines produites par la DC. Les cytokines sont déterminantes dans l'orientation de la réponse T auxiliaire effectrice. D'après ([Kapsenberg 2003](#)).

Le signal 1 est spécifique de l'antigène. Il passe par la reconnaissance du complexe CMH-II peptide par le TCR spécifique des LT. Cette interaction est stabilisée par la fixation du CD4 sur CMH II.

Le signal 2 est fourni par l'engagement des molécules de co-stimulation appartenant aux molécules de la famille B7 :CD28. Le signal de co-stimulation, peut être soit positif et conduire à l'activation des LT soit négatif et bloquer l'induction de la réponse immunitaire. La co-stimulation positive met en jeu les molécules CD80/CD86 exprimées à la surface des DCs matures qui interagissent avec le ligand CD28 présents à la surface des LT. Il existe plusieurs autres molécules de co-stimulation positives en plus de CD80 et CD86, qui contribuent à favoriser les fonctions des cellules T dont les plus connues sont ICOS (CD278), OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), et CD40. L'engagement de ces molécules a pour conséquence de stimuler la prolifération cellulaire en augmentant la sécrétion de l'IL-2 et de favoriser la survie cellulaire par l'expression de Bcl-XL ([Boise, Minn et al. 1995](#)). La transduction des signaux de costimulation positives passe par l'activation des voies de signalisation de la phosphoinositide-3kinase (PI3K), de la voie AKT, et l'activation du facteur NF-κB. En plus des molécules de co-stimulation qui favorisent l'activation des LT, il existe d'autres molécules qui la régulent et inhibent l'activation des LT. L'engagement des molécules de costimulation négatives incluant CTLA-4, PD-1, PD-L1, et PD-L2, conduit à la transduction d'un signal négatif, immunorégulateur, qui antagonise l'activation du TCR et des molécules de costimulation positives et diminue l'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et AKT. Ces signaux diminuent l'activation des LT et interfèrent avec différents processus comme, la prolifération, la production de cytokines effectrices, l'activité cytolytique ainsi que la survie cellulaire. L'absence de

signaux de co-stimulations positives, dans le cas d'une interaction avec une DC immature par exemple conduit également les LT dans cet état anergique.

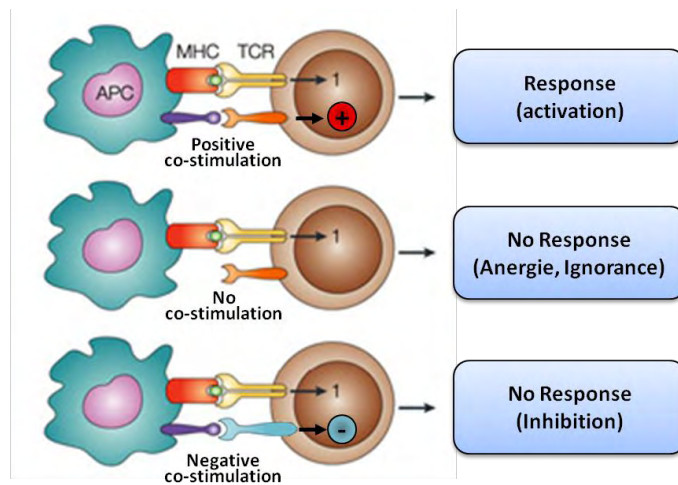


Figure 25 Rôle des signaux de co-stimulation dans l'activation des LT.

Modèle de l'activation des lymphocytes par une cellule présentatrice d'antigène (APC). Le signal 1 est fourni par l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide. Le signal 2, fournit par les molécules de co-stimulation, peut être soit activateur (+), soit inhibiteur (-). L'absence de signaux de co-stimulation n'induit pas de réponse. D'après (Chen 2004).

Enfin le signal 3 est dépendant des cytokines produites. Les cytokines agissent en se fixant sur leurs récepteurs présents à la surface des LT. En aval, elles induisent l'activation des voies STAT qui contrôlent l'expression de facteurs de transcription majeurs spécifiques de chaque lignage. Ces facteurs de transcription activent à leur tour l'expression d'un large panel de gènes conférant un phénotype spécifique aux LT. Il permet aux DCs d'orienter la différenciation des LT CD4+ naïfs (LTh0) en 4 catégories de réponses auxiliaires : Th1, Th2, Th17, et T régulatrice (Treg) qui assurent des fonctions distinctes (Boissier, Assier et al. 2008).

La différenciation en Th1 est induite par l'IL-12p70. Elle est également potentialisée par les IFN de type 1 et l'IFN- $\gamma$ . Ces cytokines activent une cascade de signalisation conduisant à l'expression de T-box transcription factor (T-bet), le régulateur majeur de la différenciation Th1. T-bet est lui-même induit par STAT-4. Il active en aval l'expression d'un large panel de gènes conférant un phénotype Th1 aux LT tout en inhibant les autres lignages. Les Th1 jouent un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et sont également associés au développement de réponses auto-immunes. Ils sécrètent principalement de l'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine active l'expression des gènes IFN-sensibles, qui représentent plus de 200 cibles. Ces gènes codent pour diverses protéines et enzymes directement impliquées dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires. Les Th1 agissent également en régulant l'activation de nombreux partenaires cellulaires. Ils activent les phagocytes, ayant pour rôle de capturer et détruire les antigènes. Ils favorisent la différenciation des LT CD8 + en cellules cytolytique. Globalement, les Th1 activent la réponse immune à médiation cellulaire et l'élimination de pathogènes intracellulaires (Knosp and Johnston 2012; Luckheeram, Zhou et al. 2012).

Les LTh2 sont différenciés en présence d'IL-4. La voie de signalisation induite par cette cytokine conduit à l'activation de STAT6, qui contrôle en aval l'expression du facteur de transcription des Th2 : GATA-3 (GATA binding protein). Les Th2 dirigent la lutte contre les pathogènes extracellulaires comme les parasites. Ils sont également impliqués dans des pathologies telles que l'asthme et les réponses allergiques. Ces cellules produisent majoritairement de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13. Ces cytokines agissent sur différents effecteurs comme les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles, et Lymphocytes B. Elles induisent notamment la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, régulent les switch isotopiques des immunoglobulines et de manière générale favorisent la réponse humorale ([Knosp and Johnston 2012](#); [Luckheeram, Zhou et al. 2012](#)).

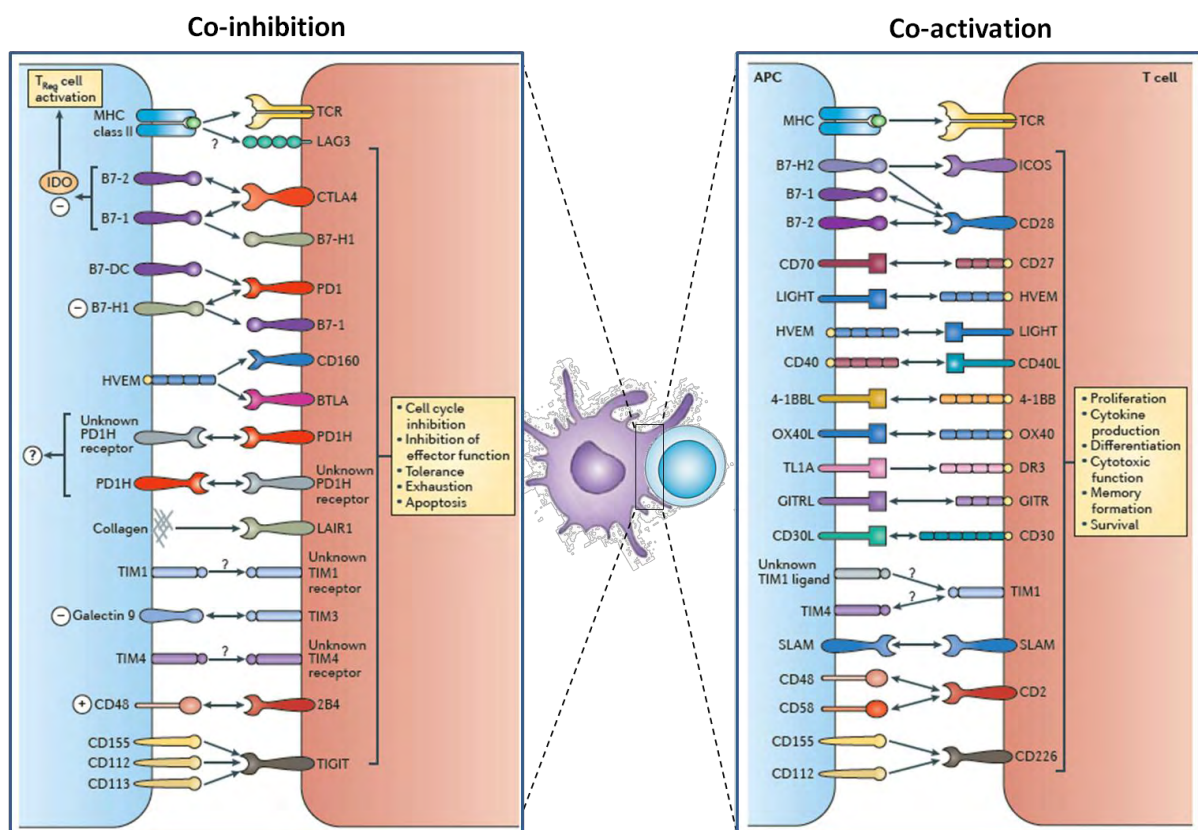


Figure 26 Les molécules de costimulation positives et négatives.

L'interaction DCs-LT met en jeu l'engagement de nombreuses molécules qui délivrent un signal soit activateur (co-activation) visant à favoriser l'induction d'une réponse immunitaire effectrice soit inhibiteur (co-inhibition) qui bloque la réponse immunitaire. Un équilibre entre les voies de co-stimulation positive et négative est important pour maintenir une réponse protectrice efficace et régulée. D'après ([Chen and Flies 2013](#)).

Les Th17 sont différenciés en présence des cytokines IL-6 et TGF- $\beta$ . Le principal facteur de transcription associé à leur différenciation est ROR $\gamma$ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T). Ces cellules Th17 sont caractérisées par la production d'interleukine-17 (IL-17) ([Romagnani, Maggi et al. 2009](#)). Elles contribuent à la défense contre les bactéries extracellulaires et les champignons. Ils agissent principalement au niveau des muqueuses, de la peau, du poumon, des intestins, et des articulations. Les Th17 créent une forte réponse inflammatoire et induisent

l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , et le TNF- $\alpha$ . Celle-ci assurant le recrutement des effecteurs de l'immunité vers le site d'inflammation. Ils participent à l'activation des LT, des LB et des NK. Enfin, ils assurent la protection et le renouvellement des tissus en induisant la production de peptides antimicrobiens (défensines) et en augmentant la prolifération cellulaire ([Romagnani, Maggi et al. 2009](#)).

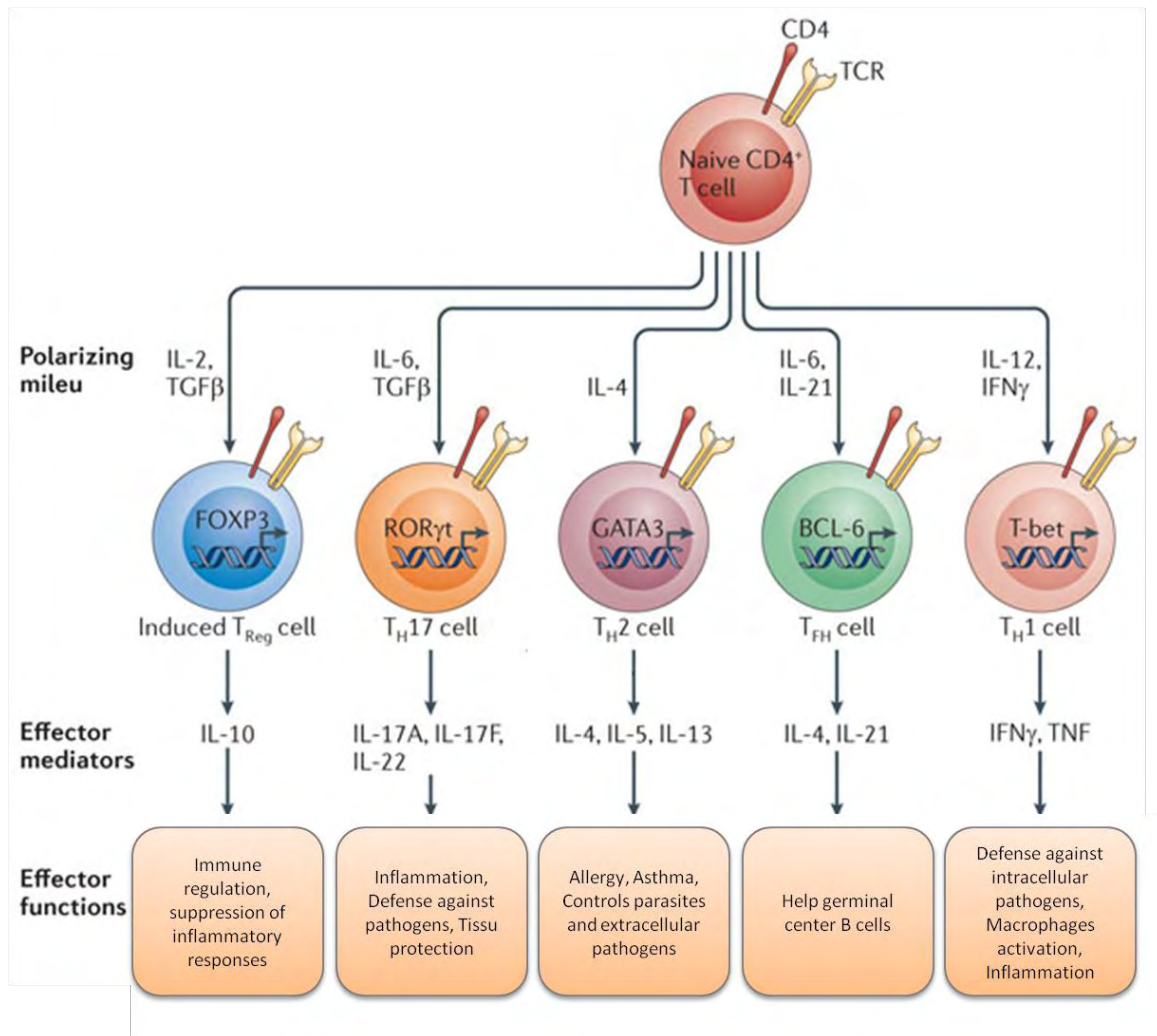


Figure 27 La polarisation des LT "helper".

Un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf peut se différencier en différentes sous population de lymphocyte T « helper ». Cette figure présente les différentes populations de lymphocyte T « helper », le milieu de polarisation, le facteur de transcription impliqué, les cytokines qu'elles produisent et leurs principales fonctions effectrices. Modifié d'après ([Swain, McKinstry et al. 2012](#)).

Les LT régulateurs constituent une sous-population lymphocytaire aux propriétés immunorégulatrices. Ils se sous-divisent en deux catégories, les LT régulateurs naturels (nTreg) et les LT régulateurs induits (iTreg) ([Ito, Hanabuchi et al. 2008](#)). Ces deux populations sont caractérisées par un phénotype spécifique : l'expression du CD4, de CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2), et du facteur de transcription Foxp3 (Forkhead/winged helix box protein 3), et expriment faiblement le CD127 (chaîne  $\alpha$  du récepteur membranaire à l'IL-7). Les nTreg sont des lymphocytes auto-réactifs



différenciés dans le thymus. Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire et la prévention des réactions auto-immunes. A l'inverse, les iTreg sont générés en périphérie, par les DCs ([Yamazaki and Morita 2013](#)). Ils contribuent à la tolérance périphérique dirigée contre des antigènes du soi ou des antigènes étrangers, provenant de pathogènes dont la présence doit être tolérée. Les iTreg sont générés par les DCs en présence de TGF- $\beta$  et en absence d'IL-6. D'autres facteurs contribuent également à la différenciation en iTreg comme l'expression de IDO par les DC, la production de l'IL-10 ou encore l'engagement de la molécule CTLA-4 avec B7, et PD-1 avec PD-L1. Le facteur de transcription FoxP3 est le principal facteur de transcription de la lignée iTreg ([Geiger and Tauro 2012](#)). Malgré un mode de différenciation différent, ces deux populations de Treg assurent une fonction commune qui est de contrôler les 3 autres types de réponses T auxiliaires et de réguler la tolérance antigénique protégeant ainsi contre les immunopathologies. Ils remplissent leurs fonctions inhibitrices grâce à différents mécanismes ([Vignali, Collison et al. 2008](#)) incluant : i) la déplétion du milieu extracellulaire en IL-2, cytokine nécessaire à l'activation et la prolifération des LT effecteurs ; ii) la production de cytokines immunosuppressives dont l'IL-10, le TGF- $\beta$ , et l'IL-35 qui inhibent l'activation des T auxiliaires ; iii) l'induction de la mort cellulaire via le système perforine/granzyme iv) la privation en signaux de co-stimulation positive en engageant les molécules CTLA-4 et LAG-3 qui entrent en compétition avec les LT auxiliaires pour la fixation de CD86 et du CMH-II respectivement ; v) l'induction de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme catabolisant le tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération des LT, en kynurénine, toxiques pour les LT.

Bien que ce modèle à quatre types de réponse auxiliaire soit couramment utilisé, d'autres sous-populations de LT ont été décrites : les lymphocytes Th22 (producteurs d'IL-22) ([Tian, Yu et al. 2013](#)), les lymphocytes Th9 (producteurs d'IL-9 et d'IL-10) ([Tan and Gery 2012](#)), les lymphocytes Th17 ou lymphocytes T auxiliaires folliculaires Tfh. Cependant, leurs rôles en physiologie et surtout en physiopathologie sont encore très mal connus ([Yu, Batten et al. 2009](#)).

De nombreuses études récentes tendent à proposer le fait que la polarisation des LT n'est pas un processus figé ([Annunziato and Romagnani 2009](#)). Au contraire elle semble dotée d'une certaine plasticité et est constamment modulée par l'environnement. Ainsi, en fonction des signaux délivrés par les DCs et des cytokines produites, les LT (Th1, Th2, Th17 ou Treg) peuvent être redirigés vers un autre sous-type de polarisation. Ils peuvent notamment évoluer de Th17 à Th1 en présence d'IL-12p70, de Th17 à Th2 grâce à l'IL-4, de Th17 à Treg en présence de l'enzyme IDO et de catabolites de la voie de dégradation du tryptophane et de Treg à Th17 lorsque l'IL-6 est produite ([Lee, Mukasa et al. 2009](#); [Sakaguchi, Vignali et al. 2013](#)). En particulier, au niveau du GALT, un environnement soumis à de nombreuses attaques et riche en flore bactérienne, il existe une balance Th17/Treg et Th17/Th1 finement régulée. Cette balance joue un rôle majeur dans l'homéostasie des muqueuses et témoigne de l'adaptation permanente du système immunitaire face aux changements de l'environnement. La polarisation de la réponse adaptative est donc un processus « dynamique » et non pas « figé ». Le microenvironnement cytokinique local, les signaux apportés par les DCs modulent et adaptent en permanence la réponse T. Cependant, cette plasticité du système immunitaire peut également conduire à l'apparition de pathologie comme c'est le cas au cours de l'infection par le VIH-1.

## 8. Les facteurs immunosuppresseifs

### a) L'interleukine-10 (IL-10)

L'interleukine (IL) -10 est une cytokine anti-inflammatoire, fortement immunosuppressive. Elle est sécrétée par une grande variété de cellules, y compris les monocytes, les macrophages, les DCs, les LT, les LB, les granulocytes, des cellules épithéliales, les kératinocytes, et les mastocytes ([Glocker, Kotlarz et al. 2011](#)). Une fois produite, elle agit sous la forme d'un homodimère de 37kDa. Pour exercer son action, l'IL-10 se fixe à son récepteur constituée de deux molécules de l'IL-10R  $\alpha$ -chaîne (IL-10R1) et deux molécules de l'IL-10R-chaîne  $\beta$  (IL-10R2). Lors de la liaison de l'IL-10 au complexe IL-10R récepteur tétramérique, deux membres de la famille des Janus kinase sont activées: Janus kinase (JAK) 1 et la tyrosine kinase (Tyk) 2. Ces kinases catalysent leur auto-phosphorylation, ainsi que la phosphorylation de l'IL-10R1 au niveau des résidus tyrosines intracellulaires (tyrosine 446 et 496), formant ainsi des sites de fixation pour le facteur STAT3. STAT3 est ensuite phosphorylée par JAK1 et Tyk2, ce qui provoque sa dimérisation et sa translocation dans le noyau où il induit l'expression de ses gènes cibles. Contrairement à la sous unité IL-10R1, qui est spécifique à l'IL-10, la seconde sous unité IL-10R2 est partagée par plusieurs autres récepteurs aux cytokines, notamment l'IL-22, IL-26, IFN- $\lambda$ , IL-28A, IL-28B et IL-29 ([Glocker, Kotlarz et al. 2011](#)).

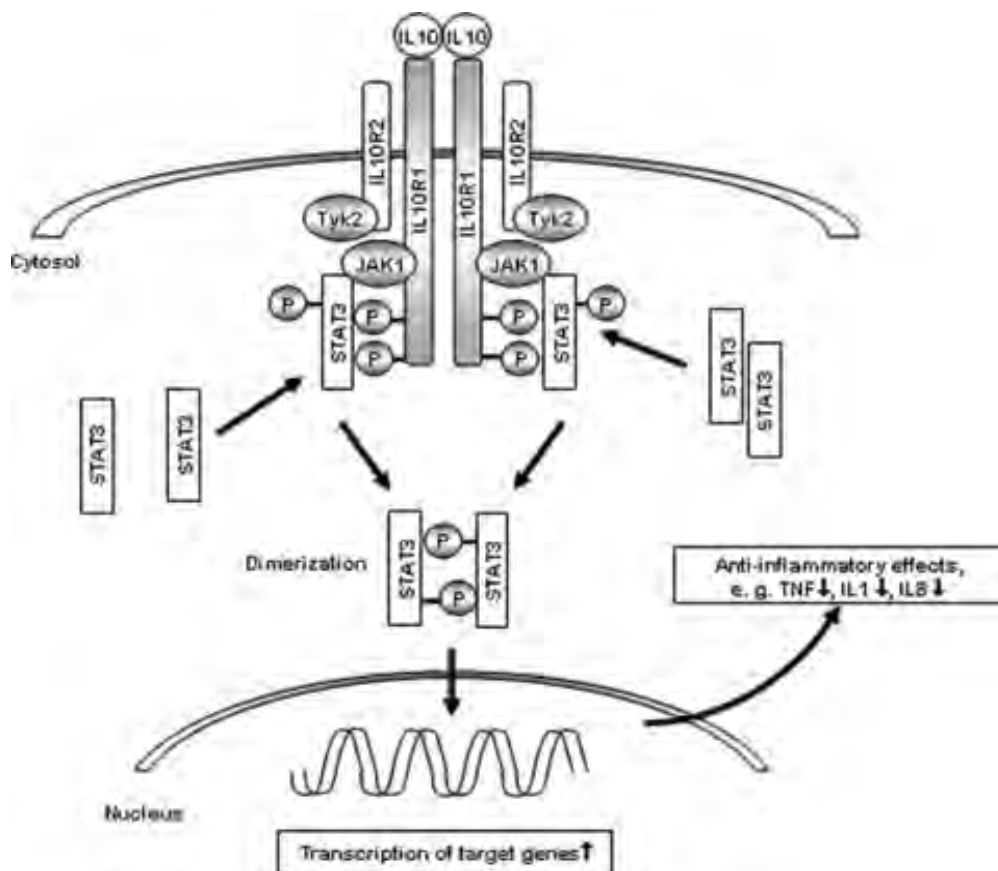


Figure 28 Voie de signalisation de l'IL-10

Représentation schématique de la voie de signalisation de l'IL-10. Les différentes étapes sont détaillées dans le texte. D'après ([Glocker, Kotlarz et al. 2011](#)).

L'interleukine 10 possède un vaste panel d'activité visant à freiner la réponse immunitaire. Elle limite la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , l'IL-8, l'IL-6 et IL-12. Elle désactive l'activité microbicide des macrophages ([Bogdan, Vodovotz et al. 1991](#)) et contrôle la différenciation et la prolifération des macrophages, des LT et LB. Au niveau des cellules présentatrices d'antigènes l'IL-10 régule négativement l'expression des molécules du CMH-II et les molécules de co-stimulation positives CD80 et CD86 ([Pestka, Krause et al. 2004](#)) tout en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation négative PD-L1 ([Rodriguez-Garcia, Porichis et al. 2011](#)), ce qui réduit leur capacité d'activation des LT. Elle est aussi associée à la différenciation des LT en T régulateur. C'est également par le biais de cette cytokine que les Treg exercent leurs fonctions immunosuppressives. L'IL-10 est également produite par les Th1, Th2, et les Th17 qui utilisent cette cytokine comme rétro contrôle négatif sur leur propre activité ([Saraiva and O'Garra 2010](#)). Sur les LT, elle a pour effet d'inhiber la sécrétion des cytokines Th1 telles que l'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire un état anergique ([Akdis and Blaser 2001](#)).

Ainsi, l'IL-10 est un acteur crucial dans le maintien de l'équilibre du système immunitaire. En régulant les réponses immunitaires innées et adaptatives, elle protège contre les réactions excessives et les lésions tissulaires.

En dehors de son rôle physiologique, l'IL-10 est détournée par de nombreux virus pour échapper au système immunitaire ([Wilson and Brooks 2011](#)). Certains virus tels que l'EBV, le CMV et les Poxvirus agissent en produisant des homologues viraux de l'IL-10 ([Pestka, Krause et al. 2004](#)). D'autres stimulent sa production par l'hôte comme le LCMV, MMTV, HCV et le VIH.

### **b) Le système PD-1/PD-L1**

Les molécules PD-1 (B7.1) et PD-L1 (B7-H1) appartiennent à la grande famille des molécules de costimulation B7 : CD28 qui comprend une grande variété de ligands/récepteurs qui peuvent être soit activateurs soit inhibiteurs ([Chen 2004](#); [Keir, Butte et al. 2008](#); [Chen and Flies 2013](#)). Ces molécules ont pour fonctions de réguler l'activation des LT et leurs fonctions effectrices au cours de leur interaction avec les cellules présentatrices.

#### *Le récepteur PD-1*

Le récepteur PD-1 a été identifié pour la première fois en 1992. Son expression a été associée à l'apoptose dans une lignée d'hybridome T ce qui lui a valu l'appellation de « programmed death receptor 1 ». Cependant, aujourd'hui le rôle de ce récepteur est mieux caractérisé et sa fonction dans l'immunité est plus complexe que sa fonction initiale d'inducteur d'apoptose ([Keir, Butte et al. 2008](#)).

#### *Structure*

Le récepteur PD-1 est une protéine transmembranaire de 288 acides aminés. Il se compose d'une région extracellulaire constituée d'un unique domaine variable des immunoglobulines (IgV) caractéristique de la famille CD28, d'une région transmembranaire d'une vingtaine d'acide aminés et d'une partie intracytoplasmique de 95 aa qui comporte un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-*

based inhibitory motif) et un motif ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*). PD-1 est codé par un seul gène *pdc1* qui est présent sur le chromosome 2 et qui comprend 5 exons codant respectivement pour la séquence signal d'adressage, le domaine Ig, la partie transmembranaire, le domaine intracytoplasmique et la région extracellulaire (Keir, Butte et al. 2008).

### Expression

PD-1 est exprimé principalement par les lymphocytes T, B et NKT mais on le retrouve également à des niveaux plus faibles sur les monocytes et les DCs. Le mécanisme qui conduit à l'expression de PD-1 est encore mal connu. Des études ont rapporté son induction après activation des récepteurs TCR ou par les cytokines (IL-2, IL-7, IL-15, IL-21) (Kinter, Godbout et al. 2008). Deux facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation de PD-1, NFATc1 et T-bet qui agissent respectivement en tant que régulateurs positifs et négatifs sur son expression (Hofmeyer, Jeon et al. 2011). PD-1 est retrouvé fortement exprimé sur les LT dans un état « Exhausted » qui correspond à un épuisement des LT caractérisés par une diminution de la prolifération et de production de cytokines initialement mises en évidence dans les infections virales chroniques (LCMV, VIH, HCV) (Watanabe, Bertoletti et al. 2010). Sur les monocytes et les DCs l'expression de PD-1 a été associée aux cytokines pro-inflammatoires et aux ligands de TLR, cependant, la fonction de ce récepteur à la surface des CPA est moins connue.

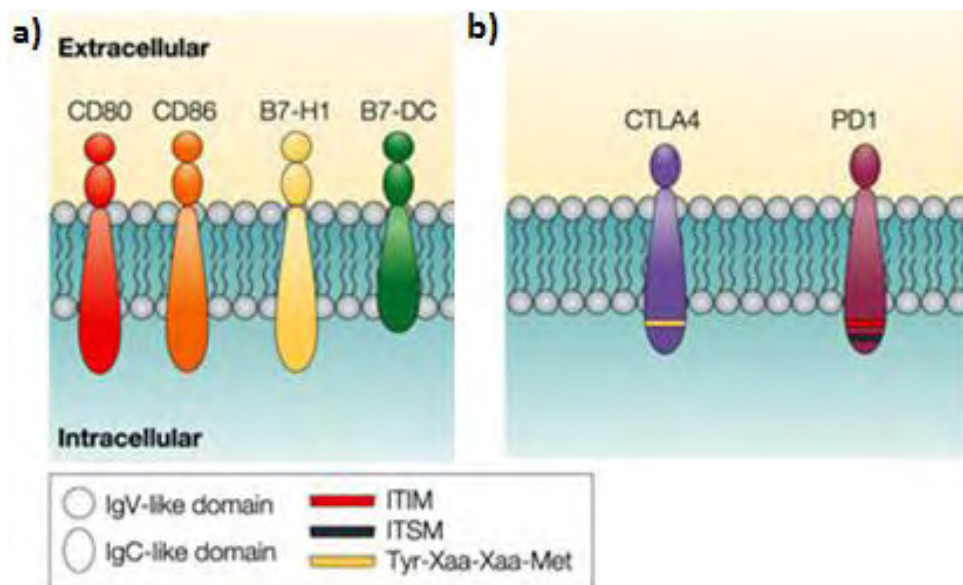


Figure 29 Molécules de co-stimulation négatives de la famille B7-CD28.

a) Les molécules de costimulation négatives CD80, CD86, B7-H1 (PD-L1) et B7-DC (PD-L2), exprimées principalement par les CPA, ont une structure comparable avec un domaine extracellulaire composé d'un domaine IgV-like et IgC-like, une partie transmembranaire et une région intra cytoplasmique. Les molécules CD80 et CD86 délivrent un signal négatif lors de leur interaction avec CTLA-4 ; B7-H1 (PD-L1) et B7-DC (PD-L2) se lie à PD-1. b) Les molécules inhibitrices de la famille CD28 : CTLA-4 et PD-1. D'après (Chen 2004).

## *Fonction*

Deux ligands pour PD-1 ont été décrits : PD-L1 (B7-H1, CD274) ([Dong, Zhu et al. 1999](#)) et PD-L2 (B7-DC, CD273) ([Latchman, Wood et al. 2001](#)). Ces deux molécules appartiennent à la famille B7, mais contrairement à leurs homologues activateurs (CD80, CD86), PD-L1 et PD-L2 sont des molécules de costimulation négatives. L'engagement de ces molécules est connu pour fournir des signaux inhibiteurs de la prolifération, de la production de cytokines effectrices dont l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2, de l'activité cytolytique et de la survie cellulaire. Le ligand PD-L2 possède une meilleure affinité que PD-L1 pour la fixation du récepteur PD-1 ([Freeman 2008](#)). Cependant PD-L2 semble doté de fonctions inhibitrices diminuées. Sa fonction reste cependant moins étudiée que celle du premier ligand PD-L1.

## *Le ligand PD-L1*

PD-L1 se retrouve largement exprimé sur les cellules hématopoïétiques. Son expression est constitutive à la surface des CPA (monocytes, macrophages, LB et DCs) et celle-ci est augmentée suite à l'activation cellulaire. L'expression de PD-L1 est induite à la surface des LT CD4 et CD8+ activées. Enfin on retrouve également PD-L1 à la surface de cellules non-hématopoïétiques comme sur les cellules endothéliales, les kératinocytes ainsi que dans le cœur, le muscle squelettique, le placenta, le poumon, le rein et le foie ([Keir, Francisco et al. 2007](#); [Francisco, Sage et al. 2010](#)).

PD-L1 (CD274) est codé par le gène *cd274* présent sur le chromosome 9. L'expression de ce gène permet la synthèse d'une protéine transmembranaire de 290 aa répartie en un domaine extra cellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. Le domaine extra cellulaire est composé d'un domaine constant (IgC) et un domaine variable (IgV) des immunoglobulines. La région intracytoplasmique est composée de 30 aa et celle-ci ne semble pas contenir de motifs fonctionnels connus.

Les mécanismes impliqués dans l'expression de PD-L1 ont fait l'objet de plusieurs études. L'analyse des voies de signalisation ont mis en évidence le rôle de la voie PI3K ([Karakhanova, Meisel et al. 2010](#); [Muthumani, Shedlock et al. 2011](#)), de la voie Myd88/TRAF6/MEK/ERK ([Liu, Hamrouni et al. 2007](#)) ainsi que de la voie Jak/STAT. L'étude de la séquence promotrice de PD-L1 à révélé la présence de deux sites de fixation pour le facteur de transcription (IRF-1). IRF-1 est essentiel pour l'expression de PD-L1 qu'elle soit constitutive ou inducible ([Lee, Jang et al. 2006](#)). En accord avec ces données, différents facteurs ont été associés à l'expression de PD-L1 dont les principaux sont l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-10 ([Rodriguez-Garcia, Porichis et al. ; Sumpter and Thomson 2011](#)) ainsi que les ligands de TLR-3 ([Pulko, Liu et al. 2009](#)) et TLR4 ([Qian, Deng et al. 2008](#)).

## *L'interaction PD-1-PD-L1*

L'interaction PD-1-PD-L1 conduit à une forte inhibition de la réponse immunitaire. Cette voie joue notamment un rôle important dans l'extinction de la réponse immunitaire au cours des réponses auto-immunes ou suite à la résolution d'une infection virale. Cependant en cas de dérégulation elle est également connue pour favoriser la persistance de nombreuses infections virales (LCMV, VIH, HCV) et promouvoir l'échappement tumoral ([Freeman, Wherry et al. 2006](#);

[Barach, Lee et al. 2010](#); [Watanabe, Bertoletti et al. 2010](#); [Hofmeyer, Jeon et al. 2011](#); [Porichis and Kaufmann 2012](#)).

Au niveau de la cellule T, l'engagement du récepteur PD-1 simultanément à l'activation du TCR conduit à la phosphorylation des tyrosines présentes sur les motifs ITIM et ITSM de la région intracellulaire par les kinases Lsk et Csk. Ces sites induisent le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases vont ensuite déphosphoryler les motifs présents à proximité comme les molécules associées au TCR CD3 $\zeta$ , ZAP70, PKC $\theta$  afin d'éteindre les voies de signalisations activées. Notamment, l'activation de la PI3K en aval de la voie du TCR est bloquée, ce qui affecte l'induction du gène de survie cellulaire Bcl-XL et diminue la production d'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et l'expression de CD28. Au niveau fonctionnel, l'activation de PD-1 par les LT diminue donc la prolifération, la survie cellulaire et la production de cytokines effectrices et des fonctions cytolytiques.

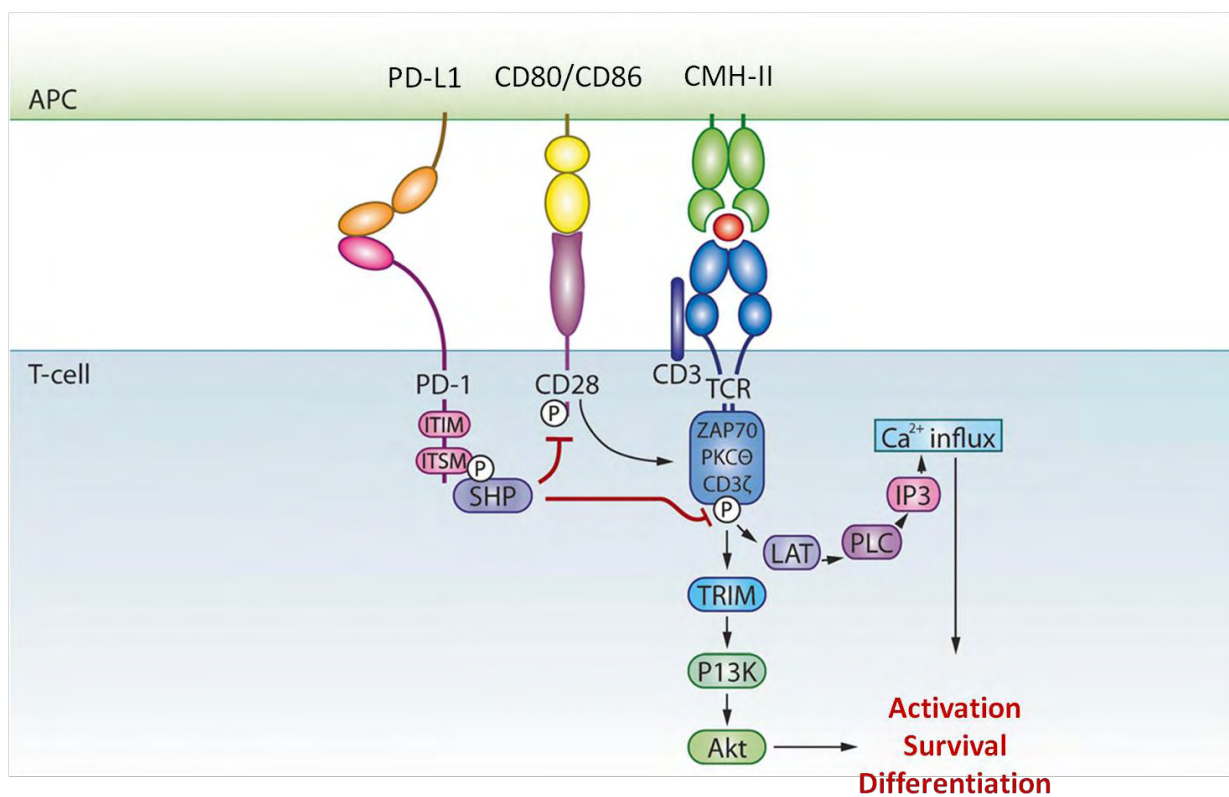


Figure 30 La Voie PD-1/PD-L1.

Représentation schématique du rôle de la voie PD-1/PD-L1 dans l'inhibition des lymphocytes T. L'interaction PD-1/PD-L1 conduit à la phosphorylation des domaines ITIM et ITSM de la région intracytoplasmique de PD-1 formant ainsi des sites de fixation pour les protéines tyrosine phosphatase SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases interfèrent avec les voies de signalisation en aval du TCR et de CD28 et conduisent au blocage de l'activation des lymphocytes T. D'après [\(Larsson, Shankar et al. 2013\)](#).

Suite à l'interaction PD-1-PD-L1 une seconde voie de signalisation, appelée « signal inverse », est également activée dans la cellule exprimant le ligand PD-L1 [\(Keir, Butte et al. 2008\)](#). Bien que le mécanisme de transduction de ce signal soit encore mal connu, plusieurs études ont montré qu'il conduit à la production de l'IL-10, une cytokine fortement immunosuppressive connue pour

désactiver les fonctions des CPA et induire l'anergie des LT. Ceci a été démontré grâce à l'utilisation d'une forme soluble de l'ectodomaine de PD-1 ([Kuipers, Muskens et al. 2006](#)). Le traitement des DCs myéloïdes avec PD-1 soluble conduit à la production d'IL-10. Ainsi la liaison de PD-1 avec PD-L1 conduit à une inhibition bidirectionnelle qui affecte à la fois les fonctions activatrices des CPA et effectrices des LT. Enfin, PD-L1 est également capable d'interagir via une voie PD-1 indépendante. En effet, des données récentes ont montré que PD-L1 est également capable de se lier à la molécule CD80 mettant en jeu les domaines IgV de ces deux molécules de costimulation. Cette interaction PD-L1-CD80 conduit également à l'activation d'une voie immunosuppressive capable d'inhiber la prolifération des LT et la production de cytokines effectrices ([Butte, Keir et al. 2007](#)).

Le rôle des molécules PD-1 et PD-L1 dans l'inhibition des réponses immunitaires est également soutenue par les observations faites dans les modèles de souris KO. Les souris PD-1-déficientes ainsi que les souris PD-L1-déficientes, développent rapidement de multiples atteintes auto-immunes incluant des arthrites, des lupus, glomérulonéphrites et cardiomyopathies ([Nishimura, Okazaki et al. 2001](#); [Keir, Butte et al. 2008](#)). Ces souris succombent également à de graves troubles immunitaires suite à l'infection par une souche persistante du LCMV ([Brooks, Ha et al. 2008](#); [Hofmeyer, Jeon et al. 2011](#)).

### **c) L'indoleamine 2,3 dioxygénase**

L'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) est une protéine intracellulaire de 41kDa. Chez l'homme, elle est codée par un gène unique *indo1*, très conservé, localisé au niveau du chromosome 8. Récemment, un autre gène *indo2* a été découvert mais sa fonction est moins étudiée ([Ball, Yuasa et al. 2009](#)).

#### *Activité enzymatique*

La protéine IDO possède une activité enzymatique de dégradation du tryptophane. Le tryptophane est un acide aminé essentiel, c'est-à-dire qu'il doit être apporté par l'alimentation. Bien qu'il ne soit pas synthétisé par les cellules des vertébrés supérieurs incluant l'homme, le tryptophane est largement utilisé par l'organisme. En plus de son incorporation dans la biosynthèse des protéines, où il représente 1% des acides aminés, c'est également le précurseur d'autres composés importants comme la sérotonine et la mélatonine. Au niveau fonctionnel, IDO réalise la dégradation oxydative du tryptophane. Cette enzyme possède un hème qui lui permet de fixer le dioxygène. En utilisant une molécule de dioxygène, IDO réalise le clivage de cycle indole du tryptophane, au niveau de la double liaison 2,3 pour donner la N-formyl-kynurenine. Cette réaction est irréversible et constitue l'étape limitante « rate-limiting » de la voie de dégradation du tryptophane. Par la suite, la N-formyl-kynurenine est rapidement convertie en kynurenine par la kynurenine formamidase. Puis ce produit est catabolisé par une nouvelle série d'enzymes pour conduire à la production de métabolites importants en passant par les hydroxykynurenine, l'acide quinolinique, l'acide kynureninique, et aboutit à la production de NAD<sup>+</sup> ([Takikawa 2005](#); [Lob and Konigsrainer 2008](#)).

Le taux de tryptophane dans l'organisme est finement régulé via la voie métabolique de la kynurenine. Deux enzymes sont essentielles à sa régulation: IDO et une seconde enzyme nommée TDO (tryptophan 2,3 dioxygénase). TDO est une protéine homotétramérique de 134 kDa. Elle est présente essentiellement dans le foie ([Dang, Dale et al. 2000](#)) et joue un rôle important dans la régulation du tryptophane au niveau plasmatique, où sa concentration est de l'ordre de 50–100  $\mu\text{M}$  ([Terness, Bauer et al. 2002](#)). Contrairement à TDO, IDO régule le taux de tryptophane au niveau de sites plus localisés comme les organes lymphoïdes secondaires, les sites inflammatoires et certains organes privilégiés comme les yeux, le placenta, et le tractus gastro-intestinal ([Zhu 2010](#)), où elle joue un rôle immuno-modulateur important ([Mellor and Munn 2004](#); [MacKenzie, Heseler et al. 2007](#); [Fallarino, Grohmann et al. 2012](#)).

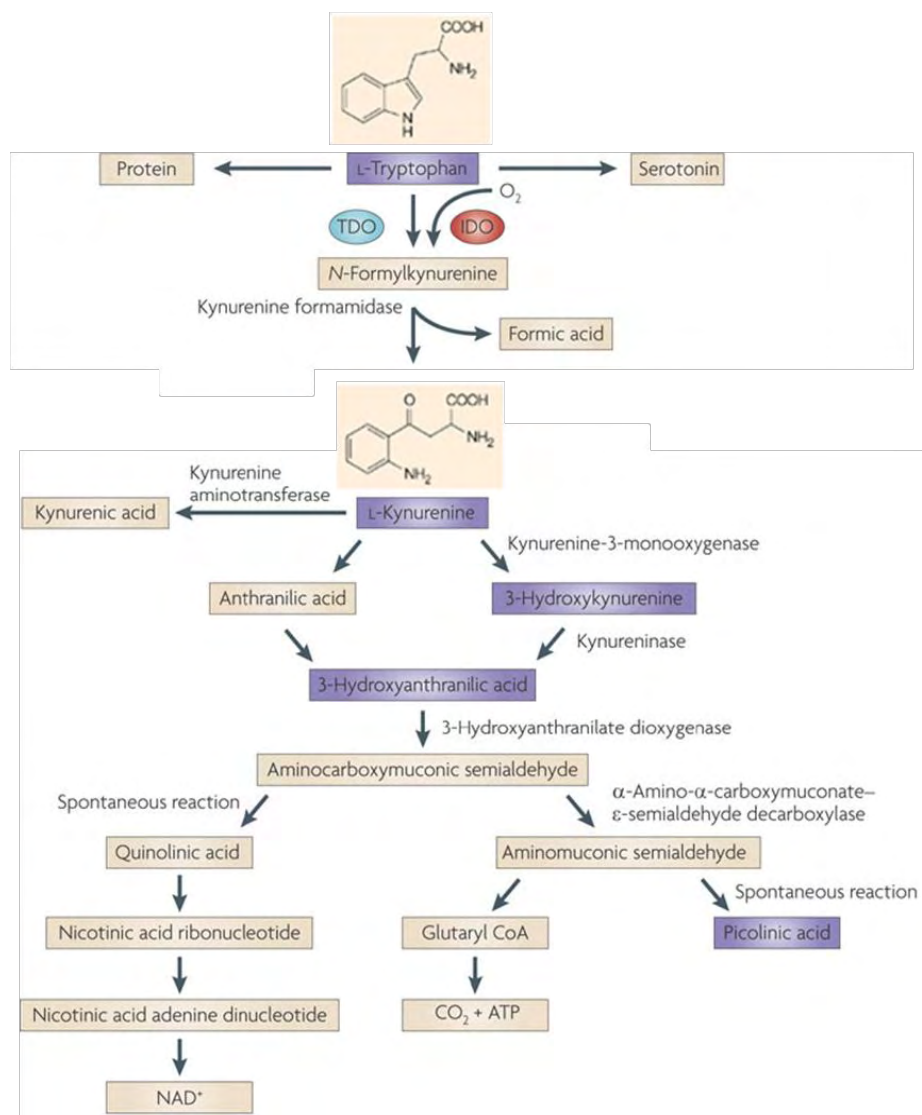


Figure 31 Voie de la kynurenine.

Représentation de la voie métabolique de la kynurenine. La première étape limitante de cette voie de dégradation du tryptophane est N-formyl-kynurenine qui est réalisée par les enzymes tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO) et indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO). Les différents métabolites du tryptophane sont encadrés et ceux jouant un rôle en immunologie sont mis sur fond violet. D'après ([Lob, Konigsrainer et al. 2009](#)).



## Spectre d'expression

IDO est exprimée principalement par les cellules présentatrices d'antigènes dont les macrophages, les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes. On la retrouve également chez les LB mais sous une forme inactive ([Godin-Ethier, Hanafi et al. 2011](#)). La présence de cette enzyme dans les cellules immunitaires a attiré l'attention de la communauté scientifique pour essayer de comprendre son rôle dans l'immunité. Les premiers rapports ont souligné l'action antimicrobienne de IDO, essentiellement sur des micro-organismes tels que *Chlamydia pneumoniae* ([Rottenberg, Gigliotti Rothfuchs et al. 2000](#)) et *Toxoplasma gondii* ([Pfefferkorn 1984](#)), qui sont incapables de synthétiser leur propre tryptophane. L'activité anti-infectieuse d'IDO est liée à sa capacité de dégrader le tryptophane. Ceci diminue sa disponibilité dans le microenvironnement et conduit à l'inhibition de la multiplication du pathogène ([MacKenzie, Heseler et al. 2007](#)).

En plus de son rôle dans la défense immunitaire, une accumulation de données plus récentes ont mis en évidence des propriétés immuno-régulatrices complexes associées à l'activité IDO. Cette enzyme est exprimée constitutivement par les trophoblastes extravilloux et joue un rôle majeur dans la tolérance immunitaire à l'interface fœto-maternelle afin de prévenir le rejet des fœtus ([Zhu 2010](#)). Elle est également exprimée par les cellules tumorales et conduit à l'échappement au système immunitaire. Enfin, elle est aussi détournée par de nombreux microorganismes pathogènes afin d'assurer leur persistance dans l'organisme ([Mellor and Munn 2004](#)).

Trois modes d'actions ont été décrits pour expliquer l'effet immunosuppresseur de IDO. Le premier mécanisme « tryptophan depletion theory » passe par la déplétion du tryptophane. En effet, la dégradation du tryptophane liée à l'activité IDO engendre des effets secondaires néfastes sur la prolifération, les fonctions et la survie des lymphocytes T. Les travaux de Terness et al. ont montré que la dégradation du tryptophane par IDO, va abaisser sa concentration jusqu'à un taux critique de 0.5-1µM qui conduit au blocage du cycle cellulaire ([Terness, Bauer et al. 2002](#)).

Le second mécanisme « tryptophan utilisation theory » est médié par la production de catabolites toxiques du tryptophane comme la kynurenine, le 3-hydroxy-anthranilic acid, et le 3-hydroxy-kynurenine. Ces produits ont un effet antiprolifératif important sur les LT et favorisent la mort par apoptose. Il n'est pas très bien connu si ces métabolites ont un effet toxique direct, ou s'ils induisent l'apoptose suite à l'activation d'un signal de mort dépendant d'un récepteur comme cela a été décrit avec l'acide quinolinique qui fixe le récepteur NMDA glutamate et induit l'apoptose des neurones ([Chiarugi, Meli et al. 2001](#)). L'effet cytotoxique et antiprolifératif des catabolites du tryptophane ne touche pas seulement les LT mais concerne également les lymphocytes B et NK ([Terness, Bauer et al. 2002](#)). Sur les LT, l'effet est différent en fonction des sous-populations et de l'état d'activation. En effet, les LT activés semblent plus sensibles à l'apoptose que les T non activés ([Terness, Bauer et al. 2002](#)). Une étude chez la souris a également montré que les LTh1 sont plus sensibles que les Th2 à l'apoptose induite par ces métabolites du tryptophane ([Xu, Zhang et al. 2008](#)). Une autre étude réalisée sur des cellules humaines a montré que le métabolite 3-hydroxy-anthranilic acid de la voie de la kynurenine stimule la prolifération des Treg tout en inhibant la prolifération des Th17 ([Favre, Mold et al. 2010](#)). Ainsi IDO jouerait un rôle dans la régulation de la balance Th1/Th2 et Th17/Treg.

Au niveau moléculaire, la carence en tryptophane est détectée principalement par deux voies de signalisation importantes, la voie GCN2 kinase (general control nonrepressed 2) et la voie mTOR. La GCN2 kinase est activée par l'accumulation d'ARN de transfert non chargés (par le tryptophane dans ce cas). Cette kinase une fois activée va phosphoryler le facteur « eukaryotic translation-initiation factor 2 $\alpha$  » et conduire à la répression de la traduction ([Munn, Sharma et al. 2005](#)). Pour le facteur mTOR, celui-ci est inhibé par la carence en acides aminés essentiels dont le tryptophane. L'inhibition de mTOR a un effet immunosuppresseur important sur les LT et conduit au blocage du cycle cellulaire ([Mellor and Munn 2004](#)).

Le troisième mécanisme immunosuppresseur généré par l'activité IDO est associée avec une augmentation de la prolifération ([Hill, Tanguy-Royer et al. 2007](#)), ainsi que de la différenciation des LT naïfs en T régulateurs ([Chung, Rossi et al. 2009](#); [Jurgens, Hainz et al. 2009](#)). Le mécanisme sous-jacent a récemment été décrit par Mezrich, et ses collaborateurs. Les auteurs ont montré que la kynurenine active le récepteur AHR « aryl hydrocarbon receptor » dont l'expression est induite par le TGF- $\beta$  sur les LT naïfs. L'activation de ce récepteur conduit à l'expression de Foxp3 et dirige la différenciation en LT régulateurs ([Mezrich, Fechner et al. 2010](#)). Ces cellules T aux propriétés immunosuppressives peuvent exercer leurs actions inhibitrices sur les cellules voisines. Les Treg ont également la capacité d'induire l'expression de IDO dans les DCs qu'ils rencontrent, ce qui contribue à l'auto-amplification d'un état immunosuppresseur.

#### *Régulation de l'activité IDO*

L'expression de IDO par les DCs est soumise à une régulation complexe. Elle est induite principalement par l'IFN- $\gamma$  et le TGF- $\beta$  ([Mellor and Munn 2004](#)) ([Chen 2011](#)). L'IFN- $\gamma$  agit via la voie de signalisation JAK/STAT qui active en aval l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire ainsi que sa régulation. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  et les ligands TLR comme le LPS agissent en synergie avec l'IFN- $\gamma$  pour augmenter l'expression de IDO, en activant la voie NF- $\kappa$ B non canonique. Ce mécanisme permet de contrôler la réponse immunitaire et de limiter les dommages à l'organisme causés par une réponse de trop forte intensité. De nombreux travaux ont montré que l'IFN- $\gamma$  induit IDO sous une forme directement active. Cependant d'autres suggèrent que son activation est dépendante de signaux supplémentaires fournis par l'engagement des molécules CD80 et CD86 avec les molécules CTLA-4 et CD28 exprimées par les LT ([Munn, Sharma et al. 2004](#)).

La seconde voie qui conduit à l'expression de IDO est celle du TGF- $\beta$ . Cette cytokine immunosuppressive induit IDO via la voie de signalisation de la PI3K. En plus de stimuler son expression, le TGF- $\beta$  stimule également la phosphorylation de IDO au niveau de deux séquences ITIM potentielles ([Pallotta, Orabona et al. 2011](#)). La forme phosphorylée de IDO favorise une immunosuppression sur un long terme, contrairement à l'IFN- $\gamma$  qui induit une activation intense de IDO mais plus courte dans le temps ([Fallarino, Grohmann et al. 2012](#)). La protéine IDO phosphorylée agit en recrutant les phosphatases SHP-1 et SHP-2. La voie IDO-SHP joue alors un rôle de signalisation qui conduit entre autre à l'augmentation du TGF- $\beta$  et active une boucle visant à amplifier l'expression de IDO et son activation ([Chen 2011](#)).

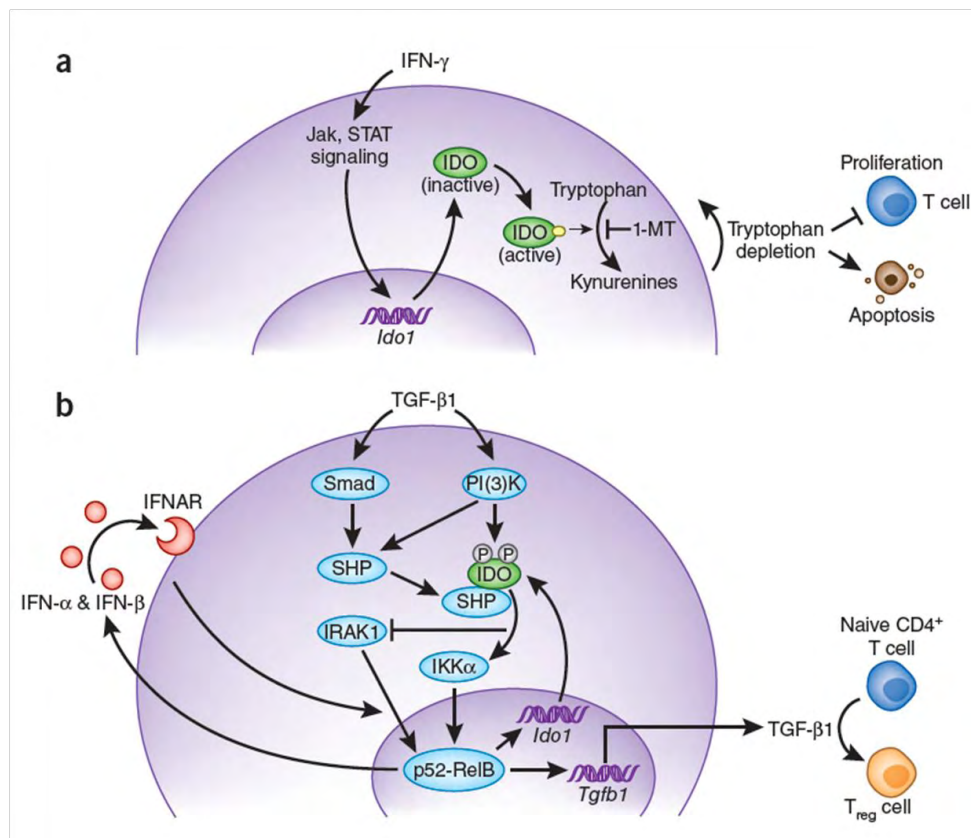


Figure 32 Voie de l'INF- $\gamma$  et du TGF- $\beta$  dans l'induction de IDO.

(a) L'IFN- $\gamma$  induit l'expression de IDO via les voies de signalisation Jak/STAT. L'enzyme IDO dégrade le tryptophane en kynurenine ce qui entraîne une déplétion du tryptophane dans le microenvironnement et conduit à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et/ou l'induction de la mort par apoptose.

(b) Le TGF- $\beta$  stimule l'expression de IDO via la voie PI3K. La voie PI3K est également impliquée dans la phosphorylation Fyn-dépendante de IDO au niveau de séquences ITIM. La forme phosphorylée de IDO recrute les phosphatases SHP-1 et SHP-2. Ce complexe IDO-SHP est impliqué dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B non canonique et contribue à augmenter l'expression de IDO et du TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  stimule également l'expression des phosphatases SHP-1 et SHP-2 via une signalisation dépendante des deux voies de signalisation SMAD et PI3K. L'expression de IDO et du TGF- $\beta$  par les DCs favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs, ce qui contribue à maintenir une tolérance immunitaire à long terme. D'après (Chen 2011).

Il existe également des mécanismes qui régulent négativement l'expression de IDO et permettent la restauration de la réponse immunitaire. Ces mécanismes passent notamment par l'activation de SOCS-3. Il a été montré que cette protéine conduit à l'ubiquitination de IDO et sa dégradation par le protéasome, ce qui fait basculer les DCs d'un état tolérogène à un état immunogène (Orabona, Pallotta et al. 2008).

En conclusion, les DCs entretiennent un dialogue complexe avec les différents effecteurs de l'immunité. Elles délivrent des signaux importants qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs et jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire. Considérant le rôle central des DCs dans la réponse immunitaire, le détournement de ces cellules par les virus constitue un enjeu majeur pour échapper au contrôle par le système immunitaire et assurer leurs persistance au sein de leur hôte (Liu, Woltman et al. 2009; Lambotin, Raghuraman et al. 2010).



## **B-Immunopathologie de l'infection au VIH-1**

L'infection par le VIH-1 est associée à une profonde atteinte de l'intégrité fonctionnelle et cellulaire du système immunitaire. De manière intéressante il existe des cas d'infections au VIH-1 chez l'homme ou au SIV chez les primates non-humain qui ne développent pas la maladie même après plusieurs années d'infection en absence de traitement anti-rétroviraux. Chez l'homme on distingue les « elite controller » qui contrôlent naturellement la réplication virale et des « long term non progressors » qui n'évoluent pas vers le stade symptomatique de la maladie malgré une charge virale importante. Chez les primates non-humains, il existe aussi différents tableaux cliniques de l'infection au SIV. En effet, les hôtes naturels du SIV comme les sooty mangabeys (SM) et les singes verts d'Afrique (AGM), ne développent pas de maladies malgré une forte charge virale. En revanche, le même virus est responsable de l'apparition du SIDA chez l'hôte non naturel, le macaque. L'étude comparée des infections pathologique et non pathologiques au VIH-1 chez l'homme ou au SIV dans le modèle animal ont permis de mettre en évidence des troubles immunologiques fondamentaux directement associés à l'évolution de la maladie. Ces troubles peuvent être divisés en trois points essentiels comprenant : 1) la destruction des LT CD4+ ; 2) la perturbation des mécanismes immunitaires incluant la dérégulation de la production des facteurs pro-inflammatoires et immunosuppresseurs; 3) le détournement des DCs. Ces trois mécanismes, largement interconnectés, agissent en synergie dans l'affaiblissement du système immunitaire et l'évolution de la maladie vers le stade SIDA. D'autre part, l'apparition des pathogènes opportunistes contribuent également à aggraver ces troubles immunologiques pour conduire irrémédiablement à la mort du patient.

### **1. La destruction des lymphocytes T CD4+**

L'une des caractéristiques principales de l'immunopathologie associée à l'infection par le VIH-1 est la diminution progressive du nombre des LT CD4+ dans l'organisme. Dès la phase aigue de l'infection où on assiste à une déplétion massive des LT dans les organes lymphoïdes secondaires ([Coffin and Swanstrom 2013](#)), alors que dans le compartiment sanguin, la déplétion des LT CD4+ est observée plus tardivement. Leur diminution en dessous du seuil critique de 200 cellules par microlitre de sang définit l'évolution de la maladie vers le stade SIDA ([Coffin and Swanstrom 2013](#)). Ce déclin des LT dans les différents compartiments de l'organisme résulte au moins de la combinaison de quatre mécanismes distincts ([Alimonti, Ball et al. 2003](#)).

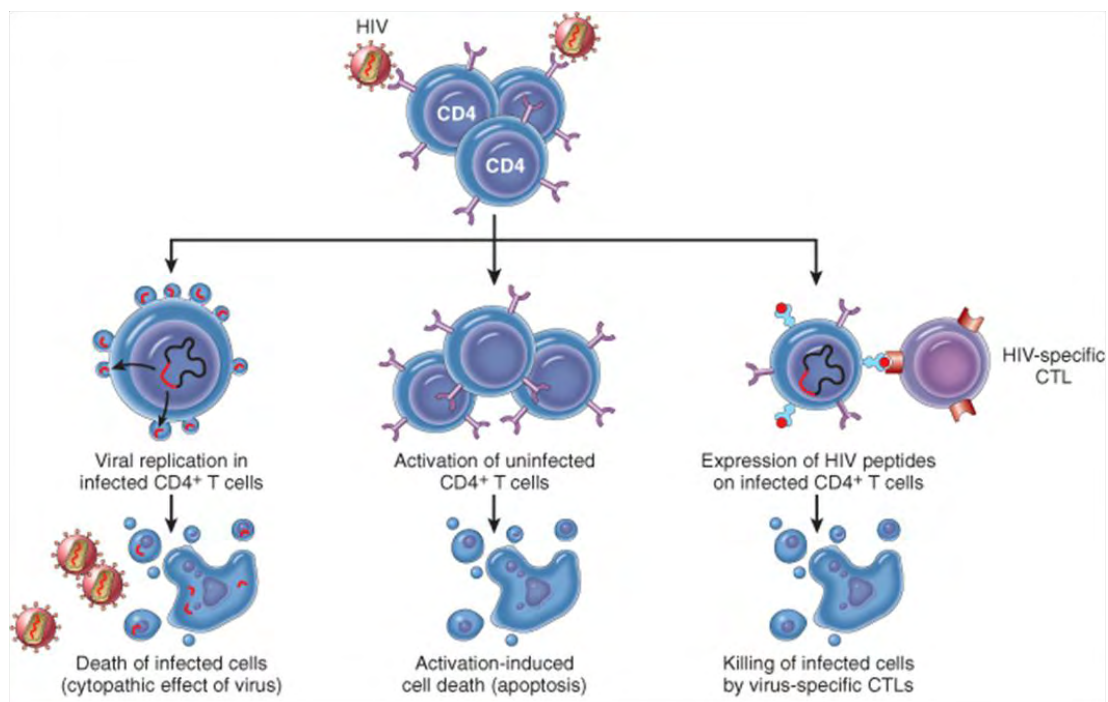


Figure 33 Différents mécanismes d'élimination des LT CD4+ au cours de l'infection VIH-1

Illustration des différents mécanismes (non exhaustifs) permettant d'expliquer l'élimination des lymphocytes T CD4+ au cours de l'infection par le VIH-1 incluant l'effet cytolytique direct du virus, la mort par apoptose lié à l'activation chronique des lymphocytes et l'élimination des cellules infectées par la réponse cellulaire CD8 cytotoxique (CTL) anti-virale. Un quatrième mécanisme (non-représenté ici) est lié à la formation de syncytia. Ces différents mécanismes sont détaillés dans le texte. D'après Mitchell, R. N. (2007). Chapter 5 - Diseases of the Immune System. In Robbins Basic Pathology, 8th Edition (pp. 107 - 172). Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

### a) Effets cytolytique direct du VIH-1

L'infection des LT CD4+ par le VIH-1 a pour effet de conduire à leur destruction. Cet effet est observé dès la primo-infection par des virus de phénotype CCR5 tropique cependant il est encore plus accentué dans les phases tardives de l'infection avec l'émergence des virus CXCR4 tropique qui ont un effet cytolytique plus important ([Swanstrom and Coffin 2012](#)). Une étude récente a mis en évidence le rôle central de la voie de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) dans la destruction des LT activés, suite à leur infection par le VIH-1 *in vitro*. Cette protéine kinase qui joue un rôle majeur dans la détection des dommages à l'ADN, est activée par le virus suite à l'étape d'intégration. L'activation de la DNA-PK conduit à la phosphorylation des protéines p53 et de l'histone H2AX associée à la mort du LT infecté ([Cooper, Garcia et al. 2013](#)). L'inhibition de l'ADN-PK réduit la mort des LT infectés. En plus de dépléter les LT activés, le virus détruit également les progéniteurs lymphocytaires présents dans le thymus, ce qui contribue à interférer avec l'homéostasie des LT.

### **b) Induction de la mort par apoptose**

Une grande majorité de cellules T qu'elles soient infectées ou non infectées meurent par apoptose. Ceci est lié à plusieurs facteurs comme l'activation chronique des LT due à une stimulation constante par des antigènes viraux ou encore à la production dérégulée des cytokines pro-inflammatoires. Elle peut également être provoquée par l'activation des récepteurs membranaires de "mort" comme les systèmes PD-1/PD-L1, Fas/Fas-Ligand et le facteur TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) qui sont augmentés au cours de l'infection ([Cummins and Badley 2010](#)).

### **c) Destruction par la réponse antivirale**

Le système immunitaire tente de lutter activement contre l'infection en mettant en place une réponse immunitaire antivirale. Cette réponse joue un rôle non négligeable dans l'élimination des LT. Elle passe notamment par l'activation des LT CD8+ cytotoxiques, et des Natural killer (NK) qui éliminent les LT CD4+ infectés ainsi que par la production d'anticorps qui ciblent les cellules infectées et conduisent à leurs mort par le mécanisme d'ADCC ou l'activation de la voie du complément.

### **d) Formation de syncytia.**

Les cellules infectées expriment à leurs surfaces les glycoprotéines virales gp120 et gp41, celles-ci peuvent fusionner, au cours d'un contact cellulaire, avec des cellules exprimant les récepteurs et co-récepteurs du virus dans un mécanisme similaire à l'étape de fusion virus-cellule cible. La fusion entraîne alors la formation de cellules géantes à plusieurs noyaux, nommées des syncytia qui ne sont pas viables.

D'autre part, certaines protéines virales ont une activité pro-apoptotique sur les cellules non infectées comme Tat, Nef, et Env ([Ross 2001](#)). Ces protéines agissent principalement en activant la voie des caspases conduisant à la mort cellulaire par apoptose.

## **2. Affaiblissement du système immunitaire**

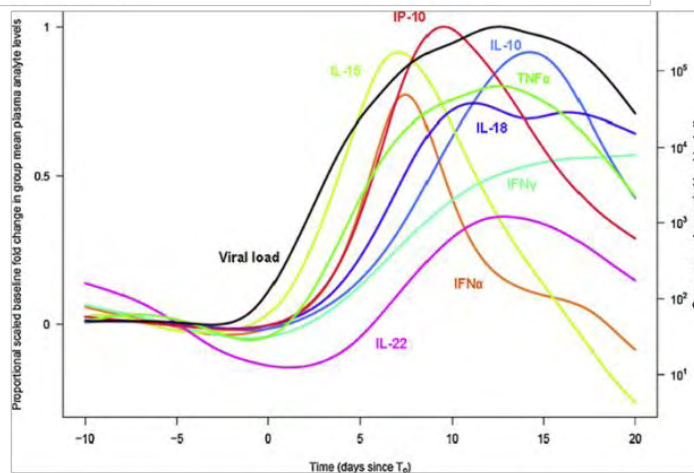
En parallèle à la diminution du nombre de LT CD4+, l'infection par le VIH-1 est associée à une profonde dérégulation des mécanismes immunitaires innés et adaptatifs. Cette dérégulation observée très tôt au cours de l'infection dès le stade asymptomatique, est un mécanisme complexe et multifactoriel qui se caractérise par trois points essentiels : a) Une hyper activation chronique du système immunitaire ; b) Une augmentation de l'expression de nombreux facteurs immunosuppresseurs ; c) Un déséquilibre des réponses T auxiliaires. L'ensemble de ces facteurs agissent négativement sur l'efficacité de la réponse immune anti-VIH. Ils conduisent à un affaiblissement généralisé du système immunitaire et sont associés à la persistance virale et à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA.

## a) Le paradoxe de la réponse inflammatoire

### Dérégulation du réseau de cytokine

L'infection par le VIH-1 crée une profonde dérégulation de la production de cytokines. Les cytokines jouent un rôle fondamental au cours des réponses immunes. Elles sont organisées en réseau et permettent aux différents acteurs cellulaires de communiquer afin d'organiser une réponse immune adaptée. Au cours de l'infection par le VIH-1, certaines cytokines sont produites davantage alors que d'autres sont inhibées. Cette dérégulation du réseau de cytokines est connue pour jouer un rôle important dans l'apparition des troubles immunitaires.

### A. Acute HIV-1 infection



### B. Acute SIV infection

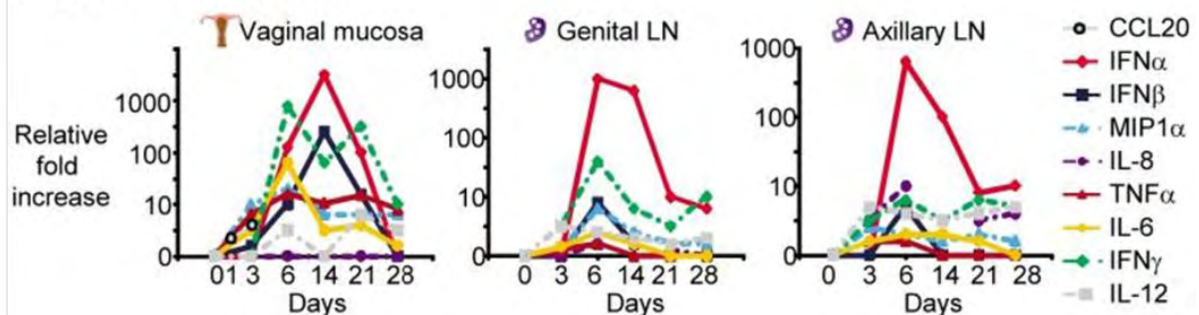


Figure 34 La tempête de cytokine au cours de la phase aigue de l'infection.

A) Cytokines retrouvées dans le plasma au cours de la phase aigue de l'infection au VIH-1. D'après (Keating, Jacobs et al. 2012). B) Cytokines retrouvées au niveau de la muqueuse vaginale, et des organes lymphoïdes secondaires drainants au cours de la phase aigue de l'infection au SIV. D'après (Katsikis, Mueller et al. 2011).

Dès la phase aigue de l'infection, on observe une production massive de cytokines connue sous le terme de tempête de cytokine, «cytokine storm» (Ford, Puroton et al. 2009). Celle-ci se



caractérisée par une augmentation du taux de cytokines plasmatiques. L'IL-15, l'IFN- $\alpha$  et la chimiokine IP-10 (CXCL10) sont les premiers éléments de la tempête. Ils sont suivies par une production soutenue et continue de l'IL-18, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-22, TNF- $\alpha$ , et de l'IL-10. Certaines de ces cytokines ont une activité antivirale qui limite la réplication virale (notamment les interférons et l'IL-12). D'autres sont connues pour stimuler la réplication virale et favoriser le recrutement et l'activation de nouvelles cibles cellulaires pour l'infection au VIH-1 (IL-6, TNF- $\alpha$ , IP-10) ([Kedzierska and Crowe 2001](#); [Kedzierska, Crowe et al. 2003](#)). Cette tempête de cytokine joue un rôle majeur dans l'initiation de la dérégulation des mécanismes immunitaires. Elle va entraîner une série d'événements en cascade conduisant à l'évolution de la maladie ([Katsikis, Mueller et al. 2011](#); [Keating, Jacobs et al. 2012](#)).

Au cours de la phase asymptomatique de la maladie on observe une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , l'IL-6, IL-1 $\beta$  et de l'IFN- $\alpha$  dont le taux corrèle avec l'évolution de la maladie. Ces cytokines sont responsables d'une hyper inflammation chronique qui s'avère délétère pour l'hôte ([Ipp and Zemlin 2013](#)).

#### *Augmentation de l'IFN- $\alpha$*

L'IFN- $\alpha$  fait partie de la grande famille des interférons de type I qui regroupe notamment plusieurs membres de la famille des IFN- $\alpha$  (1 à 13), et l'IFN- $\beta$ . Il joue un rôle majeur dans la réponse antivirale. Il a été associé à un contrôle de la réplication du VIH-1 ainsi que d'autres virus ([Seo and Hahm 2010](#); [Marsili, Remoli et al. 2012](#)). Au cours de l'infection par le VIH-1, l'IFN- $\alpha$  est produit majoritairement par les DCs plasmacytoïdes. Ces cellules sont dotées de senseurs intracellulaires spécifiques, incluant les TLR7 qui reconnaissent l'ARN du VIH-1. Suite à l'activation de ces TLR, les DCs plasmacytoïdes vont produire de grandes quantités d'IFN de type I et initier une réponse antivirale.

L'IFN- $\alpha$  active en aval, l'expression de centaines de gènes impliqués dans la réponse immunitaire anti-virale et dans sa régulation. Ils activent notamment de nombreux facteurs de restriction, des protéines impliquées dans la défense cellulaire intrinsèque, qui interfèrent avec différentes étapes du cycle viral. Parmi ces mécanismes de défense on retrouve la protéine PKR qui bloque l'initiation de la synthèse des protéines virales, le système 2'-5'A synthétase/RNase L qui dégrade l'ARN viral simple brin, la protéine Mx, une GTPase qui bloque la transcription ([Boo and Yang 2010](#)), l'adénosine déaminase ADAR ou la cytidine déaminase APOBEC3G qui introduisent de nombreuses mutations dans le génome viral ([Romani, Engelbrecht et al. 2009](#)), et les protéines de la famille TRIM qui s'attaquent à la capsid virale ([Grutter and Luban 2012](#)).

L'IFN- $\alpha$  agit également en activant les effecteurs de l'immunité. Il induit la maturation des DCs, l'activation des macrophages, le développement des CTL et l'activation des NK. Ainsi, l'IFN- $\alpha$  contribue à l'activation de la réponse immunitaire contre le VIH-1. Cependant une accumulation de données récentes souligne les effets néfastes qui peuvent être associés à l'IFN- $\alpha$ . Dans le cas d'une infection virale chronique comme le VIH-1 l'expression de l'IFN- $\alpha$  est dérégulée et cette production constante est associée à de nombreuses pathologies du système immunitaire.

Parmi ces pathologies, l'IFN- $\alpha$  est associé à i) une désorganisation de la structure des organes lymphoïdes secondaires ([Baenziger, Heikenwalder et al. 2009](#)); ii) une induction de l'apoptose des

DCs plasmacytoïdes ([Swiecki, Wang et al. 2011](#)) iii) une induction massive de l'apoptose des cellules immunitaires effectrices dont les LT CD4+ et CD8+ ([Herbeuval and Shearer 2007](#)); iv) une augmentation de l'expression de nombreux facteurs immunosuppresseurs dont PD-L1 et IDO ([Martinson, Montoya et al. 2010](#)). Bien que l'IFN- $\alpha$  ait un rôle bénéfique au cours d'infections virales aiguës, il peut conduire à des effets néfastes lorsque l'infection est persistante comme cela a été récemment démontré dans le contexte de l'infection au LCMV clone 13 chez la souris ([Teijaro, Ng et al. 2013](#); [Wilson, Yamada et al. 2013](#)).

#### *Augmentation du TNF- $\alpha$*

Chez les patients infectés par le VIH-1, des quantités importantes de TNF- $\alpha$  sont retrouvées au niveau du sérum et du système nerveux central ([Bennasser, Badou et al. 2002](#); [Buscemi, Ramonet et al. 2007](#)). Cette cytokine a un rôle majeur dans la physiopathologie liée au VIH-1. Elle contribue à la propagation du virus ainsi qu'à la pathogénèse. Parmi ces nombreux effets délétères dans le contexte de l'infection au VIH-1 il a été rapporté que le TNF- $\alpha$  i) stimule la réplication virale en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B ([Aggarwal 2003](#)); ii) est impliquée dans l'induction de l'apoptose des LT CD4+ et CD8+ ([Herbein and Khan 2008](#)); iii) serait aussi responsable de troubles neurologiques par ces effets neurotoxiques ([Bennasser, Badou et al. 2002](#); [Brabers and Nottet 2006](#); [Buscemi, Ramonet et al. 2007](#)) et contribue au développement de la démence associée au SIDA ; iv) enfin, le TNF- $\alpha$  induit l'expression en retour de nombreux facteurs immunosuppresseurs dont l'IL-10 et PD-L1 qui participent à l'affaiblissement du système immunitaire.

Récemment des travaux ont mis en évidence les effets bénéfiques potentiels de la neutralisation du TNF- $\alpha$  dans un modèle d'infection pathologique au SIV. Les auteurs ont administré des anticorps anti-TNF- $\alpha$  (adalimumab) à des macaques rhésus avant et jusqu'à 12 semaines après leur infection par le SIVmac239, une souche pathogène. Bien qu'ils n'aient pas observé d'effet sur le contrôle de la charge virale plasmatique ou sur l'état d'activation des lymphocytes T circulants (CD38 ou Ki67), ils ont noté des réductions de l'expression des gènes pro-inflammatoires, une diminution de l'infiltration de neutrophiles dans la zone des cellules T para corticales, une diminution de l'expression des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  ainsi qu'une réduction de la fibrose du tissu lymphoïde et une meilleure conservation des cellules T CD4<sup>+</sup> ([Tabb, Morcock et al. 2013](#)).

Le rôle majeur du TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1 a également été démontré au niveau génétique. Des études de polymorphisme génétique ont mis en évidence le rôle majeur du gène TNF- $\alpha$  et plus particulièrement de l'allèle TNF- $\alpha$ -238 A qui est associé au statut non-progressifs de certains patients infectés par le VIH-1 ([Nasi, Riva et al. 2013](#)). Cependant, le rôle fonctionnel de cet allèle rare TNF- $\alpha$ -238 A sur l'activité transcriptionnelle du TNF- $\alpha$  n'a pas été étudié.

#### *Augmentation de l'IL-6*

Chez les patients séropositifs le taux d'IL-6 plasmatique est élevé. Plus ce taux est important, plus il est associé à une évolution rapide de la maladie. Comme le TNF- $\alpha$  cette cytokine pro-inflammatoire augmente la réplication virale. D'autre part, elle est aussi à l'origine de nombreuses complications associées à la physiopathologie de l'infection tel que le développement de cardiomyopathies, du sarcome de Kaposi, de lymphome B, ainsi qu'une hypergammaglobulinémie. Elle entretient également l'hyper inflammation chronique en activant les cellules du système

immunitaire et en augmentant la production des cytokines pro-inflammatoires. De plus, chez les patients sous traitement anti rétroviral, un taux élevé d'IL-6 et prédictifs de l'évolution de la maladie ([Kuller, Tracy et al. 2008](#)).

En parallèle à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, l'infection par le VIH-1 est associée à une activation généralisée du système immunitaire qui corrèle avec l'évolution de la maladie ([Appay and Sauce 2008](#); [Sauce, Elbim et al. 2013](#)). Cette activation est caractérisée par une augmentation de l'expression de protéines membranaires comme les TLR ([Sanders, Cruse et al. 2008](#); [Hernandez, Stevenson et al. 2012](#)), CD38 et HLA-DR ([Deeks, Kitchen et al. 2004](#)), CD69, des marqueurs intracellulaires comme Ki67 et des facteurs solubles comme les immunoglobulines, la  $\beta$ 2-microglobuline, la forme soluble du récepteur à l'IL-2, le CD14 soluble, le MD2 soluble ([Sandanger, Ryan et al. 2009](#)) et la néoptérine. Ces marqueurs de l'activation immunitaires sont également utilisés comme marqueurs de l'évolution de la maladie suggérant une association directe entre le niveau d'activation, la perte de fonction du système immunitaire et l'évolution de la maladie.

Plusieurs facteurs viraux sont directement impliqués dans la production de ces cytokines comme les protéines Tat ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002](#); [Li, Yim et al. 2010](#)), Nef, et gp120 ([Sarkar, Mitra et al. 2013](#)). Leur production est également corrélée avec l'augmentation de produits bactériens dans la circulation sanguine comme le LPS. En effet, les travaux de Brenchley et al., ont montré que la phase chronique de l'infection au VIH est associée à une augmentation de produits bactériens dans la circulation, suite à une détérioration de l'intégrité de la barrière intestinale ([Brenchley, Price et al. 2006](#)). Ces produits bactériens hautement immunogènes favorisent l'activation chronique du système immunitaire et entraînent la mort massive des cellules activées.

Bien que l'activation du système immunitaire et la réponse inflammatoire soient généralement associées au contrôle des infections et à la clairance virale, ce principe n'est pas vérifié au cours de l'infection par le VIH-1. Ce paradoxe s'explique par le fait que le VIH-1, qui infecte directement les cellules immunitaires, tire profit de leur activation par les facteurs pro-inflammatoires pour stimuler sa propre réplication. Réplication qui augmente à son tour l'activation immunitaire et crée un cycle infernal qui tend à amplifier la réplication virale et l'affaiblissement du système immunitaire. De plus, l'hyper-inflammation chronique est contre balancée par l'augmentation de nombreux facteurs immunosuppresseurs et l'induction de l'apoptose des LT effecteurs. Tout ceci favorise la persistance du virus et l'apparition de nombreux troubles immunologiques.

## **b) L'augmentation des facteurs immunosuppresseurs**

### *Augmentation de l'IL-10*

L'infection par le VIH-1 s'accompagne d'une importante production de l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine fortement immunosuppressive ([Clerici, Wynn et al. 1994](#)). En effet chez les patients infectés on détecte un taux élevé d'IL-10 au niveau du plasma ([Stylianou, Aukrust et al. 1999](#); [Brockman, Kwon et al. 2009](#)). Cette cytokine est produite majoritairement par les cellules

du système immunitaire. Des études *in vitro* ont montré que l'IL-10 est produite spontanément par les PBMC de patients séropositifs. Parmi les PBMC, les monocytes en sont la principale source ([Kumar, Angel et al. 1998](#)). Cependant, cette cytokine est également augmentée dans de nombreux types cellulaires incluant les macrophages, les LT, les LB, les NK et les DCs myéloïdes ([Brockman, Kwon et al. 2009](#)).

La production d'IL-10 semble étroitement liée à l'affaiblissement du système immunitaire et la perte du contrôle de la réplication virale. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que i) chez les progresseurs, l'augmentation du taux d'IL-10 est corrélée positivement avec l'augmentation de la charge virale et l'évolution vers le stade symptomatique de la maladie ([Clerici and Shearer 1993](#); [Stylianou, Aukrust et al. 1999](#); [Orsilles, Pieri et al. 2006](#)). ii) les personnes produisant moins d'IL-10 à cause de la mutation sur le promoteur de l'IL-10 (IL-10-5'-592A) évoluent moins rapidement vers le stade SIDA ([Mahajan, Agosto-Mojica et al.](#)). iii) Les « elite controllers » qui ne développent pas de maladie malgré leurs statut séropositif ne présentent pas d'augmentation de l'IL-10 ([Brockman, Kwon et al. 2009](#)). iv) les personnes recevant un traitement antirétroviral efficace voient leur production d'IL-10 chuter en parallèle à la diminution de la charge virale ([Brockman, Kwon et al. 2009](#)).

Des études *in vitro* ont également montré que l'IL-10 est directement impliqué dans la perte de fonction du système immunitaire. En effet, les travaux de Clerici et al. ([Clerici, Wynn et al. 1994](#)), et plus récemment, ceux de Brockman et al. ([Brockman, Kwon et al. 2009](#)) ont montré que la neutralisation de la voie IL-10 à l'aide d'anticorps bloquant l'interaction IL10-IL-10R, permet de restaurer la fonction des cellules immunitaires de patients séropositifs. Parmi les effets bénéfiques de ce traitement, les auteurs ont pu observer une restauration de la prolifération des LT CD4+ et CD8+ spécifiques du VIH-1 ainsi qu'une augmentation de la production des cytokines IFN- $\gamma$  et IL-2. De manière intéressante, dans un autre modèle d'infection virale persistante par le LCMV clone 13, un tel traitement permet de conduire jusqu'à la clairance virale ([Brooks, Trifilo et al. 2006](#)). L'IL-10 semble donc jouer un rôle majeur dans l'échappement du virus au système immunitaire. Un des enjeux importants est donc de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu par le VIH pour induire la production de cette cytokine.

Plusieurs protéines virales peuvent induire la production de l'IL-10 comme Tat ([Badou, Bennasser et al. 2000](#); [Li, Lee et al. 2005](#); [Gupta, Boppana et al. 2008](#)), Nef ([Tangsinmankong, Day et al. 2000](#)) et gp120 ([Shan, Klasse et al. 2007](#)).

#### *Augmentation du système PD-1/PD-L1*

Plusieurs travaux ont rapporté la modulation du système PD-1/PD-L1 dans l'infection au VIH-1. L'expression du récepteur PD-1 est principalement augmentée sur les LT CD4+ ([Whittall, Peters et al. 2011](#)) et les lymphocytes T CD8+ ([Trautmann, Janbazian et al. 2006](#)). Cette augmentation est encore plus soutenue sur les LT spécifiques du VIH, en comparaison avec les LT spécifiques d'autres pathogènes comme le cytomégalovirus humain (CMV) ou le virus Epstein Barr (EBV) ([Trautmann, Janbazian et al. 2006](#)). De plus, le niveau de PD-1 est corrélé positivement avec la charge virale, et l'inactivation des LT ([Day, Kaufmann et al. 2006](#); [Trautmann, Janbazian et al. 2006](#); [D'Souza, Fontenot et al. 2007](#)). Cette augmentation de PD-1 est aussi l'une des différences

majeures entre les patients infectés par le VIH-1 qui progressent vers la maladie et ceux qui n'évoluent pas vers la phase symptomatique ([Whittall, Peters et al. 2011](#)). De manière similaire, dans le modèle animal, l'expression de PD-1 est retrouvée au cours des infections pathologiques au SIV *versus* non pathologiques ([Estes, Gordon et al. 2008](#)). L'augmentation de ce récepteur est liée à différents éléments comme la production des cytokines IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 ([Kinter, Godbout et al. 2008](#)) ou peut être induite par la protéine virale Nef ([Muthumani, Choo et al. 2008](#)). Des études *in vitro* ont également montré que des DCs exposées au VIH-1 induisent l'expression de PD-1 sur les LT en cocultures conduisant à leur inactivation ([Shankar, Che et al. 2011](#)). Par ailleurs, dans le modèle SIV/macaque, l'augmentation du ligand de PD-1 (PD-L1) sur les CPA est corrélée positivement avec l'expression de PD-1 sur les LT suggérant que ce mécanisme est également observé *in vivo* ([Xu, Wang et al. 2010](#)). Récemment le groupe de Sékaly a également montré une modulation positive de PD-1 sur les monocytes, principalement par les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 ou par différents ligands des TLR4, 2 et 9, qui sont augmentés suite à la détérioration de la barrière gastro-intestinale ([Said, Dupuy et al.](#)).

Le ligand PD-L1 se retrouve surexprimé principalement sur les CPA. D'autres travaux ont également rapporté une augmentation de PD-L1 dans les monocytes, les LT CD4 et T CD8 ([Wang, Fan et al. 2010](#)). Les travaux de Wang et al ([Wang, Fan et al. 2010](#)) ont montré une augmentation de PD-L1 dans les DCs myéloïdes de patients infectés par le VIH-1 « progresseurs ». Cette augmentation est encore plus soutenue chez les patients au stade SIDA alors que les « non-progresseurs » présentent une expression de PD-L1 comparable aux individus non infectés. De plus, cette augmentation est corrélée positivement avec la charge virale et négativement avec le taux de CD4+, suggérant une relation entre le virus, l'expression de PD-L1, et la perte des LT CD4+. En parallèle, dans le modèle SIV/macaque Xu et al ([Xu, Wang et al. 2010](#)), ont montré l'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les pDC et les mDC et de PD-1 sur les lymphocytes T CD4 et T CD8. De plus les cellules exprimant le ligand PD-L1 et celles qui expriment le récepteur PD-1 colocalisent au sein même des organes lymphoïdes secondaires des animaux infectés, suggérant une interaction qui pourrait conduire à l'inhibition de la réponse antivirale ([Xu, Wang et al. 2010](#)).

Au niveau fonctionnel, de nombreuses études ont montré que l'augmentation du système PD-1/PD-L1 est directement impliquée dans la réduction de la capacité des LT à proliférer et produire des cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2), y compris des lymphocytes spécifiques des antigènes du VIH-1 ([Trautmann, Janbazian et al. 2006](#); [Wang, Fan et al. 2010](#)). La compréhension des mécanismes viraux et cellulaires impliqués dans l'augmentation de PD-1 et PD-L1 constitue donc un enjeu important dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le SIDA ([Freeman, Wherry et al. 2006](#); [Kaufmann and Walker 2008](#); [Macatangay and Rinaldo 2009](#); [Khaitan and Unutmaz 2011](#)).

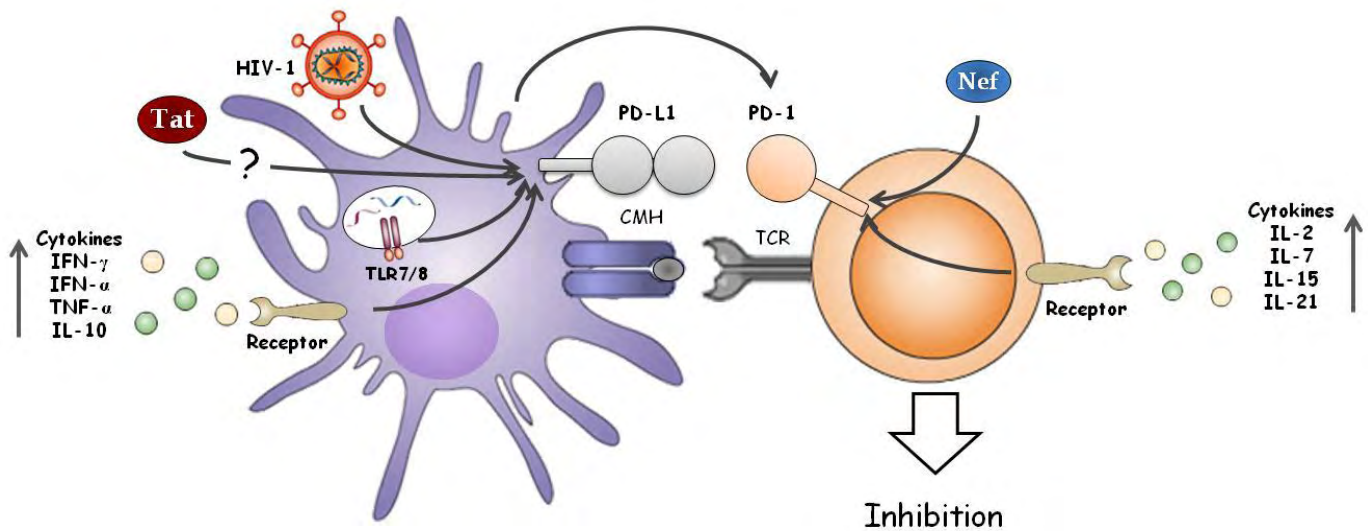


Figure 35 Mécanismes impliqués dans l'augmentation PD-1/PD-L1

Au cours de l'infection par le VIH-1, plusieurs mécanismes sont associés à l'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les CPA et de PD-1 sur les LT CD4 et CD8. Parmi les mécanismes associés à l'augmentation de PD-L1 on retrouve i) l'effet des cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  (Boasso, Hardy et al. 2008), IFN- $\gamma$ , et IL-10 (Rodriguez-Garcia, Porichis et al.); ii) le rôle de la particule virale (Boasso, Hardy et al. 2008; Wang, Fan et al. 2010); iii) l'activation des TLR7/8 par l'ARN viral riche en séquence uracil (Meier, Bagchi et al. 2008); iv) au cours de cette thèse nous avons émis l'hypothèse de l'implication de la protéine Tat.

L'expression du récepteur PD-1 est associée à i) l'induction par les DCs (Shankar, Che et al. 2011); ii) l'effet des cytokines IL-2, IL-7, IL-15, et IL-21, (Kinter, Godbout et al. 2008); iii) l'action de la protéine virale Nef (Muthumani, Choo et al. 2008).

Des études *in vitro* ont montré que l'expression de PD-L1 peut être induite dans les DCs myéloïdes (Wang, Fan et al. 2010) ainsi que dans les pDCs (Martinson, Montoya et al. 2010) directement après exposition au virus. Plusieurs travaux ont permis de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent. i) Les travaux de Rodriguez-Garcia et al. ont montré que le VIH-1 augmente l'expression de PD-L1 dans les macrophages dérivées de monocyte via la production de l'IL-10 (Rodriguez-Garcia, Porichis et al. 2011). ii) L'étude de Boasso et al. a démontré que l'induction de PD-L1 par le VIH-1 dans les monocytes et les LT est dépendante de la production de l'IFN- $\alpha$  ainsi que de la voie d'endocytose. Cela a été démontré par l'inhibition de l'augmentation de PD-L1 par le virus suite au blocage de la voie IFN- $\alpha$  à l'aide d'anticorps anti-IFN- $\alpha$ R2 ou suite au traitement à la chloroquine, un inhibiteur de l'acidification des endosomes (Boasso, Hardy et al. 2008). iii) La voie d'endocytose, l'activation des TLR7 et l'induction de la production d'IFN- $\alpha$  sont également associés à l'induction de PD-L1 par les virus X4 et R5 tropique dans les DCs plasmacytoïdes (Martinson, Montoya et al. 2010). iv) Enfin, les travaux de Meier et al. ont montré que la stimulation de PBMC avec des séquences d'ARN riches en uracil dérivée de l'ARN du VIH-1 (ARN 40, ARNgag) est suffisante pour induire l'augmentation de l'expression de PD-L1 dans les monocytes, les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes (Meier, Bagchi et al. 2008).

Le rôle primordial de la voie PD-1/PD-L1 dans l'affaiblissement du système immunitaire et la persistance virale a encouragé l'étude de nombreux essais thérapeutiques. Plusieurs études réalisées *in vitro* ont démontré l'efficacité de la neutralisation de PD-L1 à l'aide d'anticorps bloquants l'interaction avec PD-1 sur la restauration de la capacité des CPA à induire la prolifération et la production de cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2) par les LT CD4+ et les LT CD8+, y compris les lymphocytes spécifiques d'antigènes du VIH-1 ([Day, Kaufmann et al. 2006](#); [Trautmann, Janbazian et al. 2006](#); [Wang, Fan et al. 2010](#)).

Dans le modèle animal, les travaux prometteurs de Velu et al. ont montré que l'administration d'anticorps neutralisant PD-1 en comparaison avec l'administration de contrôle isotypique permet d'augmenter considérablement la survie de macaques infectés par une souche hautement pathogène du SIV (SIV251). Cet effet est lié à i) une augmentation de la réponse CD8 anti-SIV qui produisent de la perforine, granzyme B, IFN- $\gamma$ , IL-2, ii) une augmentation de la fréquence des LT CD8 anti-gag (associée au contrôle de la réplication virale), iii) une augmentation de la production d'anticorps anti-SIV et iv) d'une diminution transitoire de la charge virale ([Velu, Titanji et al. 2009](#)). Une étude plus récente a également démontré que la neutralisation de PD-1 a pour effet de protéger la barrière gastro-intestinale et de limiter la translocation de produits bactériens, améliorant considérablement la survie des animaux infectés par SIV251, une souche hautement pathogène ([Dyavar Shetty, Velu et al. 2012](#)).

Une étude réalisée dans un modèle de souris humanisée infectée par le VIH-1 BaL a également démontré le rôle bénéfique de la neutralisation de la voie PD-1/PD-L1. Après avoir montré que l'injection de progéniteurs CD34+ humain dans les souris immuno déficiente, permet de reconstituer un système immunitaire complet, composé de LT, LB monocytes et DCs humaines, et que l'infection de ces souris avec un virus VIH-1 BaL-1 induit un syndrome « SIDA-like » caractérisé par une infection des LT CD4+, une augmentation de la charge virale plasmatique au cours du temps, et une diminution progressive des LT CD4+ en parallèle à une augmentation importante de PD-1 sur les LT CD4+ et CD8+, les auteurs ont testé l'effet de l'administration d'anticorps neutralisants anti-PD-L1 sur l'évolution de l'infection. Les résultats obtenus dans ce modèle ont montré i) une diminution de la charge virale de plus de 200 fois en 28 jours de traitement, associé à ii) un maintien ou une augmentation du nombre de LT CD4 et CD8, iii) un renouvellement des LT naïfs et central mémoires et une diminution des effecteurs mémoires potentiellement infectés par le virus, iv) ainsi qu'une augmentation de la production des cytokines Th1 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-12, favorisant l'induction d'une réponse antivirale efficace ([Palmer, Neff et al. 2013](#)).

Malgré l'ensemble de ces résultats encourageants obtenus *in vitro* avec des cellules humaines et *in vivo* dans le modèle animal, aucun essai thérapeutique n'a encore été réalisé chez l'homme. En effet, tenant en considération le rôle primordial du système PD-1/PD-L1 dans l'homéostasie du système immunitaire, la régulation des réponses immunitaires excessives et le contrôle des réponses auto-immunes, la neutralisation de ces facteurs pourrait conduire à l'apparition de nombreuses pathologies comme cela a été démontré chez la souris déficiente pour PD-1 (*pdcd1*<sup>-/-</sup>) qui développe spontanément des maladies de type lupus ou des cardiomyopathies respectivement chez les souris C57BL/6 ([Nishimura, Nose et al. 1999](#)) et BALB/c ([Nishimura, Okazaki et al. 2001](#)). Une alternative serait de cibler plus directement les facteurs viraux impliqués dans l'augmentation de PD-1/PD-L1.

## Augmentation de IDO

Un autre mécanisme de l'affaiblissement du système immunitaire au cours des infections virales persistantes est l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Plusieurs travaux ont montré que cette enzyme contribue à la persistance de nombreux virus dont le LCMV ([Wilson, Kidani et al. 2012](#)), le rétrovirus MuLV ([Hoshi, Saito et al.](#)) et le VIH ([Favre, Mold et al.](#)). Les premières observations datant des années 1988 ont montré une diminution du taux de tryptophane plasmatique chez les patients infectés par le VIH-1 ([Werner, Fuchs et al. 1988](#)). En parallèle à cette chute du tryptophane d'autres travaux ont montré une augmentation de la kynurenine dont le taux corrèle avec l'évolution de la maladie ([Huengsborg, Winer et al. 1998](#)). Des observations similaires ont été réalisées dans le modèle animal au cours d'infections pathologiques au SIV. Les travaux de Boasso et al. ont montré une dérégulation de la balance kynurenine/tryptophane en faveur de la consommation du tryptophane chez les macaques infectés par le SIV et présentant une charge virale élevée. En accord avec ces résultats les auteurs ont noté une augmentation de l'ARNm de IDO dans différents organes (foie, ganglions mésentériques, colon et jéjunum) dont l'expression corrèle avec la charge virale ([Boasso, Vaccari et al. 2007](#)). Par la suite, des observations similaires ont été réalisées chez l'homme. Les travaux de Favre et al. ont montré une augmentation du ratio Kyn/Try chez les patients infectés par le VIH-1 à un stade avancée de la maladie (charge virale >10,000 copies/ml et nombre de LT CD4+ <350 cells/ml) comparé aux individus «controller» (charge virale <2000 copies/ml et nombre de LT CD4+ >500 cells/ml). L'augmentation du catabolisme du tryptophane est associée avec une expression importante de l'enzyme IDO au niveau des ganglions lymphoïdes, et des muqueuses gastro-intestinales ([Favre, Mold et al. 2010](#)). L'expression de IDO se retrouve majoritairement dans les DCs myéloïdes ([Favre, Mold et al. 2010](#)). D'autres études ont également rapporté une expression de IDO dans les macrophages ainsi que les DCs plasmacytoïdes.

Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer l'augmentation de l'expression de IDO et de son activité au cours de l'infection par le VIH-1 sont variables en fonction du type cellulaire étudiée. Certains dépendent directement de l'interaction du VIH avec sa cellule cible alors que d'autres résultent de la dérégulation de voies immunologiques plus complexes.

Dans le macrophage, l'infection *in vitro* par la souche JRFL du VIH-1 induit l'expression de IDO. Cette induction est dépendante de la production d'IFN- $\gamma$ . Cela a été démontré par le fait que l'utilisation d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  neutralisants inhibent la capacité du VIH-1 à induire l'expression de IDO et la par conséquent la production de kynurenine ([Grant, Naif et al. 2000](#)).

Dans les DCs plasmacytoïdes l'infection *in vitro* par le VIH-1 conduit également à l'expression de IDO. Le mécanisme impliqué a été décrit dans les travaux de Boasso et al. ([Boasso and Shearer 2007](#)). Les auteurs ont montré que le VIH-1 stimule la production des interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type II (IFN- $\gamma$ ) par les DCs plasmacytoïdes, principalement suite à l'activation du TLR7 par l'ARN viral. Bien que ces IFN soient capables d'induire l'expression de IDO dans les DCs plasmacytoïdes, cette production ne semble pas nécessaire à l'induction de IDO par le VIH-1. En effet, la neutralisation des IFN à l'aide d'anticorps anti-IFN- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$  utilisés séparément ou en combinaisons ne bloque pas la capacité du virus à induire IDO. Par contre, l'expression de IDO est abolie suite au blocage du récepteur CD4 à l'aide d'anticorps anti-CD4. Ces résultats suggèrent donc que



contrairement au macrophage, dans les pDC le VIH-1 induit IDO dans un mécanisme direct, dépendant de l'interaction gp120-CD4 ([Boasso and Shearer 2007](#)).

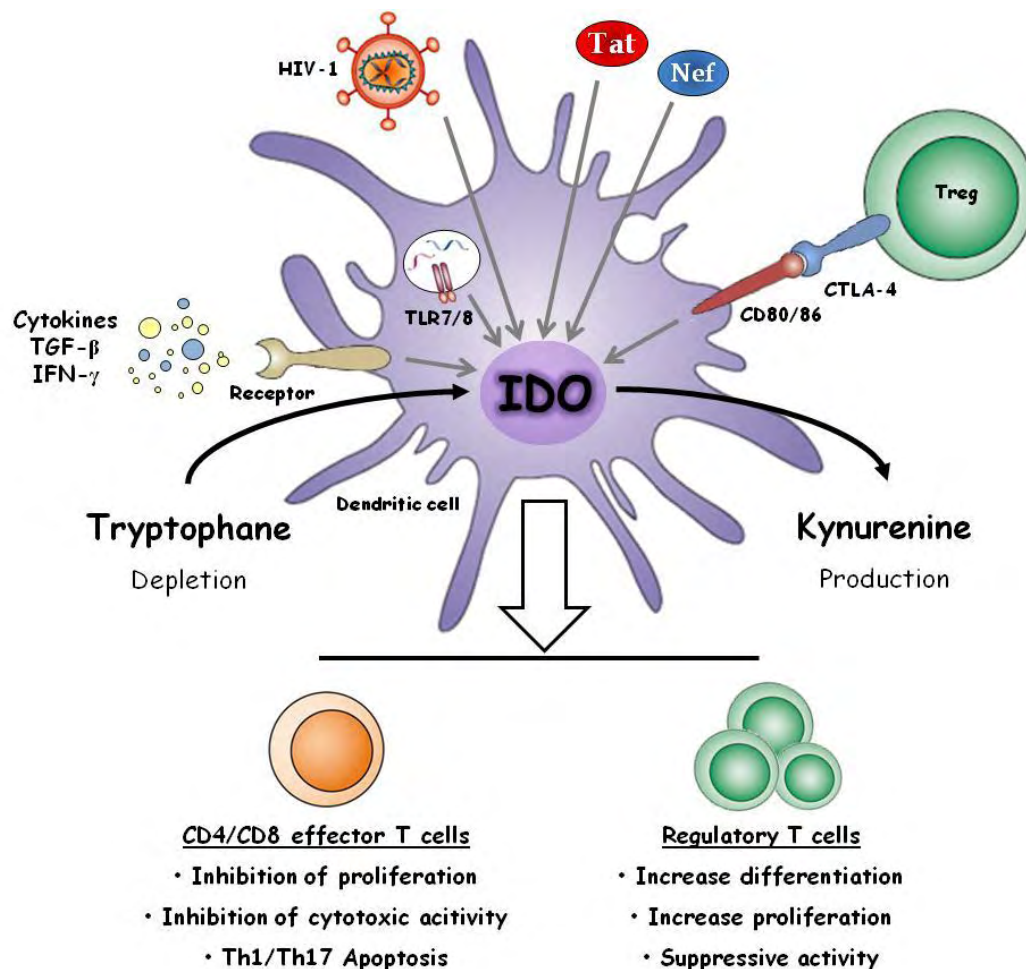


Figure 36 Mécanismes d'induction de IDO au cours de l'infection par le VIH-1.

Représentation schématique des différents mécanismes permettant d'expliquer l'augmentation de l'expression de IDO au cours de l'infection par le VIH-1 (Voir le détail dans le texte). L'expression dérégulée de IDO dans les cellules présentatrices d'antigènes a un impact négatif sur la réponse T CD8 et T CD4 effectrice et favorise l'instauration d'une tolérance en augmentant la différenciation, la prolifération et l'activité suppressive des LT régulateurs.

Les DCs myéloïdes présentent également une expression élevée de IDO au cours de l'infection par le VIH-1. Les travaux de Favre et al ont montré que les DCs myéloïdes qui expriment le marqueur DEC205 sont les principales cellules IDO+ retrouvées dans les ganglions et les tissu rectosigmoïde de patients séropositifs ([Favre, Mold et al. 2010](#)). Dans ces cellules, l'expression de IDO peut être induite suite à une exposition directe au virus *in vitro* ([Zhai, Jiang et al. 2013](#)). Cependant, ces cellules n'étant pas ou faiblement infectées par le VIH-1 *in vivo*, les acteurs responsables de l'augmentation de IDO semblent résulter de mécanisme indirect, plus complexes,

associées à des facteurs présents dans le micro environnement des cellules infectées. Les travaux de Favre et al. ont montré que l'expression de IDO dans les DCs est associée à l'augmentation de produits bactériens et de cytokines pro-inflammatoires. En effet, suite à la détérioration de la muqueuse gastro-intestinale par le VIH-1, on observe une translocation de produits bactériens dans la circulation sanguine. Ces produits bactériens sont la source de ligands pour les TLR tels que le TLR4 qui est exprimé sur les DCs et dont la stimulation conduit à l'activation immunitaire accompagnée par la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IFN- $\alpha$ . L'ensemble de ces facteurs agissent en synergie pour augmenter l'expression de IDO dans les DCs ([Favre, Mold et al. 2010](#)). Un autre facteur associé à l'augmentation de IDO est l'histamine. La production de cette molécule est augmentée au cours de l'infection par le VIH-1. Celle-ci agit en synergie avec le VIH-1 pour augmenter l'expression de IDO dans les DCs. Elle augmente également la capacité de ces cellules à différencier les LT en T régulateur ([Zhai, Jiang et al. 2013](#)). Les LT régulateurs générés par les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes IDO+ contribuent également à augmenter et à maintenir l'expression de IDO dans les DCs ([Manches, Munn et al. 2008](#); [Manches, Fernandez et al. 2012](#)). Enfin, des facteurs viraux comme les protéines Tat ([Samikkannu, Rao et al. 2010](#)) et Nef ([Smith, Guillemin et al. 2001](#)) sont également impliqués dans l'expression de IDO.

L'ensemble de ces facteurs qui conduisent à l'expression de IDO dans les macrophages, et les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes ont pour conséquence d'instaurer un état immunosuppresseur, favorable à la persistance virale. IDO exerce son activité immunosuppressive sur de nombreux effecteurs de l'immunité comme les LT CD4 et CD8 ainsi que les LB et NK. Elle participe également à la dérégulation de l'équilibre entre les réponses T auxiliaires. Un exemple bien documenté est celui du rôle central de IDO dans la dérégulation de la balance Th17/Treg au niveau de la muqueuse gastro-intestinale. En augmentant la différenciation en LTreg et en stimulant l'apoptose des LTh17 qui jouent un rôle protecteur des muqueuses, IDO favorise la dérégulation de la perméabilité gastro intestinale et la translocation bactérienne connue pour jouer un rôle crucial dans la pathologie du VIH-1. Enfin, les travaux ayant démontré une implication de IDO dans la régulation de la balance Th1/Th2 chez la souris ([Xu, Zhang et al. 2008](#)) suggèrent que cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans le switch Th1/Th2 associé avec l'évolution de la maladie vers le stade SIDA ([Clerici and Shearer 1993](#); [Clerici and Shearer 1994](#); [Boasso 2011](#)).

Chez les patients séropositifs, l'expression de IDO est également retrouvée au niveau du système nerveux central. La présence de cette enzyme est associée avec le développement de troubles neurologiques comme le complexe démentiel associé au SIDA. Cette enzyme agit principalement via la production de catabolites du tryptophane toxiques pour les neurones comme l'acide quinolinique. En plus de son implication dans des troubles neurologiques, l'expression de IDO dans le système nerveux central favorise l'établissement d'un réservoir protecteur pour le VIH-1. Une étude réalisée chez la souris dans un modèle de souris humanisée infectée par le VIH-1 a montré que la neutralisation d'IDO, dans le SNC à l'aide de l'inhibiteur de IDO 1-méthyl-tryptophane (1mT), permet d'augmenter la clairance virale dans ce compartiment, principalement via la réponse T CD8 cytotoxiques ([Potula, Poluektova et al. 2005](#)).

Deux études ont évalué le potentiel thérapeutique de la neutralisation de IDO chez le macaque rhésus infecté par une souche pathogène du SIV (SIVmac251) et recevant un traitement anti-rétroviral (ART) ([Boasso, Vaccari et al. 2009](#); [Dunham, Gordon et al. 2013](#)). Les auteurs ont

administré l'inhibiteur de IDO 1mT par voie orale. Les deux études n'ont pas montré d'incidence probantes de l'administration du 1mT sur le métabolisme du tryptophane ou sur la diminution de la charge virale plasmatique en dessous du seuil déjà atteint par le traitement ART chez les bons répondeurs. Cependant, en cas d'échec du traitement ART, la neutralisation de IDO a permis une réduction significative de la charge virale dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires ([Boasso, Vaccari et al. 2009](#)).

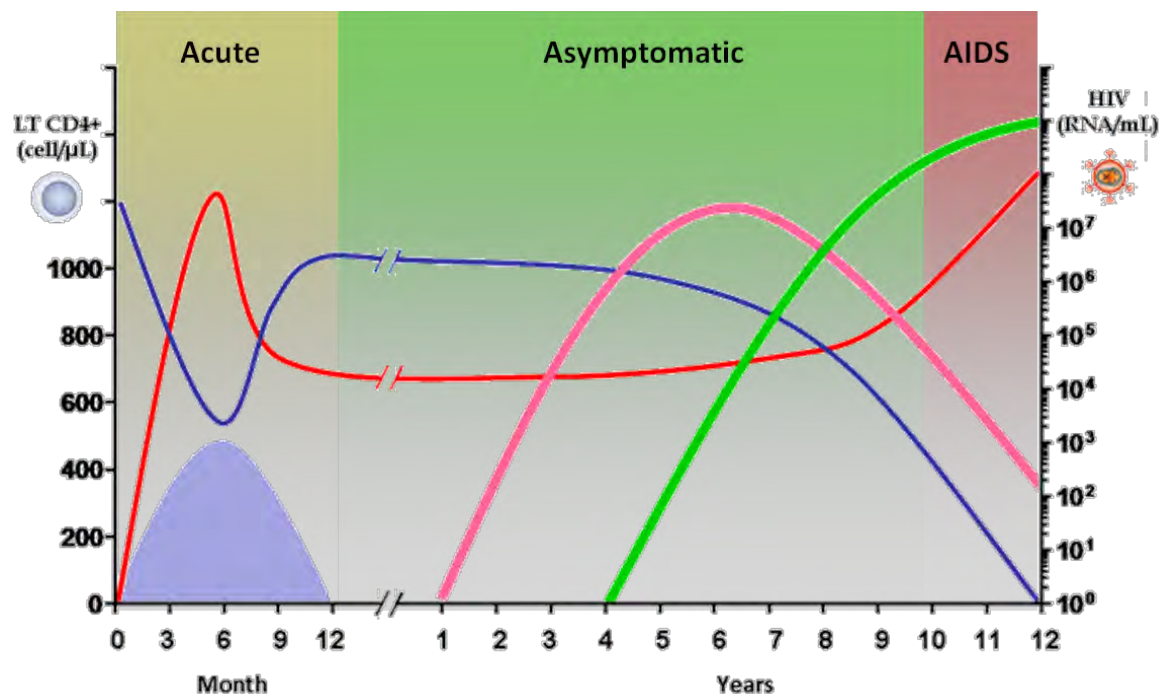


Figure 37 Immuno-pathologies de l'infection au VIH-1

Evolution du nombre de LT CD4+ par microlitre de sang (ligne bleue) et de la charge virale plasmatique du VIH-1 en nombres de copies d'ARN viral par millilitre de sang (ligne rouge) au cours des différentes phases de l'infection naturelle à VIH-1. Trois mécanismes majeurs associés à la dérégulation des mécanismes immunitaires et la progression de la maladie vers le stade SIDA sont représentés (unités arbitraires) : la dérégulation précoce du réseau de cytokines (en violet), l'augmentation des facteurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6 et IFN- $\alpha$  (ligne rose), et l'augmentation des facteurs immunosuppresseurs IL-10, PD-1, PDL-1 et IDO (ligne verte).

#### *Autres facteurs immunosuppresseurs*

En plus de l'augmentation de l'IL-10, de PD-1/PD-L1, et de IDO au cours de l'infection au VIH-1 d'autres molécules immunosuppresseuses ont été associées à l'affaiblissement du système immunitaire comme le TGF- $\beta$ , une cytokine immunosuppresseuse ([Lotz and Seth 1993](#); [Petitjean, Chevalier et al. 2012](#)), et CTLA-4, une molécule de costimulation négative exprimée par les LT régulateurs/suppresseurs ([Leng, Bentwich et al. 2002](#); [Whittall, Peters et al. 2011](#)). Enfin, une accumulation de données récentes décrivent également l'augmentation de facteurs inhibiteurs moins

connues comme a) TIM-3 (T-cell immunoglobulin mucin-containing domain-3) qui se lie à la galectine-9 ; b) LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) qui fixe le CMH-II ; c) les molécules de costimulation négatives CD160, et BTLA (B and T-lymphocyte attenuator) qui interagissent avec HVEM (herpes virus entry mediator) ; d) 2B4 (CD244) qui se fixe au récepteur CD48 ; e) LILRB (Leukocyte Ig-like receptor B) qui se lie aux CMH-I (HLA-A, -B, -G) ; f) TRAIL (Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing Ligand) qui induit l'apoptose en activant les récepteurs de mort DR4 et DR5 ; et g) KLRG1 (Killer cell lectin-like receptor G1), un membre de la famille des lectines de type C ([Larsson, Shankar et al. 2013](#)).

Bien que l'augmentation de l'IL-10, PD-1/PD-L1, et IDO soit clairement associée à la persistance virale et à l'affaiblissement du système immunitaire au cours de la phase chronique de l'infection, une expression précoce de ces molécules est associée avec un contrôle de la réplication virale. En effet, chez le Sooty mangabey hôte naturel du SIV, on observe une expression précoce des molécules immunosuppressives incluant l'IL-10 ([Kornfeld, Ploquin et al. 2005](#)), PD-1 ([Estes, Gordon et al. 2008](#)) et IDO dès la phase aigue de l'infection ([Manches and Bhardwaj 2009](#)). Cependant, l'expression de ces molécules est plus rapidement contrôlée et ne perdure pas au cours de la phase chronique. Au contraire chez le macaque ainsi que chez l'homme qui développent la maladie, l'expression de ces facteurs est augmentée plus tardivement et persiste au cours de la phase chronique. De plus, leurs taux d'expression corrèlent avec la progression de l'immunosuppression et de la maladie. Ces observations suggèrent donc que les facteurs immunosuppressifs ont un rôle protecteur au cours de la phase aigue, en limitant l'activation et la destruction des lymphocytes T ainsi que la dissémination du virus. Au contraire une dérégulation de leur production au cours de la phase chronique favorise l'affaiblissement du système immunitaire et la perte de contrôle de la réplication virale. Ainsi, les facteurs immunosuppressifs jouent un rôle ambivalent dans l'infection au VIH. Ils permettent d'une part de freiner l'activation immunitaire ce qui a pour effet de diminuer la réplication virale et de prévenir la destruction des LT. D'autre part, ils neutralisent la réponse immunitaire favorisant ainsi la persistance du VIH-1, l'établissement de réservoirs viraux ainsi que la survie des pathogènes opportunistes co-infectant.

### **c) Dérégulation des réponses T auxiliaires**

La dérégulation de la production des facteurs pro-inflammatoires et immunosuppressifs est également associée à un profond déséquilibre des réponses T auxiliaires Th1, Th2, Th17 et T régulatrices (Treg). Au cours de l'infection au VIH, on assiste au développement d'une réponse humorale de type Th2, inefficace dans la lutte contre le virus, au détriment d'une réponse cellulaire de type Th1 ([Clerici and Shearer 1993](#)). Ce « switch » Th1/Th2 est propice à l'établissement d'une infection chronique et favorise la progression de la maladie vers le stade SIDA ([Clerici and Shearer 1993](#)). Plusieurs arguments suggèrent une association entre cette dérégulation des réponses T, l'augmentation des cytokines Th2, les facteurs immunosuppressifs IL-10, PD-1/PD-L1 et IDO et une diminution des cytokines Th1 dont l'IL-2 et d'IL-12 ([Clerici and Shearer 1994](#); [Boasso and Shearer 2007](#); [Macatangay and Rinaldo 2009](#); [Boasso 2011](#)).

Les travaux de Becker proposent également que ce switch Th1/Th2 peut être lié au développement d'une réponse allergique aux protéines du VIH-1 ([Becker 2004](#)). En effet, il existe de

nombreuses similarités entre les réponses allergiques et la réponse au VIH-1 comme une augmentation graduelle de l'histamine ([Pedersen, Nielsen et al. 1991](#)) et des IgE en plus de la production des cytokines Th2 ([Marone, Florio et al. 2000](#)). De plus de nombreuses protéines virales induisent la production de cytokines Th2 tel que la protéine Tat ([Badou, Bennasser et al. 2000](#); [Gupta, Boppana et al. 2008](#); [Gandhi, Saiyed et al. 2009](#)) Nef ([Collette, Dutartre et al. 1997](#)) et gp120 ([Becker 2004](#); [Daly, Johnson et al. 2005](#)).

Un second phénomène bien documenté est la dérégulation des réponses Th17/Treg. En effet, l'infection par le VIH-1 est associée à une augmentation de population T régulatrice au niveau du sang, des muqueuses et des organes lymphoïdes secondaires. Ceci est lié à l'environnement immunosuppresseur favorable à leur développement. Les LT régulateurs ont un rôle ambivalent au cours de l'infection. Ils sont capables d'inhiber la réplication virale en diminuant l'activation des lymphocytes. Cependant leur activité immunosuppressive contribue également à l'affaiblissement du système immunitaire ([Chevalier and Weiss 2013](#)). Des études réalisées dans le modèle animal ont montré que ces cellules ont plutôt un rôle protecteur lorsqu'elles sont activées durant la phase aiguë de l'infection. Par contre leur augmentation pendant la phase chronique semble favoriser l'échappement au système immunitaire et la persistance virale ([Moreno-Fernandez, Presicce et al. 2012](#)).

En parallèle à l'augmentation des Treg on observe une diminution des LTh17 dans le sang et les muqueuses. La perte des Th17 est liée à leur déplétion massive au cours de la phase aiguë de l'infection, probablement à cause d'une plus forte susceptibilité de ces cellules à l'infection par le virus. De plus ces cellules ne sont pas ou peu régénérées au cours de la phase chronique. Ceci est lié à l'augmentation de l'expression de IDO. Cette enzyme produit des catabolites du tryptophane toxique pour les Th17, mais qui au contraire favorise la prolifération et la différenciation des Treg ([Favre, Mold et al.](#)).

La dérégulation de la balance Th17/Treg est un évènement majeur dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1. En effet, les Th17 ont un rôle crucial dans la lutte contre les bactéries et les champignons qui envahissent les muqueuses. La perte de ces cellules Th17 diminue l'immunité au niveau de ces sites sensibles ce qui favorise la translocation des produits microbiens dans la circulation systémique ([Kanwar, Favre et al. 2010](#)). Ces produits bactériens vont entraîner une hyper activation du système immunitaire, et favoriser la réplication virale et par conséquent l'évolution de la maladie.

Enfin, la modulation des réponses T auxiliaires, peut être également liée à une infection préférentielle des LTh1 et Th17, qui expriment fortement les récepteurs et co-récepteurs utilisés par le virus. Les Th2 qui expriment moins de CCR5 ([Loetscher, Ugucioni et al. 1998](#)), et plus de CXCR4 ([Jagodzinski and Trzeciak 2000](#)) sont moins sensibles à l'infection par les virus R5 retrouvées au stades précoces de l'infection. Les Treg qui inhibent la réplication virale pourraient être davantage épargnés ce qui explique leur augmentation au cours de la maladie ([Gosselin, Monteiro et al. 2010](#)). Concernant, les LT régulateurs, il a été montré que leur infection *in vitro* a pour effet d'augmenter leurs résistance à l'apoptose ainsi que leurs fonctions suppressives ([Ji and Cloyd 2009](#)).

## C-Détournement des cellules dendritiques myéloïdes

Les DCs sont parmi les premières cibles cellulaires du VIH-1 au cours de la primo-infection. De nombreuses études suggèrent que le virus détourne les DCs à son profit. Ceci peut être divisé en trois points essentiels : 1) Le virus utilise la capacité migratoire des DC pour atteindre ses cibles préférentielles les LT et assurer sa dissémination à travers l'organisme ; 2) L'infection par le VIH-1 est associée à une diminution importante de la population des DCs ; 3) Le VIH-1 module les fonctions immunologique des DCs myéloïdes afin d'échapper à l'attaque immunitaire et d'assurer sa persistance dans l'organisme ([Wu and KewalRamani 2006](#); [Lambotin, Raghuraman et al. 2010](#)).

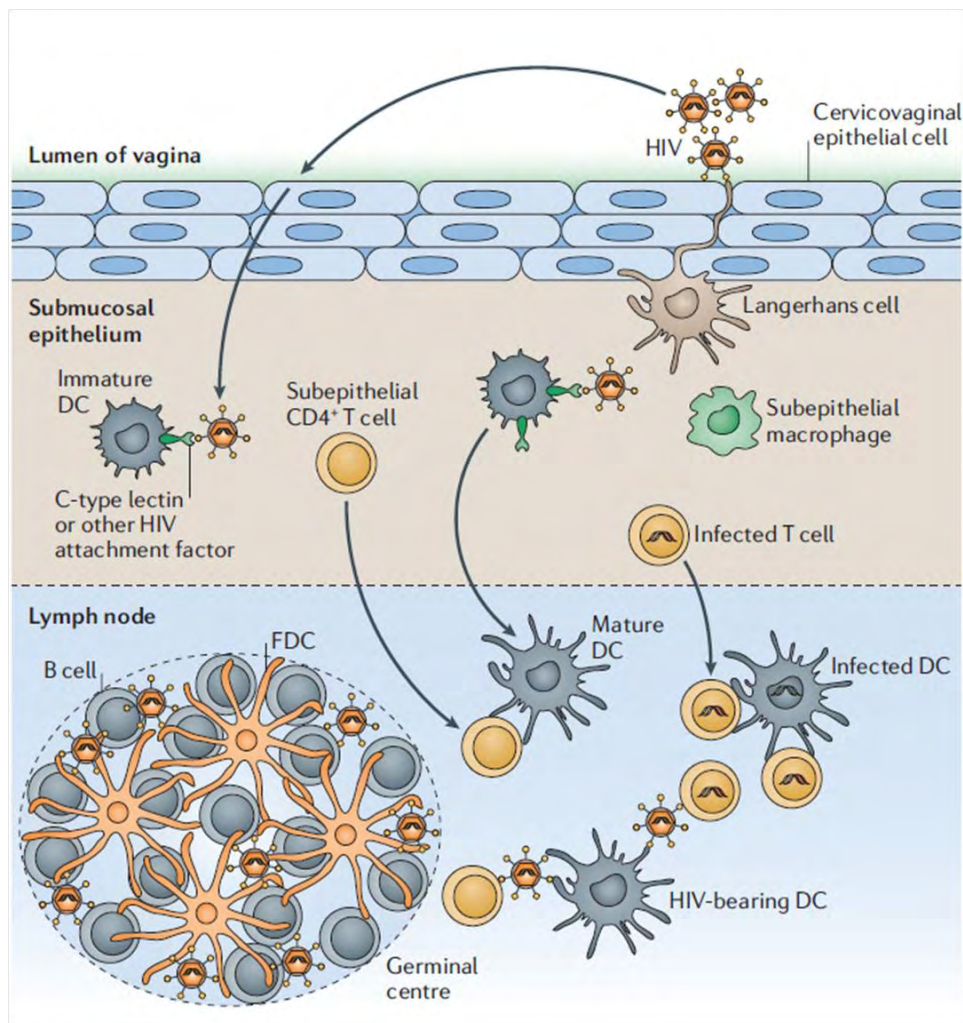


Figure 38 Rôle des DCs dans la dissémination du VIH-1

Au cours de la primo-infection au VIH-1 par voie sexuelle, les DCs sont les premières cellules à rencontrer le virus. Ces DCs incluent les cellules de Langerhans des tissus épithéliaux et des muqueuses et les DCs myéloïdes immatures dans la région sous-muqueuse. Ces cellules fixent le virus par l'intermédiaires de facteurs d'attachement dont les lectines de type C (DC-SIGN) et migrent ensuite vers les tissus lymphoïdes qui sont enrichies en lymphocytes T CD4+. Dans ces tissus, les DCs vont transmettre le virus aux lymphocytes T CD4+. Les DCs folliculaires (FDC), qui résident dans les centres germinatifs, peuvent également piéger de grandes quantités de virus à leur surface, ce qui fournit un « refuge » stable pour le VIH-1 et facilite également la diffusion du virus dans l'organisme. D'après ([Wu and KewalRamani 2006](#)).

## 1. Le VIH-1 détourne les DCs pour atteindre ses cibles préférentielles les LT

De nombreuses études ont montré que le VIH utilise les DCs pour transiter du site de primo-infection (muqueuses) vers les organes lymphoïdes secondaires, où résident la majorité des cellules cibles du VIH-1, les LT CD4+. En effet, les DCs sont présentes au niveau des muqueuses et sont les premières cellules à entrer en contact avec le virus. Les DCs vont fixer le virus par l'intermédiaire des molécules de surface et notamment les lectines de type C, comme DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin), la langerine, et les récepteurs du mannose. Après avoir fixé le virus, les DCs vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et transmettre le virus aux LT, l'une des premières étapes de la dissémination du virus dans l'organisme. Il existe deux mécanismes principaux qui sont impliqués dans la transmission du VIH au LT par les DCs : la *cis*-infection et la *trans*-infection.

### a) La *cis*-infection

Dans le modèle de la transmission en *cis*, les DCs sont, dans un premier temps, infectées par le virus. Les DCs expriment faiblement mais de manière significative le récepteur CD4, et corécepteurs CCR5, CXCR4 et peuvent être infectées par le VIH-1. Après l'achèvement de toutes les étapes du cycle viral, la DC va libérer de nouveaux virions infectieux qui vont pouvoir infecter de nouvelles cellules cibles comme les LT CD4+. Ce processus de *cis*-infection est la voie classique de transmission du VIH-1 et n'est pas spécifique aux DCs. De plus, cette voie implique l'accomplissement de l'ensemble des étapes du cycle viral avec la production de nouveaux virions. Cependant, les DCs sont faiblement permissives à l'infection *in vitro* comme *in vivo*. Les raisons qui expliquent cette faible infection des DCs par le VIH-1 incluent i) une faible expression des récepteurs et co-récepteurs, ii) une dégradation rapides des particules virales endocytées iii) et l'expression de facteurs de restrictions tels que SAMHD1 qui bloquent différentes étapes du cycle viral. Des études *ex-vivo* indiquent que seulement 0.1 à 3% des DCs myéloïdes et plasmacytoïdes provenant de donneurs sains peuvent être infectés de manière productive par une souche primaire du VIH-1 ou par une souche de laboratoire, comme cela a été démontré par le marquage intracellulaire de la protéine de capside p24 ([Smed-Sorensen, Lore et al. 2005](#)).

### b) La *trans*-infection

Le second mécanisme de *trans*-infection est indépendant d'une infection productive. Son mode d'action peut être expliqué par deux mécanismes. Dans le premier mécanisme, le VIH fixé par la DC est exposée à la surface de la cellule. Il peut ensuite infecter des cellules voisines à la suite d'un contact cellule-cellule. Dans le second mécanisme, le virus attaché à la membrane est internalisé par la DCs dans des compartiments intracellulaires endosomaux, les corps multi vésiculaire (MVB). Le virus est ensuite relargué dans le milieu extracellulaire associé à des vésicules d'exosomes. Ces exosomes vont alors fusionner avec les LT voisins pour délivrer le virus infectieux. Ce processus de *trans*-infection nécessite un contact étroit entre le LT et la DC et requiert la formation d'une synapse

virologique, comparable à la synapse immunologique et implique notamment les molécules DC-SIGN et son ligand ICAM-3 ainsi que ICAM-1 et LFA-1 ([Wu and KewalRamani 2006](#)).

La transmission du virus aux LT est également modulée par l'état de maturation des DCs. Les DCs immatures sont plus permissives au VIH-1 et répliquent mieux le virus, par contre elles sont moins efficaces dans le transfert aux LT. Au contraire les DCs matures répliquent 10 à 100 fois moins bien le virus mais sont extrêmement efficaces dans la transmission du virus aux LT ([Granelli-Piperno, Delgado et al. 1998](#); [Canque, Bakri et al. 1999](#)). Ce transfert est également différent en fonction du mode de maturation des DCs. Alors que l'IFN- $\alpha$  bloque le transfert du virus aux LT ([Manel, Hogstad et al. 2010](#)), la maturation induite par le LPS qui active la voie TLR4 a conduit à des résultats contradictoires présentant soit une augmentation du transfert aux LT ([Rodriguez-Plata, Urrutia et al. 2012](#)) soit une inhibition liée à la production de l'IFN- $\alpha$  ([Thibault, Fromentin et al. 2009](#)).

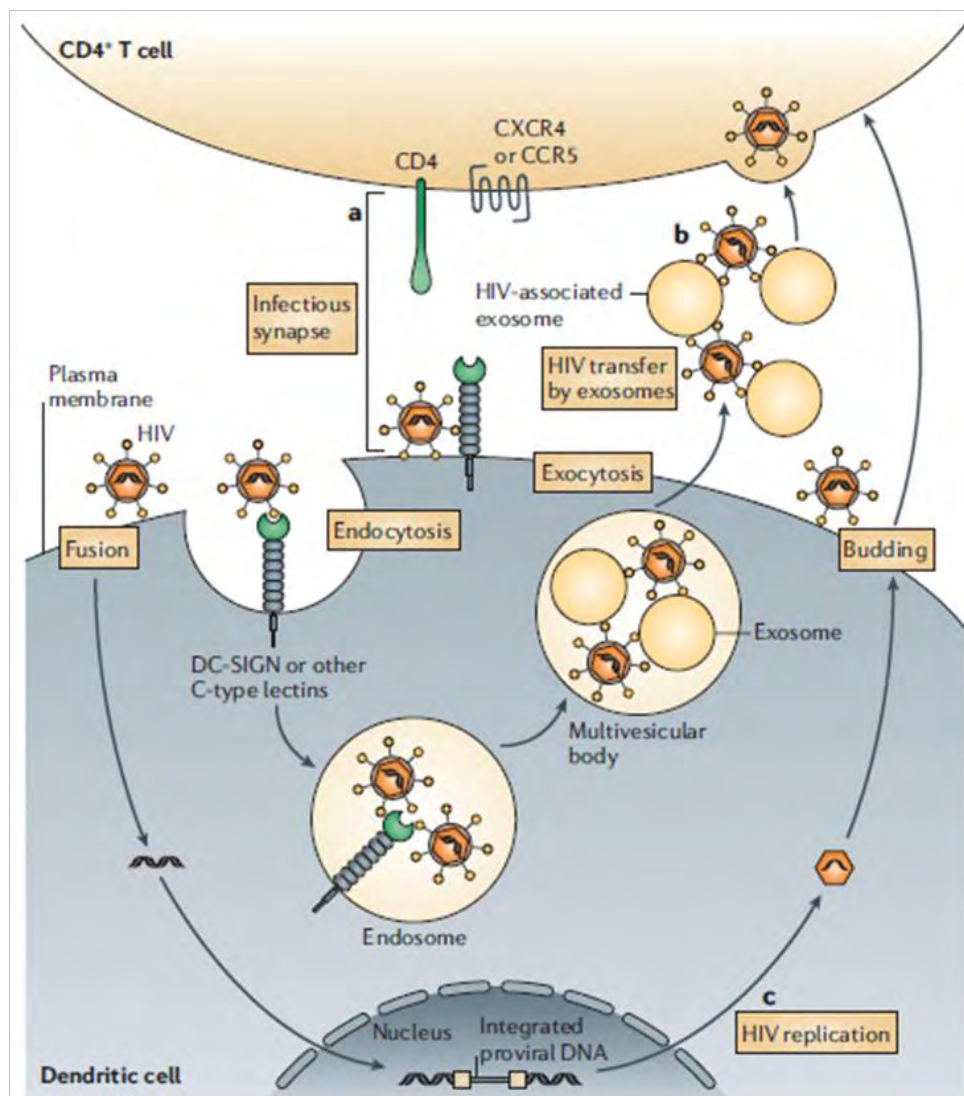


Figure 39 Mécanismes de transmission du VIH-1 aux LT par les DCs: cis- et trans-infection

Deux mécanismes majeurs sont impliqués dans la transmission du VIH-1 aux LT CD4<sup>+</sup> par les DCs : la *cis*-infection (a, b) et la *trans*-infection (c). Le mécanisme de *Trans*-infection peut également se faire par deux voies (a) et (b). Les différents mécanismes de ces voies sont détaillés dans le texte. D'après ([Wu and KewalRamani 2006](#)).



## 2. Déplétion des cellules dendritiques

L'infection par le VIH-1 est également associée à une déplétion massive des DCs du sang et des muqueuses. Cette diminution touche à la fois les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes. De manière intéressante, les patients non progressifs conservent l'homéostasie des DCs, suggérant une relation entre les DCs et le contrôle de l'infection ([Donaghy, Pozniak et al. 2001](#); [Almeida, Cordero et al. 2005](#)). Des travaux réalisés dans le modèle SIV/Macaque ont permis de mieux comprendre les mécanismes de cette déplétion. La perte des DCs est observée dès la phase aiguë de l'infection et celle-ci corrèle avec une augmentation de l'activation cellulaire caractérisée par une augmentation des molécules de costimulation CD80, CD86 et du récepteur au chimiokine CCR7. En parallèle l'expression des chimiokines CCL21 et CCL19 est également augmentée dans les ganglions ce qui suggère un recrutement des DCs vers les ganglions. Cependant les auteurs n'ont pas observé d'accumulation des DCs dans ce compartiment, mais une augmentation de l'expression de la caspase 8 et du CD95 suggérant une induction de la mort des DCs par apoptose ([Wijewardana, Soloff et al. 2010](#)). La déplétion des DCs au cours des infections pathologiques par les virus VIH/SIV semble donc liée à une augmentation de leur activation, de leur recrutement vers les ganglions et de leur mort par apoptose.

### a) Déplétion Via l'activation chronique

L'activation chronique des DCs au cours de l'infection par le VIH-1 peut être expliquée par plusieurs paramètres incluant i) la dérégulation de la production des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$ , et l'IFN- $\alpha$  connues pour induire la maturation des DCs ii) La circulation des produits microbiens, dont le taux augmente au cours de l'infection par le VIH-1, qui fournissent de nombreux ligands pour les PRR, hautement activateurs des DCs iii) La stimulation chronique des cellules par le virus notamment via son ARN qui active les TLR7/8 des DCs. Enfin, iv) des protéines virales qui sont aussi directement impliquées dans l'activation des DCs comme Tat ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002](#); [Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009](#)), Vpr ([Muthumani, Hwang et al. 2005](#); [Hoshino, Konishi et al. 2010](#)), Nef ([Quaranta, Tritarelli et al. 2002](#)), et gp120 ([Williams, Trout et al. 2002](#); [Fantuzzi, Purificato et al. 2004](#); [Shan, Klasse et al. 2007](#)).

### b) Déplétion Via la lyse par les cellules NK

L'augmentation de l'IL-10 au cours de l'infection par le VIH-1, est également impliquée dans l'élimination des DCs en augmentant leur sensibilité à la lyse par les NK ([Alter, Kavanagh et al. 2010](#)). En effet, les NK expriment une panoplie de récepteurs qui sont soit activateurs comme NKG2D soit inhibiteurs tel que le CMH-I. La balance de ces signaux contrôle l'activation de la lyse par les NK. Ces cellules contrôlent notamment le phénotype des DCs et régulent leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Ils éliminent les DCs immatures qui entrent dans la circulation et favorisent la migration des DCs matures, en raison des différences dans l'expression du CMH-I. Ce point de contrôle par les NK permet de favoriser l'induction de la réponse immunitaire. Cependant,

en présence d'IL-10, ce point de contrôle est dérégulé. L'IL-10 altère le phénotype des DCs. Les DCs immatures traitées à l'IL-10 acquièrent un phénotype semi-mature. Elles augmentent l'expression du CMH-I, de PD-L1 et PD-L2, ce qui leur permet de résister à la lyse par les NK. Au contraire, les DCs matures, perdent l'expression du CMH-I et augmentent l'expression des ligands activateurs de NKG2D (MIC-A et MIC-B). Ce phénotype tend à activer les NK qui vont alors détruire les DCs matures immunogènes et épargner les DCs semi-matures, tolérogènes. Ce mécanisme contribue à diminuer l'induction d'une réponse anti-virale protectrice et efficace.

### **c) Déplétion Via l'inhibition des précurseurs hématopoïétiques**

En plus de favoriser l'élimination des DCs, le VIH-1 inhibe l'hématopoïèse neutralisant ainsi la régénération de cette population cellulaire. En effet, la production des leucocytes est compromise au cours de l'infection par le VIH-1 et celle-ci n'est que partiellement restaurée avec la thérapie anti-rétrovirale hautement active (HAART). Plusieurs facteurs permettent d'expliquer ce défaut dans l'hématopoïèse comme i) la dérégulation du stroma de la moelle osseuse liée à l'infection de cellules résidentes comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les LT et les monocytes ii) des anomalies dans la production des cytokines régulatrices de l'hématopoïèse iii) une augmentation de l'apoptose des cellules souches CD34+ ([Scadden 2003](#)).

Par ailleurs, le virus est également capable de s'attaquer directement aux cellules souches hématopoïétiques (HPC) ([McNamara, Onafuwa-Nuga et al. 2013](#)), bien que ces cellules n'expriment que de faibles quantités de CD4 et des corécepteurs nécessaires à l'entrée du VIH-1. En accord avec l'infection des cellules souches, des travaux récents ont rapporté la présence d'ADN viral dans les cellules CD34 + de patients infectés par le VIH-1 ([Carter, McNamara et al. 2011](#)). Cependant, cette capacité du virus à infecter les cellules progénitrices hématopoïétiques reste controversée ([McNamara and Collins 2011](#)).

## **3. Le VIH-1 détourne les DCs pour échapper au système immunitaire**

Les DCs myéloïdes jouent un rôle majeur dans le déclenchement de la réponse antivirale. La première étape passe par la détection des agents infectieux grâce à une panoplie de récepteurs PRR membranaires et intracellulaires. Suite à cette détection elles vont démarrer leur processus de maturation et produire des cytokines pro-inflammatoires et des interférons essentiels au déclenchement de la réponse anti-virale innée et adaptative.

### **a) Echappement du VIH-1 à la reconnaissance**

L'un des premiers obstacles à l'induction d'une réponse immunitaire anti-VIH efficace est l'absence de reconnaissance du VIH-1 par les DCs myéloïdes. En effet, l'exposition des DCs myéloïdes au VIH-1 *in vitro* n'induit pas la maturation des cellules et entraîne une capacité altérée de

stimulation des LT. Plusieurs études ont confirmé l'incapacité du VIH-1 à activer les DCs *in vitro* ([Granelli-Piperno, Golebiowska et al. 2004](#); [Manel, Hogstad et al. 2010](#); [Sabado, O'Brien et al. 2010](#)). En contraste avec ces observations *in vitro*, les DCs myéloïdes isolées du sang et des tissu lymphoïde secondaires de patients infectés par le VIH-1 présentent un niveau d'activation partielle, mais ne sont pas totalement matures ([Krathwohl, Schacker et al. 2006](#); [Alter, Kavanagh et al. 2010](#); [Sabado, O'Brien et al. 2010](#)). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les DCs provenant de donneurs infectés ont été non seulement exposés au VIH-1, mais aussi à l'environnement pro-inflammatoire et immunomodulateur présent lors de l'infection au VIH-1.

Les travaux récents de Manel et ses collaborateurs suggèrent que l'échappement du VIH-1 à la reconnaissance par les DCs myéloïdes est lié à l'incapacité du virus à infecter efficacement ces cellules. Ils ont démontré que les DCs expriment un facteur de restriction qui bloque le cycle viral à une étape de pré-intégration au cours de la réverse transcription et empêche l'accomplissement d'un cycle viral productif. Cependant, si l'infection des DCs par le VIH-1 est restaurée, en apportant la protéine Vpx présente chez les virus SIV et VIH-2, ces cellules vont alors mûrir, et retrouver leur capacité à induire la prolifération des LT et inhiber le transfert du virus au LT via la production de l'IFN- $\alpha$ . Ces résultats suggèrent donc que les DCs sont donc dotés de senseurs du VIH-1, qui restent encore non identifiés. Les auteurs ont néanmoins démontré que la détection du virus nécessite l'expression du gène gag et sa liaison à une protéine cellulaire la cyclosporine A ([Manel, Hogstad et al. 2010](#)).

Par la suite les travaux réalisés dans l'équipe de M. Benkirane ont permis d'identifier le facteur de restriction exprimé par les DCs qui bloque l'infection productive de ces cellules ([Laguet, Sobhian et al. 2011](#)). Il s'agit de la protéine SAMHD1, bien connue pour son implication dans le syndrome d'Aicardi-Goutières. Le mécanisme d'action de cette protéine a également été étudié. Celle-ci déplete par hydrolyse le taux de désoxynucléosides triphosphates (dNTP) disponible dans la cellule. Cette dégradation des dNTP fait chuter leur concentration en dessous des taux nécessaires à la synthèse de l'ADN viral par transcription inverse et conduit au blocage du cycle viral ([Goldstone, Ennis-Adeniran et al. 2011](#)). D'autres virus apparentés au VIH-1 qui sont moins pathogènes comme le VIH-2 et le SIV ont développé une stratégie pour neutraliser ce facteur de restriction afin de pouvoir infecter de manière productive les DCs. Ceci est réalisé par la protéine Vpx qui neutralise SAMHD1 et conduit à sa dégradation par le protéasome ([Laguet, Sobhian et al. 2011](#)).

Ces données suggèrent donc de manière paradoxale, que l'absence d'infection des DCs par le VIH-1 semble défavorable à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice. La restauration de l'infection des DCs par le VIH-1 leur permettrait i) de détecter la présence du pathogène ; ii) d'activer leurs processus de maturation iii) de retrouver leurs capacités à activer efficacement les LT ; iv) de déclencher une réponse antivirale efficace et v) de favoriser le contrôle de l'infection comme c'est le cas au cours des infections rétrovirales moins pathogènes telles que l'infection au SIV chez son hôte naturel ou l'infection au VIH-2 chez l'homme. L'absence de reconnaissance du VIH-1 par les DCs semble donc constituer un mécanisme majeur d'échappement du VIH-1 au contrôle par le système immunitaire.

## **b) Induction d'une tolérance au VIH-1**

En plus d'échapper à la détection, le VIH-1 détourne la fonction des DCs myéloïdes afin d'instaurer un état immunosuppresseur ([Miller and Bhardwaj 2013](#)). En effet, bien que l'exposition au virus ne conduise pas à la maturation des DCs, ces cellules vont exprimer une panoplie de facteurs immunosuppresseurs dont l'IL-10 ([Granelli-Piperno, Golebiowska et al. 2004](#)), PD-L1, PD-L2 ([Rodriguez-Garcia, Porichis et al. 2011](#)) et IDO ([Zhai, Jiang et al. 2013](#)) décrits précédemment. Ce phénotype, caractéristique des DCs tolérogènes est également retrouvé *in vivo* dans les DCs de patients infectées par le VIH-1 ([Favre, Mold et al. ; Brockman, Kwon et al. 2009; Wang, Fan et al. 2010](#)). En accord avec leur phénotype immunosuppresseur les DCs exposées au VIH-1 présentent de nombreuses anomalies fonctionnelles. Il a été montré que l'exposition au VIH-1 diminue la capacité des DCs à induire la prolifération et la production des cytokines IFN- $\gamma$  et IL-2 dans une réponse allogénique ([Trautmann, Janbazian et al. 2006; Wang, Fan et al. 2010](#)).

Les DCs exposées au VIH-1 *in vitro* sont également incapables d'activer efficacement les LT naïfs. En effet, bien que les DCs matures sont capables de stimuler la prolifération et la production des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-2 et IFN- $\gamma$  par des LT naïfs allogéniques ([Shankar, Che et al.](#)), les DCs préalablement exposées au virus vont induire l'anergie des LT et générer des LT suppresseurs qui expriment une panoplie de facteurs immunosuppresseurs dont CTLA-4, PD-1, TRAIL, Lag-3, TIM-3, et CD160 ([Shankar, Che et al.](#)). Ces molécules, retrouvées généralement sur les LT régulateurs interfèrent avec l'induction d'une réponse T antivirale. Il a également été montré que les LT générés inhibent la prolifération de nouveaux LT au contact de DCs immunogènes ([Che, Sabado et al.](#)). La fonction immunosuppressive de ces LT a été associée à l'expression des facteurs de transcription BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein), Foxp3, BATF (Basic leucine zipper transcription factor ATF-like) ([Che, Sabado et al. ; Quigley, Pereyra et al. 2010](#)). D'autres travaux ont montré que les LT activées par des DCs préalablement exposées au VIH-1 vont propager l'immunosuppression en stimulant l'expression de facteurs inhibiteurs sur les DCs voisines ([Manches, Fernandez et al. 2012](#)).

Une publication portant sur l'étude des DCs différenciées à partir de monocytes isolées de patients séropositifs rapporte également une diminution de la capacité de ces cellules à induire la prolifération des LT allogéniques et un défaut de la polarisation Th1, contrairement à des MoDC de patients non infectés. Ceci a été associé à une diminution de la production de l'IL-12 et une augmentation de l'IL-10 ([Buisson, Benlahrech et al. 2009](#)).

L'ensemble de ces résultats démontre donc le rôle central de l'interaction VIH-1 – DCs dans l'affaiblissement du système immunitaire. Le VIH-1 stimule l'activation de voies immunosuppressives qui entraîne les DCs dans un état tolérogène favorisant la persistance virale plutôt que son élimination par le système immunitaire.

En conclusion, le détournement des DCs myéloïdes par le VIH-1 joue un rôle crucial dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1. En plus de favoriser la dissémination du virus au cours de la primo-infection, les DCs augmentent l'infection des LT et sont incapables de générer une réponse anti-virale protectrice principalement liée à l'absence de détection du virus et l'expression de nombreux facteurs immunosuppresseurs. Les stratégies thérapeutiques futures, visant à contrôler la

réplication du VIH-1 en l'absence des traitements antirétroviraux actuels, pourraient donc envisager de restaurer la fonction des DCs myéloïdes. Dans cet objectif, la détermination des facteurs viraux impliqués dans la stimulation des facteurs immunosuppresseurs constitue un enjeu important dans la recherche contre le SIDA. L'un des candidats potentiels étudiés au cours de cette thèse est la protéine Tat.



## III-LA PROTEINE TAT DU VIH-1

### A. Structure de Tat : du gène à la protéine

#### 1. Le gène codant Tat

Le gène codant pour la protéine Tat est organisé en deux exons localisés de part et d'autre du gène env. Le premier exon, très conservé, code pour les acides aminés (aa) 1 à 72. L'expression de ce premier exon de Tat est suffisante pour conduire à la transactivation du LTR *in vitro* ([Vives, Charneau et al. 1994](#)). Le second exon code pour la région C-terminale de la protéine.

#### 2. La protéine Tat

L'expression de la protéine Tat est réalisée très précocement après l'infection. Elle donne naissance à un polypeptide de 14kDa composé de 86 à 104 acides aminés en fonctions des isolats viraux. La forme prédominante de Tat est composée de 101 acides aminés. Cependant, une forme plus courte de la protéine (86 aa) qui se retrouve dans les virus de sous-type B, souche de laboratoire HXB2 et LAI/Bru, reste la protéine la plus utilisée en recherche ([Li, Dahiya et al. 2012](#)). A titre de comparaison, la protéine Tat du VIH-2 fait 130 aa et la Tat des SIV provenant des singes verts d'Afrique et des mandrills font 100 aa et 110 aa respectivement ([Sakai, Sakuragi et al. 1993](#)).

#### 3. Structure de la protéine Tat

Des études de dichroïsme circulaire et de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que Tat ne présente pas de conformation clairement définie. C'est une protéine de nature flexible, non structurée et intrinsèquement désordonnée ([Bayer, Kraft et al. 1995](#)), ([Shojania and O'Neil 2010](#)). La protéine Tat tire profit de cette flexibilité qui lui permet d'interagir avec différents partenaires cellulaires et d'interférer avec une vaste gamme de fonctions biologiques ([Shojania and O'Neil 2010](#)), ([Debaisieux, Rayne et al. 2012](#)).

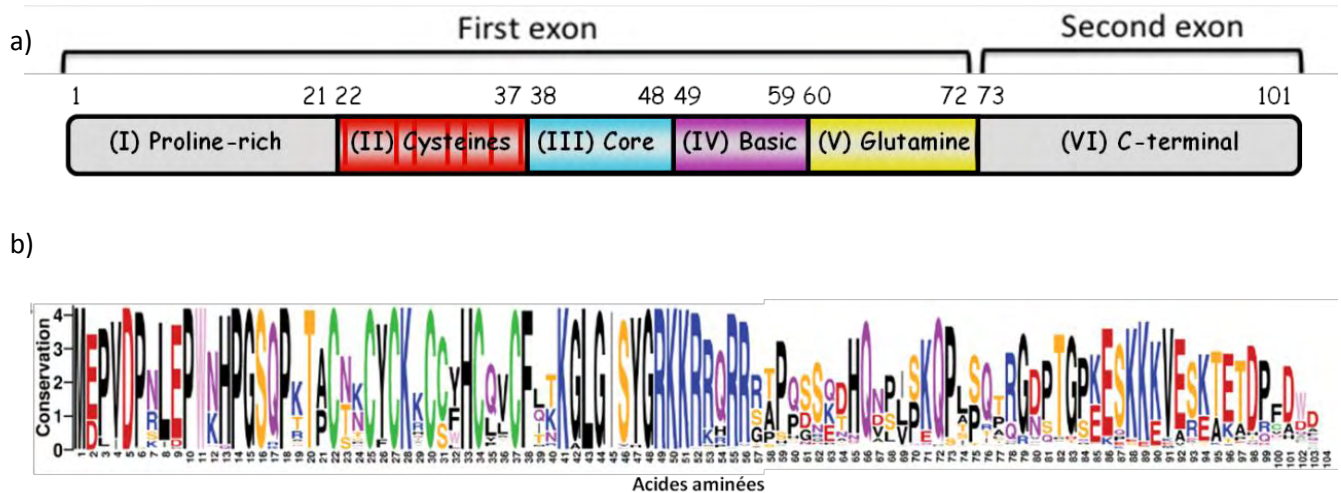


Figure 40 La protéine Tat du VIH-1. (a) Représentation schématique de la protéine Tat et ses six différents domaines d'après (Campbell and Loret 2009).

La région I (résidus 1 à 21) est riche en prolines et présente également un résidu tryptophane conservé en position 11 qui est essentiel pour le relargage de Tat par les cellules infectées et sa translocation dans le cytosol des cellules avoisinantes (Johri, Mishra et al.).

La région II (résidus 22 à 37) est riche en cystéines. Elle comporte 7 cystéines très conservées en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37. Cette séquence de Tat possède une activité « chimiokine-like » qui se fixe aux récepteurs CCR2 et CCR3, et CXCR4 et induit le recrutement des cellules cibles par chimiotactisme.

La région III (résidus 38 à 48) est riche en résidus hydrophobes (Johri, Mishra et al.).

La région IV (résidus 49 à 57) est riche en acides aminés basiques et comprend une région 49RKKRRQR56 bien conservée, essentielle pour la liaison de Tat à TAR. Ce domaine basique est requis pour la liaison et l'internalisation de Tat dans les cellules (Johri, Mishra et al.). Aussi, il contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) permettant la translocation de Tat vers le noyau (Rana and Jeang 1999).

La région V (résidus 58 à 72) est riche en résidus glutamine et est impliquée dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des cellules T (Johri, Mishra et al.).

La région VI (résidus 73 à 101) est codée par le second exon. Cette région est facultative pour la transactivation « *in vitro* » mais joue un rôle important « *in vivo* » (Campbell and Loret 2009). Cette région est relativement variable et présente pour la plupart des isolats, un motif 78RGD80 impliqué dans la liaison des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha1\beta5$  (Zocchi, Poggi et al. 1997).

(b) Séquence peptidique de Tat d'après (Debaisieux, Rayne et al. 2012).



## B-Effets extracellulaires, intracellulaires et membranaires de Tat

### 1. Sécrétion de Tat

En plus de son rôle de facteur de trans-activation dans le noyau des cellules infectées, Tat est massivement libérée dans le milieu extracellulaire. Dans le sérum des patients séropositifs on retrouve de la Tat circulante à des concentrations de 0,2 à 4 nanomolaire (nM) ([Xiao, Neuveut et al. 2000](#)). Ces concentrations sériques de Tat, ne reflètent pas la quantité réelle de protéines sécrétées et elle serait probablement plus élevée dans les ganglions lymphatiques où sont concentrées les cellules infectées par le VIH-1.

Des études *in vitro* ont permis de mieux comprendre la sécrétion de Tat. Des travaux ont montré que la sécrétion de Tat est indépendante de la voie de sécrétion classique mais Tat emprunterait une voie de sécrétion alternative, non-conventionnelle. Ce mécanisme ne nécessiterait pas la lyse de la cellule sécrétrice infectée ([Ensoli, Barillari et al. 1990](#)). Une étude plus récente a clairement montré que Tat est sécrétée directement à travers la membrane plasmique dans un mécanisme indépendant de la présence de peptide signal et de ciblage vers la voie de sécrétion classique. En fait, Tat interagirait via son domaine basique 49-RKKRRQRRR-57 avec un composant du feuillet interne de la membrane plasmique : le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate PI(4,5)P<sub>2</sub>. Cette interaction Tat-PI(4,5)P<sub>2</sub> induirait le dépliement de la protéine Tat qui va alors exposer son Tryptophane 11. Cet acide aminé hydrophobe va s'insérer dans la membrane plasmique et il s'en suit la translocation de Tat à travers la membrane pour enfin être libérée dans le domaine extracellulaire ([Rayne, Debaisieux et al.](#)).

### 2. Internalisation de Tat

La protéine Tat extracellulaire a la capacité d'être internalisée par différents types cellulaires. Plusieurs voies d'entrées de Tat ont été proposées dans la littérature incluant i) par simple diffusion à travers la membrane plasmique grâce à la propriété de son domaine basique appartenant à la famille des « Cell penetrating peptides (CPP) », également appelé « Protein transduction domain (PTD) » de Tat ([Zhang and Wang 2012](#)); ii) par endocytose ([Zhang and Wang 2012](#)), ([Johri, Mishra et al.](#) ; [Debaisieux, Rayne et al. 2012](#)). Cependant, le mécanisme précis d'internalisation de Tat est toujours débattu ([Zhang and Wang 2012](#)).

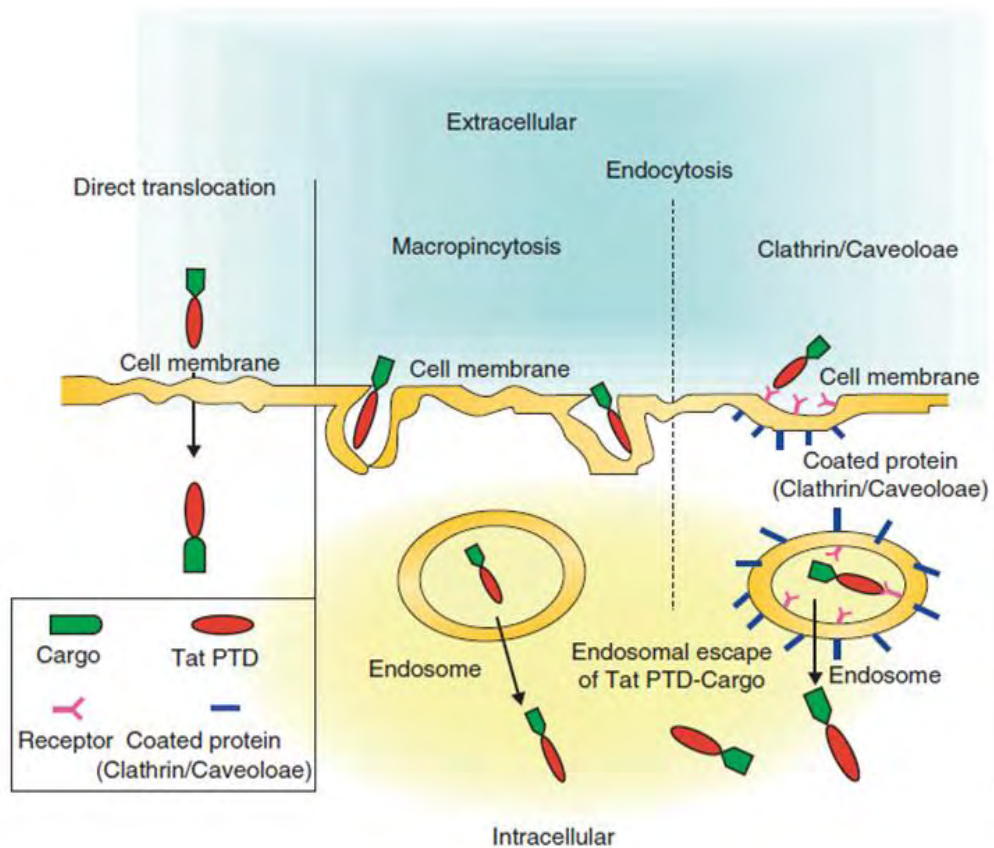


Figure 41 Les différentes voies d'internalisation de Tat et de son domaine PTD décrites dans la littérature (translocation directe à travers la membrane plasmique, endocytose dépendante de la macropinocytose, dépendante de la cavéoline ou de puits recouverts de clathrine, suivit de l'échappement de l'endosome pour atteindre le cytosol). D'après Zang and Wang 2012.

Une fois internalisée dans le cytoplasme, Tat peut interagir avec de nombreux partenaires moléculaires et interférer avec leurs fonctions au sein de la cellule. Tat peut également cibler le noyau grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS) présente dans son domaine basique ([Rana and Jeang 1999](#)). Dans le noyau Tat va reprogrammer l'expression des gènes en stimulant l'expression des gènes du VIH-1, en réactivant des virus latents et en modulant l'expression de gènes cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire, et la survie cellulaire dont une liste non exhaustive est présentée dans le tableau suivant ([Huigen, Kamp et al. 2004](#)).

Tableau 3 Les effets de la protéine Tat sur l'expression des gènes cellulaires autologues et hétérologues.

D'après (Huigen, Kamp et al. 2004).

Gene	Up/down regulation
TGF (Tumor necrosis factor)	up
IL-2 (Interleukin-2)	up
IL-2 (Interleukin-2)	down
IL-6 (Interleukin-6)	up
TGF (Transforming growth factor)	up
IL-8 (Interleukin-8)	up
IL-10 (Interleukin-10)	up
Adhesion molecules	up
Fibronectin	up
Collagen type I and II	up
CD95 ligand	up
Bcl-2, proto-oncogene	up
p53, tumour-suppressor gene	down
MnSOD	down
Interleukin-12	down
MHC class I	down
MHC class I	up
MHC class II	down
Human papilloma virus	up
Human cytomegalo virus	up
JC virus	up

### 3. Tat se fixe à des récepteurs membranaires

Tat peut également agir à la surface des cellules qu'elle rencontre en interagissant avec un grand nombre de partenaires moléculaires. Ces interactions vont permettre à Tat de cibler la voie endosomale afin de pénétrer dans la cellule, ou encore d'activer des voies de signalisations qui vont conduire à une réponse cellulaire souvent bénéfique pour le virus et néfastes pour les cellules du système immunitaire et du système nerveux central.

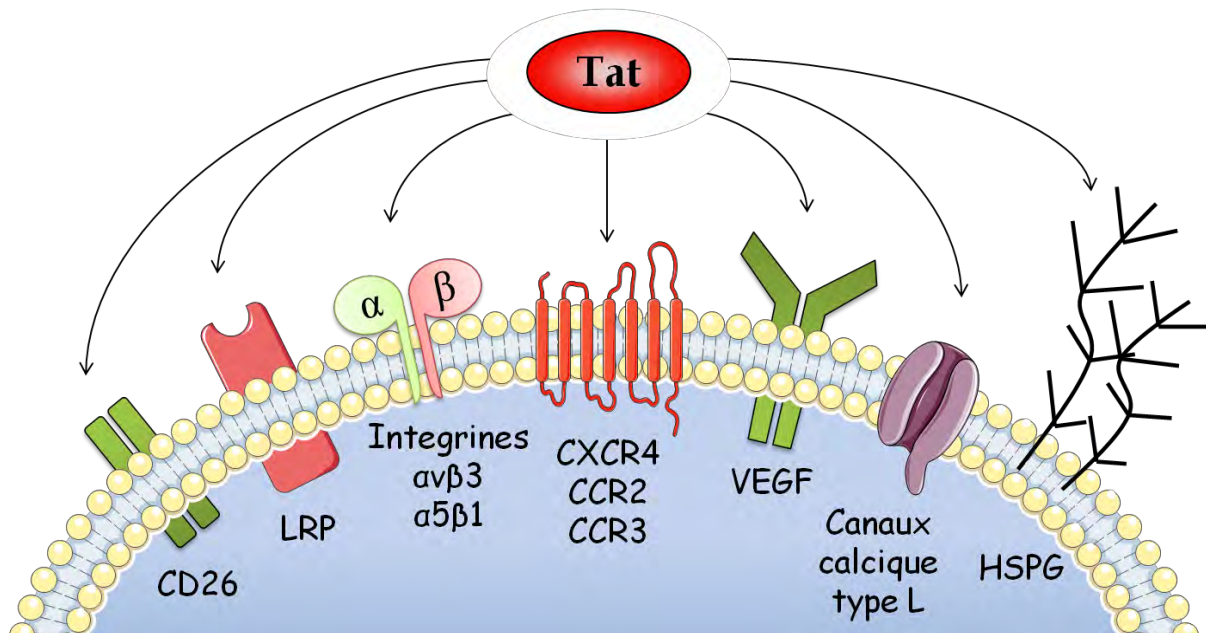


Figure 42 La protéine Tat et ses différents récepteurs membranaires.

Tat se lie au CD26, une glycoprotéine transmembranaire doté d'une activité exopeptidase qui est impliquée dans l'activation des LT. Cette interaction est médiée par le domaine N-terminal de Tat aa 1-9 et conduit à l'inhibition de la prolifération des LT, probablement via l'inhibition de la production de l'IL-2 ([Gutheil, Subramanyam et al. 1994](#)).

Tat possède un domaine riche en cystéine en N-terminal qui est doté d'une activité « chimiokine-like ». Ce domaine 24-51 interagit avec les récepteurs CCR2 et CCR3, et compète avec la fixation de leurs ligands naturels MCP-1, MCP-3, eotaxin. La fixation de Tat sur ces récepteurs va attirer les monocytes et macrophages par chimiotactisme. Ainsi, il a été proposé que Tat recrute et active les monocytes et macrophages sur le site de l'infection afin d'apporter de nouvelles cibles cellulaires pour l'infection au VIH ([Albini, Ferrini et al. 1998](#)). D'autres travaux ont également montré que Tat interagit avec le récepteur aux chimiokines CXCR4. Cette interaction semble impliquée dans la régulation des virus CCR5 tropiques ([Xiao, Neuveut et al. 2000](#)).

La séquence Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) de Tat présente dans la région C-terminale de certains isolats du VIH lui permet d'interagir avec les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha 5 \beta 1$ . Cette interaction est impliquée dans la capacité de Tat à inhiber la phagocytose des corps apoptotiques par les DCs ([Zocchi, Rubartelli et al. 1998](#)), et a induire l'activation des cellules endothéliales et l'angiogénèse ([Urbinati, Mitola et al. 2005](#)).

Tat se fixe aux deux isoformes du « vascular endothelial growth factor receptor » (VEGFR) : Le VEGFR-1 également appelé « fms-like tyrosine kinase » (Flt-1) ([Mitola, Sozzani et al. 1997](#)) et le VEGFR-2 « kinase domaine receptor » également nommé (Flk-1/KDR) ([Morini, Benelli et al. 2000](#)). Cet effet de Tat est impliqué dans l'activation des cellules endothéliales, l'induction de l'angiogénèse et le recrutement des monocytes par chimiotactisme.

Une étude à montré que Tat, via son domaine core, détourne le récepteur "low density lipoprotein receptor" (LRP), présent à la surface des neurones afin de pénétrer dans ces cellules. Cette interaction Tat-LRP pourrait être impliquée dans les troubles neurologiques associés à l'infection par le VIH-1 ([Liu, Jones et al. 2000](#)).

Tat se fixe aux HSPG, présents à la membrane de nombreux types cellulaires et constituants de la matrice extracellulaire. Cette interaction a lieu via les résidus de charges positives de son domaine basique et permet l'internalisation de Tat ([Tyagi, Rusnati et al. 2001](#)). D'autres études proposent un modèle où les Héparanes sulfates agiraient comme des co-récepteurs pour Tat. Ainsi Tat fixerait les HSPG dans un premier temps avant de rencontrer un récepteur spécifique lui permettant d'activer une signalisation intracellulaire et de pénétrer dans la cellule cible ([Liu, Jones et al. 2000](#)).

Il a été proposé une interaction entre Tat et les canaux calciques de type L présent à la surface des NK afin d'expliquer la capacité de Tat à inhiber la fonction cytotoxique des NK associée à une inhibition de l'influx de calcium. Ces canaux étant également exprimé à la surface des DC et LB, Tat pourrait contribuer à bloquer un certains nombre de réponse immune calcium dépendante dans ces types cellulaires ([Zocchi, Rubartelli et al. 1998](#)).

## C-Propriétés immuno-modulatrices de Tat

De nombreux travaux se sont intéressés aux propriétés immuno-modulatrices de Tat. Les résultats obtenus mettent en évidence des propriétés adjuvantes, activatrices ou encore des effets immunosuppresseurs néfastes pour la réponse immunitaire anti-VIH.

### 1. Propriétés immunosuppressives de Tat

#### a) Tat inhibe la prolifération des lymphocytes T

Une des caractéristiques du VIH-1 est sa capacité à inhiber la prolifération des LT *in vitro*. De manière intéressante, la prolifération peut être restaurée en présence d'anticorps anti-Tat, suggérant que Tat possède une activité immunosuppressive ([Zagury, Lachgar et al. 1998](#)). En effet, la protéine Tat, ajoutée sous forme soluble à des cultures de PBMC de donneurs sains, inhibe la prolifération des LT en réponse à la toxine tétanique (TT) ou aux antigènes de *candida albicans* ([Viscidi, Mayur et al. 1989](#)). Des résultats similaires ont été obtenus avec une protéine Tat recombinante ou des peptides synthétiques de Tat ([Viscidi, Mayur et al. 1989](#); [Chirmule, Than et al. 1995](#)). Plusieurs équipes ont tenté de déterminer le mécanisme d'action de Tat. Différents modes d'action ont été proposés incluant i) une inhibition de la production de l'IL-2 ([Chirmule, Than et al. 1995](#)), une cytokine essentielle à la prolifération des LT ; ii) une interférence avec le récepteur CD26 ([Subramanyam, Gutheil et al. 1993](#)) ; iii) une modulation de l'expression du système Fas/Fas-ligand sur les LT ([Li, Friedman et al. 1995](#); [Purvis, Jacobberger et al. 1995](#); [Westendorp, Frank et al. 1995](#)) et les CPA ([Cohen, Li et al. 1999](#)). Tat semble donc inhiber la réponse T via différents mécanismes mais l'ensemble de ces études s'accordent pour montrer que Tat agit en inhibant la synthèse d'une cytokine clé dans la prolifération lymphocytaire l'IL-2 ([Subramanyam, Gutheil et al. 1993](#); [Chirmule, Than et al. 1995](#); [Cohen, Li et al. 1999](#)).

#### b) Tat inhibe l'autophagie

L'autophagie est un des mécanismes de défense cellulaire contre les infections virales. Le VIH-1 est capable d'échapper à la dégradation autophagique grâce à l'action de deux protéines accessoires Tat et Nef. La protéine Tat agit en dérégulant les voies de signalisation essentielles à l'activation du processus autophagique dans le macrophage. En effet, une étude a montré que Tat inhibe l'autophagie induite par l'IFN- $\gamma$  et ceci en bloquant la transduction du signal qui passe par la phosphorylation de STAT-1 ([Li, Au et al. 2011](#)). Une autre étude a montré que Tat inhibe l'autophagie induite par l'interaction CD40-CD40L via l'activation des voies de signalisations Src-Akt et STAT3 et via l'induction de l'IL-10 ([Van Grol, Subauste et al. 2010](#)). La protéine Nef quand à elle, n'inhibe pas l'induction de l'autophagie mais elle agit en bloquant la maturation de l'autophagosome. En effet, Nef se lie à la protéine Beclin 1 (mammalian Atg6), un régulateur

important de la fusion phagosome lysosome afin d'empêcher la dégradation du VIH-1 par les hydrolases lysosomales ([Dinkins, Arko-Mensah et al. 2010](#)).

### **c) Tat induit l'expression de facteurs immunosuppresseurs**

Une autre stratégie mise en jeu par la protéine Tat pour favoriser l'échappement du VIH-1 au système immunitaire est sa capacité à stimuler l'expression de nombreux facteurs immunosuppresseurs.

De nombreux travaux ont montré que Tat induit la production de la cytokine immunosuppressive IL-10 par les monocytes, les macrophages et les DCs humains. L'analyse du mécanisme d'action de Tat a permis de mettre en évidence l'implication des voies des protéines kinases C (PKC) et plus particulièrement des isoformes PKC  $\beta$ II et  $\delta$  ([Bennasser and Bahraoui 2002](#)), des MAP Kinases ERK 1/2 et p38 ([Leghmari, Bennasser et al. 2008](#)) et de la voie NF- $\kappa$ B classique et alternative ([Leghmari, Bennasser et al. 2008](#)). D'autres équipes ont également démontré l'implication de la voie PKR et des facteurs de transcriptions CREB-1, Sp1, Ets-1, et de la voie calcique dans la synthèse d'IL-10 induite par Tat ([Li, Yim et al. ; Li, Lee et al. 2005](#); [Gee, Angel et al. 2006](#); [Gee, Angel et al. 2007](#); [Li and Lau 2007](#); [Wong, Campbell et al. 2010](#)). En stimulant la production de l'IL-10, Tat pourrait contribuer à supprimer les fonctions des cellules immunitaires afin de favoriser la persistance virale. En plus de l'IL-10 Tat induit la production du TGF- $\beta$  une autre cytokine immunosuppressive.

Il a été démontré que la protéine Tat du VIH-1 est capable d'induire l'expression deIDO dans de nombreux types cellulaires. C'est le cas dans les macrophages ([Smith, Guillemin et al. 2001](#)), les DCs ([Samikkannu, Rao et al.](#)) et les astrocytes primaires humains ([Samikkannu, Saied et al. 2009](#)). L'utilisation du modèle murin a permis de mettre en évidence l'induction deIDO par Tat *in vivo* au niveau du système nerveux central ([Lawson, Kelley et al.](#)) ainsi que dans des cellules hippocampiques de souris en culture, via la voie MAPK P38 ([Fu, Lawson et al.](#)). Cette activation deIDO est en accord avec une diminution sérique du tryptophane observée dans un modèle de souris transgénique exprimant Tat ([Liao, Tan et al.](#)). L'induction deIDO par Tat dans le système nerveux central est associée au développement de troubles neurologiques via la production de la kynurenine, un composé neurotoxique, et via la déplétion du L-tryptophane, un précurseur des neurotransmetteurs comme la sérotonine et la mélatonine. En accord avec ces résultats, la protéine Tat est retrouvée dans le système nerveux central chez les patients séropositifs pour le VIH-1 atteints de démence et dans le modèle murin, l'administration de Tat en intracérébral est associée au développement de comportements « dépressif-like » ([Fu, Lawson et al. ; Lawson, Kelley et al.](#)).

Au cours de ma thèse nous avons émis l'hypothèse que Tat module positivement l'expression de PD-L1 sur les DCs myéloïdes. Cette hypothèse est soutenue par les observations suivantes :

- Au cours de l'infection par le VIH-1 chez l'homme ou par le SIV dans le modèle macaque, on observe une augmentation importante de l'expression de PD-L1 par les cellules infectées mais également par les cellules non infectées incluant les monocytes et les DCs myéloïdes ([Trabattoni, Saresella et al. 2003](#)), ([Wang, Zhang et al. 2008](#)), ([Wang, Fan et al. 2010](#)), ([Xu, Wang et al. 2010](#)). Ces résultats

suggèrent qu'un facteur viral sécrété agit sur ces populations cellulaires pour stimuler l'expression de PD-L1.

- La protéine Tat a été décrite pour avoir une activité immunosuppressive en induisant l'expression de nombreux facteurs inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes T tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et IDO ([Romani, Engelbrecht et al. ; Boasso and Shearer 2007](#)).

- Les voies de signalisations NF- $\kappa$ B et PI3k/Akt sont essentielles dans l'expression de PD-L1 ([Barach, Lee et al. 2010](#)) et plusieurs travaux rapportent une activation de ces voies par Tat ([Deregibus, Cantaluppi et al. 2002; Leghmari, Bennasser et al. 2008](#)).

- Parmi les cytokines induites par Tat le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\alpha$  ([Boasso, Hardy et al. 2008](#)) et l'IL-10 ([Rodriguez-Garcia, Porichis et al. 2011](#)) sont impliquées dans l'augmentation de PD-L1 chez les patients infectés par le VIH-1.

- De plus une étude récente publiée au cours de ma thèse a montré que Tat augmente l'expression de PD-L1 (B7-H1) dans une lignée de cellules endothéliales ECV304 transfectée par un plasmide codant Tat. Ces cellules exprimant PD-L1 sont également capables d'inhiber la prolifération de PBMC dans un système de coculture ([Shi, Qin et al. 2011](#)).

Ainsi Tat pourrait contribuer à augmenter l'expression de PD-L1 via la production de cytokines, en activant des voies de signalisations essentielles à l'expression de PD-L1 ou en intracellulaire via son activité trans-activatrice.

#### **d) Tat interfère avec la réponse immunitaire antivirale *in vivo***

Une des observations les plus significatives de l'effet immunosuppressif de Tat est sa capacité à inhiber la réponse antigène spécifique *in vivo*. En effet, dans des protocoles d'immunisations réalisés chez la souris il a été montré que l'immunisation contre les antigènes du VIH-1 (p24, ou gp120) induit une réponse humorale et cellulaire, et peut même inhiber l'infection après challenge avec un virus vaccinia-*env* ([Agwale, Shata et al. 2002](#)). Par contre, la co-administration de ces antigènes avec Tat sous forme protéique ou plasmidique neutralise cette réponse. Ainsi, Tat inhibe la production d'anticorps anti-p24 ([Cohen, Li et al. 1999](#)) et elle bloque la réponse anti-gp120 dans des tests vaccinaux chez la souris ([Agwale, Shata et al. 2002](#)). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par Gupta et al où les auteurs ont montré que Tat agit via l'induction de l'IL-10 ([Gupta, Boppana et al. 2008](#)).

## 2. Tat : un activateur du système immunitaire

### a) Tat stimule la production de cytokines pro-inflammatoires

Tat simule la production de l'IL-1 $\beta$  une cytokine clé dans le déclenchement de la réponse inflammatoire. Récemment, le mécanisme d'action de Tat a été caractérisé et il a été montré que Tat induit l'IL-1 $\beta$  à travers l'activation des voies PLC, PKC, et la voie des MAP kinase p42/p44 et c-Jun N-terminal kinase (JNK) ([Yang, Wu et al. 2010](#)).

L'augmentation de l'expression de l'IL-6 induite par Tat est associée à deux mécanismes majeurs. Tout d'abord, Tat augmente la transcription de l'IL-6 en trans-activant le promoteur de l'IL-6 via son interaction avec une séquence « TAR-like » dans l'ARNm de l'IL-6 ([Scala, Ruocco et al. 1994](#)). Enfin, Tat active des voies de signalisations essentielles pour l'expression de l'IL-6 incluant la voie PKC, PKR, MAPK, et NF- $\kappa$ B ([Zidovetzki, Wang et al. 1998](#); [Li, Lee et al. 2005](#)).

La protéine Tat induit la production de TNF- $\alpha$  principalement chez le monocyte, le macrophage, la DC et les cellules microgliales. Le mécanisme moléculaire sous jacent a montré que Tat agit au niveau membranaire afin d'activer une cascade de signalisation pour conduire à la production du TNF- $\alpha$  cette signalisation induite par Tat passe par l'activation de la voie PKC (mais indépendant des PKC- $\beta$ II et PKC- $\delta$ ) ([Bennasser, Badou et al. 2002](#); [Leghmari, Bennasser et al. 2008](#); [Leghmari, Contreras et al. 2008](#)), de la voie PKR ([Li, Lee et al. 2005](#)), de la voie MAP kinases ERK1/2 ([Leghmari, Contreras et al. 2008](#)), de la voie calcique ([Mayne, Holden et al. 2000](#); [Contreras, Bennasser et al. 2003](#); [Contreras, Bennasser et al. 2005](#); [Campbell, Watkins et al. 2007](#)), et des voie NF- $\kappa$ B classique et alternative ([Leghmari, Bennasser et al. 2008](#)).

### b) Tat induit la production de chimiokines

En plus de stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires Tat contribue à instaurer un état pro-inflammatoire via la production de nombreuses chimiokines, qui sont impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité. En effet, Tat augmente l'expression et la libération de la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1) aussi appelé CCL2, dans les astrocytes et la ligné U937 ([Conant, Garzino-Demo et al. 1998](#)). En plus de CCL2, des études basées sur l'utilisation de souris transgéniques pour Tat ont montré que Tat induit la production d'une vaste gamme de chimiokines incluant CCL3, MIP-1 alpha (protéine inflammatoire des macrophages-1alpha), CCL4 (MIP-1 bêta), CCL5 (RANTES), CXCL2 (MIP-2), CXCL10 ou IP-10 (protéine qui induit-10), XCL1 (lymphotactin / C motif-1alpha/activation-induced unique, dérivé des cellules T et des chimiokines liées cytokine) ([Kim, Liu et al. 2004](#)). D'autres équipes ont montrés que Tat induit l'IL-8, IP-10 ([Kutsch, Oh et al. 2000](#)) ou encore CXCL-16 ([Landro, Damas et al. 2009](#)). La production des chimiokines est fortement dérégulée au cours de l'infection par le VIH-1. Elles jouent un rôle important dans la régulation du VIH-1. Certaines chimiokines stimulent la réplication virales tandis que d'autres l'inhibent et favorisent la latence et la formation de réservoirs viraux ([Evans, Khoury et al. 2012](#)). Cette production dérégulée des chimiokines est également associée au



développement de troubles neurologiques comme la démence liée au VIH-1. En effet, des taux importants de chimiokines se retrouvent dans le liquide céphalo-rachidien de patients VIH+ atteint de démence ([Conant, Garzino-Demo et al. 1998](#)) et de manière intéressante, cette production dérégulée des chimiokines est associée à un taux élevé de Tat.

### **c) Tat induit la maturation des cellules dendritiques**

Dans la littérature une controverse persiste au sujet de l'effet de la protéine Tat sur les fonctions des DCs. Principalement, les travaux de l'équipe du professeur Ensoli ont montré que Tat induit la maturation des DCs. Cette maturation passe par une augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80, CD83 et CD86, des CMH-I, CMH-II et semble liée à la capacité de Tat à induire la production du TNF- $\alpha$  ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009](#)). En plus d'induire la maturation des DCs, Tat stimule la production des cytokines pro-Th1 TNF- $\alpha$ , IL-12 et des  $\beta$ -chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES ; augmente la capacité des DC à faire proliférer les lymphocytes du sang périphérique (PBL) dans une réponse allogénique et antigène spécifique (anti-TT) ; et oriente la réponse immune des LT vers un profil Th1. Ces résultats ont été rapportés *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez le singe *cynomolgus* ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009](#)).

Ces travaux sont en apparence contradiction avec les travaux de Izmailova et al qui ont montré que Tat n'induit pas la maturation des DCs ni la production de cytokines pro-inflammatoires mais augmente la production des chemo-attractants pour les LT activée (IP-10, HuMIG) et les monocytes (MCP-2 et MCP-3) ([Izmailova, Bertley et al. 2003](#)). En contradiction également avec d'autres études qui ont observé un effet immunosuppresseur de Tat incluant une inhibition de la production de la cytokine pro-Th1 IL-12 par les DCs ([Poggi, Rubartelli et al. 1998](#)), une inhibition de la prolifération des LT *in vitro* et *in vivo* ([Viscidi, Mayur et al. 1989](#); [Zaqury, Lachgar et al. 1998](#); [Cohen, Li et al. 1999](#)), une inhibition la polarisation Th1 au profit d'une polarisation Th2 ([Gupta, Boppana et al. 2008](#)) et une stimulation de l'expression des facteurs immunosuppresseurs IL-10 ([Badou, Bennasser et al. 2000](#); [Gee, Angel et al. 2006](#); [Wong, Campbell et al. 2010](#)), et IDO ([Samikkannu, Rao et al.](#)). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'effet de Tat sur la modulation de la fonction des DCs est complexe et encore mal compris.

### **d) Propriétés adjuvantes de Tat**

Tenant compte des différents résultats de la littérature concernant l'effet immunomodulateur de Tat, nous pouvons nous demander quelles sont les propriétés adjuvantes de Tat *in vivo* ? Une étude menée chez la souris a montré que Tat possède une propriété auto-adjuvante intrinsèque. En effet, l'administration sous-cutané de Tat en absence d'adjuvant stimule la réponse B et la réponse T anti-Tat. Cette propriété auto-adjuvante de Tat implique deux régions essentielles de la protéine : le domaine 22-37 riche en cystéine et la région core riche en aa hydrophobes et chargés. Le mécanisme moléculaire associé suggère que cette propriété auto-adjuvante de Tat est indépendante de sa capacité transactivatrice mais semble lié à sa capacité à former des oligomères via la cystéine en position 34 ([Kittiworakarn, Lecoq et al. 2006](#)).

Les travaux du groupe Ensoli ont également montré que Tat possède une propriété adjuvante intrinsèque. En ciblant les CPA professionnelles Tat améliore leurs fonctions de présentation, favorise l'activation lymphocytaire et oriente la réponse immune vers un profil Th1 (Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009). En accord avec ces résultats, certains travaux suggèrent que Tat possède un effet adjuvant pro-Th1 (Cui, Patel et al. 2004; Kulkarni, Ravi et al. 2005; Mascarell, Bauche et al. 2006). Cependant, les derniers travaux du groupe, basées sur des études d'immunisation par Tat chez l'homme ont montré que Tat active la réponse Th1 mais également la réponse Th2 et T régulatrices suggérant que les propriétés immunomodulatrices de Tat *in vivo* sont complexes et encore mal connues. De plus, ces propriétés adjuvantes de Tat contrastent une fois encore avec les nombreux travaux ayant observés un effet inhibiteur, immunosuppresseur de Tat *in vivo* (Cohen, Li et al. 1999; Aqwale, Shata et al. 2002; Gupta, Boppana et al. 2008).

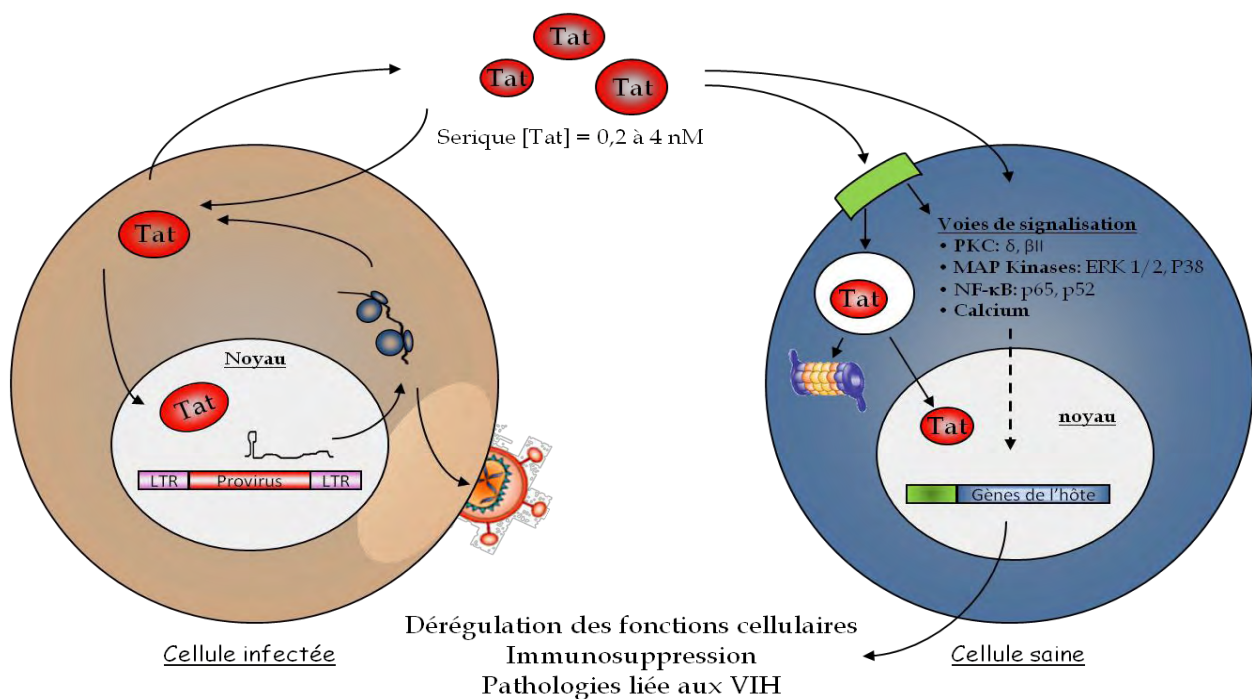


Figure 43 Effets extracellulaires et intracellulaires de Tat.

Dans les cellules infectées par le VIH-1 la protéine Tat stimule la réplication virale en assurant la *trans*-activation des gènes viraux. Tat est également sécrétée par les cellules infectées et elle se retrouve à des concentrations de l'ordre du nano-molaire dans le sérum des patients. Dans le milieu extracellulaire, Tat interagit avec les cellules infectées et non-infectées. Elle peut être internalisée par les cellules infectées afin de stimuler la réplication virale ainsi que par les cellules non-infectées et moduler l'expression de gènes cellulaires ou viraux (non VIH). Tat peut également agir à la surface cellulaire en interagissant avec différents récepteurs. Elle stimule également l'activation de nombreuses voies de signalisation incluant la voie PKC, MAPKinase, NF-κB et la voie calcique. L'activation de ces voies conduit à de nombreux effets comme l'induction de l'apoptose, la modulation de la production de cytokine et l'expression de récepteurs membranaires. Ainsi, la protéine Tat est impliquée dans la dérégulation des fonctions cellulaires, la pathogénèse et l'immunosuppression. (Modifié d'après le livre Handbook of macrophages : Life Cycle, Functions and diseases, chapitre 7, Planès et al.).

## D-Tat une cible thérapeutique

Parmi les différentes protéines du VIH-1, la protéine Tat est une cible de choix pour l'élaboration d'un vaccin anti-VIH. En effet, 1) C'est une protéine précoce produite très rapidement après l'entrée du virus dans sa cellule cible ; 2) Elle est extrêmement conservée à travers les différents isolats du VIH ; 3) Elle est essentielle à l'accomplissement d'un cycle viral productif ; 4) Elle joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1.

L'ensemble de ces propriétés font de Tat un candidat de choix pour l'élaboration d'un vaccin contre le SIDA. La neutralisation de Tat ne bloque pas l'entrée du virus mais pourrait neutraliser sa réplication, et la progression de la maladie vers le stade SIDA. Diverses approches vaccinales basées sur la protéine Tat ont été ou sont en cours de développement. Cependant l'histoire de ces approches vaccinales a conduit à des résultats parfois contradictoires et largement controversés dans la communauté scientifique.

Les premières études basées sur l'utilisation d'un vaccin à base de la protéine Tat ont donné des résultats encourageants. Les travaux dirigés par l'équipe du Pr Ensoli notamment ont montré que l'administration de la protéine Tat du VIH-1 de sous-type B à des singes macaques rhésus ou cynomolgus conduit à l'apparition d'une réponse humorale et cellulaire anti-Tat spécifique. Cette réponse est associée à une protection des animaux contre la maladie après un challenge avec un virus SHIV89.6P qui est hautement pathogène chez les animaux non-vaccinés ([Cafaro, Caputo et al. 1999](#); [Ensoli and Cafaro 2000](#); [Borsetti, Baroncelli et al. 2009](#)). Cependant, d'autres travaux utilisant des protocoles similaires n'ont observé qu'une protection partielle ([Pauza, Trivedi et al. 2000](#)) ou une absence totale de protection ([Allen, Mortara et al. 2002](#); [Silvera, Richardson et al. 2002](#)). Par ailleurs, d'autres travaux prometteurs proposent une préparation vaccinales composée d'une association de différentes protéines virales incluant la protéine Tat ([Gavioli, Cellini et al. 2008](#); [Ferrantelli, Maggiorella et al. 2011](#); [Lichterfeld, Gandhi et al. 2012](#)).

Malgré ces débuts controversés, le vaccin anti-Tat est aujourd'hui en cours de développement. Récemment l'équipe du Pr Loret a développé un vaccin anti-Tat compatible avec une administration à l'homme. L'originalité de ce vaccin réside dans l'utilisation d'une protéine Tat synthétique non toxique, provenant du virus VIH-1 Oyi. Ce virus, isolé d'une cohorte de patients qui reste séronégative malgré une exposition certaine au virus VIH « highly exposed persistently seronegative (HEPS) », diffère des autres souches du VIH par sa protéine Tat qui semble inactive en transactivation ([Watkins, Lancelot et al. 2006](#)).

Concernant le vaccin anti-Tat de Ensoli, des essais cliniques de phase I et II ont été entrepris chez l'homme. Ils ont démontré la sûreté et l'immunogénicité de la protéine Tat chez des sujets non infectés et séropositifs pour le VIH-1 ([Ensoli, Fiorelli et al. 2009](#); [Ensoli, Bellino et al. 2010](#)). Cependant à l'heure actuelle aucune étude de phase clinique III/IV démontrant l'efficacité d'un vaccin anti-VIH basée sur la protéine Tat n'a été rapportée.



## Problématique

La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par le VIH-1 afin d'échapper au système immunitaire et d'assurer sa persistance constitue un enjeu majeur dans la recherche contre le SIDA. Dans ce contexte, la thématique de mon laboratoire d'accueil s'intéresse au rôle de la protéine Tat du VIH-1 dans la dérégulation des mécanismes immunitaires et l'établissement d'un état immunosuppresseur. Au laboratoire, il a été montré que Tat induit la production de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  par les monocytes et les macrophages humains. L'analyse des voies de signalisation activées par Tat a permis de mettre en évidence l'implication des voies des protéines kinases C (PKC) et plus particulièrement des isoformes PKC  $\beta$ II et  $\delta$  (Bennasser and Bahraoui, 2002), des MAP Kinases ERK 1/2 et p38 (Leghmari et al., 2008b) et de la voie NF- $\kappa$ B (Leghmari et al., 2008a). Ces différentes voies de signalisation sont activées par la protéine Tat entière mais également par le fragment N-terminal 1-45 de Tat. Ce fragment actif 1-45 est dépourvu du domaine basique responsable de l'internalisation de la protéine, démontrant ainsi que Tat exerce son action au niveau membranaire. Ceci a conduit l'équipe à s'intéresser au récepteur membranaire de Tat.

Des résultats récents obtenus au laboratoire au cours de ma thèse (travaux de Ben Haij et al.) ont permis de mettre en évidence le rôle potentiel du TLR4 comme récepteur de la protéine Tat. En effet, la synthèse d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes humains stimulés par Tat est abolie en présence d'anticorps anti-TLR4 bloquants. En accord avec ces résultats, il a été montré que Tat est capable de co-précipiter avec le complexe TLR4/MD2 et le cofacteur MD2 seul. Cette interaction a également été caractérisée par des tests de binding direct entre Tat et le complexe TLR4/MD2 démontrant une interaction de forte affinité ( $K_{0,5} \approx 10^{-9}$  M).

Sachant que le TLR4 est un récepteur essentiel de l'immunité innée, impliqué dans l'activation/la régulation de la réponse immunitaire et que celui-ci est largement détourné par les pathogènes afin d'échapper au système immunitaire, il n'est donc pas exclu que Tat, via son interaction avec le TLR4, puisse interférer avec le fonctionnement normal du système immunitaire et contribuer à la persistance du VIH-1.



## Objectifs de cette étude

Mon projet de thèse qui s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire peut être divisé en deux objectifs majeurs :

### **I) Caractérisation du rôle du TLR4 comme récepteur de Tat.**

En utilisant une approche basée sur l'utilisation de modèles murins invalidés (KO) pour le TLR4 et/ou ses partenaires moléculaires nous étudierons : i) le rôle du TLR4 comme récepteur de Tat ii) l'implication des cofacteurs CD14 et MD2 et iii) les voies de signalisations activées par Tat en aval du TLR4 : MyD88 dépendante et TRAM dépendante.

### **II) Effets de la protéine Tat sur la modulation de la fonction des cellules dendritiques.**

Tenant compte du fait que les DCs expriment également le TLR4 et qu'elles jouent un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire et la persistance virale nous essayerons de comprendre dans cette partie les effets de la protéine Tat et de son interaction avec le TLR4 sur la modulation de la fonction des DCs incluant : i) le profil des cytokines produites, ii) l'expression des facteurs immunosuppresseurs PD-L1 et IDO et iii) la capacité à activer/inhiber les lymphocytes T.





# Résultats : article 1 *(Ben haij et al., Retrovirology, 2013)*

---

## La protéine Tat du VIH-1 active la voie TLR4/MD2 pour induire la production d'IL-10 et de TNF- $\alpha$

L'infection par le VIH provoque un affaiblissement du système immunitaire étroitement corrélé à une dérégulation du réseau de cytokines. Une des protéines du VIH-1 impliquée dans cette dérégulation est la protéine Tat. En plus de son action directe dans la transactivation du génome viral, elle stimule la production d'IL-10 et de TNF- $\alpha$ , deux cytokines qui jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'infection.

Les travaux précédents du laboratoire ont montré que Tat induit la production d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes humains (Badou et al., 2000; Leghmari et al., 2008b). L'analyse des voies de signalisation activées par Tat a permis de mettre en évidence l'implication des voies des protéines kinases C (PKC), des MAPKinase p38 et de la voie NF- $\kappa$ B. Ces différentes voies de signalisations sont activées par la protéine Tat entière mais aussi par le mutant de délétion Tat 1-45 dépourvu du domaine basique responsable de son internalisation, démontrant ainsi que Tat exerce son action au niveau membranaire. Ceci a conduit l'équipe à s'intéresser au récepteur membranaire de Tat et à proposer le « Toll like receptor 4 » (TLR4) comme candidat potentiel.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle du TLR4 comme récepteur de la protéine Tat du VIH-1. Dans cet objectif, quatre approches complémentaires ont été utilisées :

- Une approche biochimique nous a permis de montrer que Tat, par son domaine 1-45, interagit avec TLR4/MD-2, et MD-2 seul, avec une haute affinité alors qu'aucune interaction n'est observée entre Tat et CD14.
- Par microscopie confocale nous avons montré une colocalisation membranaire entre le TLR4 et la protéine Tat.
- L'utilisation d'anticorps bloquant nous a permis de montrer que les anticorps anti-TLR4 sont capables de bloquer la production de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  induite par Tat.
- Enfin, une approche basée sur l'utilisation de modèles murins invalidés pour le TLR4 ou pour d'autres cofacteurs de cette voie dont MD2 et CD14, nous a permis de confirmer le rôle central du TLR4 dans la transduction des signaux conduisant à l'induction de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  par Tat *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de souris KO pour le CD14 et MD2 a révélé qu'en l'absence de l'un de ces cofacteurs, Tat est incapable d'induire la production de cytokines, suggérant ainsi que ces cofacteurs jouent un rôle essentiel dans l'engagement de la voie TLR4 par Tat. Enfin, des résultats supplémentaires basées sur l'utilisation de souris invalidées pour les molécules de signalisations du TLR4 (MyD88 et TRIF) a permis de montrer le recrutement des deux voies MyD88-dépendante et TRIF-dépendante par la protéine Tat pour l'activation de la production des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-10.

En conclusion, nos résultats suggèrent que le VIH-1, par l'intermédiaire de sa protéine Tat, détourne à son profit un récepteur essentiel de la réponse immune : le TLR4.



## **HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- $\alpha$ and IL-10**

Nawal Ben Haij<sup>1-3</sup>., Kaoutar Leghmari<sup>1-3</sup>., Rémi Planès<sup>1-3</sup>., Nathalie Thieblemont<sup>4-5</sup>.,  
Elmostafa Bahraoui<sup>1-3\*</sup>.

1: Université Paul Sabatier, EA 3038, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

2: INSERM, U1043, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

3: CNRS, U5282, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

4: CNRS UMR 8147, Necker Hospital, Paris, France

5: Faculté de Médecine, Necker Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

\* *Corresponding Author: bahraoui@cict.fr*

Nawal Benhaij : benhaij@gmail.com

Kaoutar Leghmari: kleghmari@hotmail.com

Rémi Planes: remi.planes@inserm.fr

Nathalie Thieblemont: nathalie.thieblemont@parisdescartes.fr

Elmostafa Bahraoui: bahraoui@cict.fr

**Keywords:** HIV-1, TLR4, Tat, IL-10, TNF- $\alpha$

## **Abstract:**

**Background:** HIV-1 infection results in hyper-immune activation and immunological disorders as early as the asymptomatic stage. Here, we hypothesized that during early HIV-1 infection, HIV-1 Tat protein acts on monocytes/macrophages to induce anti-inflammatory and proinflammatory cytokines and participates in immune dysregulation.

**Results:** In this work we showed that Tat protein: i) by its N-terminal domain induces production of both IL-10 and TNF- $\alpha$  in a TLR4-MD2 dependent manner, ii) interacts specifically with TLR4-MD2 and MD2 with high affinity but not with CD14, iii) induces *in vivo* TNF- $\alpha$  and IL-10 in a TLR4 dependent manner.

**Conclusions:** Collectively, our data showed for the first time that, HIV-1 Tat interacts physically with high affinity with TLR4-MD2 to promote proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) and the immunosuppressive cytokine IL-10 both involved in immune dysregulation during early HIV-1 infection and AIDS progression.

## Background

HIV-1 infects numerous cells of the immune system, essentially CD4 T-cells, monocytes/macrophages and, to a lesser extent, dendritic cells [1] leading to the establishment of a persistent chronic hyper-immune activation [2]. As consequence, this abnormal hyperstimulation inevitably leads to the weakening of the immune system that facilitates HIV-1 replication, virus persistence and AIDS disease progression [2-4]. HIV-1 immune activation is associated with the production of several cytokines, including TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine, and IL-10, a highly immunosuppressive cytokine, two cytokines that have been involved in the immune dysregulation observed in HIV-1 infected patients [5]. Indeed, HIV-1 is able to activate cells of the innate immune system via various pathways. By its nucleic acids, HIV-1 activates Toll-like receptor 7/8 (TLR7/8) and TLR3 to activate innate signaling of HIV-1 infected cells and to induce proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and type I IFNs, that contribute to immune activation and viral replication [6-8]. At least 10 TLR have been reported in humans and 13 in mice [9], expressed by the cells of the immune system. Like TLR, other innate immune pattern recognition receptors (PRR), that play an essential role in the initiation of the innate and adaptive immune responses, including NOD-like receptors (NLR), RIG-like receptors (RLR) and C-type lectin receptors (CLR), also recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMP) to activate proinflammatory cytokines and chemokines [9].

Our group [10-13] and others [14, 15] have shown that HIV-1 Tat protein is able to stimulate proinflammatory (IL1- $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in human monocytes/macrophages. Tat protein is an 86 to 104 amino-acids polypeptide of 14 kDa, known for its crucial transactivation activity of HIV-LTR [16]. Tat protein is structured in several domains including the N-terminal region 1-47 and the basic region, which is essential for Tat internalization, nuclear localization and RNA binding at the LTR-TAR region [17]. Tat protein is found at nM levels in the serum of HIV-1 infected patients [18-20]. [21] Taking into account that a fraction of Tat protein remained adsorbed on the cell surfaces, the determined soluble Tat concentration is probably underestimated and could be much larger near the lymphoid organs and in the vicinity of infected cells.

Beside its crucial role in activating viral replication, Tat also participates in the pathogenesis of HIV-1 infection by its capacity to interact with infected or not infected cells [22]. Tat also, contributes to the spread of HIV-1 through its effect on the increase of CCR5 and CXCR4 surface expression [23]. Tat has been found to induce neurotoxicity in the central

nervous system [24, 25] and apoptosis in CD4 T-cells [26]. Moreover, several studies suggest a direct effect of Tat protein in the structural and immunological dysfunctions observed early after infection, in the gastrointestinal tract (GALT) from HIV-1 infected patients [2]. Indeed, it was reported that Tat protein can act directly on the GALT, by impairing intestinal glucose absorption [27] or indirectly by boosting abnormally immune activation, which is exacerbated later following the breakdown of the mucosal barrier and the translocation of the bacterial product into the blood [2].

While some of Tat effects are mediated after intracellular uptake of Tat, others are mediated by the interaction of extracellular Tat with cellular receptors. Different domains of Tat have been implicated in interactions with membrane receptors: the N-terminal region with CD26 receptor [28] and L-Type calcium channel [29] the tripeptide RGD with integrin  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  of dendritic cells [30], and the basic domain with membrane lipids [25] or with the Flk-1/KDR receptor [31]. Among these potential Tat receptors, it would be of importance to determine which receptor(s) participate to the activation of signalling pathways that lead to the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, reported by our group and others, which seem to be strongly involved in the abnormal immune activation and immune dysregulation.

In this study, we advance TLR4 as a potential candidate receptor for Tat protein for the following reasons: i) Tat protein induces the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 by human monocytes/macrophages by acting at the cell membrane level, ii) TLR4 is expressed on the surface of monocytes/macrophages, iii) the signalling pathways activated by Tat, including MAPkinases, PKC and NF- $\kappa$ B [11] are also activated following the engagement of the TLR4 pathways [32].

Our results presented in this study, showed that Tat protein induced TNF- $\alpha$  and IL-10 production in monocytes-macrophages from human and mice cells but not in macrophages from TLR4 KO mice. Further we showed that Tat protein by its N-terminal domain 1-45 interacts with high affinity with TLR4-MD2 receptor on human monocyte-macrophage cells to induce TNF- $\alpha$  and IL-10, two cytokines implicated in the hyperactivation and dysregulation of the immune system in HIV-1 infected patients.

## Results

### **Tat protein induces the production of TNF- $\alpha$ and IL-10 by acting at cell membrane level in human monocytes.**

Tat protein contains a nuclear localization sequence between amino acids 49 and 57 which allows it to be taken up by cells into the nucleus. Thus, Tat protein could act at either the membrane and/or the nucleus level. Previously, we showed that stimulation of human monocytes with synthetic or recombinant proteins, GST-Tat1-101 or GST-Tat 1-45, but not GST-Tat 30-72 or GST alone, activated the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 [11].

In addition, we previously showed that Tat oxidation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, its trypsin digestion or heating (5 min at 95°C) totally abolished the capacity of Tat to induce the production of TNF- $\alpha$  and IL-10, while such treatments had no effect on the capacity of LPS to stimulate the production of these cytokines [11]. Using the LAL assay, we showed that the Tat protein used in this work contained no endotoxins within the limit of detection of the test (less than 50 pg/ml). Likewise, LPS at 50 pg/ml did not cause the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in our experiments. All these characterizations exclude contamination with endotoxins and indicate the direct implication of Tat protein, by acting at the cell membrane surface, by its N-terminal domain to induce the TNF- $\alpha$  and IL-10 production.

### **Tat protein induces TLR4-dependent cytokine production in human monocytes.**

To investigate the role of TLR4-MD2 as a potential receptor implicated in the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 by Tat, we evaluated the inhibitory effect of the anti-TLR4 blocking monoclonal antibody (Mab), clone HTA125, on Tat-induced cytokine production. To this end, primary human monocytes were pretreated with increasing amounts of anti-TLR4 Mab (0.01–1  $\mu$ g/ml) before stimulation by Tat. In these conditions anti-TLR4 antibodies inhibited Tat-induced cytokine in a dose dependent manner (Figure 1A-B). Total inhibition was obtained with anti-TLR4 Mab at 1  $\mu$ g/ml. Similarly, when monocytes were pretreated with saturating amount of anti-TLR4 antibodies (1 $\mu$ g/ml) and then stimulated with increasing concentrations of Tat 1-101 (1-100 nM) or its deleted mutants Tat 1-45, strong inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-10 were observed (Figure 1 C-D). No inhibition was observed when Tat stimulation was performed in the presence of anti-TLR2 or with irrelevant IgG antibodies harbouring the same isotype as HTA125 Mab in control experiments (Figure 1A). More interestingly, we showed that LPS-RS (from *Rhodobacter Sphaeroides*), previously described

as a potent antagonist of LPS[33], is also able to block the ability of Tat to induce TNF- $\alpha$  and IL-10 production (Figure 1E). Finally, as expected, we showed that HTA125 Mab also totally inhibited LPS-induced cytokine production (Additional Figure 2).

Altogether, these results indicate that Tat induces TLR4-dependent production of IL-10 and TNF- $\alpha$  in human monocytes.

### **HIV-1 Tat protein interacts physically with TLR4-MD2**

Taking these data into consideration, we investigated the capacity of Tat to interact directly with TLR4 and its cofactors MD2 and CD14. MD2 is a soluble glycosylated polypeptide of 160 amino acids which associates with high affinity to the ectodomain of TLR4, while CD14 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane glycoprotein of 375 amino-acids which seems to play an important role in the trafficking of TLR4 and other receptors, including TLR3, TLR7 and TLR9 [34].

To investigate whether Tat was able to interact physically with TLR4-MD2 complex, MD2 or CD14 recombinant proteins were tested for their capacities to interact, in a solid phase assay, with HIV-1 Tat protein or its deleted mutants Tat 1-45 and Tat 30-72. The results depicted in Figure 2A show a direct interaction of Tat with TLR4-MD2 or with MD2 alone. In contrast, no interaction was observed between Tat and CD14 (Figure 2A). As control, when GST was used, no binding with TLR4-MD2 or MD2 was detected (Figure 2A). To identify the domain of Tat implicated in this interaction, the N-terminal domain Tat 1-45 and the central domain, Tat 30-72, were tested in the same assays. The results showed that the N-terminal domain, Tat 1-45, as Tat 1-101, also, interacted strongly with MD2 and TLR4-MD2, but not with CD14 (Figure 2A). In contrast, no binding was observed with the Tat 30-72 fragment or with GST control (Figure 2A). In a parallel assay, GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 and GST previously coupled to glutathion-agarose beads, were tested for their capacity to interact with soluble recombinant TLR4-MD2, MD2 or CD14. After incubation and washes, the preformed complexes were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The corresponding results, shown in Figure 2B, clearly confirmed the capacity of Tat to interact, *via* its N-terminal fragment, with TLR4-MD2 and MD2, but not with CD14. In line with the binding assay data, similar results were obtained when the same experiments were performed using, as source of TLR4/MD2/CD14 or cell lysate proteins prepared from HEK293 cells stably transfected with TLR4-CD14-MD2 (Figure 2C). Non-transfected HEK cells were used as controls (Figure 3C). In addition, recombinant GST-Tat proteins (Additional Figure 1A) and recombinant TLR4, MD2 and CD14 (Additional Figure 1C) were characterized by SDS-



PAGE. Further we have evaluated the native-like conformations of TLR4 and MD2 by demonstrating, in a binding assay, their capacity to interact physically and in a dose dependent manner (Figure 2D)

In order to demonstrate the specificity of Tat-TLR4-MD2 interactions, Tat-MD2 or Tat-TLR4-MD2 interactions were further analyzed in a molecular binding assay. Binding was performed in the presence of various concentrations of MD2, TLR4-MD2 or Tat. The results in (Additional Figure 3A-B), show that Tat (1  $\mu$ M) binds to MD2 (1pg/mL to 1 $\mu$ g/mL) in a dose dependent manner, with a clear saturation plateau. Similarly, the binding of MD2 (10 ng/mL) to increasing amounts of Tat ( $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M) showed that the formation of Tat-MD2 or Tat-TLR4-MD2 complexes were dependent on the Tat concentrations, with a saturation plateau at  $10^{-6}$  M of Tat (Additional Figure 3C-D).

The specificity of Tat-MD2 and Tat-TLR4-MD2 interactions were further characterized by testing the capacity of soluble MD2, TLR4-MD2, TLR4 or CD14 to compete for these interactions. The results depicted in Figure 2E, clearly show the capacity of soluble MD2 (100 pg - 1  $\mu$ g) to inhibit the binding of Tat to coated MD2 in a dose dependent manner (Figure 2E). Strong inhibition (more than 95%) was obtained with soluble MD2 used at 1  $\mu$ g/ml. The concentration of soluble MD2 ( $K_{0.5}$ ) capable of inhibiting Tat-MD2 interaction by 50% was about  $4.10^{-9}$  M. This value of  $K_{0.5}$ , which can be considered as an apparent dissociation constant, indicates that Tat recognizes MD2 with a relatively high affinity. In agreement with the direct binding data, soluble TLR4-MD2 is also able to totally inhibit Tat-MD2 or Tat-TLR4-MD2 interactions when used at 1  $\mu$ M (Figure 2E). The  $K_{0.5}$  of TLR4-MD2, about  $10^{-9}$  M, is 2.5 times less than that obtained with MD2 alone, suggesting a higher affinity of MD2, for Tat, when it is associated with TLR4. In contrast, when soluble TLR4 or CD14 were used as competitors, no significant inhibitions were observed (Figure 2E). Similar results were obtained when soluble TLR4-MD2, TLR4, or CD14 were used to compete for MD2-Tat 1-45 interaction (Additional Figure 3).

Then we wondered whether Tat protein was able to bind and to localize with TLR4 at the cell surface of HEK cells stably transfected with TLR4-MD2-CD14. Non-transfected HEK cells, HEK Null, were used as negative controls. To this end, Tat-TLR4-MD2 interaction was labelled with stained anti-Tat (Tat-555) and anti-TLR4 (TLR4-488) antibodies and complex formation was analyzed by confocal microscopy (Figure 3). Briefly, cells were incubated or not with Tat, and then labelled with anti-Tat or anti-TLR4 antibodies, separately or in a mixture. The results showed that Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 were able to bind to HEK-TLR4-MD2-CD14 cells but not to HEK Null (Figure 3). This labeling

was specific since no staining was observed when experiments were performed after: i) incubating cells with the same amount of soluble GST protein instead of Tat (Figure 3), ii) omitting the primary antibody or iii) using an isotype control instead of anti-Tat antibodies (data not shown). This co-presence is also in agreement with the ability of Tat to interact physically with TLR4-MD2 in the inhibition and the biochemical binding assays previously described.

### **Tat protein fails to stimulate TNF- $\alpha$ and IL-10 in macrophages from TLR4<sup>-/-</sup> mice.**

To confirm the involvement of Tat-TLR4 interaction in the signalling pathways leading to cytokine production, we used genetically engineered mice deficient in various TLR or their cofactors, including MD2 and CD14. Firstly, we validated the ability of Tat protein to stimulate the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in peritoneal macrophages. Our results showed that Tat protein and its N-terminal Tat 1-45, but not Tat 30-72, stimulated specifically and in a dose dependent manner TNF- $\alpha$  and IL-10 production in murine wt macrophages (Figure 4A-B). In agreement with the implication of TLR4-MD2, we showed that, when murine macrophages from TLR4<sup>-/-</sup> mice were stimulated in the same conditions, no production of TNF- $\alpha$  and IL-10 was observed (Figure 4C-D). Similar results were obtained with macrophages from C3H/HeJ mice, which have a missense mutation in the third exon of TLR4 (Additional Figure 4). In accordance with the selective involvement of TLR4, our results showed that Tat protein and Tat 1-45, continued to stimulate TNF- $\alpha$  and IL-10 production in macrophages from mice deficient for TLR2<sup>-/-</sup> TLR3<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup> or TLR9<sup>-/-</sup> (data not shown). As a positive control we showed that TLR2 pathway was not altered in macrophages obtained from TLR4 KO mice as shown by cytokines production following stimulation with Pam<sub>3</sub>CsK<sub>4</sub> ligand (Figure 4C-D). Most interestingly, *in vivo* data, showed that intraperitoneal administration of Tat protein leads to the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in the peritoneal washes of wt mice whereas these cytokines were greatly reduced by 75% for TNF- $\alpha$  and remained undetectable for IL-10, in TLR4 KO mice (Figure 4I-J).

Considering the role of MD2 in the interaction with Tat protein, we evaluated the importance of the *in vivo* expression of this cofactor in the induction of the signalling pathways leading to Tat-induced cytokine production. Using macrophages from MD2<sup>-/-</sup> mice, we showed that deficiency in MD2 abolished the ability of Tat to induce the production of both TNF- $\alpha$  and IL-10 (Figure 4E-F). Using the same approach, the implication of CD14 was also evaluated by using macrophages obtained from CD14<sup>-/-</sup> mice. Unexpectedly, despite the

absence of direct Tat-CD14 interaction (Figure 2A-B), the presence of CD14 expression seems to be essential for the activation of TLR4-MD2 signalling pathway by Tat as shown by the absence of cytokine production (Figure 4E-F). However, these data seem to be in apparent contradiction with those obtained with blockade anti-MD2 and anti-CD14 antibodies, which were unable to block Tat-induced TNF- $\alpha$  and IL-10 production (Figure G-H). As controls, and in agreement with previously reported data, the same antibodies completely blocked LPS-induced cytokine production (Figure 4G-H). We also confirmed that stimulation with LPS at relatively high concentrations restored cytokine production in macrophages from CD14 deficient mice (data not shown).

Altogether, our data confirm the essential implication of TLR4 and its cofactors CD14 and MD2 in HIV-1 Tat signalling for the production of IL-10 and TNF- $\alpha$  in monocytes/macrophages.

## Discussion

Several reports have shown that Tat protein is able to bind to various cell membrane receptors [35]. However Tat-TLR4 interaction has not been reported previously. Numerous arguments allowed us to test this hypothesis: i) TLR4 is expressed by human monocytes, ii) TLR4 activation induces the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$  and IL-10, by activating MAPkinases, PKC and NF- $\kappa$ B pathways that we have previously demonstrated to be activated by Tat in primary human monocytes [11], iii) TLR4 have been reported, in addition to LPS, to interact with several other ligands including viral proteins [34].

In agreement with this hypothesis, our results showed that Tat-induced TNF- $\alpha$  and IL-10 production was strongly inhibited in the presence of anti-TLR4 blocking antibody.

In order to be expressed at the cell surface, and functional, TLR4 requires the action of several factors including MD2 and CD14, which form complexes at the cell membrane. Analysis of Tat interaction with TLR4-MD2, MD2 and CD14, by complementary approaches, showed that Tat protein was able to interact with high affinity, with TLR4-MD2 and MD2 but not with CD14. This binding was totally inhibited, in a dose dependent manner, with soluble TLR4-MD2 or MD2, thus demonstrating the specificity of these interactions. This conclusion is also in line with confocal microscopy analysis data, which showed the co-detection of Tat and TLR4 only in TLR4-MD2 expressing cells. Comparison of the dissociation constant values  $K_{0.5}$  of Tat-TLR4-MD2 ( $10^{-9}$  M) and Tat-MD2 ( $4 \cdot 10^{-9}$  M), showed that  $K_{0.5}$  of Tat-

TLR4-MD2 was 2.5 times smaller than that of Tat-MD2. This higher affinity of Tat for TLR4-MD2 complex may be due to a better stabilization of Tat interactions with the TLR4-MD2 complex than with the MD2 alone. On the other hand, it has been shown that LPS recognizes MD2 with a dissociation constant of about  $2.3 \cdot 10^{-6}$  M [36] a  $K_{0.5}$  value that is 500 times higher than that found for Tat-MD2. In addition, while a direct interaction between LPS and CD14 has been described in several reports [36-38], in our study, no detectable interaction was found between Tat and CD14 neither in the solid phase nor in pull-down binding assays.

At functional level and in agreement with our biochemical data, we showed that Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 induced the production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in macrophages from wild type mice but not in macrophages from mice genetically deficient for TLR4, MD2 or CD14. While the importance of cell surface expression of TLR4 and MD2 seems to be in line with our biochemical data, results obtained with CD14 KO mice seem to be in apparent contradiction if we consider its inability to interact with Tat protein. This apparent contradiction is amplified by the fact that anti-CD14 antibodies, which continue to inhibit LPS activation, fail to inhibit Tat-induced cytokine production. This apparent discrepancy may be related to the importance of CD14 in the expression of a biologically active TLR4 or its recruitment at cholesterol rich domains corresponding to the signalling platform [34]. Also, it is interesting to note that anti-MD2 antibodies were able to block cytokine production by LPS, while these same antibodies failed to inhibit Tat-induced cytokines. These results, in association with those obtained with MD2 KO mice, also underline the role of MD2 in the trafficking and surface localization of TLR4 as previously reported [39]. In addition the capacity of LPS-RS, an antagonist known for its capacity to alter MD2-TLR4 signalling [33] to inhibit Tat-induced cytokines is also an additional argument for the recruitment of this signalling pathway by HIV-1 Tat protein.

Considering the crucial role of PRR in the anti-viral immune defense, some viruses have evolved multiple mechanisms to hijack the initial function of TLR to their advantage so as to escape the control of the immune system or to infect their targets. For example, the respiratory syncytial virus (RSV) by its F protein, activates TLR4 to induce pro-inflammatory response that is implicated in the rapid viral clearance [40, 41]. Interestingly, the rate of viral clearance was significantly reduced in RSV infected TLR4-deficient mice [40, 42]. Similarly, MMTV envelope glycoprotein also triggers TLR4 pathway to activate in one hand, B-cells, the major target cells of the virus, and on the other hand to induce the expression of the immunosuppressive cytokine IL-10, [43]thereby establishing an immunosuppression state

favorable for both the inhibition of anti-viral immune response and viral replication [44]. So, unlike the antiviral role of TLR4 in the clearance of RSV [40, 42], MMTV and HIV-1 are able to hijack TLR4 pathway to induce the production of IL-10, which contribute in association with other immunosuppressive factors, as PD-1, PD-L1 and IDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) [45, 46] to divert efficient immune response and to the establishment of persistent infections. In addition, several studies have shown that in some conditions, IL-10 can synergise with inflammatory cytokines to enhance HIV-1 replication [47, 48].

Interestingly, other viruses have developed strategies to interfere with TLR pathway activation. For example, vaccinia virus, by its A46R protein which shares a TIR-like domain, interferes with the TLR pathway to block both MyD88 dependent and independent signalling [49]. Similarly, hepatitis C virus by its NS5A protein, forms insoluble complexes with MyD88 and inhibits the activation of the TLR4 pathway in murine macrophages [50]. Measles virus by its hemagglutinin, interacts with TLR2 on human monocytes and activates the expression of CD150, that is its own entry receptor. These reports indicate that TLR can be hijacked by endogenous or viral ligands to promote the establishment of a pathological state or to escape viral containment.

## Conclusions

Taken together, our results give the first description of a direct, high affinity interaction between HIV-1 Tat protein and TLR4/MD2. By hijacking this pathway, HIV-1, *via* its early expressed Tat protein, contributes to the establishment of an abnormal hyper-activation of the immune system *via* TNF- $\alpha$  and to the development of an immunosuppression state by the production of IL-10, a highly immunosuppressive cytokine.

The understanding of the molecular and cellular mechanisms by which HIV Tat protein hijack the TLR4-CD14-MD2 receptor pathway represents a crucial interest for understanding the mechanisms recruited by HIV-1 to induce immunosuppression and for the development of new therapeutic strategies for future treatments.

## Methods

**Monocyte isolation.** PBMCs were isolated from buffy coat of healthy HIV-1-negative donors by Ficoll density gradient. Briefly, PBMC were counted and resuspended in a 60/30 complete medium (60% AIMV, 30% Iscove; (Gibco)) containing 1% foetal calf serum (FCS), penicillin

(100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/ml). Monocytes were separated from lymphocytes by adherence to tissue culture plastic (Beckton Dickinson). After an incubation of 1 h at 37°C 5% CO<sub>2</sub>, non-adherent cells were removed and adherent cells (> 94% CD14<sup>+</sup> by flow cytometric analysis) were washed and cultured in 60/30 complete medium containing 10% FCS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) before being used in the experiments.

**Human embryonic kidney 293 cell line.** Transfected HEK cell line stably expressing TLR4, TLR4-CD14-MD2, TLR2-CD14 and non-transfected HEK cell line (HEK Null) were purchased from Invivogen. HEK Null and HEK-TLR4 cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, normocin (100 µg/mL) and blasticidin (10 µg/ml); while HEK TLR4-CD14-MD2 and HEK TLR2-CD14 cell lines were grown in DMEM 10% FCS, normocin (100 µg/ml), blasticidin (10 µg/ml) and hygrogold (50 µg/ml) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

**Human monocytic leukemia cell lines and epithelial HeLa cells.** HeLa cells stably transfected with tat gene were obtained from O. Pleskoff (Institut Cochin Paris). Secretion of Tat protein in the cell supernatant was tested by showing its capacity to activate β-gal gene expression under the control of HIV-1- LTR promoter (data not shown).

**Primary mouse peritoneal macrophages and peritoneal washes.** C57BL/6 were purchased from Charles Rivers. C3H/HeN and C3H/HeJ or Knockout (KO) mice C57BL/6: TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>, CD14<sup>-/-</sup>, MD2<sup>-/-</sup> were obtained from (CNRS, Orléans, France). This study was conducted in accordance with the EU regulations and with the French national chart for ethics of animal experiments (articles R214-87 to 90 of the code rural). The protocol was approved by the committee on the ethics animal experiments of the Region Midi Pyrenée and by IFR 150 (permit numbers: 04-U563-DG-06 and MP/18/26/04/04). To minimize suffering, all animals were handled under anesthesia. Primary macrophages were isolated as previously described [51]. Briefly, mice were injected intra peritoneally with 1 ml of thioglycolate medium 3% (Biomerieux). Three days later, the mice were sacrificed and macrophages were recovered by peritoneal washes and then enriched by adherence selection for 1 h in complete medium (DMEM supplemented with or without 2% FCS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Isolated macrophages were characterized by FACS analysis for the expression of CD11b<sup>+</sup>. Primary macrophages and peritoneal washes were obtained from two groups of mice. Wt (3 animals) and TLR4 KO (3 animals) mice were injected intraperitoneally with 100 µg of Gst-Tat at days 0, 1 and 3. 24h after the last injection peritoneum was washed with 5ml of PBS and cytokines were quantified.

**Generation of monocyte-derived dendritic cells.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of healthy blood donors (EFS, Toulouse) by centrifugation on Ficoll paque (GE Healthcare). Monocytes were isolated by adherence to tissue culture plastic on 6-well plates (Beckton Dickinson) for 1 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed and adherent cells were washed three times with PBS, then used for the generation of dendritic cells. When analyzed by flow cytometry, more than 94% of this adherent population was CD14<sup>+</sup>. To allow them to differentiate into monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), CD14<sup>+</sup> cells were cultured in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Invitrogen), containing penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml), 10 ng/ml recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) and 10 ng/ml interleukin-4 (IL-4). Alternatively, monocytes were also isolated by positive selection using a CD14<sup>+</sup> isolation kit (Myltenyi biotec). After 5 days of culture, loosely adherent cells were recovered by gentle pipetting and used as immature dendritic cells in our experiments. Over 90% of cells had the standard phenotype of immature dendritic cells: CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>.

**Tat protein and TLR ligands.** Recombinant HIV-1 Tat protein1-86 was obtained from “Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA” (Paris, France). Synthetic Tat was obtained from E Loret (CNRS Marseille). Recombinant GST and deleted Tat mutant proteins were produced in our laboratory as previously described [11]. The level of endotoxin was assessed using the LAL assay (Bio-Septra, France). All these recombinant proteins contained less than 0.3 EU/µg, the limit of detection of this test. LPS from *E. coli*, serotype R515 was purchased from Alexis biochemicals. Pam3CsK4 and LPS-RS from *R Sphaeroides*, were obtained from InvivoGen (San Diego, CA). Human IFN-γ was purchased from eBioscience.

**Antibodies and chemical inhibitors.** For inhibition experiments: anti-human TLR4 (clone HTA125), anti-TLR2 (clone TL2.1), anti-CD14 (clone 61D3) and mouse IgG2a isotype were obtained from eBioscience. Anti-CD14 (clone RMO52 and clone MY4) and mouse IgG isotype controls were from Beckman Coulter; anti-MD2 (clone 288307) was from R&D Systems. Mab anti-Tat antibodies were obtained from ANRS (Paris). For confocal imaging and flow cytometry analysis: goat anti-hTLR4 was from R&D System. Unlabelled mouse anti-hTLR4 and labelled mouse anti-hTLR4-PE were from eBioscience. Alexa 488 or 555 labelled IgG against rabbit and goat IgG respectively, were from Invitrogen. For western blot analysis, recombinant hMD2, rhCD14 and rhTLR4-MD2, monoclonal anti-hMD2 and anti-hTLR4 were from R&D systems. Mabs CD14 (MEM-18) was from Santa Cruz Biotechnology.

**Cytokine detection by ELISA.** Adherent monocytes ( $10^6$ /well), murine macrophages ( $5 \cdot 10^5$ /well) or HEK cells ( $5 \cdot 10^5$ /well) were washed 3 times with cold PBS. Cells were then cultured in the presence of 1% FCS. After 24 h of cell treatment, the supernatants were collected and analyzed for human and mouse TNF- $\alpha$  and IL-10. Cytokine amounts were determined using ELISA kits from BD Biosciences and R&D Systems according to the manufacturers' instructions.

**Confocal microscopy.** HEK cells were grown on 12-mm round coverslips at 60-80 % confluence. They were then incubated with GST-Tat (100 nM) for 15 min. After stimulation and washing with PBS, cells were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS for 10 min. After 3 washes, they were incubated with 50 mM of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for quenching. This step saturated free aldehydes to inhibit auto-fluorescence. After extensive washing, the cells were saturated with PBS-BSA 5% for 30 min. For colocalization experiments, GST-Tat and TLR4 proteins were labelled for 45 min at room temperature with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of mouse (Mab anti-Tat) or goat primary polyclonal anti TLR4 antibodies. After washes, Tat and TLR4 antibodies were labelled with the corresponding secondary antibodies: Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-555-conjugated antibodies directed against mouse or goat immunoglobulin G (1/500) for 45 min at room temperature. After three washes with PBS or PBS- $\text{MgCl}_2$  150 mM, cell nuclei were stained at room temperature with DAPI or chromomycin A3 in PBS- $\text{MgCl}_2$  150 mM for 1h. The images were taken with a confocal microscope (Zeiss Axioimager LSM 710 META scanning unit and a 1.4NA x 63 objective). Cellular localization were analyzed and processed with ImageJ.

**GST pull-down and Co-immunoprecipitation assays.** For GST pull-down, equal amounts of GST, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST-Tat 1-101 proteins coupled to glutathione agarose beads were saturated with BSA (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 2 h at 4°C. After washing (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM), agarose fixed proteins were incubated with 1  $\mu\text{g}$  of TLR4-MD2, MD2 or CD14 soluble recombinant human proteins (R&D Systems) or total cellular extracts (500  $\mu\text{g}$ ) from HEK 293 or HEK 293-TLR4-MD2-CD14 cells. The beads were then washed extensively with Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.5%, PMSF 0.5 mM, leupeptin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.2 mM, NaF 0.05 mM and the presence of retained TLR4, MD2 or CD14 proteins was analyzed by SDS-PAGE and western blot using specific antibodies. Recombinant human MD2, TLR4-MD2, TLR4 or CD14 were coated at the indicated concentrations in 96 well plates for 24h at 4°C. After washing with PBS-0.05% Tween20, wells were saturated with PBS-0.05% Tween 20, 5% non-fat milk for 1 h at 37°C. After 3 washes, various amounts of GST, GST-Tat 1-101 or Tat deleted mutants were incubated for 2



h at 37°C. For competition assays, GST-Tat or its deleted mutants previously incubated for 1 h at 37°C with different ligands were added to compete with the coated proteins (MD2 or TLR4-MD2) in the wells for an additional 2 h. After washing, binding was detected by anti-GST (1/500) or monoclonal anti-Tat antibodies (10 µg/ml) as described [9].

**Statistical tests.** All statistical analyses used the Student's t-test, unpaired for normal distribution, for at least three independent experiments. Differences were considered significant at p values < 0.05. Microsoft Excel and Prism were used to construct the plots and measure means, standard deviations and p values.

## **Additional files**

**Additional Figure 1. Characterization of recombinant proteins.** A) Equal amounts (1µg) of recombinant GST-Tat proteins were separated by SDS-PAGE at 10% and stained by coomassie blue dye. B) recombinant GST-Tat proteins analysis by western blot. Proteins were labeled by using a monoclonal anti-Tat directed against the N-terminal region 1-15. C) Recombinant TLR4, TLR4-MD2, MD2, CD14 proteins were separated by SDS-PAGE at 10% and stained by coomassie blue dye.

**Additional Figure 2. LPS-induced TNF-α and IL-10 is TLR4-dependent.** Monocytes were pretreated or not with increasing amounts of blocking antibodies against TLR4 or TLR2 or isotype control for 1h before stimulation by LPS 1 ng/mL. TNF-α and IL-10 production were quantified in the culture supernatants by ELISA. Data represent means +/- SD (n=3).

**Additional Figure 3. Tat interacts specifically and with high affinity with MD2 and TLR4-MD2.** A-B) Increasing amounts of rhMD2 were coated in the wells. After incubation with a constant amount of GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 (1 µM), the binding of Tat to rhMD2 was detected by using anti-GST antibodies (1/500). The data represent OD at 450 nm +/- SD (triplicate) and are representative of one of three independent experiments.

C-D) Increasing concentrations of GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 were incubated for 2 h with 10<sup>-2</sup> µg/mL of coated rhMD2. The data represent OD at 450 nm +/- SD (triplicate) and are representative of one of three independent experiments. E) rhMD2 and rhTLR4-MD2 compete for Tat-rhMD2 interaction: GST-Tat 1-101 and 1-45 (0.1 µM) were pre-incubated for 1 h with PBS (control) or with increasing amounts of soluble rhTLR4-MD2, rhTLR4 or

rhCD14 before incubation with the coated rhMD2. Binding of Tat to rhMD2 was analyzed as described above by measuring OD at 450 nm. Data represent mean +/- SD (n ≥3).

**Additional Figure 4. Tat protein fails to stimulate TNF- $\alpha$  and IL-10 in macrophages from TLR4<sup>-/-</sup> MD2<sup>-/-</sup>, and CD14<sup>-/-</sup> mice.**

Macrophages were isolated from Wt mice (C3H/HeN) or mice deficient for TLR4 signalling (C3H/HeJ). The cells were stimulated with increasing concentrations of Tat 1-86, GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST as control or LPS. Mouse TNF- $\alpha$  and IL-10 production were determined by ELISA. Data representative of three independent experiments (mean +/- SD).

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

NB, KL, RP, NT and EB conceived and designed the experiments.

NB, KL, and RP performed the experiments

NB, KL, RP, and EB analyzed the data

EB and NB wrote the paper.

All authors read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements**

This work was supported by ANRS, SIDACTION, and ministère de la recherche et des technologies. We thank Dr N Chazal for helpful discussion, Pr B Ryffel for the gift of TLR KO mice, the plateau technique INSERM U1043 for technical assistance and S. Becker for the reading of the manuscript.

**Author details**

1: Université Paul Sabatier, EA 3038, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

2: INSERM, U1043, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

3: CNRS, U5282, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

4: CNRS UMR 8147, Necker Hospital, Paris, France

5: Faculté de Médecine, Necker Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

## Figure legends

### **Figure 1. HIV-1 Tat-protein-induced TNF- $\alpha$ and IL-10 is TLR4-dependent.**

A-B) Monocytes were pretreated or not with increasing amounts of blocking antibodies against TLR4 or TLR2 or isotype control for 1h before stimulation by GST-Tat 1-101. C) Mab anti-TLR4 (1  $\mu$ g/ml) were incubated for 1 h with  $10^6$  human monocytes before stimulation with 1, 10 or 100 nM of Tat or with, D) 100 nM of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, or GST-Tat 30-72. GST was used as a control. After 24 h, TNF- $\alpha$  and IL-10 in the SN were measured by ELISA. After 24h, TNF- $\alpha$  and IL-10 were measured in the SN. The values are representative of three independent experiments. E) Monocytes were treated with LPS (1ng/ml) or GST-Tat1-101 (10nM) in the presence or not of LPS-RS (1 $\mu$ g/ml). After 24 h, TNF- $\alpha$  and IL-10 were quantified in the culture supernatant by ELISA. Data represent means +/- SD.

### **Figure 2. Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 interact physically with TLR4-MD2 and MD2 but not with CD14.**

A) rh TLR4-MD2, MD2 and CD14 were coated at 1  $\mu$ g/ml in the wells. After incubation with GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST control (1  $\mu$ M), interaction of Tat with coated rh proteins was analyzed by ELISA. The data represent OD at 450 nm and are representative of one of three independent experiments.

B) Rh TLR4-MD2, MD2 and CD14 (1  $\mu$ g/ml) were incubated with GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST control (1  $\mu$ M) coupled to glutathione-agarose beads. C) GST-pull down experiments. 500  $\mu$ g of cellular extracts from HEK cell expressing TLR4-MD2-CD14 or not. Unretained TLR4 was evaluated by western blot. D) Evaluation of the capacity of recombinant TLR4 to interact with recombinant MD2. rh TLR4 was coated at 1  $\mu$ g/ml in the wells. After incubation with various concentrations of MD2 (1-10 $\mu$ g/ml). TLR4-MD2 interaction was analyzed by ELISA using anti-MD2 monoclonal antibodies. E) rhMD2 and rhTLR4-MD2 compete for Tat-rhMD2 interaction: GST-Tat 1-101 (0.1  $\mu$ M) were pre-incubated for 1 h with PBS (control) or with increasing amounts of soluble rhMD2, rhTLR4-MD2, rhTLR4 or rhCD14 before incubation with the coated rhMD2. Binding of Tat to rhMD2 was analyzed as described above by measuring OD at 450 nm. The data represent OD at 450 nm and are representative of one of three independent experiments.

**Figure 3. Analysis of Tat and- TLR4-MD2 labelling at the cell surface.**

HEK cells null or HEK-TLR4-MD2-CD14 were pre-incubated with GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 or control GST during 15 min. GST<sup>±</sup>-Tat were labelled with an anti-GST antibodies (red). WGA-633 (blue) was used to label the membrane of cells and DAPI (cyan) was used as a nuclear marker. Scale bars are represented right down of each images.

**Figure 4. Tat protein fails to stimulate TNF- $\alpha$  and IL-10 in macrophages from TLR4<sup>-/-</sup> MD2<sup>-/-</sup>, and CD14<sup>-/-</sup> mice.**

A-B) Tat induces mTNF $\alpha$  and mIL-10 production in wt C57Bl/6 murine macrophages. Peritoneal macrophages ( $5 \cdot 10^5$ /well) from wild type C57BL/6 mice were stimulated for 24 h with increasing concentration of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST as control. LPS was used as a positive control. C-F) TLR4, CD14 and MD2 cell surface membrane proteins are essential for TNF- $\alpha$  and IL-10 production by Tat. Macrophages were isolated from Wt mice or mice KO for TLR4, TLR2 (C-D) or CD14 or MD2 (E-F). The cells were stimulated with increasing concentrations of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45 or GST as control. Positive control experiments were performed by using the following TLR ligands: LPS (TLR4-CD14-MD2) and Pam<sub>3</sub>CsK<sub>4</sub> (TLR2-CD14). G-H) Human monocytes were pretreated with blocking antibodies, anti-CD14 or anti-MD2 (0.1 - 1  $\mu$ g/ml) for 60 min. Cells were then stimulated with GST or GST-Tat 1-101 (100 nM). I-J) TNF- $\alpha$  and IL-10 production in peritoneal washes from Wt (I) or TLR4 KO mice (J) injected with Tat protein. The data represent means  $\pm$  SD of three independent experiments.

# Figures

Figure 1

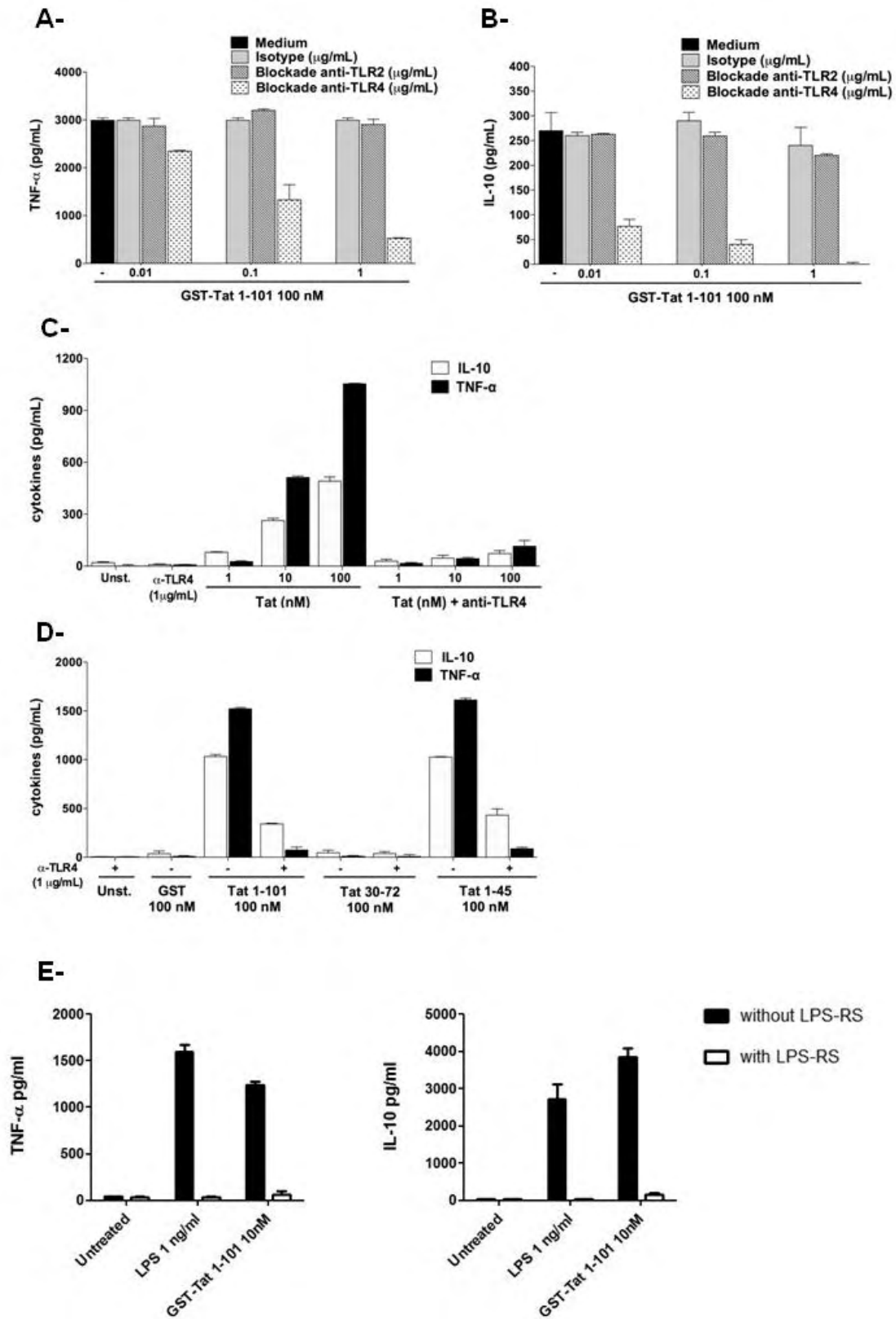


Figure 2

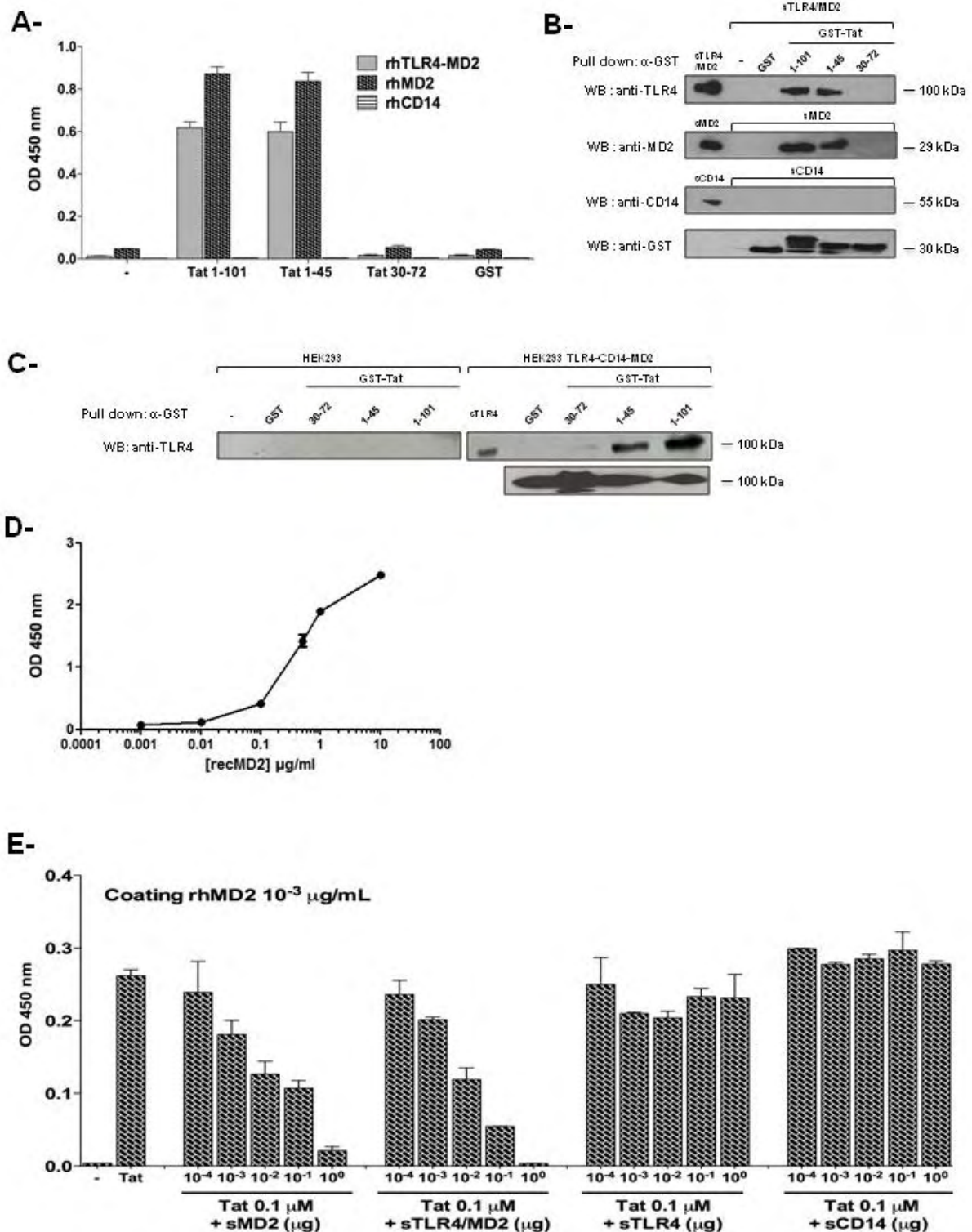


Figure 3

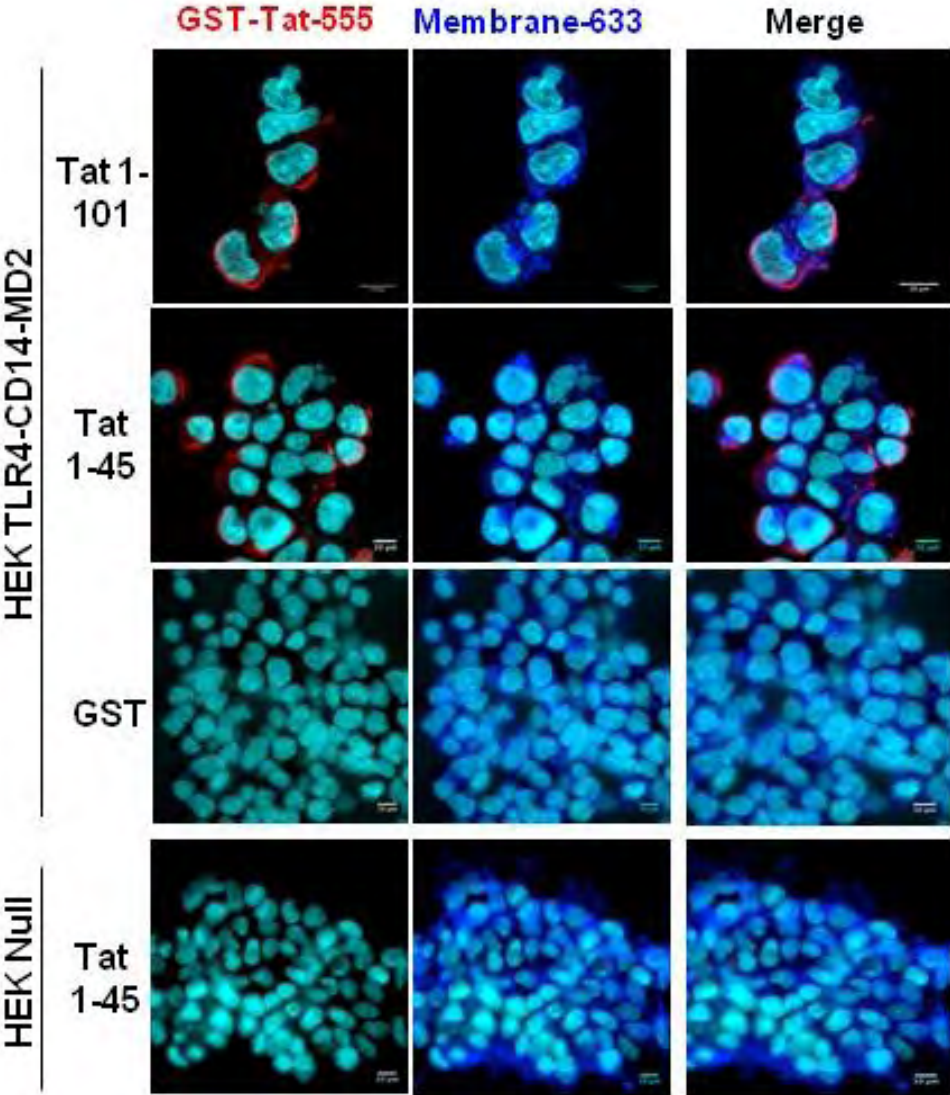
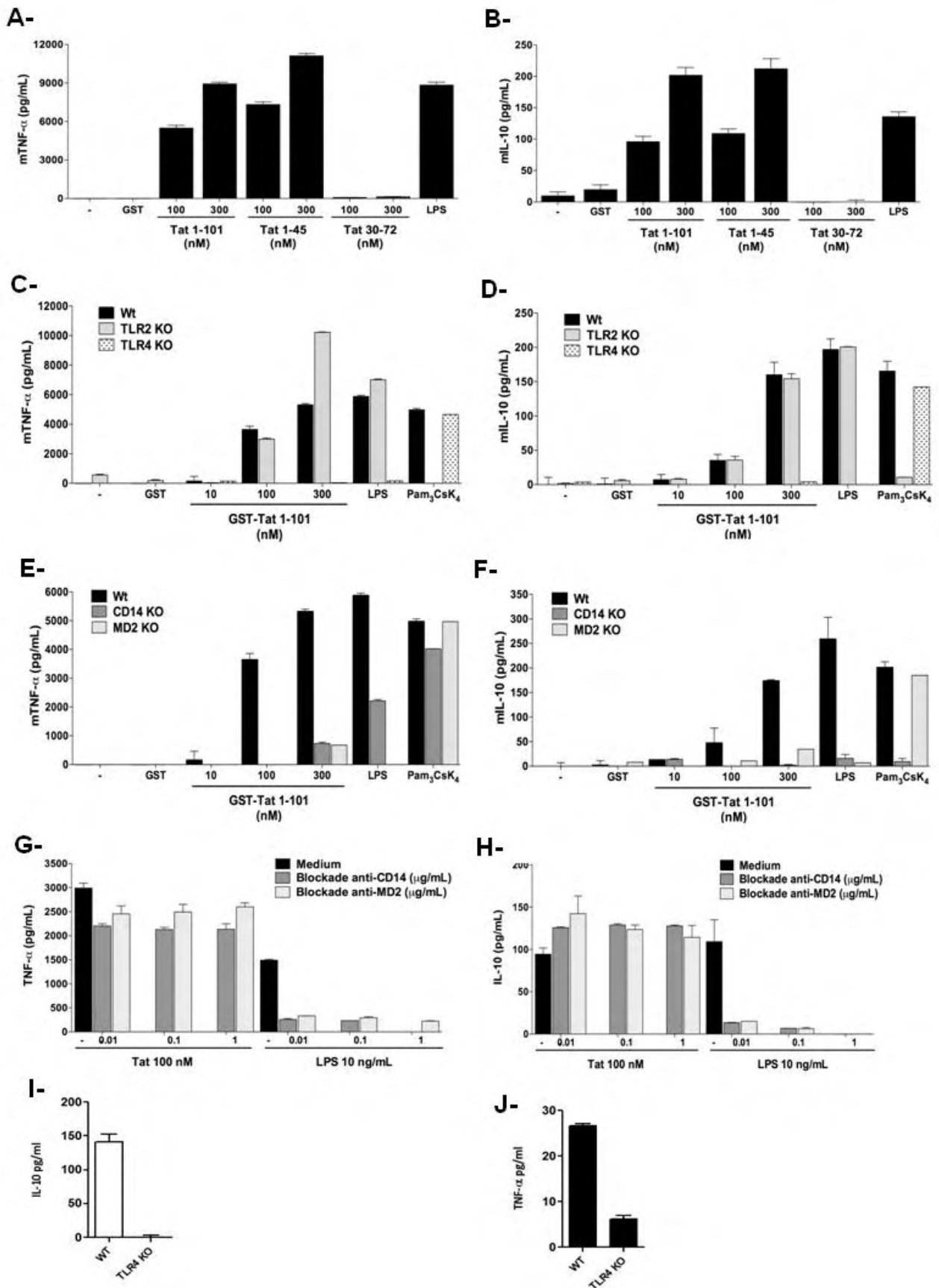


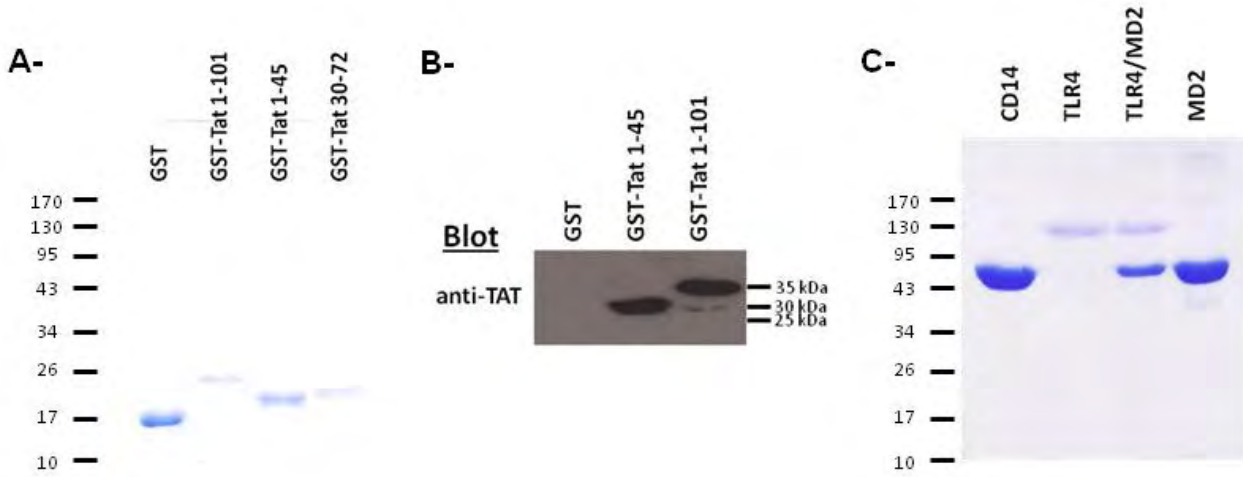
Figure 4



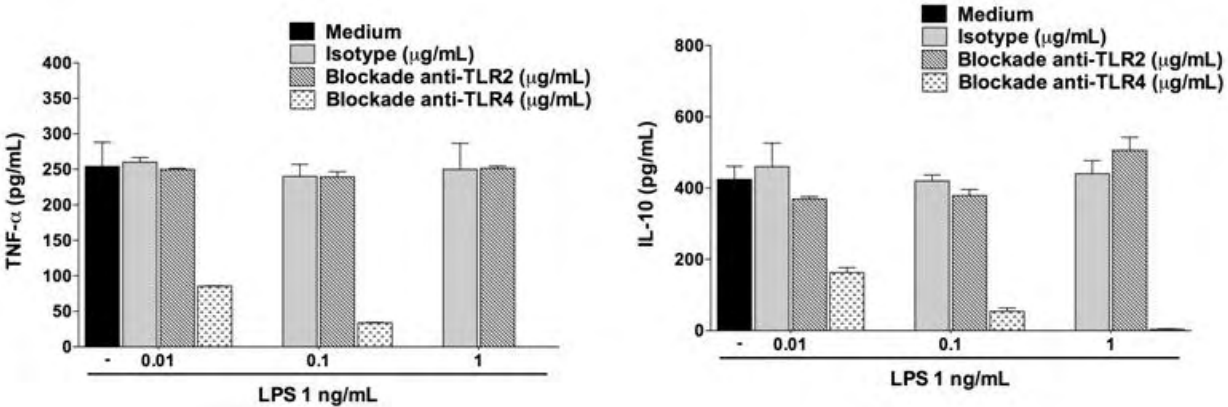


# Additional Figures

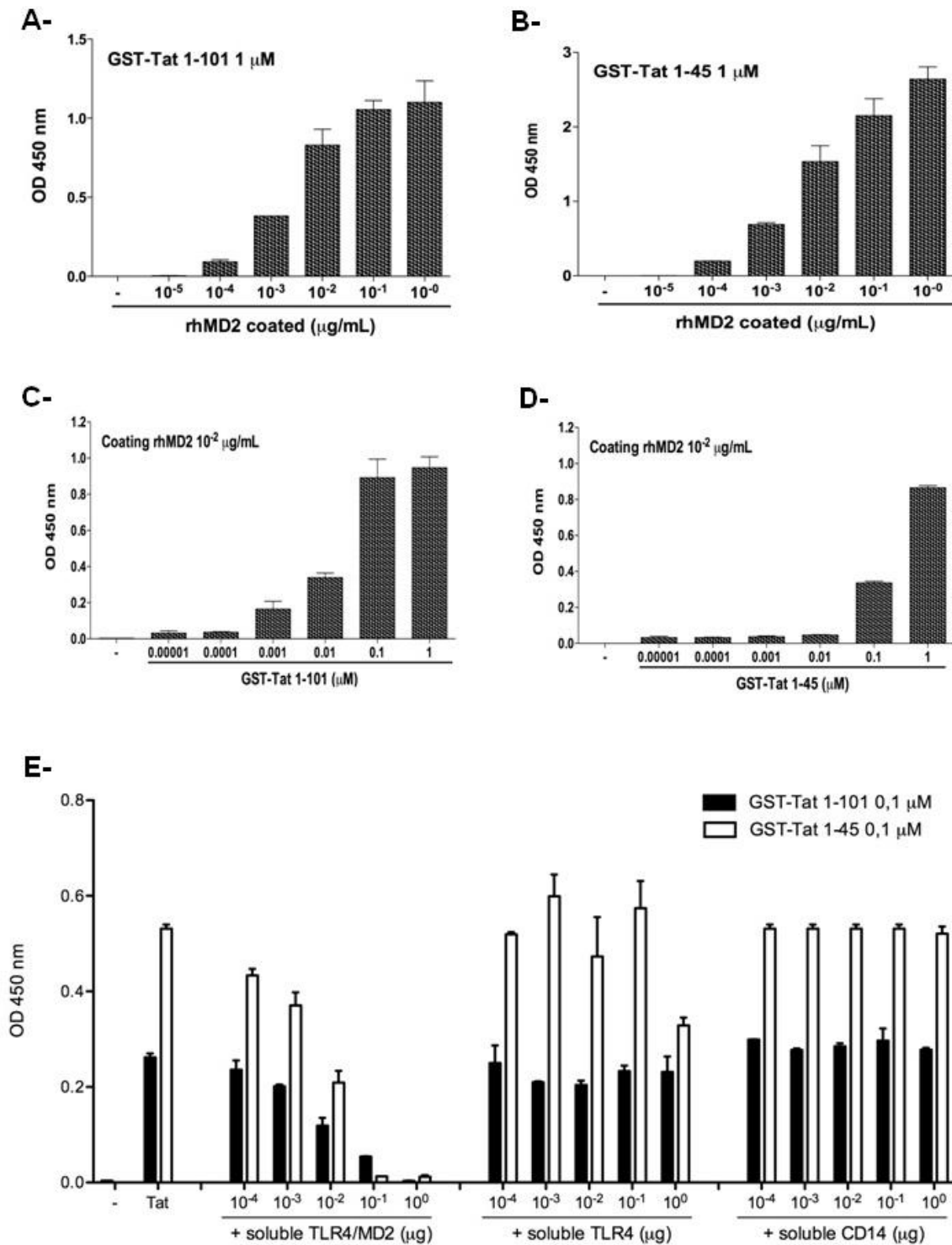
Additional Figure 1



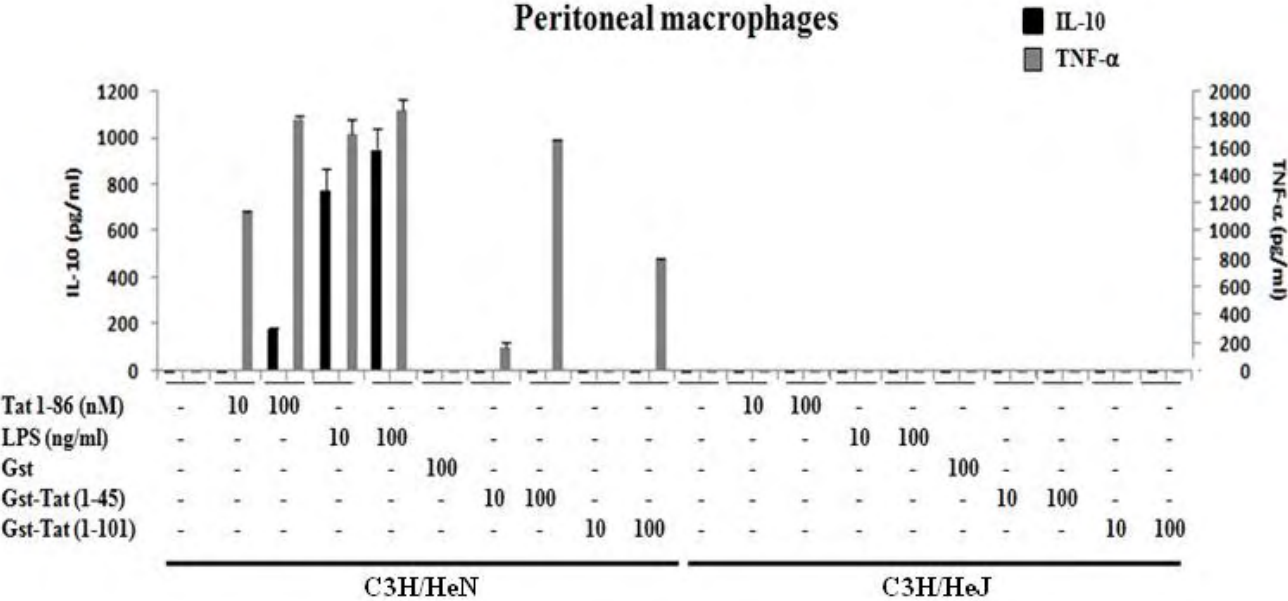
Additional Figure 2



Additional Figure 3



Additional Figure 4



## References

1. Uchil, P.D. and W. Mothes, *HIV Entry Revisited*. Cell, 2009. **137**(3): p. 402-4.
2. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
3. Boasso, A. and G.M. Shearer, *Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis*. Clin Immunol, 2008. **126**(3): p. 235-42.
4. Mir, K.D., et al., *Simian immunodeficiency virus-induced alterations in monocyte production of tumor necrosis factor alpha contribute to reduced immune activation in sooty mangabeys*. J Virol, 2012. **86**(14): p. 7605-15.
5. Clerici, M., et al., *Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 768-75.
6. Lepelley, A., et al., *Innate sensing of HIV-infected cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001284.
7. Schmidt, B., et al., *HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration*. Virology, 2005. **343**(2): p. 256-66.
8. Breckpot, K., et al., *HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5627-36.
9. Ishii, K.J., et al., *Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 352-63.
10. Leghmari, K., Y. Bennasser, and E. Bahraoui, *HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(12): p. 947-62.
11. Badou, A., et al., *Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10551-62.
12. Bennasser, Y. and E. Bahraoui, *HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta*. Faseb J, 2002. **16**(6): p. 546-54.
13. Contreras, X., Y. Bennasser, and E. Bahraoui, *IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes*. Microbes Infect, 2004. **6**(13): p. 1182-90.
14. Lotz, M., I. Clark-Lewis, and V. Ganu, *HIV-1 transactivator protein Tat induces proliferation and TGF beta expression in human articular chondrocytes*. J Cell Biol, 1994. **124**(3): p. 365-71.
15. Zauli, G., et al., *tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression*. Blood, 1992. **80**(12): p. 3036-43.
16. Frankel, A.D., *Activation of HIV transcription by Tat*. Curr Opin Genet Dev, 1992. **2**(2): p. 293-8.
17. Feng, S. and E.C. Holland, *HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 165-7.
18. Goldstein, G., *HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 960-4.
19. Westendorp, M.O., et al., *Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 497-500.

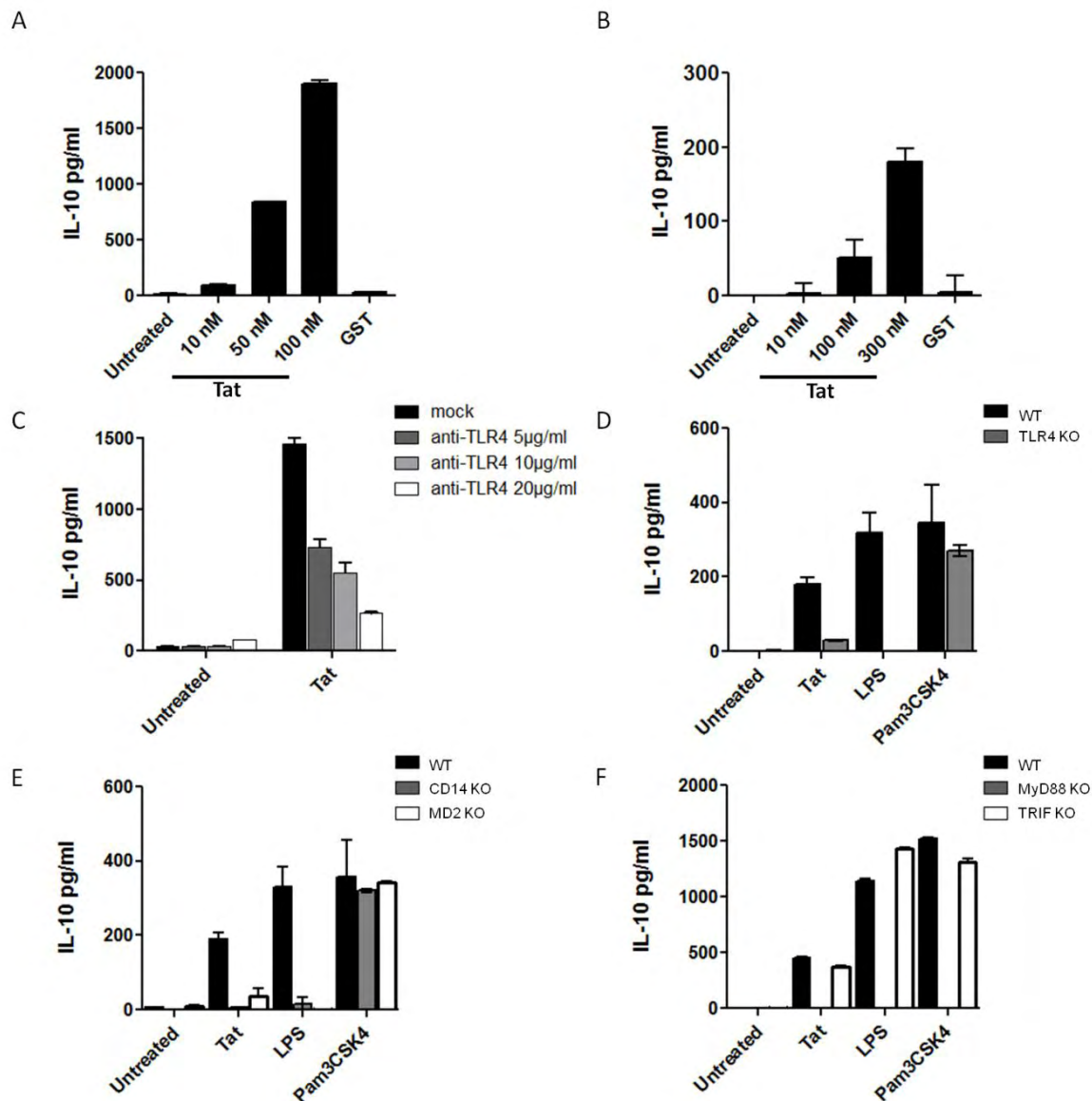
20. Xiao, H., et al., *Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11466-71.
21. Urbinati, C., et al., *HIV-1 Tat and heparan sulfate proteoglycan interaction: a novel mechanism of lymphocyte adhesion and migration across the endothelium*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3335-42.
22. Ensoli, B., et al., *Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 277-87.
23. Howcroft, T.K., et al., *Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1320-2.
24. Kim, T.A., et al., *HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2629-37.
25. Sabatier, J.M., et al., *Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 961-7.
26. Li, C.J., et al., *Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein*. Science, 1995. **268**(5209): p. 429-31.
27. Canani, R.B., et al., *Inhibitory effect of HIV-1 Tat protein on the sodium-D-glucose symporter of human intestinal epithelial cells*. Aids, 2006. **20**(1): p. 5-10.
28. Gutheil, W.G., et al., *Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6594-8.
29. Contreras, X., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production*. Virology, 2005. **332**(1): p. 316-28.
30. Rubartelli, A., et al., *HIV-1 Tat: a polypeptide for all seasons*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 543-5.
31. Albini, A., et al., *HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor*. Oncogene, 1996. **12**(2): p. 289-97.
32. Akira, S., *TLR signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 1-16.
33. Coats, S.R., et al., *MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize Escherichia coli lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4490-8.
34. Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh, *Accessory molecules for Toll-like receptors and their function*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 168-79.
35. Debaisieux, S., et al., *The ins and outs of HIV-1 Tat*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 355-63.
36. Shin, H.J., et al., *Kinetics of binding of LPS to recombinant CD14, TLR4, and MD-2 proteins*. Mol Cells, 2007. **24**(1): p. 119-24.
37. Kirkland, T.N., et al., *Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24818-23.
38. Thomas, C.J., et al., *Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response*. FEBS Lett, 2002. **531**(2): p. 184-8.
39. Nagai, Y., et al., *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 667-72.
40. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
41. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1492-500.

42. Haynes, L.M., et al., *Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10730-7.
43. Rassa, J.C., et al., *Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2281-6.
44. Boehme, K.W. and T. Compton, *Innate sensing of viruses by toll-like receptors*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 7867-73.
45. Said, E.A., et al., *Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection*. Nat Med. **16**(4): p. 452-9.
46. Favre, D., et al., *Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease*. Sci Transl Med. **2**(32): p. 32ra36.
47. Weissman, D., G. Poli, and A.S. Fauci, *IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **9**(5): p. 442-9.
48. Finnegan, A., et al., *IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 841-51.
49. Lysakova-Devine, T., et al., *Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4261-71.
50. Abe, T., et al., *Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8953-66.
51. Grela, F., et al., *The TLR7 agonist R848 alleviates allergic inflammation by targeting invariant NKT cells to produce IFN-gamma*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 284-90.

## Résultats supplémentaires

### Quel est le rôle de la voie TLR4 sur la production de l'IL-10 induite par Tat dans les DCs ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux approches complémentaires incluant i) la neutralisation du TLR4 à l'aide d'anticorps anti-TLR4 bloquants et ii) l'utilisation de BMDC myéloïdes provenant de souris WT ou invalidées pour le TLR4. Des MoDC ou des BMDC ont été stimulées avec des doses croissantes de Tat. Après 24h le surnageant est prélevé et les cytokines dosés dans le surnageant par ELISA. Les résultats obtenus montrent que Tat induit une production dose dépendante d'IL-10 par les MoDC (Figure supplémentaire 1A) et les BMDC (Figure supplémentaire 1B). L'incubation des MoDC avec des quantités croissante d'anticorps anti-TLR4 (Clone HTA125) permet d'inhiber la capacité de Tat à induire l'IL-10 (Figure supplémentaire 1C). L'utilisation du modèle de souris KO nous a permis de démontrer que Tat est incapable d'induire l'IL-10 dans des souris TLR4 KO (Figure supplémentaire 1D). Comme contrôle, le traitement des BMDC avec le ligand TLR2 (Pam3CSK4) induit une production de l'IL-10 comparable dans les BMDC de souris WT ou TLR4 KO (Figure supplémentaire 1C). L'implication de la voie TLR4 dans l'effet de Tat à été caractérisée davantage en utilisant des DCs murines provenant de souris invalidées pour les cofacteurs CD14 et MD2, ou les molécules de transduction du signal MyD88 et TRIF. Les résultats présentés dans la Figure supplémentaire 1E montrent qu'en l'absence d'un des cofacteurs du TLR4 CD14 ou MD2, Tat perd sa capacité à induire la production de l'IL-10 dans les BMDC. En revanche la production de l'IL-10 après traitement par le Pam3CSK4 est comparable dans les BMDC provenant de souris WT, CD14 KO ou MD2 KO. L'étude des voies de signalisation du TLR4 recrutées par Tat pour conduire à la production de l'IL-10 Figure supplémentaire 1F montre que l'induction de l'IL-10 par Tat est strictement dépendante de la protéine MyD88. En revanche, la voie TRIF ne semble pas impliquée.



**Figure supplémentaire 1. La protéine Tat du VIH-1 induit la production d'IL-10 par les cellules dendritiques humaines et murines de manière TLR4-dépendante.** A) Des MoDC, sont stimulées avec la protéine Tat du VIH-1 (10, 50, 100 nM). La GST seule (100nM) est utilisée comme contrôle. Après 24h de stimulation, la production d'IL-10 dans le surnageant est dosée par ELISA. B) Des BMDC de souris sauvages (WT) sont stimulées avec des doses croissantes de Tat (10nM, 100nM, 300nM) ou la GST seule (300nM). Après 24h de stimulation, la production d'IL-10 dans le surnageant est dosée par ELISA. C) Les MoDC sont stimulées avec la protéine Tat du VIH-1 (100nM) en présence de quantité croissantes d'anticorps anti-TLR4 bloquants (5 à 20 µg/ml). D) Des BMDC provenant de souris WT ou TLR4 KO, C) Des BMDC provenant de souris WT, CD14 Ko et MD2 KO ou D) Des BMDC de souris WT, MyD88 Ko et TRIF KO sont traitées par la protéine Tat (300nM). Le LPS (1µg/ml), et le Pam3Csk4 (1µg/ml) sont utilisées comme contrôle. Après 24h de stimulation, la production d'IL-10 dans le surnageant est dosée par ELISA.



## Résultats : article 2 (*Planès et al., PLoS ONE, 2013*)

---

### **La protéine Tat du VIH-1 induit l'expression de IDO dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes via un mécanisme direct : effet sur la prolifération des lymphocytes T**

L'infection par le VIH-1 est associée à un affaiblissement du système immunitaire dont l'aggravation conduit inévitablement au stade SIDA. Cet affaiblissement est le résultat de l'association de plusieurs facteurs incluant : 1) une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IFN- $\alpha$ ) ; une surexpression des facteurs immunosuppresseurs dont 2) l'interleukine 10, 3) les molécules de costimulation négatives PD-1/PD-L1, et 4) l'enzyme immunosuppressive indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). L'ensemble de ces facteurs agissent négativement sur la réponse immunitaire en perturbant la fonction des cellules présentatrices d'antigènes afin d'instaurer un état immunosuppresseur. Parmi les facteurs viraux impliqués, la protéine Tat du VIH-1 qui est sécrétée par les cellules infectées et qui se retrouve à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans le sérum, favorise l'apparition des troubles immunitaires, en modifiant les fonctions physiologiques des cellules dendritiques essentiellement en stimulant en l'expression de facteurs immunosuppresseurs.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de la protéine Tat du VIH-1 sur l'expression de IDO dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs). Cette enzyme a des propriétés immunosuppressives et une augmentation de son activité est associée à une progression de la maladie vers le stade SIDA. Les résultats que nous avons obtenus montrent que Tat induit l'expression et l'activation de la protéine IDO de manière dose-dépendante. L'utilisation de différents fragments de la protéine Tat nous a permis de montrer que le domaine N-terminal, Tat 1-45, mais pas la région centrale, Tat 30-72, est suffisant pour induire l'expression et l'activation de IDO, de manière similaire à la protéine Tat entière Tat 1 - 101. En plus de IDO, Tat est également capable de stimuler la production de plusieurs cytokines dans les MoDCs, dont l'IFN- $\gamma$ , un puissant inducteur de IDO. Afin de comprendre le mécanisme mis en jeu par Tat pour conduire à l'expression de IDO, via un mécanisme direct ou indirect suite à production d'IFN- $\gamma$ , des expériences complémentaires ont été réalisées. Nous avons montré que : i) au niveau cinétique, l'expression de IDO est induite bien avant la détection de la production d'IFN- $\gamma$  ; ii) le traitement des MoDCs avec du milieu conditionné par Tat est incapable de stimuler l'expression de IDO ; iii) L'utilisation d'un système de co-culture de MoDCs séparées par une membrane perméable aux facteurs solubles, montre que l'expression de IDO est détectable uniquement dans le compartiment de MoDCs qui ont été au contact préalable avec Tat ; iv) dans un système de co-culture directe, l'expression de IDO n'est induite que dans les cellules qui ont été préalablement stimulées par Tat ; v) le blocage des voies de signalisations Jak ou PI3K à l'aide des inhibiteurs chimiques Jak I et LY294002 inhibe l'action de l'IFN- $\gamma$  mais n'a aucun effet sur la capacité de Tat à induire IDO. L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine Tat induit l'expression de IDO dans les MoDCs dans un mécanisme direct, indépendant de la production d'IFN- $\gamma$ , en agissant au niveau membranaire. Au niveau fonctionnel, nos données montrent que le traitement de MoDCs avec Tat conduit à l'altération de leur capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T. Cette inhibition est totalement restaurée en présence du 1MT, un inhibiteur de l'activité IDO, démontrant l'implication de la voie IDO.

En conclusion, ces travaux mettent en évidence un nouveau mécanisme mis en jeu par le VIH-1, via sa protéine Tat, pour stimuler l'expression d'IDO dans les cellules dendritiques, un phénomène connu pour favoriser l'affaiblissement de la réponse immunitaire et la progression de la maladie vers le SIDA.



**HIV-1 Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived-dendritic cells through a direct mechanism: effect on T cells proliferation**

Rémi Planès<sup>1-3</sup>, Elmostafa Bahraoui<sup>1-3</sup>.\*

1: Université Paul Sabatier, EA 3038, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

2: INSERM, U1043, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

3: CNRS, U5282, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

\* *Corresponding Author: [bahraoui@cict.fr](mailto:bahraoui@cict.fr)*

**Keywords:** HIV-1, Tat, IDO, MoDC, immune evasion

**Running Title:** HIV-1 Tat protein induces IDO production

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: RP - EB.

Performed the experiments: RP.

Analyzed the data: RP - EB.

Contributed reagents/materials/analysis tools: RP - EB.

Wrote the paper: RP- EB

## **Abstract**

During HIV-1 infection, an increase of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression, and dendritic cells (DC) dysfunction were often associated with AIDS disease progression.

In this work, we investigated the effect of HIV-1 Tat protein on the expression of IDO, in MoDCs. We show that Tat induces IDO protein expression and activity in a dose dependent manner by acting at the cell membrane. Using Tat-mutants, we show that the N-Terminal domain, Tat 1-45, but not the central region, Tat 30-72, is sufficient to induce the expression of active IDO. Tat protein is also able to induce several cytokines in MoDCs, including IFN- $\gamma$ , a strong inducer of IDO. In order to understand whether IDO is induced directly by Tat protein or indirectly following IFN- $\gamma$  production, complementary experiments were performed and showed that: i) at the kinetic level, Tat induced IDO expression before the production of IFN- $\gamma$  ii) treatment of MoDCs with Tat-conditioned medium was unable to stimulate IDO expression, iii) coculture of MoDCs in a transwell cell system did not allow IDO expression in MoDCs not previously treated by Tat, iv) direct contact between Tat-treated and untreated MoDCs was not sufficient to induce IDO expression in a Tat-independent manner, and v) treatment of MoDCs in the presence of IFN- $\gamma$  pathway inhibitors, Jak I and Ly294002, inhibited IFN- $\gamma$ -induced IDO but had no effect on Tat-induced IDO.

At the functional level, our data showed that treatment of MoDCs with Tat led to the inhibition of their capacity to stimulate T cell proliferation. This impairment was totally abolished when the stimulation was performed in the presence of 1MT, an inhibitor of IDO activity, arguing for the implication of the kynurenine pathway.

By inducing IDO, Tat protein may be considered, as a viral pathogenic factor, in the dysregulation of the DC functions during HIV-1 infection.

## Introduction

Dendritic cells (DCs) play a pivotal role during HIV-1 infection by promoting both dissemination and viral escape. During sexual transmission, HIV-1 particles are captured by DCs, through gp120-DC-SIGN interaction, and transported to the draining lymph nodes, where T4-lymphocytes are infected [1]. DC-HIV-1 interactions are also involved in the immune system dysregulation following modulations of DC phenotypes and functions. A decrease in the ability to activate T cells has been reported [2]. This was linked to a defect in antigen presentation associated with a loss of MHC-II [3] and CD83, CD86 costimulatory molecules [4]. In parallel, DC-HIV-1 interactions are also associated with a great increase of pro-inflammatory cytokines and various immunosuppressive factors including indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) [5]. All these elements contribute to the impairment of an efficient immune response, an impairment that persists during the chronic state.

Identifying the viral factors implicated in DC dysfunction and induced immunosuppressive factors seems to be crucial for understanding the molecular mechanisms of HIV-1 immunopathology and for the development of anti-HIV-1 treatments. One of the potential candidate is HIV-1 Tat protein. Tat is a 14 kDa protein, composed of a single polypeptide of 86 to 101 amino acids, with a transactivating activity. By binding to the TAR (Tat activation region) on the nascent viral RNA, Tat protein recruits various cellular factors, including cyclin T1 and CDK9, to form TAK (Tat associated complex kinase) which is essential for the elongation of viral transcripts [6]. At structural level, Tat contains six identifiable domains, including the cystein-rich (aa 20-31), the core (32-47) and the basic (49-57) domains, which are essential for the transactivating activity [7]. The basic domain of Tat is also essential for Tat internalization and nuclear localization [8]. Despite the absence of signal peptide, Tat protein is secreted, as an early gene product, by infected cells. The protein released can then be taken up both by infected cells to transactivate HIV-1 replication and by uninfected cells to modulate various functions [9]. Secreted HIV-1 Tat has been found as soluble protein in the sera of HIV-1-infected patients at nM levels (0.1 to 4 nM) [10,11]. However, these concentrations are probably underestimated, and are most likely higher in the neighbouring infected cells.

At functional level, several reports have shown that Tat protein has numerous effects, including production of pro- and anti-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  [12], IL-6 [13,14], IL-1 $\beta$  [15], IL12 [16], IL10 [17-19], chemokine receptor increase CXCR4 [20] and CCR5 [21] and

apoptosis of T-lymphocytes [22,23]. Thus, by affecting the production of these factors and others (review in [9,24,25]), HIV-1 Tat protein might play a key role in viral pathogenesis. In this study, we focused on one potential immunosuppressive mechanism involving catabolism of tryptophan, an essential amino acid, by IDO following its induction by HIV-1 Tat protein in dendritic cells [26].

Human IDO is an intracellular monomeric protein of 45 kDa, with oxygenase activity that catalyzes the cleavage of L-tryptophan into N-formyl-kynurenine. Subsequently, kynurenine is catabolyzed by a range of other enzymes constitutively expressed to lead to the production of other important metabolites such as hydroxykynurenine, quinolinic acid, and Kynurenic acid [27,28]. However, IDO is still the rate limiting enzyme in the kynurenine pathway. While IDO is present in several cells, mainly in macrophage and dendritic cells, another oxygenase, named TDO (tryptophan 2,3-dioxygenase), with a more strict specificity for tryptophan degradation, is present essentially in the liver [29]. TDO is a homotetrameric protein of 134 kDa that regulates plasma levels of tryptophan. Its expression is induced by tryptophan, tyrosine, histidine and kynurenine. IDO is a more regulated gene product that is inducible in antigen presenting cells, essentially by two major cytokines, IFN $\gamma$  and TGF $\beta$ , acting through Jak/stat and PI3K respectively [30-32].

Early reports underlined the antimicrobial action of IDO, essentially on microorganisms such as *Clamydia pneumoniae* [33] and *toxoplasma gondii* [34], which are unable to synthesize their own tryptophan. This observation can be related, at least in part, to the capacity of IFN $\gamma$ , a strong inducer of IDO, to block the growth of the parasite [34]. In addition to its involvement in defense against pathogens, an accumulation of recent data highlights the immunoregulatory properties of IDO on T-cell proliferation [35-37], apoptosis [5,35] and Treg differentiation [31,38-40].

During HIV-1 infection, an increase of tryptophan catabolism has been shown in the plasma of HIV-1 infected patients [41]. This increase was observed more in HIV-1 non-controllers (CD4-T cells less than 350/ $\mu$ l and viral load > 10 000 RNA copies/ml) than in HIV-1 controllers (CD4-T cells more than 500/ $\mu$ l and viral load < 2000 RNA copies/ml) [5]. The increase in tryptophan catabolism was associated with a substantial expression of IDO in lymph nodes and gastro intestinal mucosa [5]. The expression of IDO was found predominantly in myeloid dendritic cells [5]. Other studies have also reported increased expression of IDO in macrophages [42] and plasmacytoid dendritic cells [43]. This IDO activity is associated with immunological disorders including, inefficient immune response, T

cell exhaustion and neurological dysfunction and injury [44,45]. As shown for TNF- $\alpha$  [46,47], a proinflammatory cytokine, and IL-10 [48-50], a highly immunosuppressive cytokine, IDO expression/activity also seems to parallel AIDS disease progression. Thus, an important issue is to identify the direct and/or indirect viral factors involved in the expression and activation of the IDO pathway. Different viral proteins have been reported to be involved, including the envelope glycoprotein gp120 [43], and the regulatory proteins Nef and Tat [51-53], which could act directly or indirectly via the induction of proinflammatory cytokines. In macrophages, IDO expression by HIV-1 infection is known to be mediated by INF- $\gamma$  production [42]. In plasmacytoid dendritic cells (pDC), in vitro exposure to HIV-1 stimulates IDO expression after direct attachment of gp120 to CD4, or alternatively by inducing TLR7 pathway and IFN- $\gamma$  production [43,54]. Although some studies have reported the implication of HIV-1 Tat protein in the induction of IDO [52], the mechanism of this induction and its effect on T-cell proliferation have not been investigated. These two important questions constitute the aim of the present study.

## **Materials and Methods**

### **Ethics statement**

This study was approved by the Research Ethical Comity Haute-Garonne. Human Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coat, from healthy donors. Buffy coats were provided anonymously by the EFS (établissement français du sang, Toulouse, France). Written informed consents were obtained from the donors under EFS contract N° 21/PVNT/TOU/INSERM01/2011-0059, according, to “Decret N° 2007-1220 (articles L1243-4, R1243-61)”.

### **Materials**

Tat protein: Recombinant HIV-1 Tat protein (aa 1–86) from HIV-1 Lai strain was obtained from “Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA” (Paris, France), glutathione S-transferase (GST), GST-Tat full length protein (1-101) from HIV-1 strain SF2 or deleted mutants GST-Tat 1-45 and GST-Tat 30-72 were produced and purified in our laboratory as previously described [17]. The level of endotoxin in all these recombinant proteins was assessed using the Limulus amoebocyte lysate assay (Bio-Septra, Villeneuve la Garenne, France) and was shown to contain less than 0.3 EU/ $\mu$ g, the limit of detection of this test.

Chemical products: LPS, from *E. coli* serotype R515, was purchased from Alexis biochemicals. Chemical inhibitors of phosphoinositide 3-kinases (LY 294002) and Janus kinase inhibitor (JAK Inhibitor I) were purchased from Calbiochem. L-tryptophan, L-Kynurenine, 1-Methyl Tryptophan (1MT), DMSO and Ehrlich's reagent were from Sigma-Aldrich. CellTrace CFSE Proliferation kit was purchased from Invitrogen.

Recombinant cytokines and antibodies: Recombinant human IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  cytokines were purchased from eBioscience. Recombinant GM-CSF and IL-4 were from HumanZyme. Anti-human-IDO, Mab, were purchased from Abcam. Secondary rabbit antibodies coupled with HRP were from Dako and those coupled with APC, produced in goat, were purchased from Abcam. Anti- $\beta$ -actine, AC-15, Mab, were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-CD3, OKT3, Mab, and anti-CD11c-FITC were from eBioscience. Anti-IL-10, #25209, Mab, were purchased from R&D system. Anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 633 were from Invitrogen. Fluorochrome-conjugated antibodies anti-CD1a-FITC, anti-CD14-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE, anti-CD83-FITC, anti-HLA-DR-FITC and isotype control were from Biolegend. Anti-Tat antibodies were obtained from ANRS. Anti-GST antibodies were produced in our laboratory as described by [55].

### **Generation of monocyte-derived dendritic cells**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of healthy blood donors (EFS, Toulouse) by centrifugation on Ficoll paque (GE Healthcare). Monocytes were isolated by adherence to tissue culture plastic on 6-well plates (Beckton Dickinson) for 1 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed and adherent cells were washed three times with PBS, then used for the generation of dendritic cells. When analyzed by flow cytometry, more than 94% of this adherent population was CD14<sup>+</sup>. To allow them to differentiate into monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), CD14<sup>+</sup> cells were cultured in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Invitrogen), containing penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml), 10 ng/ml recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) and 10 ng/ml interleukin-4 (IL-4). Alternatively, monocytes were also isolated by positive selection using a CD14<sup>+</sup> isolation kit (Myltenyi biotec). After 5 days of culture, loosely adherent cells were recovered by gentle pipetting and used as immature dendritic cells in our experiments. Over 90% of cells had the standard phenotype of immature dendritic cells: CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>.



### **Treatment of monocyte-derived dendritic cells with Tat**

At least 1 hr before treatment, MoDCs were resuspended in RPMI complete medium (supplemented with 10% FCS containing penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at  $1 \cdot 10^6$  cells /ml in 6-well plates. Cells were then treated with Tat protein or its derivatives, in the presence or absence of inhibitors for a period of 24h or alternatively as indicated. Cell culture supernatants were collected and kept frozen until cytokine quantification, while cells were recovered and used for the quantification of IDO expression and activity. For signalling pathways blockade, MoDCs were treated with chemical inhibitors for 30 min before stimulation with Tat or IFN- $\gamma$ .

To obtain Tat conditioned medium, MoDCs were treated with Tat for 1h and then washed three times with PBS to eliminate soluble Tat. Culture was then conducted for 24h. Cell supernatant was recovered, centrifuged for 10 min at 1200 rpm and the supernatant was used directly as Tat conditioned medium.

The transwell experiments were performed in 6-well plates (Becton Dickinson). Untreated MoDCs were cultured in the lower compartment. In the upper chamber of a 1- $\mu$ m transwell insert (from Becton Dickinson) we added autologous MoDCs previously incubated with Tat for 1 h and washed three times with PBS. Cells were kept in co-culture in the transwell for a further 24 h.

In a direct co-culture experiment, we mixed CFSE-labelled MoDCs with autologous unlabelled MoDCs previously treated with Tat for 1h. After three washes and 24h of incubation, MoDCs were recovered and CFSE-labelled and unlabelled MoDCs were separated by cell sorting using FACS Aria II (Becton Dickinson) and analyzed separately for IDO expression.

### **Analysis of IDO expression and activity**

IDO protein expression in MoDCs was investigated by immunoblot analysis. MoDCs previously stimulated or not by different ligands, were lysed by 20-min treatment in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.2% SDS, pH 7.4 and containing a protease inhibitor cocktail) on cold. Protein concentrations in cellular extracts were determined by Bradford assay. For the analysis of IDO expression, equal amounts of protein (80-100 µg) were separated by 12% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were saturated in Tris-buffered saline (TBS) with 0.05% Tween 20 containing 5% non-fat milk (pH8) for 1 hr and then incubated, overnight, with anti-human IDO antibodies (3 µg/ml) at 4°C. After three washes with TBS 0.1% Tween 20, the

membranes were further incubated with a secondary antibody (rabbit anti-mouse IgG HRP) for 1h at room temperature. After three washes, immunoreactive bands were detected with a chemiluminescent substrate (Pierce). To control the protein load, membranes were first dehybridized by incubation in glycine 0.1M, 0.1% NP40, 1% SDS, pH 2.2 buffer for 20 minutes and then used for  $\beta$ -actin detection by using the anti- $\beta$ -actin, AC-15, Mab.

For intracellular detection of IDO by flow cytometry on a FACSCalibur (Becton Dickinson), MoDCs were first washed once with PBS, 5 mM EDTA, and then once with PBS, 5% FCS. Cells were then incubated for 30 min on cold with anti CD11c-FITC (1/10). After 2 washes with PBS 5% FCS, cells were treated for intracellular IDO labelling using the intracellular staining kit from BD Bioscience according to the manufacturer's instructions. For IDO detection, intracellular staining was performed by an indirect labelling assay using a primary mouse anti-human IDO (1/100) for the first step and a goat anti-mouse IgG2b-APC conjugated antibody (1/200) for the second step.

To evaluate the activity of IDO in catabolizing tryptophan into kynurenine, MoDCs were resuspended in Hanks buffered saline solution (HBSS) supplemented with 500  $\mu$ M L-tryptophan and incubated for 2 to 4 hr at 37°C. Supernatants were harvested and kynurenine was quantified by Ehrlich's Assay. Briefly, supernatant was cleared of its protein contents by treatment with 30% trichloroacetic acid followed by 5 min of centrifugation at 10000 rpm. Then, 100  $\mu$ l of soluble phase was mixed with 100  $\mu$ l of Ehrlich's reagent (25 mg/ml of 4-dimethylaminobenzaldehyde in glacial acetic acid) in 96-well plates. The OD was measured at 492 nm and kynurenine concentrations were calculated using a kynurenine standard curve.

### **T-cell proliferation assay**

In the T-cell proliferation assay, the non-adherent fraction of PBMC, or CD14 negative untouched cells, were used as Peripheral Blood Lymphocytes (PBL). These cells were first labelled with 2  $\mu$ M CellTrace CFSE Proliferation kit (Invitrogen). Labelled PBL were then cocultured with autologous MoDCs in round-bottomed 96-well plates at the ratio of  $4 \cdot 10^5$  PBL for  $2 \cdot 10^5$  MoDC. Before PBL was added to the coculture, MoDCs were either treated with the IDO inhibitor 1MT for 2 hr or left untreated. T-cell proliferation was stimulated by anti-CD3, OKT3, Mab (10 ng/ml) in a total volume of 200  $\mu$ l of RPMI complete medium. At day 5 post activation, cells were harvested and labelled with anti-human CD3 used as primary antibody followed by detection with anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 647 conjugated secondary antibody and analyzed by flow cytometry.

### **Antibodies, cytokines and cytokine quantifications**

Cytokine quantification of TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IFN- $\alpha$ 1, IL-12p70 and IFN- $\gamma$  in the cell's supernatants was performed using a specific ELISA kit from eBioscience. Briefly, the first monoclonal antibody was used for capture overnight at 4°C. After three washes with PBS containing 0.05% Tween 20 (wash buffer), plates were saturated by adding 250  $\mu$ l of a protein solution (diluent assay) for one hr at room temperature. After three washes, culture supernatants (100  $\mu$ l/well) were added and incubated for 2 hr at room temperature. Plates were then washed three times and incubated for 1 hr at room temperature with a biotinylated anti-cytokine antibody. After five washes, the bound biotinylated antibody was detected by an additional 30 min incubation with streptavidin peroxidase. After seven washes, plates were incubated with the enzyme substrate (TMB). The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4N) to each well. Absorbance was read at 450 nm with a wavelength correction at 570 nm. Cytokines were quantified from a standard curve generated by using various concentrations of recombinant protein of each cytokine. The limit of detection of each cytokine was 4 pg/ml for TNF- $\alpha$ , 2 pg/ml for IL-10, 2 pg/ml for IL-6, 15 pg/ml for IFN- $\alpha$ 1, 4 pg/ml for IFN- $\gamma$  and 4 pg/ml for IL-12p70.

### **Statistical analysis**

The Mann-Whitney non parametric test was used in this study.

## Results

### **Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived dendritic cells**

To investigate the role of Tat in the induction of IDO, immature MoDCs (Figure S1) were treated with HIV-1 Tat 1-86 from the Lai strain or with GST-Tat 1-101 from the SF2 strain. Both Tat proteins induce the expression of IDO in a dose dependent manner (Figure 1A-B). IDO expression was specific to Tat as shown by its inhibition when the stimulation was performed in the presence of anti-Tat antibodies (Figure 1B). In agreement with the implication of Tat protein, fraction that was depleted of GST-Tat protein (Eluate) with anti-Tat/GST antibodies (Figure S2 A) became unable to induce IDO (Figure 1A). As a positive control, we showed that treatment of MoDC by IFN- $\gamma$ , a potent IDO inducer, stimulated a clear expression of IDO, while no evident IDO detection was observed with LPS treatment (Figure 1C). As a negative control, no IDO expression was obtained when MoDC cells were stimulated in the same conditions with GST alone (Figure 1A). It is interesting to note that no detectable IDO production was observed in non-stimulated cells. This result indicates that IDO expression is observed only after its stimulation by specific inducers such as IFN- $\gamma$  or HIV-1 Tat.

We next analysed the intracellular induction of IDO by Tat using flow cytometry. In agreement with SDS-PAGE and WB data, we showed that, like IFN- $\gamma$  (19% IDO positive cells), Tat protein stimulated IDO expression (18% IDO positive cells), while the percentage of IDO positive cells stimulated by GST (1.6% IDO positive cells) or LPS (0.4% IDO positive cells) remained comparable to that of untreated cells (1% IDO positive cells) (Figure 1D).

To assess whether the Tat induced IDO was enzymatically active, we measured its activity to oxidize L-Tryptophan to kynurenine using a colorimetric assay. The results presented in Figure 1 (A to C) show that the induction of IDO expression, as indicated in Western blot data (upper panels), was associated with kynurenine increase (lower panels) while no enzymatic activity was observed in the culture medium of untreated, LPS- or GST-treated cells. As expected, treatment of cells with IFN- $\gamma$  led to a significant increase in kynurenine (Figure 1 A-C). Altogether, our data show that HIV-1 Tat protein induces a biologically active IDO in a specific manner.

## **HIV-1 Tat protein induces IDO by acting at the cell membrane level**

Tat protein contains a basic domain between amino acids 49 and 57 which is responsible for Tat internalization and its nuclear localization. Thus, Tat protein could induce IDO expression by acting either at the cell membrane or intracellularly. To investigate the mechanism involved, the N-terminal fragment GST-Tat1-45 and the central fragment GST-Tat 30-72 were used, in addition to the total GST-Tat1-101 protein, for MoDC stimulation. Similar to Tat protein, GST-Tat 1-45, but not GST-Tat 30-72 or GST alone, activated the expression of IDO (Figure 1A). In contrast to IDO induction, only the full length GST-Tat 1-101 shows optimal HIV-1 LTR transactivation activity in HeLa cells stably transfected with the gene of  $\beta$ -galactosidase on the control of the HIV-1 LTR promoter (Figure S2 B). These results show that, despite the absence of the basic region 49-57, which is essential for the penetration of Tat, the N-terminal fragment Tat 1-45 is sufficient to stimulate the expression of IDO. This clearly demonstrates that Tat protein mediates IDO induction by acting at cell membrane level.

## **Mechanisms of Tat induced IDO: direct or indirect**

Tat protein can exert its action to stimulate the production of IDO by acting directly or indirectly *via* the production of cytokines. With these possibilities in mind, we first explored the panel of Tat-induced cytokines known for their potential to induce IDO. We showed that Tat protein was able to stimulate the production of TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-6, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (Figure 2A-F). The production of these cytokines is specific to Tat as shown by the absence of cytokine production when MoDCs were stimulated with GST alone (Figure 2A-F). Among these cytokines, only IFN- $\gamma$  is known to be able to stimulate the production of IDO. For this reason, we further characterized the specificity of Tat to induce IFN- $\gamma$  by showing that, when the stimulation of MoDCs was performed in the presence of anti-Tat antibodies IFN- $\gamma$  production was totally inhibited (Figure 2F). Thus we showed, as expected, that IFN- $\gamma$ , but not TNF- $\alpha$ , is capable of stimulating the production of IDO (Figure 3A).

One can wonder whether the IDO production was mediated directly by Tat action or indirectly *via* Tat-induced IFN- $\gamma$ . To explore the mechanism involved, complementary approaches were used. We compared the kinetics of IDO production induced by Tat and IFN- $\gamma$ . The results presented in Figure 3 show that IDO became detectable after 12 h of stimulation by Tat (Figure 3A), while the induction of IDO by IFN- $\gamma$  is induced only after 24 hr of stimulation (Figure 3A). In contrast, TNF- $\alpha$  has no effect on IDO induction even after 24h of

stimulation (Figure 3A). We next analysed the kinetic of cytokine secretion. Tat-induced IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  are significantly produced only after 24 h of Tat treatment (Figure 3B), while TNF- $\alpha$  which is shown to be unable to stimulate IDO production (Figure 3A) is detectable as early as 3 hr post-Tat stimulation and reach the maximum after 6h of treatment (Figure 3B). In agreement with a direct implication of Tat protein in IDO induction, we showed that, when MoDCs were stimulated in the presence of the inhibitors of the IFN- $\gamma$  pathway: Jak I, an inhibitor of Janus tyrosine kinase Jak, and Ly 294002, an inhibitor of PI3K, production of IDO was totally or strongly inhibited when the stimulation of MoDCs was performed with IFN- $\gamma$  (Figure 4A), while these inhibitors had no effect on the capacity of Tat to induce IDO. As controls, treatment of MoDCs with Jak I and Ly 294002 chemical inhibitors or DMSO solvent had no effect on IDO expression and cell cytotoxicity (Figure S3 A-B). Although these data argue for a direct implication of Tat, we cannot exclude the possibilities that, on the one hand, a very low dose of IFN- $\gamma$ , undetectable by our assay, remained sufficient to induce IDO or, on the other hand, another cytokine, not explored in our panel of Figure 2 A-F, was involved.

To determine whether these possible explanations could be excluded, the expression of Tat- induced IDO by MoDCs was analyzed by culturing cells in a transwell co-culture system that allowed factor diffusion between the upper and lower chambers. MoDCs previously treated by Tat and washes were cultured in the upper chamber and untreated MoDCs were cultured in the lower chamber. After 24 hr of coculture, MoDCs from each compartment were harvested and tested by Western blot for IDO expression. Figure 4B shows, as expected, a clear induction of IDO expression in MoDCs that had been previously treated by Tat, while no IDO induction is observed in cells from the lower chamber that were in contact with the medium only (Figure 4B). Taken together, these results suggest that the production of IDO by Tat requires a direct contact of Tat protein with human dendritic cells. This conclusion is also in agreement with the incapacity of Tat-conditioned medium to induce IDO in MoDCs (Figure 4C). However, this does not exclude the possibility that treatment of MoDCs by Tat stimulates new cell membrane factors which in turn can also stimulate the production of IDO in non-Tat-treated cells, following cell-cell interactions.

To investigate this third hypothesis we set up the following protocol. MoDCs were treated with Tat for 1 hr and cocultured with an equivalent fraction of Tat-untreated cells that were labelled with CFSE. 24 hr later, CFSE labelled and unlabelled MoDCs were separated by cell sorting (Figure 4D left panel) and IDO production was analyzed by Western blot in

each fraction. The results depicted in Figure 4D (right panel) show as expected, the presence of IDO in unlabelled cells while, despite cell-cell contact, no induction of the enzyme expression is observed in CFSE labelled MoDC (Figure 4D). These data demonstrate that cell-cell interaction is not sufficient to stimulate IDO induction in non-Tat-treated cells and suggest that induction of IDO in MoDCs is rather mediated by a direct action of HIV-1 Tat protein following its action at cell membrane level.

### **Effect of Tat-induced IDO on the capacity of dendritic cells to stimulate T Cell proliferation**

The results presented above show that Tat protein, by acting at the cell membrane level, induced the production of IDO. This enzyme is known for its capacity to oxidize tryptophan to different metabolites including kynurenine, 3-hydroxykynurenine, and 3-hydroxyanthranilic acid. These metabolites are involved in various functions, including inhibition of cell proliferation, differentiation and apoptosis.

To assess the functional relevance of IDO induced by Tat, we analysed the capacity of Tat-stimulated MoDCs to activate lymphocyte proliferation. To this end, MoDCs pre-treated with Tat were cocultured with autologous PBL, that were loaded with CFSE, in the presence of a suboptimal amount of anti-CD3, OKT3, Mab. Control experiments showed that, in the absence of MoDCs, anti-CD3 antibodies alone induced a low T lymphocyte proliferation (10%) (Figure 5 a-c). In contrast, a more significant T cell proliferation (64%) was obtained when PBL were coculture with MoDCs in the presence of anti-CD3 antibodies (Figure 5d). Treatment of MoDCs with Tat protein prior to coculture led to a significant inhibition of lymphocyte proliferation resulting in a decrease from 64% to 20% (Figure 5e). Similarly, treatment with IFN- $\gamma$  inhibited T-cell proliferation which shifted from 64% to 32% (Figure 5f). To understand the relationship between Tat, IDO expression and the effect of its metabolites on cell proliferation, we tested the effect of kynurenine on lymphocyte proliferation. Addition of kynurenine to the MoDC-PBL coculture inhibited T cell proliferation at similar levels of those observed with Tat protein or IFN- $\gamma$  (from 64% to 38%) (Figure 5g). More interestingly, addition of 1-MT, a known inhibitor of the IDO pathway, abolished Tat inhibitory effect and restore optimal cell proliferation to 64% (Figure 5i and 5l). Similar results were observed with IFN- $\gamma$ -positive control performed in the presence of 1-MT (55% instead of 32%) (Figure 5j, m). As control, we showed that 1-MT had no direct effect on T cell proliferation stimulated with anti-CD3 in the presence of Tat untreated MoDCs (Figure

5h, 5k). In contrast when the coculture was performed in the presence of anti-IL-10 neutralizing antibodies no effect on the restoration of T-cell proliferation was observed (Figure S4).

Altogether, our data suggest that, by acting on the cell membrane of human dendritic cells, HIV-1 Tat protein induces IDO expression and activity that is associated with an inhibition of lymphocyte proliferation.

## **Discussion**

In this study, we have shown that HIV-1 Tat protein induces the expression of IDO in monocyte-derived dendritic cells. Using Tat-deleted mutants, we showed that the Tat active domain is located at the N-terminal region 1-45 of the protein. Because this active domain lacks the basic region 49-57, which is essential for Tat internalization, we can deduce that Tat protein activates IDO production by acting at the cell membrane level. This conclusion is in agreement with several reports showing that Tat protein is able to bind to cell membrane and several receptors have been proposed by different groups, including  $\alpha v\beta 3$ , and  $\alpha 5\beta 1$  [56], CD26 [57], CCR2, CCR3 [58] and CXCR4 [10], V-EGF and b-FGF [59] and L-Type calcium channel [60,61], and low density lipoprotein receptor-related protein [62].

In addition to IDO, it has been shown that Tat protein is also implicated in the induction of the production of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  [12], IL-6 [13,14], IL-1 $\beta$  [15], IL12 [16], and the anti-inflammatory, highly immunosuppressive IL-10 cytokine [17-19,63-66]. All these cytokines, either because of their action to chronically stimulate the immune system, or because of their immunosuppressive action mediated by IL-10 and IDO are produced during HIV-1 infection. Furthermore, their amounts increase with AIDS disease progression [46,49,67-72].

Because Tat protein is also able to induce IFN- $\gamma$ , a strong inducer of IDO, the production of IDO could be induced either directly by Tat or by an indirect pathway via Tat-induced IFN- $\gamma$ . Complementary experiments showed that Tat induced IDO expression by a mechanism that can be considered IFN- $\gamma$  independent for the following reasons: i) At a kinetic level, Tat induced IDO expression before the production of IFN- $\gamma$ . However, this argument does not exclude an intracellular action of IFN- $\gamma$ . ii) Treatment of MoDCs with Tat-conditioned medium was unable to stimulate IDO expression. iii) Coculture of MoDCs in a transwell cell system did not allow IDO expression in MoDCs not previously treated by Tat



when they were cultured in the lower compartment. Moreover, we showed that direct contact between previously Tat treated and untreated MoDCs was not sufficient to induce IDO in untreated MoDCs. All these experiments indicate that Tat protein acts directly at the cell membrane of MoDCs to induce IDO expression. The fact that inhibitors of IFN- $\gamma$  pathway, JakI and Ly294002, had no effect on the capacity of Tat to induce IDO expression in MoDCs adds new arguments in favour of Tat recruiting a new pathway different from that activated by IFN- $\gamma$ . Similar conclusions were drawn by Boasso et al. in their study showing that HIV-1 was able to induce the production of IDO in plasmacytoid cells (pDC) following gp120-CD4 interaction. In addition, they showed that, while anti-CD4 antibodies were able to block IDO production, blocking of IFN- $\alpha/\beta$  or IFN- $\gamma$  had no effect on the induction of IDO expression [43]. They used HIV-1MN, an X4 tropic virus, and HIV-1Ada, an R5 tropic virus, both rendered non replicative by modification with 2,2'-dithiodipyridine (2-AT). However, because this treatment inactivates only the post-binding steps in the HIV-1 cycle but has no effect on the binding and entry of HIV-1, we cannot exclude the possibility that IDO expression observed in the work of Boasso et al. [43] may have been mediated by internal viral proteins. This hypothesis cannot be excluded because Nef and Tat proteins, known for their capacity to stimulate IDO expression, were also found to be associated with HIV-1 viral particles [73,74]. The implication of gp120-CD4 interaction in IDO production suggested in the work of Boasso et al. needs to be confirmed, at least by demonstrating that soluble gp120 of HIV-1 is also able to induce the same effect.

In HIV-1 persistent infection, an abnormal increase in the expression of IDO is often associated with several abnormalities in the balance of the immune system, such as suppression of T cell responses and impairment of the functions of antigen-presenting cells [75-77]. This aberrant increase of IDO expression has also been reported to be associated with an inefficient immune response against viral clearance, and seems to be associated with an expansion of the immunosuppressive T- regulatory cells, and a decrease in the population of antimicrobial Th-17 cells [72]. Expansion of Treg cells is correlated with the increase of FOXP3 and CTLA4 markers, while the diminution of Th17 cell numbers parallels the progressive alteration of the mucosal barrier, leading to LPS translocation in the blood. Some authors associate LPS augmentation in the plasma of HIV-1 infected patients with its potential capacity to stimulate IDO expression [78]. However, at least *in vitro* in our hands, and as reported by others no IDO expression was observed in dendritic cells after treatment with LPS

[79]. However, LPS has been reported, in some studies, to act in synergy with IFN- $\gamma$  for the induction of IDO expression [72].

In agreement with the implication of IDO in the impairment of T-cell response, the present study shows that treatment of MoDCs with Tat leads to an alteration of their capacity to stimulate T cell proliferation. The fact that this inhibitory effect can be abolished in the presence of 1MT, an inhibitor of IDO activity, argues for the implication of Tat-induced immunosuppressive IDO, via the kynurenine pathway, in the inhibition of T cell proliferation. The data presented here are also in agreement with those reported by other groups and showing the capacity of kynurenine pathway inhibitors, including 1MT (1-methyl-tryptophan), to interfere with its effects both *in vitro* [37,76,80] and *in vivo* [81-83]. The first *in vivo* experiments were conducted in two different animal models. SCID (severe combined immunodeficient) mice, reconstituted with human PBMC, and then infected by intracranial administration of autologous HIV-1 infected macrophages were treated with 1MT, an IDO inhibitor, leading to a progressive elimination of HIV-1 macrophages from the brain [83]. In the more interesting model using infection with SIV (simian immunodeficiency virus) the results obtained were less clear. Despite the fact that blockade of CTLA4 in SIV infected macaques was associated with a loss of IDO production and viral load in lymph nodes [84], a more direct experiment based on direct administration of 1MT to SIV-infected macaque showed no inhibitory effect on the SIVmac-251 viral load [85]. However, in another study [82], it was shown that 1MT treatment had a beneficial effect by reducing the viral load in the group of SIV infected macaques selected for their unresponsiveness to antiretroviral therapy.

Overall, our study has shown that HIV-1, by its Tat protein, is able to specifically stimulate IDO expression/activity with the potential to inhibit MoDC-mediated T-cell proliferation. Consistently with our results, the presence of anti-Tat antibody [86] and Tat-specific cytotoxic T cells [87] have been correlated with better control of viremia and slower progression towards AIDS. This mechanism is probably not exclusive, and must be considered in association with other HIV-1 induced immunosuppressive mechanisms such as TGF- $\beta$ , IL-10 and PD-1/PD-L1 [49,88,89]. Because Tat protein is known to be involved in the induction of some of these factors, as a pathogenic factor, it must be considered for the development of specific inhibitors and as an immunogen, for inclusion in the development of a potential anti HIV-1 vaccine candidate.

## Figure legends

**Figure 1. HIV-1 Tat induces IDO protein expression and activity in MoDCs.** Tat protein specifically induces IDO expression/activity in MoDCs. (A) MoDCs ( $2.10^6$ ) were treated with increasing amounts (10, 100, and 200 nM) of full length recombinant GST-Tat 1-101 (SFII strain) or with the truncated forms GST-Tat 1-45, and GST-Tat 30-72 (100 nM). GST protein alone (100 nM) and IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) were used as negative and positive controls respectively. Eluent corresponds to the fraction of GST-Tat not retained following incubation of GST-Tat (100 nM) with anti-Tat/anti-GST coupled to protein A sepharose beads (pharmacia biotech). (B) MoDCs ( $2.10^6$ ) were treated with 50 nM of Tat 1-86 protein (Lai strain) for 24 hr. Untreated and IFN- $\gamma$ -treated (500 ng/ml) cells were used as negative and positive controls respectively. The specificity of Tat was evaluated by treating MoDCs with Tat (50 nM) previously incubated with anti-Tat antibodies (3  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C. (C) MoDCs ( $2.10^6$ ) were treated with LPS (1  $\mu$ g/ml), IFN- $\gamma$  (1 $\mu$ g/ml), GST-Tat 1-101 (50 nM), or kept untreated for 24 hr. For each experiment, the upper panel shows IDO protein expression by immuno-blot, and the loading control ( $\beta$ -actine) in the second line. Lower panels' shows the tryptophan catabolism activity determined by Ehrlich's spectrophotometric assay. (D) Intracellular IDO protein expression was assessed by flow cytometry in CD11c positive MoDCs after stimulation for 24 hr with GST (100 nM), GST-Tat (100 nM), LPS (1  $\mu$ g/ml) IFN- $\gamma$  (500 ng/ml), or untreated MoDC. The settings were made on the control isotype. Data are representative of three to four independent experiments.

**Figure 2. Tat induces the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL12, IFN- $\alpha$ 1 and IFN- $\gamma$  in MoDCs.** MoDCs ( $0.5 \times 10^6$ ) were incubated with increasing amounts of GST-Tat 1-101 protein (10, 50 and 100 nM). Untreated and GST-treated cells were used as controls. The capacity of Tat to induce IFN- $\gamma$  was tested in the presence of anti-Tat antibodies. Untreated and LPS-treated MoDC were used as negative and positive controls respectively. After 24h, cell supernatants were harvested and analyzed for cytokine production by ELISA, including (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IFN- $\alpha$ 1, (D) IL-10, (E) IL-12p70, and (F) IFN- $\gamma$ .

**Figure 3. Kinetics of IDO induction and cytokine production by Tat in MoDCs.** (A) MoDCs ( $2.10^6$ ) were incubated with full length GST-Tat protein 100 nM, IFN- $\gamma$  (100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) or kept untreated for the indicated time. Afterwards, IDO protein expression was assessed by Western blot in cell extracts. (B) The production of cytokine

(TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) at different time points was measured in cell supernatants by ELISA.

**Figure 4. Tat stimulates IDO expression via a direct mechanism.** In order to decipher the mechanism used by Tat to induce IDO protein expression, four different protocols were used. In (A) the role of Janus kinase and PI3K signalling pathways in Tat-induced IDO protein expression was evaluated: MoDCs were treated with Tat protein (100 nM) or IFN- $\gamma$  500 ng/ml in the presence or absence of 1  $\mu$ M Janus kinase inhibitor (JAK Inhibitor I) or 20  $\mu$ M phosphoinositide 3-kinases (LY 294002) inhibitor, IDO protein was detected in MoDC extract by Western blotting experiments, and  $\beta$ -actine was used as loading control. Data are representative of three independent experiments. In (B) autologous Tat-treated ( $2 \cdot 10^6$ ) or untreated MoDCs ( $2 \cdot 10^6$ ) separated by a 1  $\mu$ M transwell insert were put in co-culture for 24h. In the bottom part, MoDCs were untreated and, in the upper chamber, MoDCs had been previously treated with Tat 100 nM for 1h. MoDCs alone and direct IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) stimulation were used as negative and positive controls respectively. In (C) MoDCs ( $2 \cdot 10^6$ ) were incubated in medium conditioned by Tat 100 nM or PBS for 24 hr. Unconditioned medium or direct treatment by Tat (50 nM) were used as controls. In (D) autologous MoDCs ( $10^6$ ) treated, or not, by Tat for 1 h and washed were kept in direct coculture. To discriminate between the two conditions, untreated cells were previously labelled with CFSE (1  $\mu$ M) whereas Tat-treated cells were kept unlabelled. After 24 h, CFSE positive and CFSE negative MoDC were sorted (lower panel) and analyzed separately for IDO expression.

**Figure 5. Tat treated MoDC inhibits T cell proliferation in an IDO dependent mechanism.** Immature MoDCs were incubated for 48 hr with Tat (50 nM), IFN- $\gamma$  (500 ng/ml), or PBS at 37°C. After washing with PBS, MoDCs were put back into culture with or without IDO inhibitor 1MT (500  $\mu$ M). After 2 hr,  $2 \cdot 10^5$  MoDCs were cocultured with  $4 \cdot 10^5$  autologous PBL (a CD14 negative fraction) labelled with 2  $\mu$ M CFSE, and stimulated with anti-CD3, OKT3, Mab (10 ng/ml) or left unstimulated. Direct treatment with kynurenine (500  $\mu$ M) was used as a control. After 5 days, autologous T cell proliferation was monitored by FACS analysis by following CFSE dilution analysis in the CD3 positive population. Overlay show T cell proliferation performed in the absence (purple) or in the presence (red) of 1MT. Histogram plots are representative of two independent experiments.

## Supporting Informations

### **Figure S1. Characterization of Monocytes differentiation into immature MoDCs.**

Monocytes were differentiated into DCs by culture for 5 days with GM-CSF and IL-4. Differentiation was checked by monitoring the specific surface markers CD14, and CD1a, respectively present on monocytes and DCs. The immature status of DCs was verified by the expression of surface markers (CD83, CD80, CD86 and HLA-DR) by flow cytometry.

### **Figure S2. Characterization of GST-Tat recombinant proteins.**

(A) Homogeneity of GST-Tat 1-101 recombinant protein was analysed by 12% SDS-PAGE Electrophoresis. Column 1, shows GST-Tat 1-101 recombinant protein (10  $\mu$ l at 5 $\mu$ M). Column 2, correspond to equal volume of the un bound fraction (Eluent) following incubation of GST-Tat with anti-Tat/anti-GST coupled to protein A sepharose beads (pharmacia biotech). Column 3 shows the retained fraction that has been recovered with acetic acid treatment. (B) Equal amounts of GST, GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45 and GST-Tat 30-72 (1 $\mu$ M) proteins were tested for trans-activation activity. HeLa cells line stably transfected with a plasmid encoding the  $\beta$ -galactosidase protein under the control of the LTR promoter of HIV-1 were incubated with 1  $\mu$ M GST, GST-Tat 1-101 and GST-Tat 1-45 proteins. After 24 hr, cells were washed with PBS, fixed with PBS 0.5% glutaraldehyde and incubated with X-gal as b-galactosidase substrate (0.4mg/ml X-gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). After 24 hr, the number of blue dyed cells, corresponding to transactivated cells were counted in optical microscopes magnifying 400x. The results are represented as numbers of blue cells per field.

### **Figure S3. Absence of cytotoxic effect of PI3K and Jak I on MoDCs.**

MoDCs were treated with of 1  $\mu$ M Janus kinase inhibitor (JAK Inhibitor I), 20  $\mu$ M phosphoinositide 3-kinases (LY 294002) inhibitor or diluent DMSO alone. After 24h, (A) cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. (B) The effect of chemical inhibitors on basal expression of IDO was also analysed. GST-Tat 1-101 (100 nM) treatment was used as a positive control for IDO expression. IDO protein was detected in MoDC extract by Western blotting experiments and  $\beta$ -actine was used as a loading control.

### **Figure S4. IL-10 blockade do not restore the capacity of Tat-treated MoDCs to stimulate T cells proliferation.**

Immature MoDCs were incubated with GST-Tat 1-101 (50 nM), GST (50 nM), or equal volume of PBS during 48 hr at 37°C. After washing with PBS, 2x10<sup>5</sup> MoDCs were cocultured with 4x10<sup>5</sup> autologous PBL, previously labelled with 2  $\mu$ M CFSE, with or without anti-IL-10 (20 $\mu$ g/ml). T cells proliferation was stimulated with anti-CD3

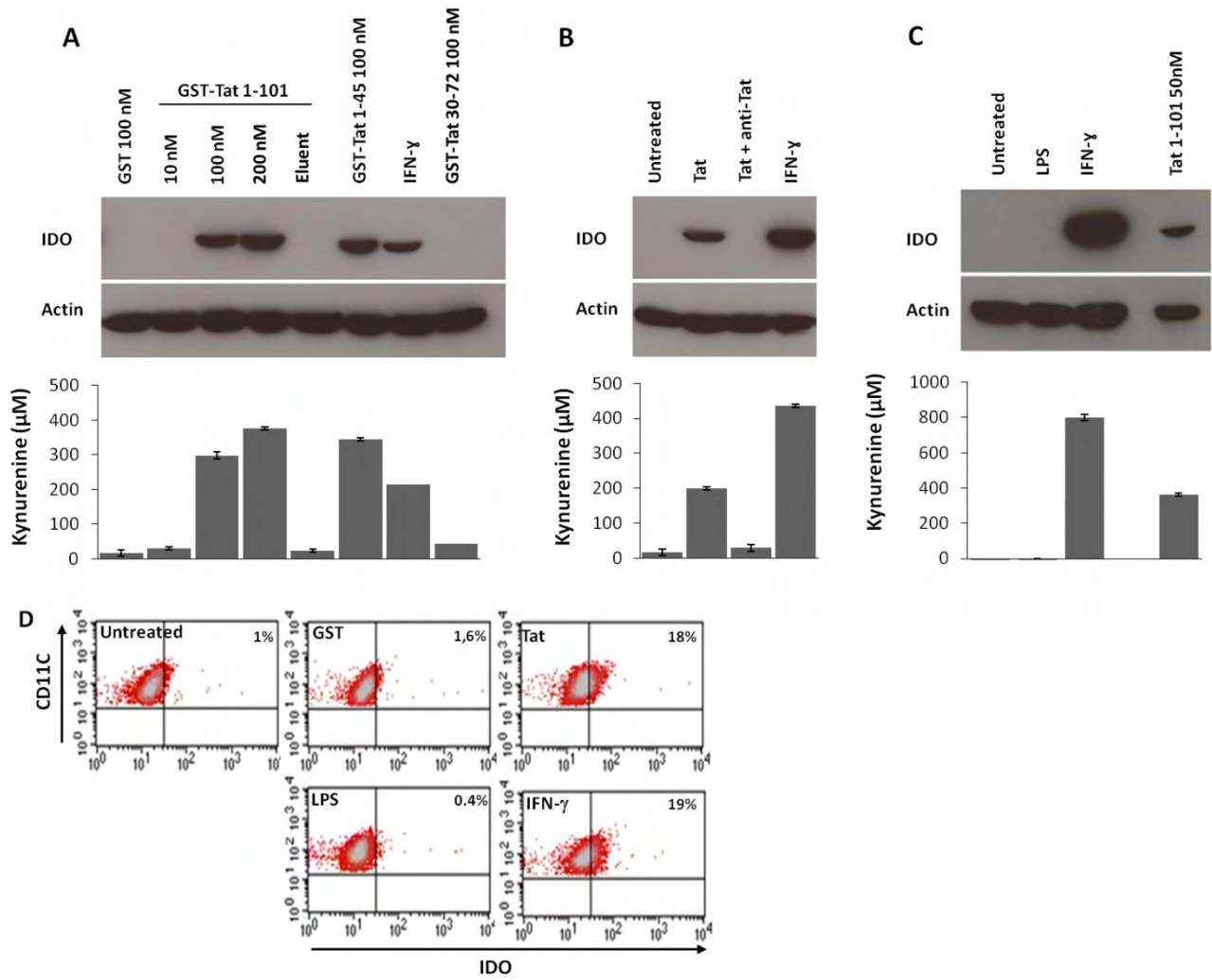
antibodies (10 ng/ml). After 5 days, autologous T cell proliferation was monitored by FACS analysis by following CFSE dilution analysis in the CD3 positive population. Overlay show T cell proliferation performed in the absence (purple) or in the presence (red) of anti-IL-10.

### **Acknowledgments**

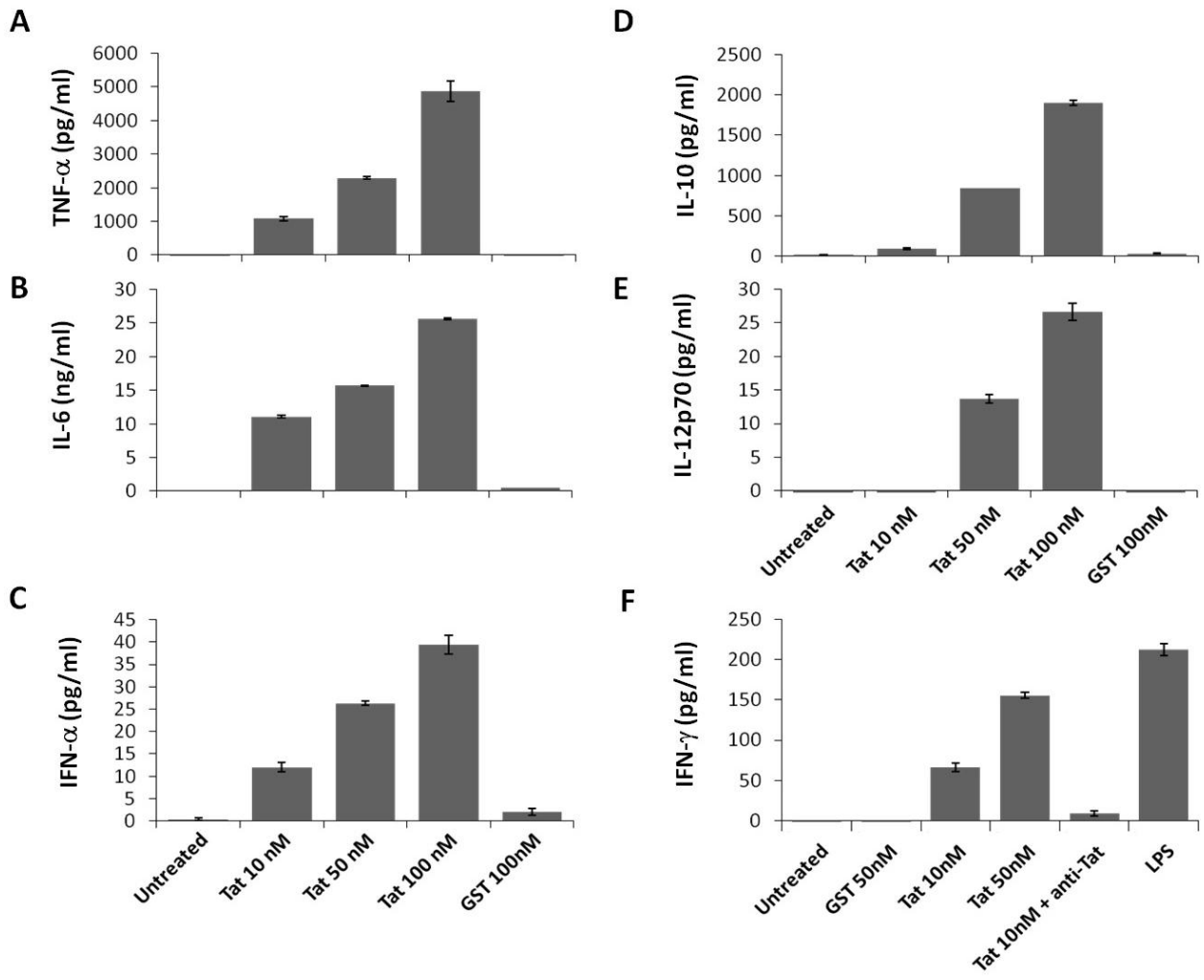
We thank the plateau technique INSERM U1043 for technical assistance in flow cytometry and cell sorting experiments, Jabrane-Ferrat Nabila and Becker Susan for the reading of the manuscript.

# Figures

## Figure 1



**Figure 2**





**Figure 3**

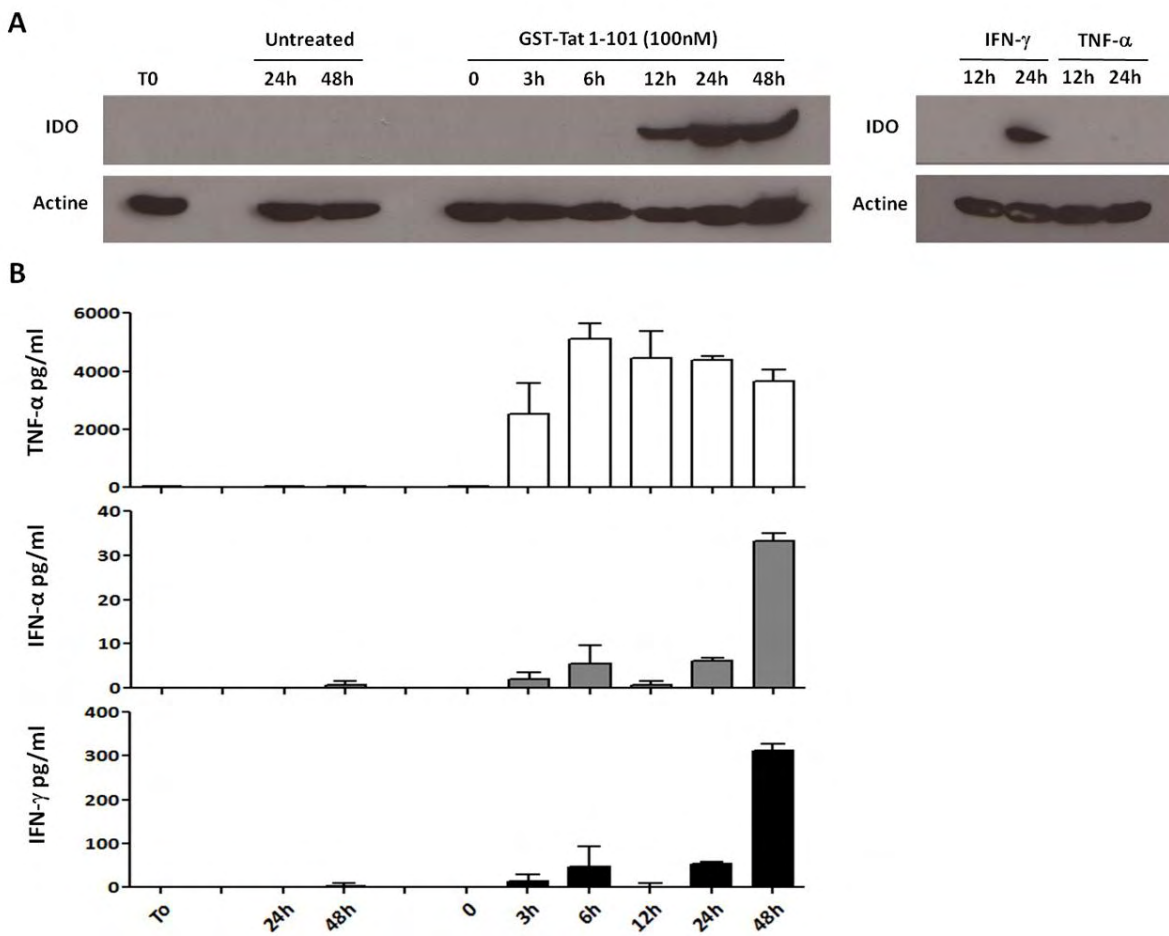


Figure 4

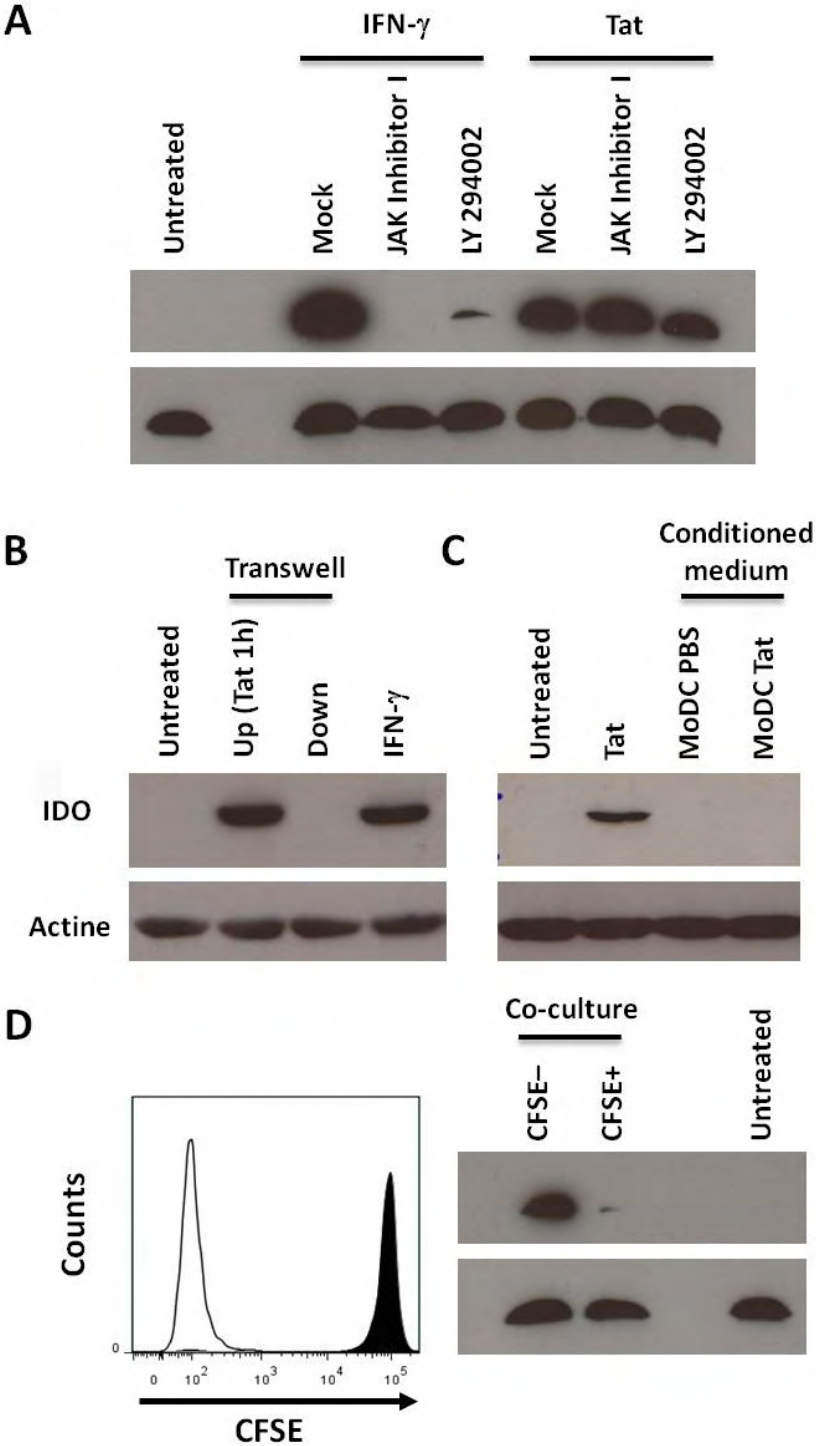
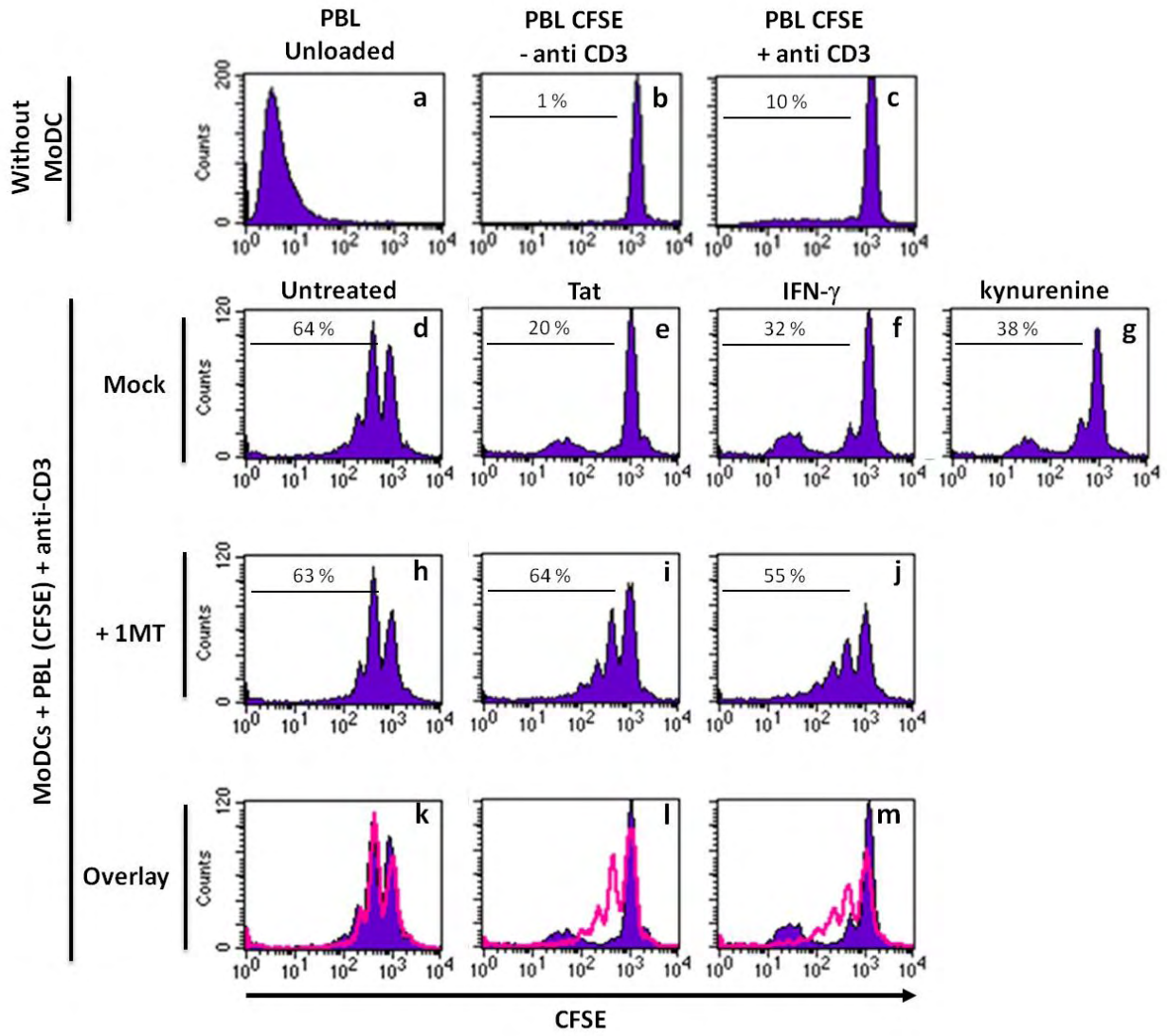
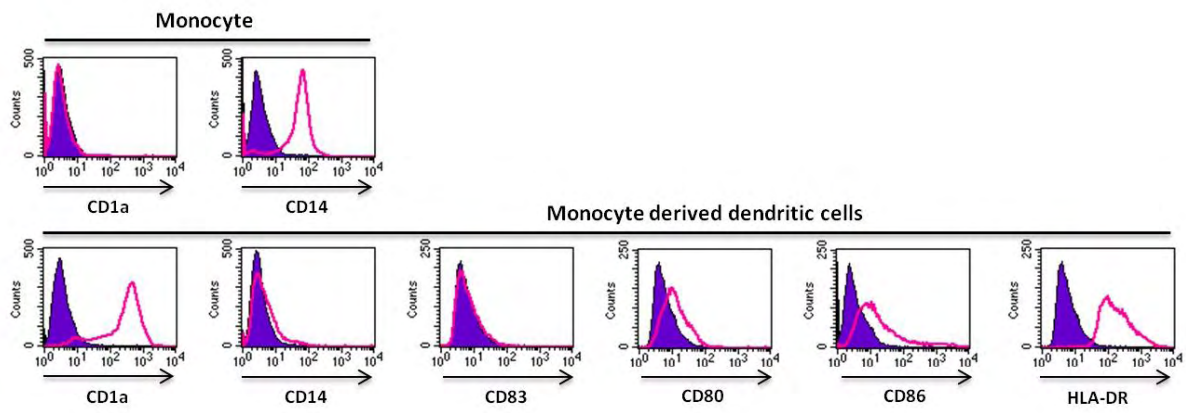


Figure 5

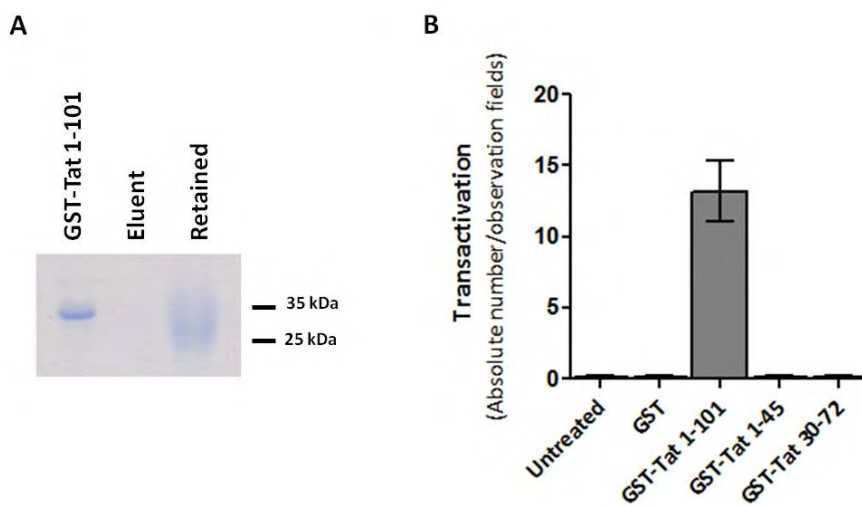


## Supplementary Figures

### Figure S1



### Figure S2



### Figure S3

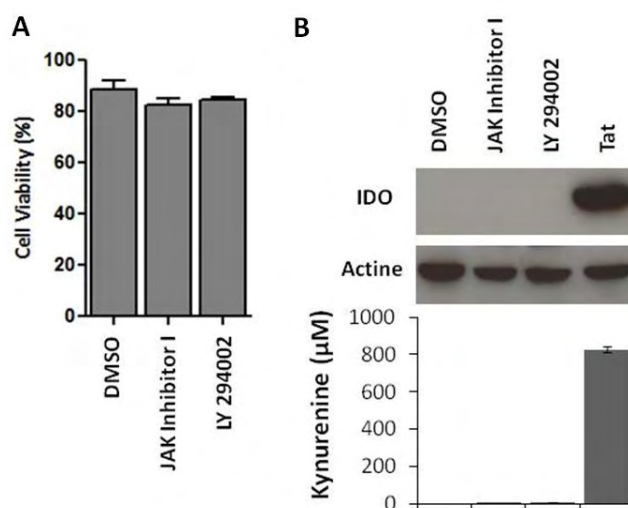
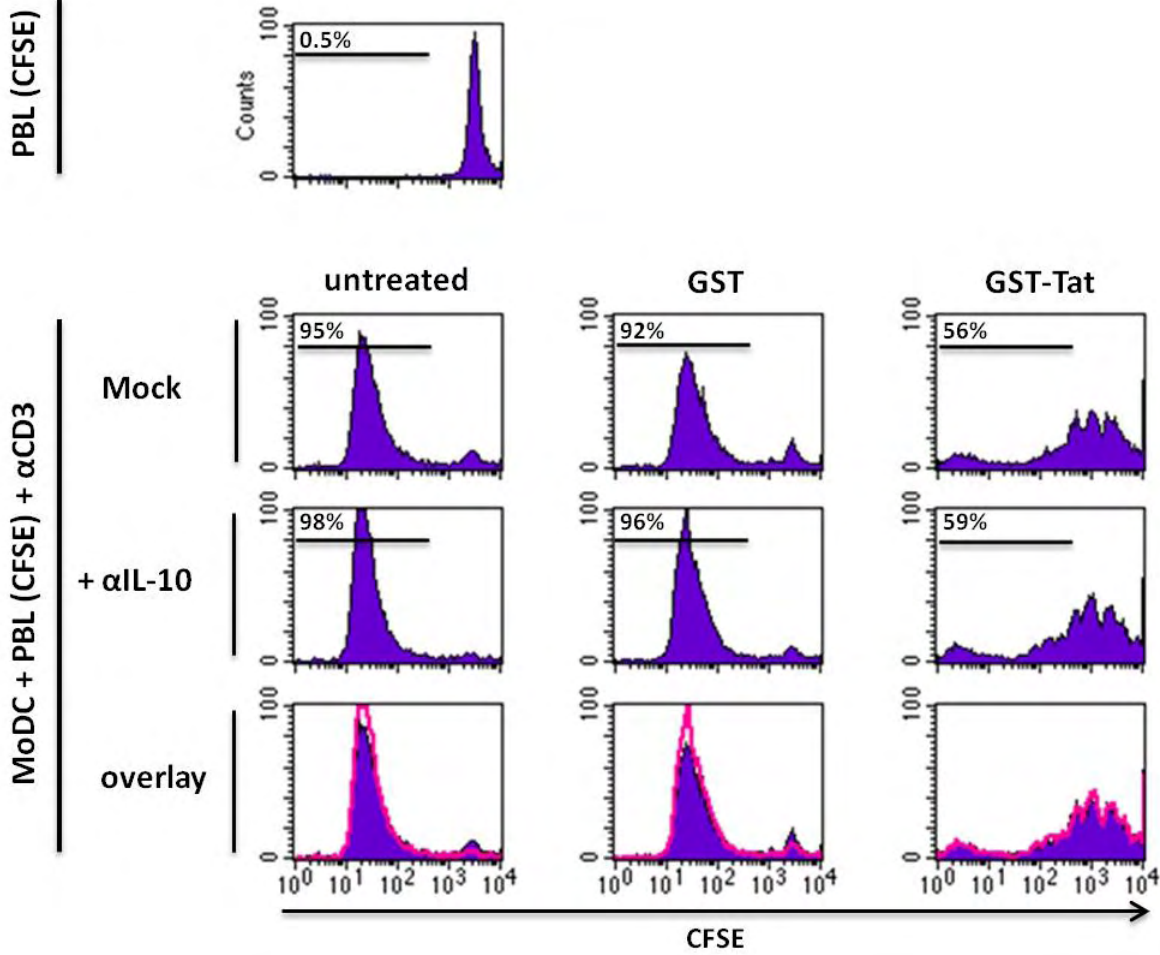


Figure S4



## References

1. Wu L, KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6: 859-868.
2. Che KF, Sabado RL, Shankar EM, Tjomsland V, Messmer D, et al. (2010) HIV-1 impairs in vitro priming of naive T cells and gives rise to contact-dependent suppressor T cells. *Eur J Immunol* 40: 2248-2258.
3. Fairman P, Angel JB (2012) The effect of human immunodeficiency virus-1 on monocyte-derived dendritic cell maturation and function. *Clin Exp Immunol* 170: 101-113.
4. Granelli-Piperno A, Shimeliovich I, Pack M, Trumpheller C, Steinman RM (2006) HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J Immunol* 176: 991-998.
5. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, et al. (2010) Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2: 32ra36.
6. Frankel AD (1992) Activation of HIV transcription by Tat. *Curr Opin Genet Dev* 2: 293-298.
7. Feng S, Holland EC (1988) HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334: 165-167.
8. Rana TM, Jeang KT (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 365: 175-185.
9. Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11: 269-283.
10. Xiao H, Neuveut C, Tiffany HL, Benkirane M, Rich EA, et al. (2000) Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11466-11471.
11. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, et al. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375: 497-500.
12. Buscemi L, Ramonet D, Geiger JD (2007) Human immunodeficiency virus type-1 protein Tat induces tumor necrosis factor-alpha-mediated neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 26: 661-670.
13. Scala G, Ruocco MR, Ambrosino C, Mallardo M, Giordano V, et al. (1994) The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med* 179: 961-971.
14. Zauli G, Furlini G, Re MC, Milani D, Capitani S, et al. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat-protein stimulates the production of interleukin-6 (IL-6) by peripheral blood monocytes. *New Microbiol* 16: 115-120.
15. Yang Y, Wu J, Lu Y (2010) Mechanism of HIV-1-TAT induction of interleukin-1beta from human monocytes: Involvement of the phospholipase C/protein kinase C signaling cascade. *J Med Virol* 82: 735-746.
16. Fanales-Belasio E, Moretti S, Nappi F, Barillari G, Micheletti F, et al. (2002) Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 168: 197-206.
17. Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, et al. (2000) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J Virol* 74: 10551-10562.
18. Bennasser Y, Bahraoui E (2002) HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-beta11 and -delta. *Faseb J* 16: 546-554.
19. Leghmari K, Bennasser Y, Tkaczuk J, Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cell Immunol* 253: 45-53.

20. Secchiero P, Zella D, Capitani S, Gallo RC, Zauli G (1999) Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *J Immunol* 162: 2427-2431.
21. Zheng L, Yang YD, Lu GC, Salvato MS (2005) Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 668-672.
22. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, et al. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375: 497-500.
23. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Meteleev V, Pardee AB (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268: 429-431.
24. Li JC, Yim HC, Lau AS Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection. *Aids* 24: 1609-1623.
25. Noonan D, Albin A (2000) From the outside in: extracellular activities of HIV Tat. *Adv Pharmacol* 48: 229-250.
26. Samikkannu T, Rao KV, Gandhi N, Saxena SK, Nair MP Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS. *J Neurovirol* 16: 255-263.
27. Lob S, Konigsrainer A (2008) Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction? *Langenbecks Arch Surg* 393: 995-1003.
28. Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762-774.
29. Dang Y, Dale WE, Brown OR (2000) Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free Radic Biol Med* 28: 615-624.
30. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P (2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol* 42: 1932-1937.
31. Jurgens B, Hainz U, Fuchs D, Felzmann T, Heitger A (2009) Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood* 114: 3235-3243.
32. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, et al. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 12: 870-878.
33. Rottenberg ME, Gigliotti Rothfuchs A, Gigliotti D, Ceausu M, Une C, et al. (2000) Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 164: 4812-4818.
34. Pfefferkorn ER (1984) Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 908-912.
35. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, et al. (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196: 447-457.
36. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH (2002) Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 168: 3771-3776.
37. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, et al. (2000) Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164: 3596-3599.
38. Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, et al. (2007) IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 37: 3054-3062.
39. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, et al. (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood* 114: 555-563.

40. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, et al. (2010) An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185: 3190-3198.
41. Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Jaeger H, Reibnegger G, et al. (1988) Tryptophan degradation in patients infected by human immunodeficiency virus. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: 337-340.
42. Grant RS, Naif H, Thuruthyl SJ, Nasr N, Littlejohn T, et al. (2000) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *J Virol* 74: 4110-4115.
43. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. (2007) HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109: 3351-3359.
44. Gendelman HE, Persidsky Y, Ghorpade A, Limoges J, Stins M, et al. (1997) The neuropathogenesis of the AIDS dementia complex. *AIDS* 11 Suppl A: S35-45.
45. Heyes MP, Ellis RJ, Ryan L, Childers ME, Grant I, et al. (2001) Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection. *Brain* 124: 1033-1042.
46. Clerici M, Shearer GM (1994) The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15: 575-581.
47. Rizzardi GP, Barcellini W, Tambussi G, Lillo F, Malnati M, et al. (1996) Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome. *AIDS* 10: F45-50.
48. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS (1999) IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 116: 115-120.
49. Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, et al. (2009) IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114: 346-356.
50. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, et al. (1994) Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 93: 768-775.
51. Smith DG, Guillemin GJ, Pemberton L, Kerr S, Nath A, et al. (2001) Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat. *J Neurovirol* 7: 56-60.
52. Samikkannu T, Rao KV, Gandhi N, Saxena SK, Nair MP (2010) Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS. *J Neurovirol* 16: 255-263.
53. Samikkannu T, Saiyed ZM, Rao KV, Babu DK, Rodriguez JW, et al. (2009) Differential regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by HIV type 1 clade B and C Tat protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 329-335.
54. Martinson JA, Montoya CJ, Usuga X, Ronquillo R, Landay AL, et al. (2010) Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 871-881.
55. Debin A, Kravtsoff R, Santiago JV, Cazales L, Sperandio S, et al. (2002) Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine* 20: 2752-2763.
56. Brake DA, Debouck C, Biesecker G (1990) Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat. *J Cell Biol* 111: 1275-1281.
57. Gutheil WG, Subramanyam M, Flentke GR, Sanford DG, Munoz E, et al. (1994) Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6594-6598.
58. Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, et al. (1998) HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13153-13158.



59. Morini M, Benelli R, Giunciuglio D, Carlone S, Arena G, et al. (2000) Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 267-271.
60. Zocchi MR, Rubartelli A, Morgavi P, Poggi A (1998) HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol* 161: 2938-2943.
61. Contreras X, Bennasser Y, Chazal N, Moreau M, Leclerc C, et al. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology* 332: 316-328.
62. Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Laribee N, et al. (2000) Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* 6: 1380-1387.
63. Wong JK, Campbell GR, Spector SA (2010) Differential induction of interleukin-10 in monocytes by HIV-1 clade B and clade C Tat proteins. *J Biol Chem* 285: 18319-18325.
64. Li JC, Lee DC, Cheung BK, Lau AS (2005) Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett* 579: 3055-3062.
65. Gee K, Angel JB, Mishra S, Blahoianu MA, Kumar A (2007) IL-10 regulation by HIV-Tat in primary human monocytic cells: involvement of calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated p38 MAPK and Sp-1 and CREB-1 transcription factors. *J Immunol* 178: 798-807.
66. Masood R, Lunardi-Iskandar Y, Moudgil T, Zhang Y, Law RE, et al. (1994) IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 374-383.
67. Clerici M, Shearer GM (1993) A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 14: 107-111.
68. Emilie D, Fior R, Crevon MC, Maillot MC, Boue F, et al. (1994) Cytokines from lymphoid organs of HIV-infected patients: production and role in the immune disequilibrium of the disease. *Res Immunol* 145: 595-600; discussion 600-592.
69. Graziosi C, Pantaleo G, Fauci AS (1994) Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol* 145: 602-605; discussion 605-607.
70. Williams A, Steffens F, Reinecke C, Meyer D (2013) The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: a multivariate cytokinomics approach. *Cytokine* 61: 521-526.
71. Chuenchitra T, Chaitaveep P, Sukwit S, Dettrairat S, Tabprasit S, et al. (2012) Cytokine profiles in HIV-1 subtype CRF01\_AE infected individuals with different rates of diseases progression: a multiplex immunoassay. *J Med Assoc Thai* 95 Suppl 5: S116-123.
72. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2: 32ra36.
73. Monini P, Cafaro A, Srivastava IK, Moretti S, Sharma VA, et al. (2012) HIV-1 Tat Promotes Integrin-Mediated HIV Transmission to Dendritic Cells by Binding Env Spikes and Competes Neutralization by Anti-HIV Antibodies. *PLoS One* 7: e48781.
74. Bukovsky AA, Dorfman T, Weimann A, Gottlinger HG (1997) Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J Virol* 71: 1013-1018.
75. Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Rusie LK, Fichtenbaum C, Chougnet CA (2012) In vitro HIV infection impairs the capacity of myeloid dendritic cells to induce regulatory T cells. *PLoS One* 7: e42802.
76. Boasso A, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Shearer GM (2008) HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation. *PLoS One* 3: e2961.
77. Boasso A, Royle CM, Doumazos S, Aquino VN, Biasin M, et al. (2011) Overactivation of plasmacytoid dendritic cells inhibits antiviral T-cell responses: a model for HIV immunopathogenesis. *Blood* 118: 5152-5162.

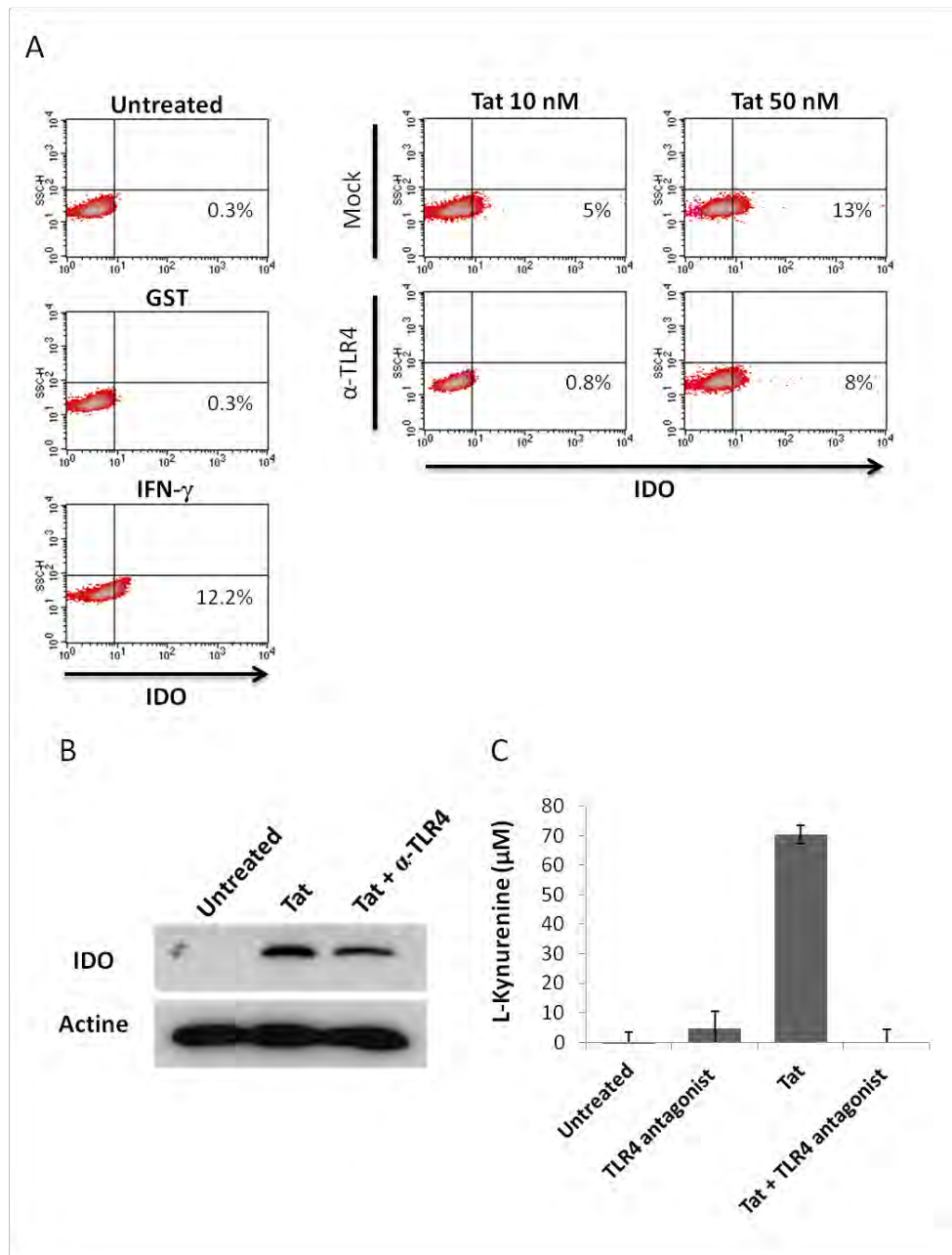
78. Sandler NG, Douek DC (2012) Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol* 10: 655-666.
79. Braun D, Longman RS, Albert ML (2005) A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106: 2375-2381.
80. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, et al. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189: 1363-1372.
81. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, et al. (2007) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67: 792-801.
82. Boasso A, Vaccari M, Fuchs D, Hardy AW, Tsai WP, et al. (2009) Combined effect of antiretroviral therapy and blockade of IDO in SIV-infected rhesus macaques. *J Immunol* 182: 4313-4320.
83. Potula R, Poluektova L, Knipe B, Chrastil J, Heilman D, et al. (2005) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. *Blood* 106: 2382-2390.
84. Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D, et al. (2006) CTLA-4 blockade decreases TGF-beta, IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. *Blood* 108: 3834-3842.
85. Dunham RM, Gordon SN, Vaccari M, Piatak M, Huang Y, et al. (2013) Preclinical evaluation of HIV eradication strategies in the simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque: a pilot study testing inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29: 207-214.
86. Rezza G, Fiorelli V, Dorrucchi M, Ciccozzi M, Tripiciano A, et al. (2005) The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters. *J Infect Dis* 191: 1321-1324.
87. van Baalen CA, Pontesilli O, Huisman RC, Geretti AM, Klein MR, et al. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* 78 ( Pt 8): 1913-1918.
88. Liovat AS, Rey-Cuille MA, Lecroux C, Jacquelin B, Girault I, et al. (2012) Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. *PLoS One* 7: e46143.
89. Wang XC, Fan YS, Zhou ZQ, Li HQ, Zhang Z, et al. (2010) [Expression of B7-H1 on peripheral myeloid dendritic cells in patients with HIV infection and its correlation with diseases progression]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90: 588-592.
90. Fu X, Lawson MA, Kelley KW, Dantzer R HIV-1 Tat activates indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Neuroinflammation* 8: 88.
91. Lawson MA, Kelley KW, Dantzer R Intracerebroventricular administration of HIV-1 Tat induces brain cytokine and indoleamine 2,3-dioxygenase expression: a possible mechanism for AIDS comorbid depression. *Brain Behav Immun* 25: 1569-1575.
92. Xu H, Zhang GX, Ciric B, Rostami A (2008) IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett* 121: 1-6.

## Résultats supplémentaires

### Quel est le rôle du TLR4 dans l'induction de IDO par Tat dans les DCs ?

De nombreux travaux récents ont montrés que Tat stimule l'expression de l'enzyme immunosuppressive IDO. Cette enzyme, impliquée dans la dégradation du tryptophane, est douée d'une forte activité immunosuppressive liée à sa capacité à inhiber la prolifération des LT via la déplétion du tryptophane et la production de composés cytotoxiques pour les LTh1 et Th17. Cette sur-activation de IDO par les DCs myéloïdes au cours de l'infection par le VIH-1 est associée à une perte des réponses Th-1 et Th-17 essentielles pour le contrôle de la réplication virale et de l'intégrité de la barrière intestinale.

Tenant compte de la capacité de Tat à stimuler la voie TLR4 et des travaux récents montrant sa capacité à induire IDO, notre objectif dans cette partie est de démontrer si cette induction est médiée par l'interaction Tat-TLR4. Pour cela, des MoDCs ont été stimulées par Tat en présence ou en absence d'anticorps anti-TLR4 bloquants (HTA125). Après 24h les cellules sont récupérées et analysées par cytométrie en flux pour l'expression de IDO (Figure additionnelle 1A). Les résultats montrent que la protéine IDO n'est pas détectée dans les MoDC non traitées, ou traitées avec la GST. L'IFN- $\gamma$  est utilisé comme contrôle positif et permet d'induire l'expression de IDO (12.2%). Comme cela a été rapporté dans d'autres travaux (planès et al.) le traitement par la protéine Tat stimule une expression dose dépendante de IDO (Figure additionnelle 1A). Lorsque les MoDCs sont préincubées avec l'anticorps anti-TLR4, on observe une forte inhibition de la capacité de Tat à induire l'expression de IDO (avec 10nM de Tat : 5% de MoDC IDO+ contre 0.8% en présence de l'anti-TLR4 et avec la Tat 50 nM : 13% de MoDC IDO+ contre 8% en présence de l'anti-TLR4). L'expression de IDO a également été recherchée par immuno-blot (Figure additionnelle 1B). En accord avec les résultats précédent de cytométrie en flux, nous observons que Tat induit l'expression de IDO dans les MoDCs, alors que cette enzyme n'est pas exprimée dans les MoDC non traitées (Figure additionnelle 1B). L'utilisation d'anticorps bloquants anti-TLR4 montre une forte inhibition de l'induction de IDO par Tat. Nous nous sommes également intéressés à l'effet de l'interaction Tat-TLR4 sur l'activation de IDO qui peut être mesurées par la production de kynurenine. Les résultats montrent que le traitement avec la protéine Tat stimule la production de la kynurenine par les MoDC (Figure additionnelle 1C). En revanche, lorsque les MoDC sont préincubées avec un antagoniste du TLR4 (LPS-RS de *R. sphaeroides* acheté chez Invivogen) avant d'être traitées par Tat la production de kynurenine n'est plus détectée (Figure additionnelle 1C). Comme contrôle, les MoDC non traitées ou incubées avec l'antagoniste du TLR4 seul ne produisent pas de kynurenine (Figure additionnelle 1C).



**Figure additionnelle 1. Tat stimule l'expression de IDO dans les MoDC : implication du TLR4.** A) Des MoDC sont stimulées par la protéine Tat (10-50nM) en présence ou en absence d'anti-TLR4 bloquants (10 $\mu$ g/ml). Comme contrôle des MoDC sont gardées non traitées (Untreated), traitées avec le GST (50nM) ou l'IFN- $\gamma$  (100ng/ml). Après 24h l'expression de IDO en intracellulaire est analysée par cytométrie en flux. B) Des MoDC sont stimulées par la protéine Tat (50nM) en présence ou en absence d'anti-TLR4 bloquants (10 $\mu$ g/ml). Les cellules sont ensuite récupérées puis lysées et l'expression de IDO est analysé par WB. La détection de l'actine est utilisée comme contrôle de charge. C) Des MoDC sont stimulées par la protéine Tat (50nM) en présence ou en absence de l'antagoniste du TLR4 (LPS-RS 10 $\mu$ g/ml). Après 24h, les cellules sont récupérés puis incubés dans du tampon HBSS complété avec du L-tryptophane (500 $\mu$ M). Après 4h d'incubation à 37°C le surnageant est récupéré et analysé pour la conversion du tryptophane en L-kynurenine par le dosage de Ehrlich.

## Résultats : article 3 *(En Préparation)*

---

### **La protéine Tat du VIH-1 augmente l'expression de PD-L1 à la surface des cellules dendritiques de manière TNF- $\alpha$ dépendante : implication de la voie TLR4**

An cours de l'infection par le VIH-1 on observe une augmentation importante de l'expression des molécules de co-stimulation négatives PD-1 et PD-L1 dont le niveau est étroitement corrélé avec l'inactivation du système immunitaire et l'évolution de la maladie vers le stade SIDA.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la protéine Tat du VIH-1 sur la modulation des molécules de co-stimulation négatives PD-1, PD-L1 et PD-L2 sur les DCs. Dans cet objectif, nous avons montré que le traitement des MoDCs avec la protéine Tat recombinante ou synthétique augmente de manière spécifique et dose dépendante la maturation des DCs ainsi que l'expression de PD-L1. En revanche, aucun effet sur l'expression de PD-1 et PD-L2 n'a été observé. Afin de caractériser le mécanisme du mode d'action de Tat, nous avons montré que le fragment N-terminal 1-45 de Tat qui est incapable de Transactiver le promoteur LTR du VIH-1 continue à stimuler l'expression de PD-L1, démontrant ainsi que Tat agit indépendamment de son activité trans-activatrice. De plus, le fragment 1-45 de Tat est dépourvu du domaine basique responsable de son internalisation, suggérant ainsi que Tat exerce son action au niveau membranaire. Tat peut donc agir de manière directe, suite à l'interaction et l'activation de récepteurs membranaires soit indirectement via l'induction de facteurs solubles.

L'utilisation de quatre approches complémentaires incluant i) l'étude de la cinétique d'induction de PD-L1 par Tat, ii) l'utilisation de milieu conditionné par Tat, iii) la co-culture de MoDC, traitées ou non par Tat, dans deux compartiments séparés par une membrane semi- perméable iv) la co-cultures directe de MoDCs dont une partie a été marquée au CFSE et traitée ou non par Tat, nous a permis de conclure à une action indirecte de Tat. Parmi les cytokines induites par Tat, nous avons démontré que la neutralisation du TNF- $\alpha$  à l'aide d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  est suffisante pour inhiber la capacité de Tat à stimuler l'augmentation de l'expression de PD-L1. De plus, nous avons démontré que Tat agit suite à son interaction avec le TLR4. En effet, le blocage de l'interaction Tat- TLR4 grâce à l'utilisation d'anticorps anti-TLR4, ou de cellules dendritiques provenant de souris TLR4 KO inhibe la capacité de Tat à stimuler la modulation de l'expression de PD-L1. Cette inhibition de la modulation de PD-L1 est associée à une inhibition de la production du TNF- $\alpha$ , confirmant ainsi le rôle de cette cytokine dans l'augmentation de l'expression de PD-L1 induite par Tat.

L'ensemble de ces résultats, démontre que le VIH-1 par l'intermédiaire de sa protéine Tat détourne le TLR4 à la surface des DCs pour stimuler la production de TNF- $\alpha$  et augmenter l'expression de la molécule de co-stimulation négative PD-L1 directement associée à l'établissement d'un état immunosuppresseur.



# **HIV-1 Tat protein up regulates PD-L1 expression in dendritic cells in a TNF- $\alpha$ dependent manner: Implication of TLR4 pathway**

Rémi Planès<sup>1-3</sup>., Elmostafa Bahraoui<sup>1-3</sup>.\*

1: INSERM, U1043, Toulouse, France

2: CNRS, U5282, Toulouse, France

3: Université Paul Sabatier, EA 3038, Toulouse, France

\* *Corresponding Author:* [bahraoui@cict.fr](mailto:bahraoui@cict.fr)

**Keywords:** HIV-1, Tat, PD-L1, TNF- $\alpha$ , TLR4, Dendritic cells,

## Abstract

Several chronic viral infections, including HIV-1, are associated with up-regulation of PD-1/PD-L1 immunosuppressive factors. The aim of the present study was to understand the effect of HIV-1 Tat protein on the modulation of PD-L1 on Monocyte-derived Dendritic Cells (MoDC).

To this end we have shown that treatment of MoDC with recombinant or chemically synthetic Tat protein stimulates up-regulation of PD-L1 in a dose dependent manner, while this treatment had no effect on PD-L2 and PD-1 expression. In order to investigate the mechanism involved, we showed that the N-terminal fragment 1-45 of Tat which is unable to *trans*-activate HIV-1 LTR continue to stimulate PD-L1 up-regulation. These results indicated that *trans*-activation activity of Tat is dispensable for its capacity to modulate PD-L1 expression. Because this N-terminal Tat fragment lacks the basic domain, necessary for Tat uptake, thus Tat can mediate its action either directly by action on cell surface or indirectly via the production of soluble factors. Our data showed that Tat-conditioned medium is sufficient to stimulate PD-L1 up-regulation in the absence of Tat. These results were also in agreement with those obtained in transwell culture experiment to conclude for an indirect action of Tat. Among the Tat-induced cytokines, we demonstrated that Tat-induced PD-L1 up-regulation can be totally inhibited in the presence of anti-TNF- $\alpha$  antibodies. In addition, we demonstrated that Tat acts by recruiting TLR4 pathway. Indeed, when the stimulation was performed in the presence of anti-TLR4 antibodies or with dendritic cells from TLR4 KO mice, the effect of Tat was strongly inhibited or totally blocked. Here again we indirectly demonstrated the implication of TNF- $\alpha$  by showing that dendritic cells from TLR4 KO mice became sensitive following their stimulation by Tat conditioned medium prepared from BMDC of wt mice.



## Introduction

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection is characterized by the multitude and the complexity of the interactions between the virus and its host. Since the acute phase, HIV-1 infection leads to the establishment of a peak of virus replication, followed by a severe and rapid depletion of CD4<sup>+</sup> T cells in lymphoid tissues, especially in the gastrointestinal tract. In addition to CD4<sup>+</sup> T cells, monocytes and macrophages, HIV-1 also infects, even at lesser level, dendritic cells (DCs). DCs play key roles in both the innate and adaptive immune responses [1-3]. Interactions between HIV-1 and the immune system, lead to immune activation since the acute phase. This immune activation, which persists during the chronic state, is associated with gradual depletion of circulating CD4<sup>+</sup> T cells, high set point of viral replication that persists despite antiviral immune response, exhaustion of T cells, polyclonal B-cell activation, increased frequencies of activated T-cells, increased in T cell turnover [4], a decrease in plasmacytoid dendritic cells (pDCs) [5] and myeloid (mDCs) [6] and production of proinflammatory cytokines and chemokines [7,8]. As consequences, this hyperactivation lead inevitably to the weakening of the immune system, a situation that facilitates HIV-1 replication, persistence and AIDS disease progression. Indeed, several clinical manifestations observed in HIV-1 infected patients, are tightly associated with the capacity of the virus, via its protein and nucleic components to activate abnormally the immune system leading to the establishment of an immunodeficient state, favourable to the escape of the immune defences.

Among the viral factors, it was reported that Tat protein interferes with the normal function of the immune system [9-19]. HIV-1 Tat is a protein of 14kDa, composed of 86 to 104 amino acids, produced early after HIV-1 infection. At structural level, Tat protein is structured in several domains including the N-terminal region 1-47 that contains the activation domain, and the basic region 49-57, which is essential for Tat internalization, nuclear localization and RNA binding at the LTR-TAR region [17]. In addition to its essential role in the viral cycle, Tat protein is found at the nanomolar (nM) levels in the serum of HIV-1 infected patients [20-22]. However, it can reasonably assumed that this quantification of Tat protein is underestimated, due to the proportion of the Tat already adsorbed on the surface of cell membranes via heparan sulfates [23] and to the fact that this concentration could be much larger near the lymphoid organs and in the vicinity of infected cells.

Tat protein participates in the pathogenesis of HIV-1 infection by its capacity to interact with different cell types. It is secreted by infected cells and can act on other cells whether or not they are infected [10,24]. In addition to its direct role in viral promoter trans-activation of transcription, Tat contributes also indirectly to the spread of HIV-1 through its effects on the increase of the rate of CCR5 and CXCR4 cell surface expressions [25,26] and on the activation of quiescent CD4+ T cells which in turn were used by the virus as new targets to enhance HIV-1 replication [27].

Tat was also found to induce neurotoxicity in the central nervous system [28-30] and apoptosis in T-CD4+ cells [21,31,32]. Paradoxically Tat was showed to mediate macrophage survival by up-regulating the expression of Bcl2 anti-apoptotic factor [33]. Tat protein was also reported for its action to inhibit MHC-I cell surface expression [34], and MnSOD activity.

While some of these effects were mediated after intracellular uptake of Tat, others were mediated by the interaction of extracellular Tat with cellular receptors. Different domains of Tat have been implicated in interactions with membrane receptors: The N-terminal region interacts with CD26 receptor [35] and L-Type calcium channel [36], the tripeptide RGD with integrin  $\alpha\beta3$  and  $\alpha5\beta1$  of DCs [37], and the basic domain with membrane lipids [28] or with the Flk-1/KDR receptor [38]. In addition to these potential Tat receptors, more recently we have demonstrated that Tat protein is able to recruit TLR4 pathway, following its interaction with high affinity with TLR4-MD2 complex, to activate the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory IL-10 cytokines (Ben Haij et al., 2013). In the present study, we explored the effect of Tat protein on the up-regulation of negative co-stimulatory molecules on mDCs including PD-1, PD-L1 and PD-L2.

Several viruses, responsible for chronic infections hijack PD-1/PD-L1 pathway to escape immune defenses. This mechanism have been reported for LCMV Clone 13 infection in mice [39], SIV infection in macaques and HIV-1 [40-42], HBV [43], HTLV [40] and HCV [44] infections for human. The blockade of PD-1/PD-L1 interaction helped to restore the capacity of T lymphocytes to proliferate and to produce cytokines both *in vitro* and *in vivo* [45-48].

The objective of the present study was to understand the effect of HIV-1 Tat protein on the modulation of PD-L1 expression on the surface of DCs and to understand the involved mechanisms. The results showed that Tat protein up-regulates PD-L1 expression on DCs by

an indirect mechanism involving TNF- $\alpha$ . Further we showed that this modulation is mediated following Tat-TLR4 interaction.

## Materials and Methods

### Materials

Tat protein : HIV-1 Tat recombinant protein (aa 1–86) from HIV-1 Lai strain was obtained from “Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA” (ANRS, Paris, France). HIV-1 Tat protein from SF2 strain (Tat 1-101) or N-terminal Tat fragments (Tat 1-45) fused to glutathione S-transferase (GST) were produced and purified in our laboratory as previously described [9]. Chemically synthesized Tat (aa 1–86) protein from HIV-1 Lai strain and oxidized form of Tat was kindly provided by E. Loret (Hôpital La Conception de Marseille). The level of endotoxin in all those recombinant proteins was assessed using the Limulus amoebocyte lysate assay (Bio-Septra, Villeneuve la Garenne, France) and was shown to contain less than 0.3 EU/ $\mu$ g, the limit of detection of this test.

Chemical products: Lipopolysaccharide (LPS), from *E.coli* serotype R515, was purchased from Alexis biochemicals. Pam3CSK4 (TLR2 ligand) was purchased from invitrogen.

Recombinant cytokines and antibodies: Recombinant human cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, and IFN- $\gamma$  were purchased from eBioscience. Recombinant human granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) were purchased from HumanZyme. Recombinant murine GM-CSF was purchased from Tebu Bio. Mouse monoclonal anti-human-TNF- $\alpha$  (TNF-D), anti-TLR4/MD2 (HTA 125) and mouse IgG isotype control purified antibodies were purchased from eBioscience. Anti-Tat antibodies were obtained from ANRS. Polyclonal goat anti-human-IFN- $\gamma$  and monoclonal mouse anti-human-IL-10 were purchased from R&D system. For cell surface labelling fluorochromes conjugated antibodies anti-CD1a-FITC, anti-CD14-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD83-FITC, anti-CD86-PE, anti-HLA-DR-FITC, anti-mouse CD86-PE and isotype control were purchased from Biolegend. Anti-PD-1-APC, anti-PD-L1-APC, anti-PD-L2-PE, anti-mouse PD-L1-PE and isotypes control were purchased from eBioscience.

## **Generation of monocyte-derived DCs**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of healthy blood donors (from EFS, Toulouse) by centrifugation on Ficoll paque density gradient (GE Healthcare). Monocytes were isolated by adherence to tissue culture plastic on 6-well plates (Beckton Dickinson) 1h at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Non-adherent cells were removed and adherent cells were washed three times with PBS. This adherent population was CD14<sup>+</sup> (> 94%) when analyzed by flow cytometry. To allow differentiation into monocyte-derived dendritic cells (MoDC), cells were cultured in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (PS), 10ng/ml GM-CSF and 10ng/ml IL-4. Alternatively, monocytes were isolated by positive selection using CD14<sup>+</sup> isolation kit (Myltenyi biotec). After 5 days of culture loosely adherent cells were recovered by gentle pipetting and used as immature dendritic cells in our experiments. Over 90% of cells had the standard phenotype of immature dendritic cells : CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>.

## **Generation of bone marrow derived DCs**

The C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratory. TLR4 KO with C57BL /6 genetic background were kindly provided by the laboratory of B. Ryffel (INEM - UMR7355 CNRS - Université d'Orléans). Myeloid cells were extracted from the bone marrow of mouse femur by washing with 5 ml of complete RPMI-1640, using a syringe. After homogenization, filtration, and centrifugation (5 min at 20°C and 1200 rpm), the cell suspension was recovered in 10 ml of complete RPMI-1640 medium. To stimulate the differentiation into DCs, myeloid cells were cultured in 100x20mm petri dishes (Dominique DUTSCHER) at 2x10<sup>6</sup> cells in 10 ml of complete RPMI-1640 medium in the presence of 50ng/ml of recombinant murine GM-CSF. The medium was renewed after 3 and 6 days of culture. BMDC were recovered in the supernatant after 9 days of culture and used as immature cells.

## **Treatment of DCs**

Immature MoDC or BMDC were resuspended in RPMI complete medium (supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin) and distributed in 6, 12 or 24 well plates at the density of 1.10<sup>6</sup> cells /ml and then treated for 24h or alternatively for the indicated time. Then, cells were recovered and analyzed for the

expression of surface molecules by flow cytometry. Cell culture supernatant were collected and kept frozen until cytokine quantification.

To obtain Tat conditioned medium, MoDC or BMDC were treated with Tat for 1h, washed three times with PBS to remove soluble Tat and then cultured for a further 24h. After this time, cell supernatant was recovered, centrifugated for 10 min at 1200 rpm and used as Tat conditioned medium to stimulate autologous cells.

In the transwell experiment untreated MoDC were cultured in 6-well plates (Becton Dickinson). In the upper chamber of 1 $\mu$ m transwell insert we added autologous MoDC previously incubated with Tat for 1h and washed three times with PBS. Cells were kept in co-culture for a further 24h before they were separately analyzed for the expression of surface molecules by flow cytometry.

In direct co-culture experiment MoDC previously treated with Tat for 1h and washed were mixed with autologous Tat-untreated CFSE-labelled MoDC. After 24h of incubation, MoDC were recovered and phenotype was analysed in CFSE-labelled and CFSE unlabelled cells using different windows gating on a FACSCalibur (Becton Dickinson).

### **Phenotype analysis by Flow cytometry**

For flow cytometry analysis, MoDC were first washed once with PBS, 5 mM EDTA, and then once with PBS, 5% FCS. Cells were then incubated for 30 min on cold with fluorochrome conjugated antibodies. After 2 washes with PBS 5% FCS, cells were recovered in PBS-0.01% azide before analysis on a FACSCalibur.

### **Cytokine quantifications**

Quantification of TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IFN- $\alpha$ 1, IL-12p70 and IFN- $\gamma$  in cell's supernatants were performed by specific ELISA kit from eBioscience. Briefly, the first monoclonal antibody used for capture was incubated overnight at 4°C in 96 well (NUNC). After three washes with PBS containing 0.05% Tween 20 pH 7.4 (wash buffer), plates were saturated by adding 250 $\mu$ l of a proteic solution (diluent assay) during one hour at room temperature. After three washes, culture supernatants (100 $\mu$ l/well) were added and incubated for two hours at room temperature. Plates were then washed three times and incubated during one hour at room temperature with a biotinylated anti-cytokine antibody. After five washes, the bound biotinylated antibody was detected by an additional 30 min incubation with

streptavidin peroxidase. After seven washes plates were incubated with the enzyme substrate (TMB). The reaction was stopped by adding 50µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) to each well. Absorbance was read at 450nm with a wavelength correction at 570nm. Cytokines were quantified from a standard curve generated by using various concentrations of recombinant protein of each cytokine. The limit of detections of each cytokine were 4pg/ml for TNF- $\alpha$ , 2pg/ml for IL-10, 2pg/ml for IL-6, 15 pg/ml for IFN- $\alpha$ , 4pg/ml for IFN- $\gamma$  and 4pg/ml for IL-12p70.

## **Results**

### **HIV-1 Tat protein stimulates PD-L1 expression on MoDC**

HIV-1 infection is associated with the establishment of an immunosuppressive state associated with the increase of immunosuppressive factors including IL-10 [49], PD-1/PD-L1 [50] and IDO [51]. HIV-1 Tat protein has been implicated as an immunosuppressive factor by several reports including ours [9,16,52-55].

HIV-1 Tat protein has been shown to activate DCs maturation [13,56]. In our system, similar observations have been made both by using recombinant and synthetic Tat protein. To this end, we monitored the expression of maturation markers in MoDC by flow cytometry. Immature MoDC express low levels of CD83 and co-stimulatory molecules CD80, CD86 (Figure 1 A-C). However incubation of immature MoDC with HIV-1 Tat protein resulted in the acquisition of a phenotype that are characteristics of mature DCs as assessed by the expression of the DCs maturation markers CD83, and an increase expression of CD80 and CD86 co-stimulatory molecules (Figure 1 A-C). As control, we showed that MoDC treatment with similar amount of recombinant GST protein or chemically synthetic oxidized Tat protein, had no effects on the expression of these maturation markers (Figure 1 A-B). Further, we showed that treatment with previously heated Tat protein completely inhibited its capacity to activate MoDC maturation, while the treatment with heated LPS had no effect on its capacity to activate MoDC maturation (Figure 1 A). Cumulative data obtained from 10 different independent experiments indicated that Tat induced a significant and reproducible up-regulation of CD80, CD83 and CD86 molecules. Indeed, a significant increase of the MFI was observed for MoDC of all donors after 24hr of treatment with Tat (Figure 1 C).

To further characterize the effect of HIV-1 Tat protein on DCs, we investigated the action of this protein on the expression of negative co-stimulatory molecules including PD-1, PD-L1 and PD-L2. To this end, MoDC were treated during 24h with HIV-1 Tat protein before FACS analysis by using labeled-antibodies. Immature MoDC constitutively express significant levels of PD-L1 molecules whereas cell surface expressions of PD-1 and PD-L2 were negative (Figure 2 A). Stimulation by GST-Tat led to a strong up-regulation of PD-L1 in MoDC (Figure 2 A). As control, no change on PD-L1 expression was obtained in MoDC treated in the same condition by GST alone (Figure 2 A-B). In contrast to PD-L1 modulation, no effect of the expression of PD-1 and PDL-2 was observed on MoDC treated in the same conditions by Tat (Figure 2 A). These results indicate that HIV-1 protein activates selectively the increase of PD-L1 expression on MoDC.

To further characterize the effect and the specificity of Tat action we showed in complementary experiments that: i) Tat protein stimulated PD-L1 expression in a dose dependent manner, with a maximum effect at 50nM of Tat protein (Figure 2 B). ii) Tat induced PD-L1 increase expression is totally inhibited in the presence of anti-Tat antibodies (Figure 2 C). iii) Heat treatment of Tat protein totally abolished its effect on PD-L1 expression, while the same treatment on LPS had no effect on its capacity to up regulate PD-L1 expression (Figure 2 C). iv) Chemically synthetic Tat protein, but not its oxidized form, stimulated PD-L1 up-regulation on MoDC (Figure 2 D). vi) PD-L1 up-regulation was induced by both Tat proteins from Lai and SF2 strain (Figure 2 A-D).

To generalize these observations, Tat effect was tested on MoDC prepared from 10 HIV-1 seronegative donors. The obtained data, presented in figure 2 E confirmed that PD-L1 up-regulation by Tat protein is reproducible. A significant increase of the MFI was observed for all donors with a mean ranging from 46 in unstimulated MoDC to 352 in Tat-treated MoDC (Figure 2 E).

### **Tat trans-activation function is dispensable for PD-L1 up-regulation**

In order to evaluate the action mechanism of Tat leading to increased PD-L1 expression, we firstly produced, in addition to the total GST-Tat protein, the GST-N-terminal 1-45 fragment of Tat. As expected this fragment GST-Tat1-45 migrates in SDS-PAGE more than the total GST-Tat1-101 protein, and is also labeled by both anti-Tat and anti-GST antibodies in contrast to GST which is labeled by anti-GST antibodies only (Figure 3 A). At functional level, we showed that, as total Tat protein, Tat-1-45 fragment is also able to

stimulate the up-regulation of PD-L1, but not PD-L2, in MoDC (Figure 3 C). In contrast to total Tat protein, this 1-45 N-terminal fragment of Tat is unable to stimulate trans-activation as assessed by its incapacity to activate the gene of  $\beta$ -gal under the control of HIV-1- LTR (Figure 3 B). This result suggests that the effect of Tat on PD-L1 up-regulation seems to be independent of its trans-activation activity. This interpretation is also in agreement with the absence of the basic domain 49-57, which is essential for Tat uptake, nuclear localization and Tat-TAR interaction. Therefore we advanced alternative hypotheses including either a direct action of Tat following its interaction with MoDC or an indirect mechanism involving Tat-induced factors as cytokines.

### **Mechanism of Tat action: Direct or indirect?**

In order to understand the implicated mechanism two complementary approaches have been analyzed. To understand if PD-L1 up-regulation by Tat protein necessitates its direct interaction with target cells, we investigated PD-L1 up-regulation in MoDC by culturing cells in a transwell co-culture system that allowed diffusion of soluble factors between the upper and lower chambers. After treatment of MoDC during 1hr by Tat, cells were washed to eliminate soluble Tat and cultured in the upper chamber. In parallel untreated MoDC were cultured in the lower chamber. After 24 hr of co-culture, MoDC from each compartment were harvested and PD-L1 expression was tested by FACS analysis. Interestingly, in addition to the expected PD-L1 up-regulation in the MoDC from the upper chamber, a similar positive PD-L1 modulation was also obtained in the MoDC from the lower chamber (Figure 4 A). This result indicates that Tat effect is independent on cell to cell contact but, rather, can be mediated indirectly via soluble factors as cytokines.

Therefore, we conducted, in parallel, both the kinetics of Tat induced PD-L1 and those of Tat induced cytokines. This strategy has the advantage that it allows the exclusion of the cytokines that are produced with later kinetics than PD-L1. Figure 4 showed that Tat stimulates PD-L1 up-regulation in Tat treated MoDC from 6 hours post-stimulation and reach a maximum after 24h to 72h of Tat stimulation (Figure 4 B). In contrast, only a slight increase in PD-L1 was detected on the untreated MoDC (Figure 4 B). Accordingly, among the panel of Tat induced cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , only TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6 are produced before 6 hours of Tat stimulation (Figure 4 C). However, due to the fact that exogenous recombinant IL-6 is unable to up-regulate PD-L1 expression in MoDC, we focused our study on the potential implications of TNF- $\alpha$  and IL-10.



### **Tat stimulates PD-L1 up-regulation in MoDC via TNF- $\alpha$**

In agreement with the data of transwell experiments (Figure 4 A), we confirmed that Tat conditioned medium obtained from the supernatants of MoDC, previously treated by Tat during 24h, stimulates the up-regulation of PD-L1 in naïve MoDC (non Tat treated cells) (Figure 5 A). To study the involvement of TNF- $\alpha$ , and IL-10 in PD-L1 up-regulation, these cytokines were selectively depleted from Tat conditioned medium by incubation with specific anti-cytokine antibodies. Interestingly, when the stimulation of naïve MoDC was conducted in the presence of anti-TNF- $\alpha$  antibodies, this PD-L1 up-regulation was totally inhibited (Figure 5 A). In contrast, neutralization of IL-10, by anti-IL-10 antibodies, had no effect on the inhibition of PD-L1 up-regulation (Figure 5 A). Altogether these results, suggested the implication of Tat induced TNF- $\alpha$  as potential factor responsible for PD-L1 up-regulation on MoDC. Therefore, to further characterize the implication of TNF- $\alpha$  we conducted the following co-culture protocol: MoDC were treated by Tat for 1h and then washed one time with PBS before co-culturing, at 1/1 ratio, with autologous Tat untreated MoDC. To discriminate between Tat treated and untreated MoDC, only Tat untreated cells were previously labelled with CFSE (1  $\mu$ M). After 24 hours of co-culture, PD-L1 expression was measured both in CFSE (+) and CFSE (-) MoDC. The obtained results showed that pre-incubation with Tat protein induced PD-L1 up-regulation both in Tat-treated (CFSE-) and Tat untreated MoDC (CFSE+). In accordance with data presented above (Figure 5 A), the co-culture of CFSE+ and CFSE- MoDC in the presence of anti TNF- $\alpha$  antibody strongly inhibited PD-L1 up-regulation in both cells (Figure 5 B). As control, we showed that CFSE (+) and CFSE (-) MoDC express similar basal levels of PD-L1 in the absence of Tat stimulation (Figure 5 B). In addition we showed that CFSE labeling had no effects on cell viability as demonstrated by the capacity of Tat to continue to up-regulate PD-L1 in a similar manner as in non CFSE-labeled MoDC (Figure 5 B). All together, these data demonstrated that HIV-1 Tat protein up regulates PD-L1 expression in a TNF- $\alpha$  dependent manner.

## **Role of Tat-TLR4 interaction in PD-L1 up-regulation**

Recently we have showed that HIV-1 Tat protein is able to mediate TNF- $\alpha$  production in a TLR4 dependent manner (Benhaij et al.). Further we have demonstrated that Tat protein interacts physically and with high affinity with TLR4-MD2. Taking into account these informations, we explored the association between Tat-TLR4 interaction, TNF- $\alpha$  production and PD-L1 up-regulation, both in human MoDC and BMDC from wt or TLR4 KO mice. In the first model we showed that the stimulation of MoDC by Tat in the presence of increasing amount of anti-TLR4 antibodies strongly inhibited Tat induced PD-L1 up-regulation (Figure 6 A). Similarly, in the animal model, we showed that Tat protein stimulated the increase of PD-L1 expression in BMDC from wt mice (Figure 6 B), while this treatment remained without effect on the BMDC obtained from TLR4 KO mice (Figure 6 B). More interestingly, here again we showed a direct association between Tat induced TNF- $\alpha$  and PD-L1 up-regulation (Figure 6 C-D). Indeed we demonstrated that PD-L1 up-regulation on human MoDC, in the presence of anti-TLR4 antibodies (Figure 6 C), or BMDC from wt or TLR4 KO mice by Tat were strictly dependent on the production of TNF- $\alpha$  (Figure 6 C). Moreover, in a very interesting experiment, we showed that the coculture of BMDC from TLR4 KO mice with the supernatant from Tat conditioned medium of BMDC wt mice, lead to the up-regulation of PD-L1 (Figure 6 C).

## **Discussion**

A large number of reports have shown that several chronic viral infections are associated with the up-regulation of immunosuppressive factors including IL-10, IDO and PD-1/PD-L1 [40,57,58]. In the case of HIV-1 infection, it was shown an increase of IL-10 concentration in parallel with the progression of the disease toward AIDS [49,59,60]. In agreement with the implication of IL-10 in AIDS disease progression, it was shown that HIV-1 infected patients that harboring a mutation in IL-10 promoter, progressed more slowly to AIDS disease [61]. Moreover, IL-10 production was also involved in the loss of the function of T cells isolated from HIV-1 infected patients when analyzed *in vitro*. Indeed, it has been shown that T cell functions could be restored and the cells recover their ability to produce IL-2 and to proliferate following stimulation with specific antigens [49,59]. The association between HIV-1 infection, viral load, immune dysregulation and disease progression has also been reported to be associated with IDO and PD-1/PDL1 up-regulation both in HIV-1 infected

human patients and animal models. In line with these observations, we have recently shown that HIV-1 Tat protein is able to stimulate IDO expression/activity in MoDC (Planès et al., 2013). Moreover we showed that treatment of MoDC with Tat protein led to the alteration of their capacity to stimulate T cell proliferation. Further we showed that T cell proliferation could be restored in the presence of 1MT, an inhibitor of IDO activity (Planès et al., 2013).

In the present study, we showed that HIV-1 Tat protein is able to up-regulate PD-L1 expression on MoDC, in contrast, this treatment had no effect on the expression of PD-L2 and PD-1. These two PD-1-ligands share several domains, characteristic of B7 immunoglobulin family [62,63]. While PD-L1 is constitutively expressed at the surface of DCs, macrophages and B cells the expression of PD-1 on T-CD4, TCD-8, NK and B-cells is dependent of its induction.

Using the Tat deleted mutant encoding for the N-terminal region 1-45, we showed that this N-terminal Tat fragment continues to up regulate PD-L1 on MoDC in a similar manner as total Tat protein. However, because this fragment lost its capacity to trans-activates HIV-1-LTR, we can conclude that the up-regulation of PD-L1 mediated by Tat is independent of its trans-activation activity. This conclusion is also in agreement with the incapacity of this fragment, which lacks the basic domain 49-57 necessary for the cellular uptake of Tat. Ruling out the possibility of Tat action by an intracellular mechanism, we investigated the hypothesis involving a mechanism mediated by a direct or indirect cell surface action of Tat.

The hypothesis of a direct action was excluded, because Tat conditioned medium, as MoDC coculture in transwell system, both clearly showed that the physical contact between Tat and MoDC is not necessary to PD-L1 up-regulation.

To test the indirect hypothesis, we take into account the kinetics of Tat induced PD-L1 up-regulation, which started for 6 hours of Tat-treatment and then we explored the potential implication of each Tat-induced cytokine. Among the cytokines stimulated within 6 hours of Tat treatment, we showed that only TNF- $\alpha$  is able to induce PD-L1 up-regulation on MoDC. This effect was clearly demonstrated by the capacity of anti-TNF- $\alpha$  antibodies to inhibit Tat-induced PD-L1 up-regulation. Therefore, we asked the question about the nature of the interaction between Tat and MoDC and the implicated receptor.

In fact, we have recently showed that Tat protein is able to interact physically and with high affinity with TLR4-MD2 (Ben Haij et al., 2013). We also showed that Tat-TLR4

interaction leads to the activation of TLR4 pathways and the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$  and IL-10 respectively. In line with the implication of Tat-TLR4 interaction in the positive modulation of PD-L1 we showed that stimulation of MoDC by Tat in the presence of anti-TLR4 antibodies strongly inhibited Tat-induced PD-L1 up-regulation. In agreement with TLR4 implication, we showed that no PD-L1 up-regulation was obtained in Tat-treated BMDC from TLR4 KO mice, while a clear positive modulation was observed in BMDC prepared from wt mice. More interestingly, we showed that BMDC from TLR4 KO mice became sensitive to PD-L1 up-regulation, following their treatment by Tat conditioned medium obtained from the supernatant of wt BMDC. Thus, we can clearly conclude that PD-L1 up-regulation is mediated indirectly and essentially via the production of Tat-induced TNF- $\alpha$ .

### **Figure legends**

#### **Figure 1. HIV-1 Tat up-regulates maturation markers on MoDC.**

Immature MoDC were treated with GST-Tat 1-101 protein (50nM) or equal amount of GST protein alone. Untreated cells and LPS (100ng/ml) - treated MoDC were used as negative and positive controls respectively. Heat-inactivated Tat and LPS treated in the same conditions (20min at 95°C) were also included as control. After 24h cells were harvested and analyzed for CD80, CD83 and CD86 cells surface expression by flow cytometry. One representative experiment is showed in (A). The gray line represents labeling with the isotype control. The purple filled histograms correspond to the phenotypes of untreated MoDC, and the red line represents the effect of the indicated treatment on the expression of maturation markers. (B) MoDC were treated with increasing amount of chemically synthesized Tat protein in the reduced or oxidized form. (C) The mean fluorescence intensity (MFI) of CD80, CD83 and CD86 labeling on MoDC treated with GST, GST-Tat 1-101 (50nM), or untreated cells are represented for 10 different experiments. Horizontal lines shows mean values. The MFI of CD80, CD83 and CD86 labeling on Tat-treated or untreated MoDC was compared for each donor.

#### **Figure 2. HIV-1 Tat stimulates PD-L1 expression on MoDC.**

The effect of HIV-1 Tat protein on the expression of PD-L1 by MoDC was analyzed by flow cytometry. (A) MoDC were treated with recombinant GST-Tat 1-101 protein (50 nM) or GST

alone (50nM). Untreated cells were used as negative. After 24h PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression was analyzed by flow cytometry. (B) MoDC were treated with increasing amount of recombinant GST-Tat 1-101 protein. (C) MoDC were treated with (10nM) 1-86 Tat protein, or 50nM GST-Tat 1-101 protein for 24 hours. Untreated cells were used as negative control and LPS (100ng/ml) stimulation is the positive control. To evaluate the specificity of Tat effects several controls were also used including stimulation with GST alone (50nM), Tat previously incubated with anti-Tat antibodies (3µg/ml) for 30 min at 37°C, Tat heat-inactivated (20 min at 95°C) and LPS used in the same conditions. (D) MoDC were treated with increasing amount of chemically synthesized Tat 1-86 protein. Oxidized Tat was used as negative control. (E) MoDC from different donor were stimulated with GST-Tat 1-101 (50nM), or equal amount of GST protein or kept untreated for 24h. Data represents mean fluorescence intensity of PD-L1 labelling. Horizontal lines show mean values. In (F) PD-L1 MFI on MoDC after incubation for 24h with or without GST-Tat 1-101 (50nM) was compared for each donor.

**Figure 3. HIV-1 Tat induced PD-L1 up-regulation is independent from its trans-activation activity.**

(A) Equal amounts of GST, GST-Tat 1-101 and GST-Tat 1-45 proteins were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting using a monoclonal anti-Tat antibody targeting the N-terminal epitope (aa 1-15) or anti-GST antibodies. In (B) proteins were tested for trans-activation activity. HeLa cells stably transfected with a plasmid encoding the  $\beta$ -galactosidase protein under the control of the LTR promoter of HIV-1 were incubated with 1µM GST, GST-Tat 1-101 and GST-Tat 1-45 proteins. After 24 hours, cells were washed with PBS, fixed with PBS 0.5% glutaraldehyde and incubated with X-gal as  $\beta$ -galactosidase substrate (0.4mg/ml X-gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). After 24 hours, the number of blue dyed cells corresponding to transactivated cells was counted in optical microscopes magnifying 400x. The results are represented as numbers of blue cells per field. (C) The active domain of HIV-1 Tat protein was investigated by the comparative effects of full length GST-Tat 1-101 protein (100nM) or equal amounts of truncated form GST-Tat 1-45. GST and LPS (100ng/ml) were used as negative and positive control respectively.

**Figure 4. Role of soluble factors on the up-regulation of PD-L1 expression by HIV-1 Tat.**

(A) Tat-treated MoDC and autologous untreated MoDC were put in co-culture for 24h separated by a 1 µM transwell insert. In the bottom part, MoDC were untreated and, in the

upper chamber, MoDC had been previously treated with Tat 100 nM for 1h and washed three times with PBS. MoDC alone and direct Tat (100nM) stimulation were used as negative and positive controls respectively. (B) MoDC were stimulated by HIV-1 Tat protein (100nM) or kept untreated. After the indicated time (0, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h) PD-L1 was analyzed by flow cytometry. Purple filled histograms correspond to the phenotypes of untreated MoDC, and the red line represents the effect of Tat 1-101 (100nM) treatment. (C) cell supernatant was harvested and cytokines content was quantified by ELISA including TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12p70, IFN- $\alpha$ 1, and IFN- $\gamma$ .

**Figure 5. Tat up regulates PD-L1 expression in a TNF- $\alpha$  dependent manner.**

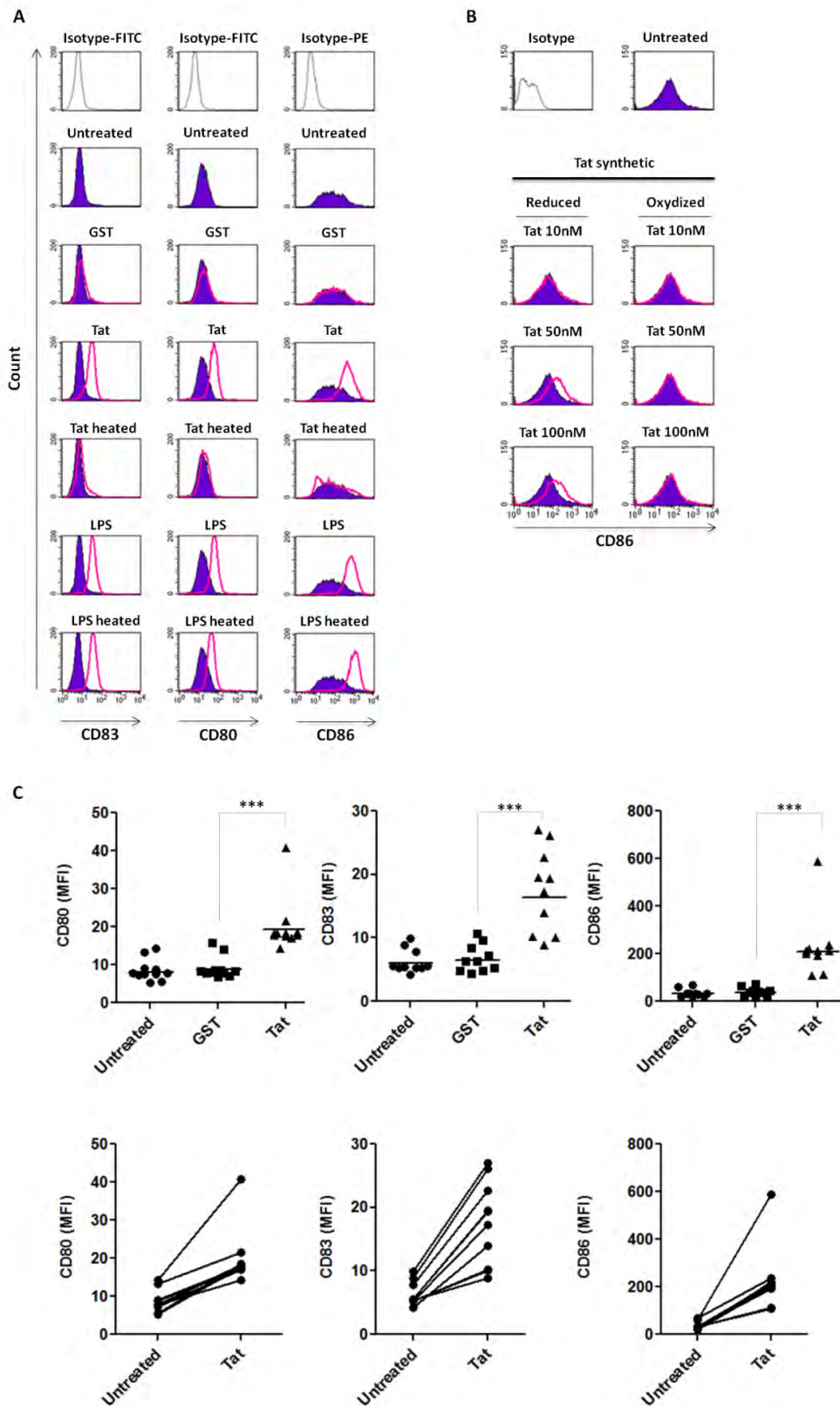
In order to identify the role of cytokines in the up-regulation of PD-L1 by Tat two different experiments were performed. (A) MoDC were incubated in medium conditioned by Tat 100 nM for 24 hours. Unconditioned medium or direct treatment by Tat was used as controls. To determine the implication of TNF- $\alpha$ , IL-10, and IFN- $\gamma$  cytokines in PD-L1 up-regulation, those cytokines were selectively depleted from Tat conditioned medium by pre incubation for 90 min with 20 $\mu$ g/ml anti-cytokine specific antibodies. (B) MoDC treated by Tat for 1h and then washed one time with PBS were put in direct coculture with autologous untreated MoDC at the 1:1 ratio. To discriminate between the two conditions, untreated cells were previously labelled with CFSE (1  $\mu$ M) whereas Tat-treated cells were kept unlabelled. To determine the implication of TNF- $\alpha$ , the same experience was performed in the presence of 20 $\mu$ g/ml anti-TNF- $\alpha$  specific antibody. After 24 h, PD-L1 expression was monitored in CFSE positive and CFSE negative MoDC.

**Figure 6. Role of Tat-TLR4 interaction in PD-L1 up-regulation.**

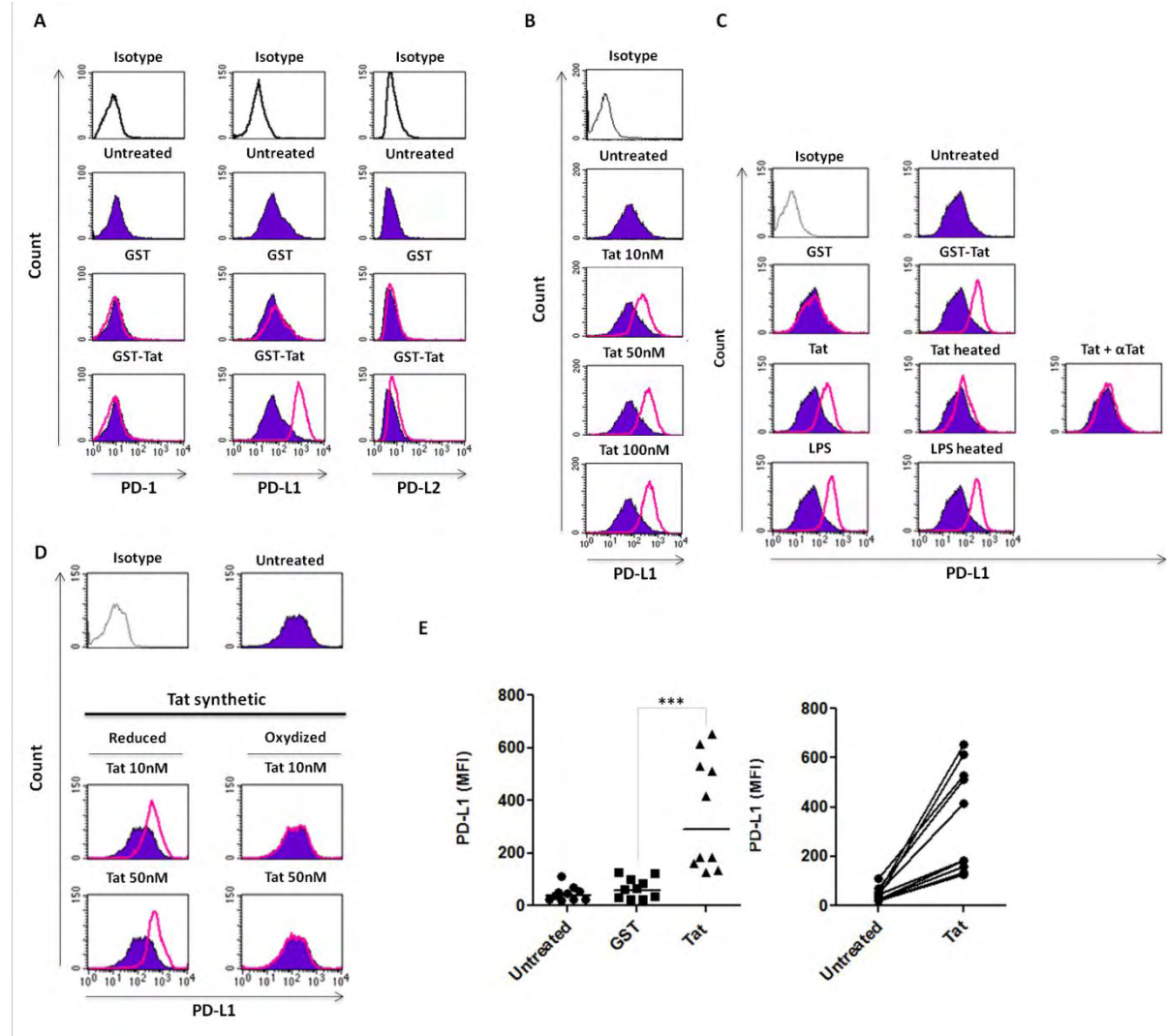
MoDC were treated with Tat protein (10nM) or kept untreated in the presence of increasing amount of anti-TLR4 antibodies. After 24hr, PD-L1 expression was monitored in (A) TNF- $\alpha$  production was quantified in (C). BMDC from WT or TLR4 KO mice were treated with Tat (100 nM), Pam3CSK4 (1 $\mu$ g/ml), LPS (1 $\mu$ g/ml), or GST (100nM). Tat conditioned medium from BMDC WT mice was also included as control. After 24hr, PD-L1 expression was monitored in (B) TNF- $\alpha$  production was quantified in (D).

# Figures

## Figure 1

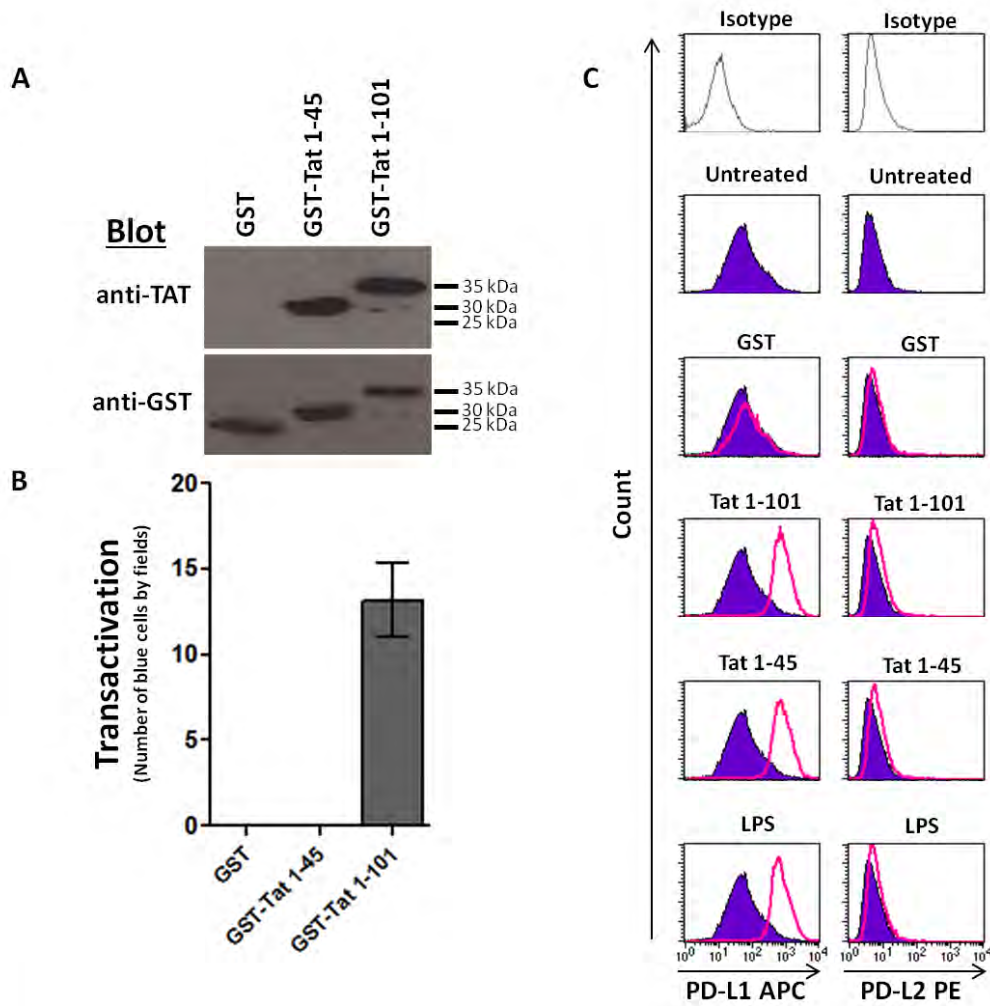


**Figure 2**





**Figure 3**



**Figure 4**

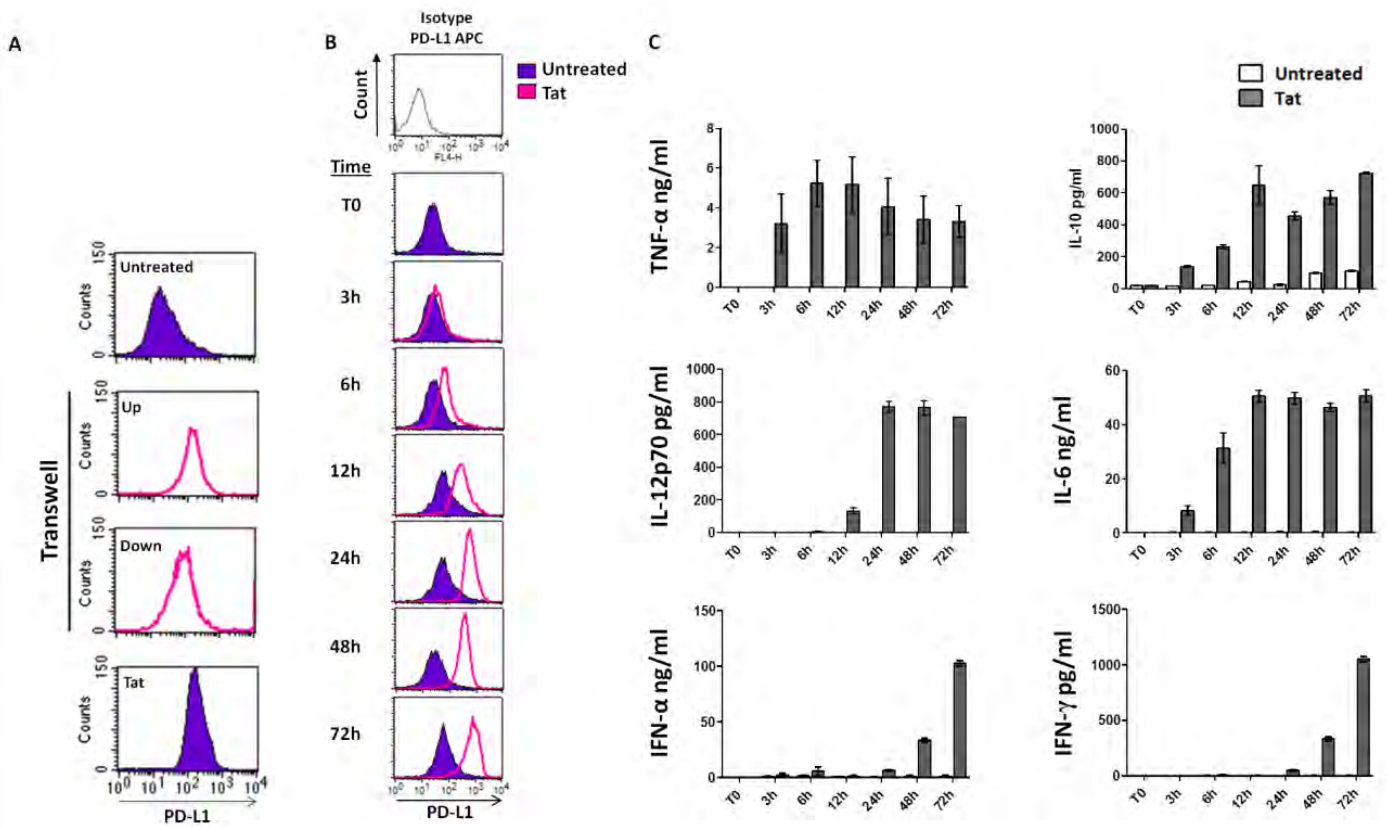
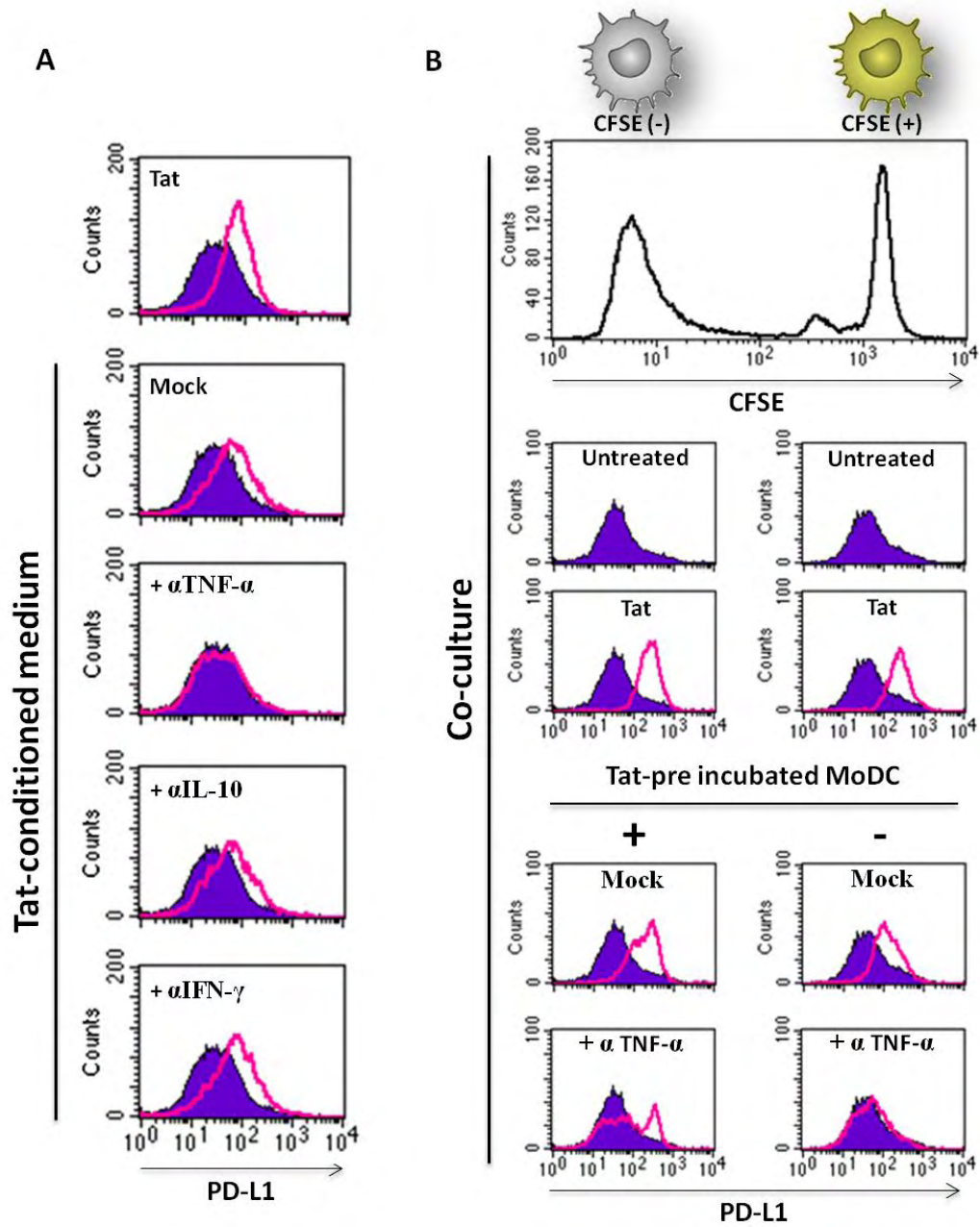
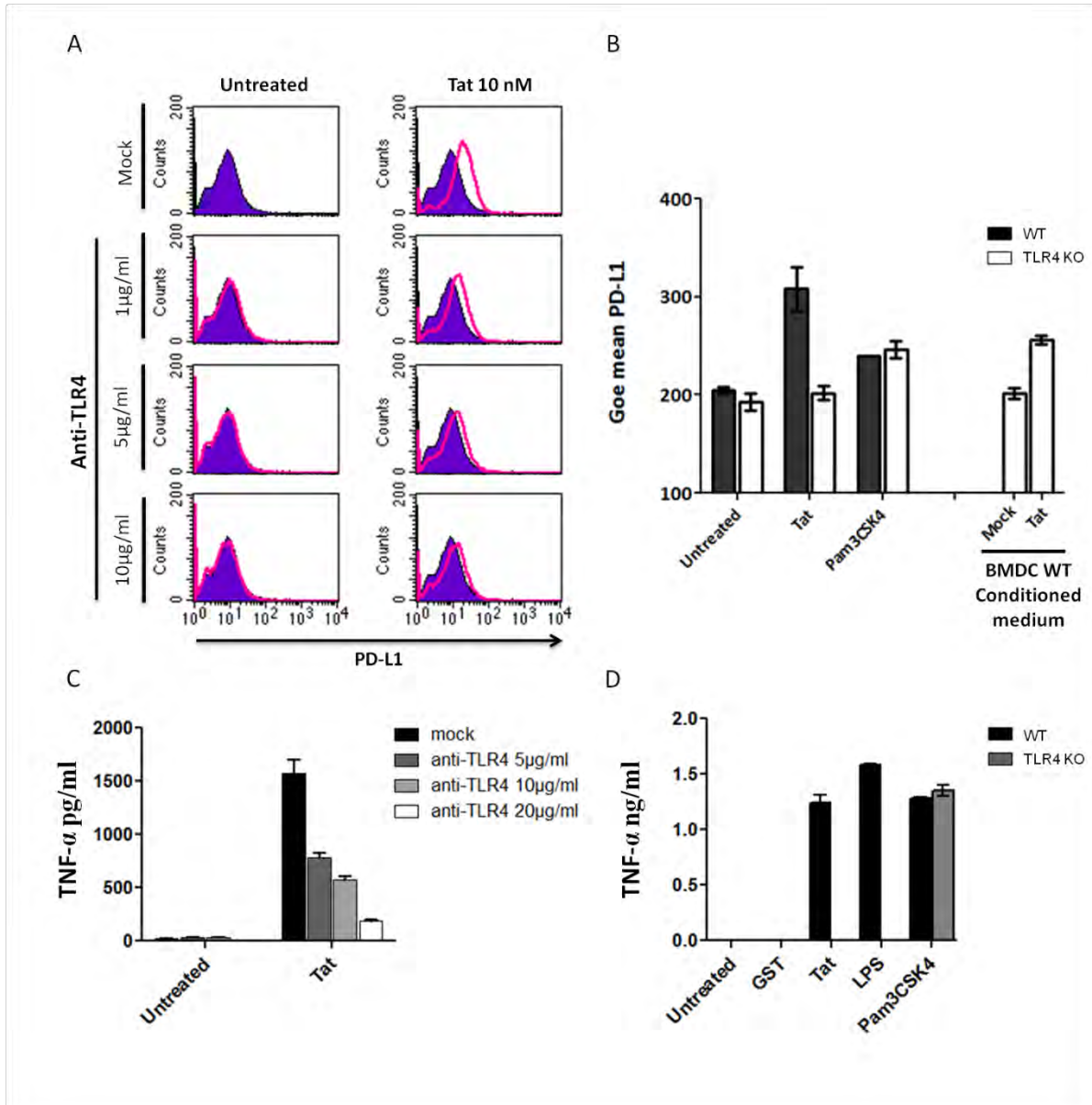


Figure 5



**Figure 6**



## References

1. Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF, Barth H (2010) A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Microbiol* 8: 350-360.
2. Liu B, Woltman AM, Janssen HL, Boonstra A (2009) Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *J Leukoc Biol* 85: 205-214.
3. Reis e Sousa C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483.
4. Herbeuval JP, Shearer GM (2007) HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123: 121-128.
5. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, et al. (2011) Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* 208: 2367-2374.
6. Wijewardana V, Soloff AC, Liu X, Brown KN, Barratt-Boyes SM (2010) Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* 6: e1001235.
7. Katsikis PD, Mueller YM, Villinger F (2011) The cytokine network of acute HIV infection: a promising target for vaccines and therapy to reduce viral set-point? *PLoS Pathog* 7: e1002055.
8. Keating SM, Jacobs ES, Norris PJ (2012) Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev* 23: 193-206.
9. Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, et al. (2000) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J Virol* 74: 10551-10562.
10. Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, Bohan CA, Kao V, et al. (1992) Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol* 66: 7159-7167.
11. Buscemi L, Ramonet D, Geiger JD (2007) Human immunodeficiency virus type-1 protein Tat induces tumor necrosis factor-alpha-mediated neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 26: 661-670.
12. Contreras X, Bennasser Y, Bahraoui E (2004) IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes. *Microbes Infect* 6: 1182-1190.
13. Fanales-Belasio E, Moretti S, Nappi F, Barillari G, Micheletti F, et al. (2002) Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 168: 197-206.
14. Gandhi N, Saiyed Z, Thangavel S, Rodriguez J, Rao KV, et al. (2009) Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 691-699.
15. Gee K, Angel JB, Ma W, Mishra S, Gajanayaka N, et al. (2006) Intracellular HIV-Tat expression induces IL-10 synthesis by the CREB-1 transcription factor through Ser133 phosphorylation and its regulation by the ERK1/2 MAPK in human monocytic cells. *J Biol Chem* 281: 31647-31658.
16. Gupta S, Boppana R, Mishra GC, Saha B, Mitra D (2008) HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner. *J Immunol* 180: 79-88.
17. Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11: 269-283.
18. Leghmari K, Bennasser Y, Tkaczuk J, Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cell Immunol* 253: 45-53.
19. Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR (1998) HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 19: 543-545.
20. Goldstein G (1996) HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nat Med* 2: 960-964.

21. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, et al. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375: 497-500.
22. Xiao H, Neuveut C, Tiffany HL, Benkirane M, Rich EA, et al. (2000) Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11466-11471.
23. Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276: 3254-3261.
24. Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, et al. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 67: 277-287.
25. Zheng L, Yang YD, Lu GC, Salvato MS (2005) Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 668-672.
26. Campbell GR, Loret EP, Spector SA (2010) HIV-1 clade B Tat, but not clade C Tat, increases X4 HIV-1 entry into resting but not activated CD4+ T cells. *J Biol Chem* 285: 1681-1691.
27. Li CJ, Ueda Y, Shi B, Borodyansky L, Huang L, et al. (1997) Tat protein induces self-perpetuating permissivity for productive HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8116-8120.
28. Sabatier JM, Vives E, Mabrouk K, Benjouad A, Rochat H, et al. (1991) Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 65: 961-967.
29. Nath A, Psooy K, Martin C, Knudsen B, Magnuson DS, et al. (1996) Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J Virol* 70: 1475-1480.
30. King JE, Eugenin EA, Buckner CM, Berman JW (2006) HIV tat and neurotoxicity. *Microbes Infect* 8: 1347-1357.
31. Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, Bourgarel-Rey V, Peyrot V, et al. (2004) The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem* 279: 48197-48204.
32. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Meteleev V, Pardee AB (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268: 429-431.
33. Zhang M, Li X, Pang X, Ding L, Wood O, et al. (2002) Bcl-2 upregulation by HIV-1 Tat during infection of primary human macrophages in culture. *J Biomed Sci* 9: 133-139.
34. Howcroft TK, Strelbel K, Martin MA, Singer DS (1993) Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260: 1320-1322.
35. Gutheil WG, Subramanyam M, Flentke GR, Sanford DG, Munoz E, et al. (1994) Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6594-6598.
36. Contreras X, Bennasser Y, Chazal N, Moreau M, Leclerc C, et al. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology* 332: 316-328.
37. Zocchi MR, Poggi A, Rubartelli A (1997) The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells. *Aids* 11: 1227-1235.
38. Albin A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraudo E, Benelli R, et al. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 2: 1371-1375.
39. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, et al. (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682-687.
40. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704.
41. Wang X, Zhang Z, Zhang S, Fu J, Yao J, et al. (2008) B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 38: 3226-3236.
42. Estes JD, Gordon SN, Zeng M, Chahroudi AM, Dunham RM, et al. (2008) Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *J Immunol* 180: 6798-6807.

43. Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, et al. (2007) Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81: 4215-4225.
44. Shen T, Chen X, Chen Y, Xu Q, Lu F, et al. (2010) Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection. *J Med Virol* 82: 1152-1159.
45. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, et al. (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350-354.
46. Dyavar Shetty R, Velu V, Titanji K, Bosinger SE, Freeman GJ, et al. (2012) PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *J Clin Invest* 122: 1712-1716.
47. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, et al. (2006) Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12: 1198-1202.
48. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, et al. (2009) Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458: 206-210.
49. Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, et al. (2009) IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114: 346-356.
50. Wang XC, Fan YS, Zhou ZQ, Li HQ, Zhang Z, et al. (2010) [Expression of B7-H1 on peripheral myeloid dendritic cells in patients with HIV infection and its correlation with diseases progression]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90: 588-592.
51. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2: 32ra36.
52. Bennasser Y, Badou A, Tkaczuk J, Bahraoui E (2002) Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha. *Virology* 303: 174-180.
53. Leghmari K, Bennasser Y, Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur J Cell Biol* 87: 947-962.
54. Samikkannu T, Rao KV, Gandhi N, Saxena SK, Nair MP Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS. *J Neurovirol* 16: 255-263.
55. Samikkannu T, Saiyed ZM, Rao KV, Babu DK, Rodriguez JW, et al. (2009) Differential regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by HIV type 1 clade B and C Tat protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 329-335.
56. Fanales-Belasio E, Moretti S, Fiorelli V, Tripiciano A, Pavone Cossut MR, et al. (2009) HIV-1 Tat addresses dendritic cells to induce a predominant Th1-type adaptive immune response that appears prevalent in the asymptomatic stage of infection. *J Immunol* 182: 2888-2897.
57. Wilson EB, Brooks DG (2011) The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 350: 39-65.
58. Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762-774.
59. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, et al. (1994) Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 93: 768-775.
60. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS (1999) IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 116: 115-120.
61. Mahajan SD, Agosto-Mojica A, Aalinkeel R, Reynolds JL, Nair BB, et al. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 348-352.

62. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH (2006) Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203: 2223-2227.
63. Freeman GJ (2008) Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10275-10276.



# Discussion/Conclusion

---

L'infection par le VIH-1 se caractérise par une hyperactivation chronique du système immunitaire, associée à une profonde immunosuppression. L'intensité de cette activation a été corrélée positivement avec la déplétion des LT, et la progression de la maladie vers le stade SIDA ([Brenchley, Price et al. 2006](#); [Appay and Sauce 2008](#); [Boasso and Shearer 2008](#); [Sodora and Silvestri 2008](#); [Brenchley, Silvestri et al. 2010](#)). La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par le VIH-1 pour induire cet état d'hyperactivation/immunosuppression constitue donc un enjeu majeur dans la recherche contre l'immuno-pathologie liée à l'infection au VIH-1. Nos travaux, ainsi que ceux d'autres équipes, proposent la protéine Tat comme facteur viral important dans ces dysfonctionnements ([Johri, Mishra et al. ; Buonaguro, Barillari et al. 1992](#); [Rubartelli, Poggi et al. 1998](#); [Badou, Bennasser et al. 2000](#); [Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002](#); [Contreras, Bennasser et al. 2004](#); [Gee, Angel et al. 2006](#); [Buscemi, Ramonet et al. 2007](#); [Gupta, Boppana et al. 2008](#); [Leghmari, Bennasser et al. 2008](#); [Gandhi, Saiyed et al. 2009](#)).

## Effets extracellulaires de la protéine Tat

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ma thèse montrent que la protéine Tat induit la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, des interférons IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , augmente l'expression des marqueurs de maturation CD83, CD80 et CD86 dans les MoDC et stimule également l'expression des facteurs immunosuppresseurs IL-10, PD-L1 et IDO. Ces différents effets de Tat ont également été obtenus avec le fragment N-terminal de la protéine (Tat 1-45) qui est dépourvu du domaine basique essentiel à l'internalisation de Tat, suggérant que Tat agit au niveau membranaire. Les effets de la protéine Tat ont été observés à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (10 à 100 nM). De ce fait, il est tout à fait possible d'envisager qu'un tel mécanisme se déroule également *in vivo*. En effet, la protéine Tat est sécrétée par les cellules infectées. Elle a été dosée dans le sérum des patients infectés à des concentrations de l'ordre de 1 à 4nM ([Xiao, Neuveut et al. 2000](#)). Cependant, cette concentration sérique de Tat est vraisemblablement sous-estimée si l'on prend en considération la capacité de Tat à s'adsorber à de nombreux types de récepteurs cellulaires (héparans sulfates, CD26, CXCR4, intégrines...([Noonan and Albini 2000](#))) et à être rapidement internalisée par les cellules qu'elle rencontre ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002](#)). Par conséquent, les quantités réelles de Tat seraient plus importantes à proximité des sites de réplication du VIH-1, rendant nos observations *in vitro* compatibles avec la réalité observée *in vivo*. De plus une étude récente suggère que Tat est continuellement sécrété même chez les patients sous traitement anti rétroviral ([Mediouni, Darque et al. 2012](#)). Très récemment, des travaux ont également mis en évidence une interaction entre Tat et la protéine Env qui engagerait la région riche en cystéine de Tat et les boucles V2 et V3 de la gp120 ([Monini, Cafaro et al. 2012](#); [Cardaci, Soster et al. 2013](#)). Cette association entre Tat et la particule virale a été associée à une augmentation de l'infectiosité du VIH-1 ([Poon, Moscoso et al. 2013](#)) probablement, via l'utilisation d'une voie d'entrée alternative du VIH-1 impliquant Tat et les intégrines  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha\beta 5$  comme cela a été montré dans les MoDC ([Monini, Cafaro et al. 2012](#)). La présence de Tat associé à la particule virale pourrait aussi, expliquer l'initiation du premier cycle de réplication du VIH. Ces résultats suggèrent que la protéine Tat peut

agir sous forme libre ou associée à la particule virale. Ainsi Tat constituerait un acteur important dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1 et l'affaiblissement du système immunitaire. En accord avec ces résultats la présence d'anticorps anti-Tat ([Rezza, Fiorelli et al. 2005](#)) et la présence de LT CD8 cytotoxiques spécifiques de Tat ([van Baalen, Pontesilli et al. 1997](#)) ont été corrélées avec un meilleur contrôle de la virémie et une progression plus lente de la maladie vers le SIDA.

Au niveau structural, différentes études de dichroïsme circulaire et de RMN ont montré que la protéine Tat ne présente pas de conformation clairement définie. Au contraire, c'est une protéine de nature flexible, non structurée et intrinsèquement désordonnée ([Bayer, Kraft et al. 1995](#)), ([Shojania and O'Neil 2010](#)). A l'image des différentes protéines intrinsèquement désordonnées (facteurs de transcriptions, VEGF...), il semblerait que Tat adopte différent repliement en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve et des molécules avec lesquelles elle interagit. Elle se structure principalement en feuillet- $\beta$  quand elle est en solution aqueuse. Au contraire, elle adopte une structure en hélices  $\alpha$  dans des solvants hydrophobes ([Campbell and Loret 2009](#)). De plus, différentes conformations de Tat ont été décrites en fonction des partenaires moléculaires avec lesquels elle interagit incluant p-TEFb ([D'Orso and Frankel 2010](#)), gp120 ([Poon, Moscoso et al. 2013](#)), et CD26 ([Fan, Tansi et al. 2012](#)). Cette incroyable flexibilité de Tat est à mettre en relation avec sa capacité à interagir avec un grand nombre de partenaires moléculaires et interférer avec une vaste gamme de fonctions biologiques ([Shojania and O'Neil 2010](#)), ([Debaisieux, Rayne et al. 2012](#)).

### **Tat induit la production des cytokines pro-inflammatoires**

De nombreux travaux définissent l'hyperactivation chronique du système immunitaire comme un facteur important dans la physiopathologie de l'infection au VIH-1 ([Brenchley, Price et al. 2006](#); [Appay and Sauce 2008](#); [Boasso and Shearer 2008](#); [Sodora and Silvestri 2008](#); [Brenchley, Silvestri et al. 2010](#)). Par l'induction des cytokines pro-inflammatoires Tat participe donc à ce processus. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IFN- $\alpha$  sont augmentées au cours de l'infection. Elles ont été associées à de nombreux effets néfastes comme i) une stimulation de la réplication virale ([Aggarwal 2003](#); [Herbein and Khan 2008](#)), ii) l'induction massive de l'apoptose des lymphocytes T et des DCs ([Herbeuval and Shearer 2007](#); [Swiecki, Wang et al. 2011](#)), iii) une contribution dans l'apparition des troubles neurologiques et la démence associée au SIDA ([Brabers and Nottet 2006](#)). La production de ces cytokines a été reliée à la translocation de produits microbiens dans la circulation sanguine suite à la détérioration de la barrière gastro-intestinale ([Brenchley, Price et al. 2006](#)). Cependant, il n'est pas exclu que Tat, à cause de son expression précoce, contribue à instaurer cet état pro-inflammatoire très tôt après l'infection et bien avant la détérioration de la barrière gastro-intestinale.

### **Tat induit la maturation des cellules dendritiques**

Nos résultats ont montré que la protéine Tat est capable de stimuler la maturation des DCs, en accord avec ce qui a été rapporté par d'autres groupes ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002](#); [Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009](#)). Généralement, la maturation des DCs est associée à l'induction d'une réponse immunitaire visant à contrôler la réplication virale. Cependant, au cours de l'infection au VIH-1 l'activation immunitaire semble plutôt associée à la progression de la maladie plutôt qu'au contrôle de l'infection. Ce paradoxe peut être expliqué par le fait que le VIH-1, qui infecte directement les cellules immunitaires, tire profit de l'activation immunitaire pour gagner de

nouvelles cibles et stimuler sa propre réplication. Bien que les DC matures répliquent moins bien le virus, celles-ci sont plus efficaces dans le transfert du virus aux LT ([Graneli-Piperno, Delgado et al. 1998](#); [Canque, Bakri et al. 1999](#)). Ainsi, en stimulant la maturation des DCs Tat pourrait favoriser la dissémination du virus en induisant le recrutement et l'activation de nouvelles cibles pour le VIH-1. En plus, du détournement des DCs, il a été montré que Tat augmentent l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR4 à la surface des LT ([Huang, Bosch et al. 1998](#); [Secchiero, Zella et al. 1999](#); [Campbell, Loret et al. 2010](#)), ce qui contribue à favoriser leur infection par le VIH-1. Tat est également capable de se fixer et d'antagoniser ce récepteur ([Xiao, Neuveut et al. 2000](#)). Cette interaction a notamment été impliquée dans la régulation de l'infection par les virus CCR5 tropiques ([Xiao, Neuveut et al. 2000](#)). Par ailleurs, Tat joue également un rôle ambivalent dans la régulation de l'infection au VIH-1, en induisant la mort par apoptose des LT sains ([Li, Friedman et al. 1995](#); [Westendorp, Frank et al. 1995](#)), tout en préservant la survie des LT infectées ([McCloskey, Ott et al. 1997](#); [Lopez-Huertas, Mateos et al. 2013](#)). Une seconde protéine du VIH-1 impliquée dans ce mécanisme est la protéine Nef. En effet, Nef contribue à augmenter l'apoptose des LT induite par les voies Fas/Fas-ligands et le TNF- $\alpha$ . Cependant, elle favorise la résistance des cellules infectées en interférant avec la fonction de la protéine ASK1 « apoptosis signal regulating kinase 1 » ([Geleziunas, Xu et al. 2001](#)).

En plus de leur rôle dans la dissémination du VIH-1 et le transfert aux LT, les DCs sont également impliquées dans la persistance du virus. En effet, la population des DCs myéloïdes est fortement dérégulée au cours de l'infection par le VIH-1. Leur nombre est diminué au niveau du sang et des muqueuses ([Donaghy, Pozniak et al. 2001](#); [Almeida, Cordero et al. 2005](#)). Dans les organes lymphoïdes, ces cellules présentent un phénotype altéré. Elles sont caractérisées par l'expression d'une panoplie de molécules inhibitrices dont l'IL-10, PD-L1 et IDO et présentent une capacité diminuée à activer les LT, et à stimuler une réponse Th1 antivirale ([Favre, Mold et al.](#); [Brockman, Kwon et al. 2009](#); [Wang, Fan et al. 2010](#)). De manière intéressante, le niveau d'expression de ces molécules immunosuppressives est étroitement corrélé à la persistance virale ainsi qu'à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA ([Favre, Mold et al.](#); [Wang, Zhang et al. 2008](#); [Brockman, Kwon et al. 2009](#)). Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de montrer que la protéine Tat du VIH-1 pourrait contribuer à ce mécanisme. En effet, nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1 induit l'expression des facteurs immunosuppressifs PD-L1, IDO et d'IL-10 par les DCs. Ceci pourrait donc constituer un nouveau mécanisme d'échappement du VIH-1.

### **Tat induit la production d'IL-10**

L'interleukine 10 est une cytokine fortement immunosuppressive qui agit à la fois sur les CPA en désactivant leurs fonctions immuno-activatrices et microbicides ainsi que sur les LT en induisant leur anergie ([Glocker, Kotlarz et al. 2011](#)). De part ses propriétés immuno-modulatrices cette cytokine joue un rôle critique au cours de l'infection par le VIH-1 en participant à l'échappement viral ainsi qu'à l'établissement de réservoirs viraux en inhibant à la fois la réponse immunitaire et la réplication virale ([Masood, Lunardi-Iskandar et al. 1994](#)). Il a été observé chez les patients VIH+ une augmentation de l'IL-10 sérique dont le taux corrèle avec l'évolution de la maladie ([Stylianou, Aukrust et al. 1999](#)). Par ailleurs, des études génétiques ont montré que les personnes possédant la mutation IL-10-5'-592A sur le promoteur du gène de l'IL-10, produisent moins d'IL-10, et évoluent moins rapidement vers le stade SIDA ([Mahajan, Agosto-Mojica et al.](#)). Plusieurs protéines virales sont capables d'induire la production de l'IL-10 dont Tat ([Badou, Bennasser et al. 2000](#); [Li, Lee et al. 2005](#);

[Gupta, Boppana et al. 2008](#)), Nef ([Tangsinmankong, Day et al. 2000](#)) et gp120 ([Shan, Klasse et al. 2007](#)). Nous avons montré que Tat induit la production de l'IL-10 par les monocytes, les macrophages et les DCs suite à la stimulation de la voie TLR4. D'autres virus utilisent également l'IL-10 comme moyen d'échapper au système immunitaire. Certains agissent directement en codant pour des homologues viraux de l'IL-10 tel que l'EBV, le CMV et les Poxvirus ([Tortorella, Gewurz et al. 2000](#); [Wilson and Brooks 2011](#)). Par exemple, le CMV par son IL-10 virale, est capable d'inhiber la maturation des DCs et ceci afin de réprimer la réponse anti-virale et la réponse cellulaire Th1 ([Chang, Baumgarth et al. 2004](#)). D'autres virus stimulent sa production par l'hôte comme cela a été démontré pour les virus murins LCMV, MMTV ou les virus humains HBV, HCV et HIV ([Tortorella, Gewurz et al. 2000](#); [Redpath, Ghazal et al. 2001](#); [Wilson and Brooks 2011](#)).

### **Tat augmente l'expression de PD-L1**

La voie PD-1/PD-L1 est détournée par de nombreux virus pour échapper au contrôle par le système immunitaire afin d'assurer leur persistance dans l'organisme. Une accumulation de données récentes souligne l'importance de cette voie dans l'affaiblissement du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH-1. L'expression du ligand PD-L1 est augmentée principalement sur les CPA tandis que le récepteur PD-1 est induit sur les lymphocytes T ([Xu, Wang et al. ; Trabattoni, Saresella et al. 2003](#); [Day, Kaufmann et al. 2006](#); [Trautmann, Janbazian et al. 2006](#); [Zhang, Zhang et al. 2007](#); [Wang, Zhang et al. 2008](#)). Le niveau d'expression de PD-1/PD-L1 a été corrélé positivement avec la perte de fonction du système immunitaire et l'évolution vers le stade symptomatique de la maladie. En accord avec cette observation, il a été montré que les « élite contrôleur » qui ne développent pas de maladie malgré leur statut séropositif ne présentent pas d'augmentation significative de PD-1/PD-L1, tandis que les « progressseurs » et les patients au stade SIDA ont une expression élevée de ces molécules immunosuppressives ([Wang, Fan et al. 2010](#); [Whittall, Peters et al. 2011](#)).

Récemment, les travaux du groupe de Sékaly ont montré une relation entre la stimulation de la voie PD-1/PD-L1 et la production de l'IL-10 au cours de l'infection par le VIH-1. En effet, les auteurs ont montré une augmentation de l'expression de PD-1 sur les monocytes des patients séropositifs pour le VIH-1 principalement par les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ ) ou les ligands des TLR (TLR-4/-2/-9) qui sont augmentés suite à la détérioration de la barrière gastro-intestinal ([Said, Dupuy et al.](#)). Les monocytes exprimant PD-1 en interagissant avec PD-L1 présent à la surface de différents types cellulaires, induisent la production de l'IL-10 impliquée dans l'affaiblissement du système immunitaire. En accord avec ces résultats, la fonction des LT CD4+ peut être restaurée suite à la neutralisation de l'interaction PD-1-PD-L1 ou IL10-IL-10R ([Said, Dupuy et al.](#)). Ainsi, ces deux voies immunosuppressives semblent jouer un rôle important dans le dysfonctionnement de la réponse immune et la persistance virale.

Des études réalisées *in vitro* chez l'homme ainsi que *in vivo* dans le modèle SIV/macaque et HIV/souris humanisées ont démontré l'efficacité de la neutralisation de la voie PD-1/PD-L1 sur la restauration de la fonction du système immunitaire et le contrôle de la réplication virale ([Freeman, Wherry et al. 2006](#); [Macatangay and Rinaldo 2009](#); [Velu, Titanji et al. 2009](#); [Palmer, Neff et al. 2013](#)). D'autre part, une étude récente a mis en évidence une association entre le polymorphisme génétique de PD-1 et notamment le rôle protecteur de l'allèle *pdcd1*-7209 T et le statut non-progressseur de certains patients infectés par le VIH-1 ([Nasi, Riva et al. 2013](#)). Cette mutation,

localisée dans la région enhancer à proximité du promoteur du gène codant pour PD-1, semble associée à une expression diminuée de PD-1 ([Mostowska, Wudarski et al. 2008](#)).

Les travaux que nous avons réalisés montrent que la protéine Tat augmente l'expression de PD-L1 sur les monocytes et les DCs, ce qui pourrait favoriser l'établissement d'un état immunosuppresseur. En accord avec ces résultats une étude récente publiée au cours de ma thèse a montré que Tat augmente l'expression de PD-L1 dans une lignée de cellules endothéliales ECV304 transfectée par un plasmide codant Tat. Ces cellules exprimant PD-L1 sont également capables d'inhiber la prolifération de PBMC dans un système de coculture ([Shi, Qin et al. 2011](#)). En plus de la protéine Tat plusieurs mécanismes ont été associés à l'augmentation de PD-L1 au cours de l'infection incluant i) le rôle direct de la particule virale sur les pDC et les mDC ([Boasso, Hardy et al. 2008](#); [Wang, Fan et al. 2010](#)); ii) le rôle de l'ARN viral suite à l'activation des TLR7/8 dans les pDC ([Meier, Bagchi et al. 2008](#)); iii) des effets indirects liés à l'induction de l'IFN- $\alpha$  dans les monocytes et les lymphocytes T ([Boasso, Hardy et al. 2008](#)) ou à l'induction de l'IL-10 dans les macrophages ([Rodriguez-Garcia, Porichis et al.](#)). Nos résultats ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme impliquant le TNF- $\alpha$ , stimulé par la protéine Tat suite à l'activation du TLR4. Dans notre système, la neutralisation de l'IL-10 ou de l'IFN- $\gamma$  ne bloque pas la capacité de Tat à augmenter l'expression de PD-L1, suggérant que le VIH-1 a développé différentes stratégies pour assurer l'augmentation de ce facteur immunosuppresseur.

### **Tat stimule l'expression de IDO**

Un autre mécanisme responsable de l'affaiblissement du système immunitaire au cours de l'infection au VIH-1 est l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme immunosuppressive IDO ([Favre, Mold et al.](#); [Boasso, Herbeuval et al. 2007](#)). Plusieurs virus induisent cette enzyme comme mécanisme d'échappement au système immunitaire dont le LCMV ([Wilson, Kidani et al. 2012](#)), le rétrovirus MuLV ([Hoshi, Saito et al.](#)) et le VIH ([Favre, Mold et al.](#)). Plus précisément, il a été montré que le VIH active l'expression de l'enzyme IDO chez les macrophages et les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes ([Ahn, Byeon et al.](#)). Cette augmentation de IDO est responsable de la dégradation du tryptophane en kynurénine, un composé neurotoxique et lymphotoxique ([Aandahl, Quigley et al.](#)). La déplétion du tryptophane a pour conséquence d'inhiber la prolifération lymphocytaire contribuant ainsi à l'échappement et la persistance virale. L'un des mécanismes mis en place par le VIH pour activer l'enzyme IDO est la protéine virale Tat. En effet, nous avons montré que Tat induit l'expression et l'activation de IDO dans les MoDC ([Planes and Bahraoui 2013](#)), en accord avec d'autres travaux publiés au cours de ma thèse ([Samikkannu, Rao et al.](#)). La capacité de Tat à induire l'expression de IDO a également été rapportée dans d'autres types cellulaires incluant les macrophages et les astrocytes humains ([Samikkannu, Saiyed et al. 2009](#)), les cellules d'hypocampe ([Fu, Lawson et al.](#)) et du système nerveux central de souris ([Lawson, Kelley et al.](#)).

En complément des précédents travaux déjà publiés, notre contribution a permis d'apporter de nouveaux éléments sur le mécanisme d'action de Tat. Cette protéine semble agir par un mécanisme direct, indépendamment de la production des cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , et IFN- $\gamma$ . Bien que ces cytokines aient été décrites pour leurs capacités à induire IDO dans d'autres systèmes ([Grant, Naif et al. 2000](#); [Wang, Koga et al. 2011](#); [Yeung, Wu et al. 2012](#)), nous avons démontré grâce à l'utilisation de trois approches complémentaires incluant l'utilisation i) de milieu conditionné par Tat ii) d'un système de coculture dans des compartiments séparés (transwell) et iii) d'un système de co-

culture directe, que Tat induit l'expression deIDO de manière directe dans les MoDC, indépendamment de la production de facteurs solubles ou membranaires ([Planes and Bahraoui 2013](#)). De manière similaire, les travaux de Boasso et al. ont montré que le VIH-1 stimule l'expression deIDO dans les pDC en parallèle à la production des interférons de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type II (IFN- $\gamma$ ) ([Boasso, Herbeuval et al. 2007](#)). Cependant, bien que ces IFN soient capables d'induire l'expression deIDO, leur induction par le virus ne semble pas nécessaire à l'induction deIDO dans la mesure où la neutralisation des IFN à l'aide d'anticorps anti-IFN- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$  utilisés séparément ou en combinaison ne bloque pas la capacité du virus à induireIDO. En revanche, l'expression deIDO est abolie suite au blocage du récepteur CD4 à l'aide d'anticorps anti-CD4. Ces résultats suggèrent donc que dans les pDC, le VIH-1 induitIDO dans un mécanisme direct, dépendant de l'interaction gp120-CD4 ([Boasso and Shearer 2007](#)). Cependant, ce dernier mécanisme proposé reste à valider en activant l'expression deIDO avec la gp120 soluble ou en inhibant avec des anticorps anti-gp120.

Grâce à l'utilisation d'une protéine Tat tronquée (Tat 1-45) délétée de sa région C-terminale contenant le domaine basique essentiel à l'internalisation de Tat, nous avons montré que Tat agit au niveau membranaire, probablement suite à l'activation d'une cascade de signalisation. Deux voies de signalisations majeures sont bien connues pour stimuler l'expression deIDO : les voies Jak et PI3K ([Chen 2011](#)). Cependant, le blocage de ces voies à l'aide d'inhibiteurs chimiques s'est révélé incapable d'inhiber la capacité de Tat à induireIDO, suggérant un mode d'action différent de Tat. En aval de ces voies de signalisation, l'expression deIDO est sous le contrôle d'un promoteur comportant deux séquences ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*), retrouvés habituellement dans les promoteurs des gènes inductibles par les IFN  $\alpha/\beta$  (dits de type I), et trois séquences du type GAS (*interferon Gamma Activated Site*), retrouvés dans les promoteurs des gènes induits par l'IFN $\gamma$  (dit de type II) ([Robinson, Shirey et al. 2003](#)). Nous pouvons donc nous demander comment Tat active-t-elle ces gènes stimulés par les interférons (ISG) indépendamment de la production d'IFN ? L'une des hypothèses est que Tat pourrait agir via un mécanisme intracellulaire. En accord avec cette hypothèse, une étude récente basée sur l'utilisation d'un vecteur adénoviral codant pour la protéine Tat 1-101, a démontré que Tat est capable de moduler l'expression d'un sous-ensemble de gènes stimulés par les interférons (ISG) incluant les facteurs de transcription IRF7, STAT1, les chimiokines IP10, HuMIG, MCP2 et le récepteur TRAIL, via un mécanisme intracellulaire et plus particulièrement intranucléaire ([Kim, Kukkonen et al. 2013](#)). En effet, il a été démontré par des expériences de CHIP que la protéine Tat s'associe directement avec le promoteur des gènes IRF7 et MAP2K6 dans les MoDC. Ceci a été corrélé à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription IRF7, STAT1, une activation des voies STAT1 et de la voie MAPK p38 et une augmentation de l'expression des gènes ISG en aval. Cependant, l'expression deIDO n'a pas été étudiée. En contraste apparent avec nos travaux, cette étude propose donc un mode d'action intracellulaire pour Tat cependant la sécrétion de Tat n'a pas été recherchée. Une seconde étude récente a démontré le rôle de la voie p38 MAPK dans l'induction deIDO par Tat dans des cellules d'hypocampes de souris, en démontrant l'inhibition de l'ARNm deIDO suite à l'utilisation d'un inhibiteur chimique (SB 202190) ([Fu, Lawson et al.](#)). Cependant, cette étude ne s'est intéressée à la régulation deIDO par Tat qu'au niveau transcriptionnel sans étudier l'expression deIDO au niveau protéique.

En plus de la voie dépendante des IFN, il existe une seconde voie conduisant à l'expression des ISG : la voie des Toll-like receptors. Nos résultats montrent que le blocage du TLR4 par des

anticorps ou par l'antagoniste LPS-RS inhibe significativement l'induction de IDO par Tat dans les MoDC. Paradoxalement, la stimulation avec le LPS, ligands naturel du TLR4, ne conduit pas à l'expression de IDO ([Favre, Mold et al. ; Braun, Longman et al. 2005](#)). Ces observations suggèrent donc une activation du TLR4 par Tat différente de celle connue pour le LPS, ou bien, l'activation d'une seconde voie alternative par Tat concomitante à la voie TLR4.

### **Tat module la réponse T auxiliaire**

L'expression de IDO, ainsi que des autres facteurs IL-10 et PD-L1 a été associée à une stimulation de la prolifération des LT régulateurs et une inhibition des LTh1 et Th17 ([Clerici and Shearer 1993; Clerici and Shearer 1994; Favre, Mold et al. 2010](#)). La protéine Tat, en augmentant leur expression, pourrait donc favoriser le développement d'une réponse Th2/Treg inefficace dans la lutte contre le virus, au détriment d'une réponse cellulaire de type Th1/Th17, plus propice au contrôle de la réplication virale. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de Tat sur la polarisation des lymphocytes T. Ceci permettrait de mieux comprendre le rôle joué par Tat dans la dérégulation de la balance des réponses T auxiliaires (Switch Th1→ Th2 et Th17→ Treg) observé au cours de l'infection par le VIH-1. Dans cet objectif, les travaux de Gupta et al ont montrés que l'IL-10 induite par Tat joue un rôle majeur dans la modulation des réponses immunes ([Gupta, Boppana et al. 2008](#)). Les auteurs ont montré que le profil de réponse de type Th1 anti-gp120 chez des souris co-immunisées avec un plasmide codant pour la gp120 est déplacé vers un profil Th2 chez des souris immunisées avec Tat en plus de la gp120. Lorsque l'immunisation est réalisée dans des souris IL-10 KO, cet effet est perdu, suggérant que la polarisation de la réponse immune vers un profil Th2 est médiée par la capacité de Tat à stimuler la production de l'IL-10 ([Gupta, Boppana et al. 2008](#)). En contraste avec ces résultats les travaux du groupe Ensoli, ont montré que l'immunisation avec la protéine Tat chez l'homme active une réponse Th1 et Treg en plus d'une réponse de type Th2 ([Fanales-Belasio, Moretti et al. 2002; Fanales-Belasio, Moretti et al. 2009; Ensoli, Bellino et al. 2010](#)). Une troisième étude récente a montré que la protéine Tat active la production de 11 cytokines différentes dans les LT dont l'expression et la sécrétion de l'IL-17 ([Johnson, Patel et al. 2013](#)). Bien qu'aucun consensus n'ait été établi, l'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle important de Tat dans la modulation des réponses T auxiliaires.

Des mécanismes similaires de dysfonctionnement immuns et de persistance virale impliquant l'IL-10, PD-1/PD-L1 et IDO ont été décrits pour d'autres virus tel que EBV, hCMV, HBV, HCV et LCMV. Dans le modèle LCMV Cl13, la persistance du virus a été associée à l'augmentation d'une population de DCs tolérogènes exprimant simultanément PD-L1, IDO et l'IL-10, au détriment d'une population immunogène produisant l'IL-12 ([Wilson, Kidani et al. 2012](#)). En accord avec leur phénotype immunosuppresseur, ces cellules présentent une capacité altérée à activer les LT. Des données obtenues dans ce même modèle d'infection au LCMV persistant clone 13 ont montré que ces facteurs agissent en synergie via des voies indépendantes ([Brooks, Ha et al. 2008](#)). La neutralisation de l'ensemble de ces facteurs pourrait donc conduire à restaurer une fonction T normale et entraîner la clairance virale.

### **Un nouveau récepteur pour la protéine Tat : le TLR4**

Les travaux précédents du laboratoire (Benhajj et al.) ont permis de mettre en évidence le rôle crucial du TLR4/MD2 comme récepteur de la protéine Tat du VIH-1 en utilisant deux approches

complémentaires. Une approche biochimique, par des expériences de « GST-pull down », de co-immuno-précipitation et d'ELISA a permis de montrer que Tat, par son domaine 1-45, interagit physiquement et de manière directe avec le complexe TLR4/MD2, et le cofacteur MD2 seul, alors qu'aucune interaction n'est observée entre Tat et CD14. Une seconde approche, utilisant des anticorps bloquant (anti-TLR4, anti-CD14, anti-MD2) a montré que seuls les anticorps anti-TLR4 (HTA125) sont capables de bloquer la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 induits par Tat dans les monocytes humains.

Ma contribution personnelle dans cette partie, a permis de développer une troisième approche basée sur l'utilisation de modèle murin invalidé pour le TLR4 ou ses partenaires moléculaires. Ainsi, l'utilisation des souris TLR4 KO (C57BL65 TLR4<sup>-/-</sup>) ou exprimant un TLR4 non fonctionnel, muté dans le domaine intracellulaire TIR (lignée C3H/HeJ) nous a permis de confirmer le rôle central du TLR4 dans la transduction des signaux conduisant à la l'induction de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  par Tat aussi bien *in vitro* dans les macrophages et les DCs que *in vivo* dans le péritoine des souris préalablement injectées par Tat. En plus de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$ , nous avons montré que le TLR4 est impliqué dans l'induction de l'IL-6, l'IL-12, l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  par Tat. L'utilisation de souris KO pour le CD14 et MD2 a révélé qu'en l'absence de l'un de ces cofacteurs, Tat est incapable d'induire la production de cytokines, suggérant ainsi que ces cofacteurs jouent un rôle essentiel dans l'engagement de la signalisation de la voie TLR4 par Tat. L'utilisation de souris invalidées pour les molécules de signalisations du TLR4 (MyD88 et TRIF) a permis de montrer l'importance des deux voies MyD88-dépendante et TRIF-dépendante dans la production de cytokine induite par Tat.

L'ensemble de ces résultats tendent à suggérer un rôle majeur de la voie TLR4 incluant les cofacteurs CD14 et MD2 et les molécules de signalisation MyD88 et TRIF dans la transduction des signaux conduisant à l'induction de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  par la protéine Tat du VIH-1. Bien que l'utilisation des souris invalidées pour le TLR4 et ses différents partenaires moléculaires (CD14, MD2, MyD88 et TRIF) représente un précieux modèle, les conclusions obtenues doivent être validées dans le modèle humain. Dans cet objectif, nous avons entrepris des travaux d'invalidation du TLR4 et ses partenaires moléculaires par des siRNA dans le modèle cellulaire HEK.

En plus du LPS, des ligands viraux ont été décrits pour le TLR4. Il s'agit des glycoprotéines d'enveloppe du rétrovirus murin MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) ([Rassa, Meyers et al. 2002](#)) et de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV) ([Kurt-Jones, Popova et al. 2000](#)). Plus récemment, il a été rapporté que le virus VSV (Vesicular Stomatitis Virus) stimule le TLR4 via sa protéine G ([Beutler, Jiang et al. 2006](#)). En plus des protéines virales, d'autres ligands ont été rapportés pour leur capacité à interagir avec le TLR4 comme les protéines Hsp60 et 70, la fibronectine et le fibrinogène humains, le Hsp60 bactérien, le diterpène et le taxol ([Beutler, Jiang et al. 2006](#)).

Ce nouveau mécanisme de reconnaissance d'un ligand viral par les TLR soulève la question du rôle de cette interaction dans la lutte contre le VIH. En effet, les TLR jouent un rôle majeur dans la détection et l'élimination des pathogènes en stimulant à la fois l'immunité innée et adaptative.

Au moins six TLR ont été rapportés dans l'interaction avec des virus ou des facteurs viraux. Bien que l'on ne connaisse probablement pas tous les ligands viraux impliqués dans l'activation des TLR, quatre classes de PAMP viraux ont été définies à ce jour : les ARN simples (TLR7 et 8) ou doubles



brins (TLR3), les ADN CpG non méthylés (TLR9) et les protéines virales (TLR2 et 4) ([Boehme and Compton 2004](#); [Barton 2007](#)). Les TLR capables de reconnaître des facteurs viraux exercent leurs actions antivirales en induisant la production des interférons, connus pour leurs nombreuses fonctions antivirales et en stimulant la maturation des DCs. Cette maturation permet alors l'activation des LT spécifiques et donc l'initiation de la réponse adaptative dirigée contre le virus en question. Par exemple, l'activation des cellules T CD4+ auxiliaires est inhibée chez des souris déficientes pour MyD88 suite à l'infection par le HSV-2 (Herpes Simplex Virus 2) ([Brockman, Kwon et al. 2009](#)). Suite à une infection virale, l'activation des TLR, et notamment du TLR4, conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I, initialement découvert pour leurs multiples propriétés antivirales ([Isaacs and Lindenmann 1957](#); [Samuel 2001](#)).

### **Détournement des TLR par les virus et le VIH-1**

Afin d'échapper au système immunitaire les virus ont développé différentes stratégies pour bloquer ou détourner la voie des TLR. Certains, sont capables d'inhiber directement la transduction du signal passant par les TLR, empêchant ainsi l'activation efficace de la réponse antivirale. Par exemple, le virus de la vaccine bloque la signalisation des TLR en codant pour un dominant négatif du domaine intra cytoplasmique TIR ([Stack, Haga et al. 2005](#)). Le virus de l'hépatite C agit en codant pour une protéase capable de dégrader la molécule de transduction TRIF ([Roy and Mocarski 2007](#)).

D'autres virus détournent la fonction des TLR et/ou de leurs cofacteurs à leur avantage. Cette stratégie est employée par le virus de la rougeole qui en interagissant avec le TLR2 induit l'expression de son propre récepteur le CD150 ([Gerlier and Valentin 2009](#)). Le rétrovirus MMTV quand à lui utilise le TLR4 pour induire la production d'IL-10 par les LB et ceci afin d'instaurer un état immunosuppresseur ([Jude, Pobezińska et al. 2003](#)). Le virus de la Dengue utilise la protéine CD14 pour infecter les monocytes/macrophages ([Chen, Wang et al. 1999](#)) et le virus influenza utilise ce cofacteur pour induire la production de cytokines ([Pauligk, Nain et al. 2004](#)).

Dans le cas du VIH-1, la voie des TLR semble également détournée au profit du virus. Il a été montré que le VIH-1 utilise la voie de signalisation du TLR8 pour activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B lui permettant ainsi d'initier la transcription des gènes viraux ([Gringhuis, van der Vlist et al.](#)). Il tire également profit de l'activation des TLR7/8 pour induire l'expression de PD-L1 et IDO afin d'instaurer un état immunosuppresseur favorable à sa persistance ([Boasso, Herbeuval et al. 2007](#); [Meier, Bagchi et al. 2008](#); [Martinson, Montoya et al. 2010](#)). D'autre part, l'activation des TLR contribue également à stimuler la réplication virale soit directement en activant le promoteur pro-viral LTR ([Equils, Faure et al. 2001](#); [Equils, Schito et al. 2003](#)), soit indirectement en favorisant le recrutement et l'activation de nouvelles cibles pour le VIH. Par ailleurs, certaines variations génétiques au niveau des gènes codant pour les TLR sont connues pour influencer l'évolution de l'infection par le VIH-1. Alors que les polymorphismes des TLR2 et TLR3 ne semblent pas avoir de conséquences sur la virémie et la physiopathologie de l'infection ([Pine, McElrath et al. 2009](#)), d'autres mutations touchant les TLR4 ([Pine, McElrath et al. 2009](#)), TLR9 ([Bochud, Hersberger et al. 2007](#)), TLR7 ([Oh, Baumann et al. 2009](#)) et TLR8 ([Oh, Taube et al. 2008](#)), ont été associées avec différents tableaux cliniques de l'infection par le VIH-1. Notamment, des polymorphismes du TLR4 (Asp299Gly et Thr399Ile) ont été associés à une forte virémie ([Pine, McElrath et al. 2009](#)) et une susceptibilité accrue aux tuberculoses ([Papadopoulos, Ferwerda et al. 2010](#)). Nos travaux proposent donc un nouveau mécanisme d'échappement viral où le VIH, par l'intermédiaire de sa protéine Tat,

détourne le TLR4 à son profit pour induire l'expression des molécules immunosuppressives, l'IL-10, PD-L1 et IDO.

### **Quels sont les autres effets de l'interaction Tat – TLR4 ?**

La mise en évidence du TLR4/MD2 comme récepteur de la protéine Tat du VIH-1 ouvre de nouvelles perspectives de recherches. En effet, en plus des effets décrits dans cette étude, la protéine Tat du VIH-1 a été impliquée dans un vaste panel d'activité incluant la production de nombreuses cytokines et chimiokines (TGF- $\beta$  ([Barreto-de-Souza, Pacheco et al. 2006](#); [Barreto-de-Souza, Xavier Medeiros et al. 2008](#)), IL-1 $\beta$  ([Yang, Wu et al. 2010](#)), IL-8 ([Ott, Lovett et al. 1998](#)), CXCL16 ([Landro, Damas et al. 2009](#))), l'augmentation de récepteurs membranaires CD95 ([Cohen, Li et al. 1999](#)), TRAIL ([Zhang, Li et al. 2001](#)), CCR5 ([Zheng, Yang et al. 2005](#)) et CXCR4 ([Huang, Bosch et al. 1998](#); [Secchiero, Zella et al. 1999](#); [Campbell, Loret et al. 2010](#)), et l'induction de l'apoptose ([Purvis, Jacobberger et al. 1995](#)). Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle potentiel de cette interaction Tat-TLR4 dans ces différents effets décrits pour Tat.

D'autre part, le TLR4 est exprimé à la surface des lymphocytes T et B en plus des CPA. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction Tat-TLR4 à la surface de ces populations lymphocytaires d'autant que leurs fonctions sont fortement perturbées au cours de l'infection par le VIH-1 ([Sanders, Cruse et al. 2008](#)). Parmi les effets décrits dans la littérature, l'engagement du TLR4 sur les LB a été associé à une production de l'IL-10 ([Jude, Pobezinskaya et al. 2003](#)) et une augmentation de la production d'anticorps ([Dorner, Brandt et al. 2009](#)). Sur les LT, l'activation du TLR4 ne semble pas affecter la sécrétion de cytokine ou la prolifération, cependant, il a été montré que le traitement des LTreg au LPS augmente leur activité suppressive ([Lewkowicz, Lewkowicz et al. 2006](#)). Notons que l'activité des Treg est également augmentée au cours de l'infection par le VIH-1 ([Ji and Cloyd 2009](#)). La protéine Tat via son interaction avec le TLR4 pourrait donc contribuer à la dérégulation de la fonction lymphocytaire en plus de la modulation de la fonction des CPA.

### **La protéine Tat une cible thérapeutique ?**

Le rôle central de la protéine Tat dans l'infection au VIH-1, a encouragé l'étude de nombreux essais thérapeutiques contre le SIDA. Diverses approches vaccinales basées sur la protéine Tat ont été ou sont en cours de développement ([Cafaro, Caputo et al. 1999](#); [Ensoli and Cafaro 2000](#); [Opi, Peloponese et al. 2004](#); [Ensoli, Fiorelli et al. 2006](#); [Watkins, Lancelot et al. 2006](#); [Campbell and Loret 2009](#); [Caputo, Gavioli et al. 2009](#); [Ensoli, Fiorelli et al. 2009](#); [Ensoli, Bellino et al. 2010](#)). Cependant nos travaux vont dans le sens d'un effet négatif de Tat sur la réponse immunitaire anti-virale via l'induction des molécules immunosuppressives PD-L1, IDO et IL-10. La neutralisation de ces facteurs immunosuppressifs induits par Tat pourrait donc contribuer à neutraliser l'effet immunosuppresseur de Tat et stimuler l'induction d'une réponse humorale et cellulaire anti-Tat efficace contre le VIH-1 ([van Baalen, Pontesilli et al. 1997](#); [Rezza, Fiorelli et al. 2005](#)). Une seconde alternative pourrait être de bloquer directement le TLR4 à l'aide d'antagonistes ou d'inhibiteurs ciblant les voies de signalisations, ceci afin de limiter les effets immunosuppressifs de Tat. De plus, le blocage de la voie TLR4 au cours de l'infection par le VIH-1 pourrait apporter plusieurs avantages potentiels. En plus d'inhiber les effets de Tat que nous avons décrit, ce traitement pourrait limiter l'activation immunitaire chronique dont la cause a été associée à l'augmentation systémique du LPS bactériens ([Brenchley, Price et al. 2006](#)). Par ailleurs, une telle approche thérapeutique a déjà été testée chez la

souris afin de limiter les dommages liés à l'infection par le virus influenza ([Shirey, Lai et al. 2013](#)). L'étude a montré que l'administration de l'Eritoran, un antagoniste synthétique du TLR4, protège les souris d'une infection létale par le virus influenza, en réduisant l'inflammation ainsi que les pathologies pulmonaires et les symptômes cliniques associées à la grippe ([Shirey, Lai et al. 2013](#)).

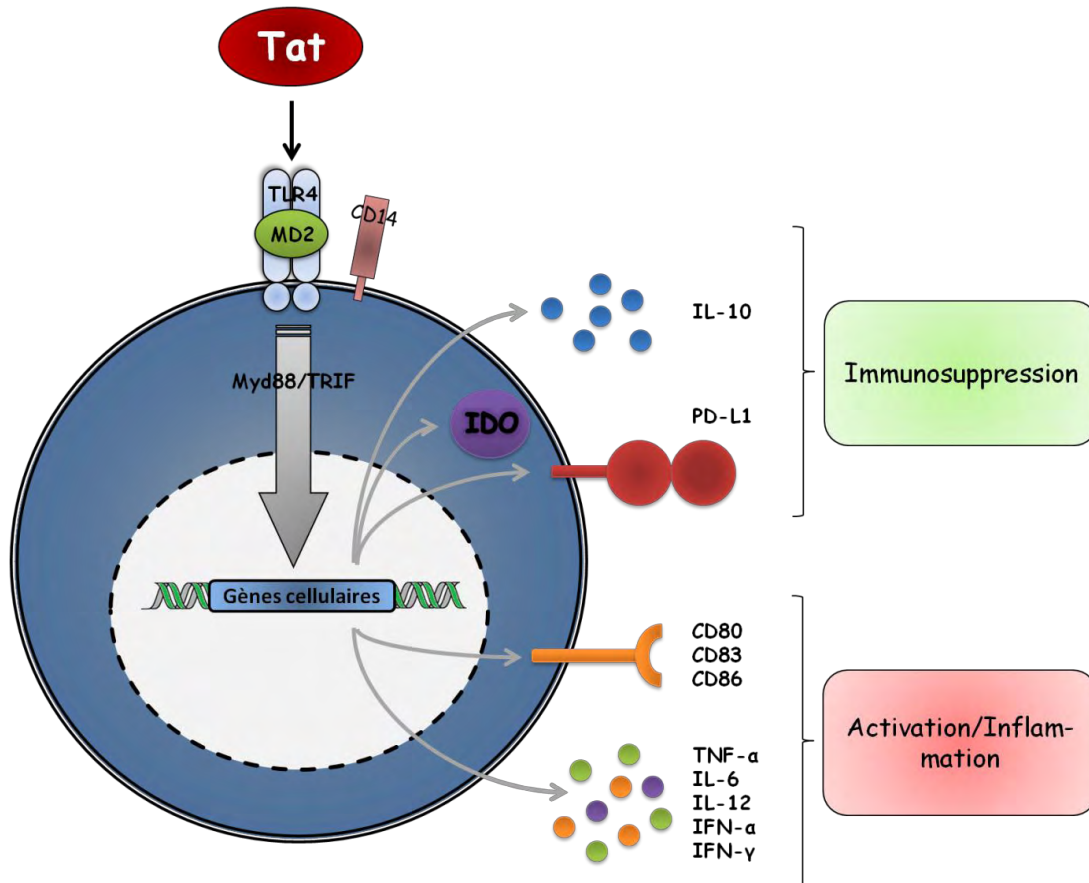


Figure 44 Effets de Tat sur l'expression des facteurs d'activation/immunosuppression

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ma thèse montrent que la protéine Tat du VIH-1 interagit avec le TLR4/MD2 et active la voie TLR4. Tat stimule l'activation immunitaire en induisant la maturation des DCs et en stimulant la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, et des interférons IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . Tat stimule l'expression des facteurs immunosuppresseurs IL-10, PD-L1 et IDO. L'essentiel de ces effets semble dépendre de l'interaction Tat – TLR4.

## Conclusion.

En conclusion, nos résultats suggèrent que le VIH-1, par l'intermédiaire de sa protéine Tat, détourne à son profit un récepteur essentiel dans la réponse immune : le TLR4. Ce mécanisme contribue à la pathogénèse du VIH en induisant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12. Il interfère aussi avec les réponses antivirales en stimulant la production d'IL-10, de PD-L1 et de IDO. Il n'est donc pas exclu que Tat, à cause de son expression précoce, contribue à instaurer un état immunosuppresseur très tôt après l'infection. Le détournement du TLR4 par le VIH-1 pourrait constituer un nouveau mécanisme d'échappement viral. La compréhension de ce phénomène pourrait apporter des informations importantes pour le développement de thérapies futures.



# Références

---

- Aandahl, E.M., M.F. Quigley, W.J. Moretto, M. Moll, V.D. Gonzalez, A. Sonnerborg, S. Lindback, F.M. Hecht, S.G. Deeks, M.G. Rosenberg, D.F. Nixon, and J.K. Sandberg. 2004. Expansion of CD7(low) and CD7(negative) CD8 T-cell effector subsets in HIV-1 infection: correlation with antigenic load and reversion by antiretroviral treatment. *Blood* 104:3672-3678.
- Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
- Aggarwal, B.B., and W.J. Kohr. 1985. Human tumor necrosis factor. *Methods in enzymology* 116:448-456.
- Agwale, S.M., M.T. Shata, M.S. Reitz, Jr., V.S. Kalyanaraman, R.C. Gallo, M. Popovic, and D.M. Hone. 2002. A Tat subunit vaccine confers protective immunity against the immune-modulating activity of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10037-10041.
- Ahn, J., I.J. Byeon, S. Dharmasena, K. Huber, J. Concel, A.M. Gronenborn, and N. Sluis-Cremer. 2010. The RNA binding protein HuR does not interact directly with HIV-1 reverse transcriptase and does not affect reverse transcription in vitro. *Retrovirology* 7:40.
- Akdis, C.A., and K. Blaser. 2001. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 103:131-136.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
- Albini, A., S. Ferrini, R. Benelli, S. Sforzini, D. Giunciuglio, M.G. Aluigi, A.E. Proudfoot, S. Alouani, T.N. Wells, G. Mariani, R.L. Rabin, J.M. Farber, and D.M. Noonan. 1998. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13153-13158.
- Alimonti, J.B., T.B. Ball, and K.R. Fowke. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84:1649-1661.
- Alkhatib, G. 2009. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* 4:96-103.
- Allen, T.M., L. Mortara, B.R. Mothe, M. Liebl, P. Jing, B. Calore, M. Piekarczyk, R. Ruddersdorf, D.H. O'Connor, X. Wang, C. Wang, D.B. Allison, J.D. Altman, A. Sette, R.C. Desrosiers, G. Sutter, and D.I. Watkins. 2002. Tat-vaccinated macaques do not control simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* 76:4108-4112.
- Almeida, M., M. Cordero, J. Almeida, and A. Orfao. 2005. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *Aids* 19:261-271.
- Alter, G., D. Kavanagh, S. Rihn, R. Luteijn, D. Brooks, M. Oldstone, J. van Lunzen, and M. Altfeld. 2010. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *J Clin Invest* 120:1905-1913.
- Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791-798.
- Annunziato, F., and S. Romagnani. 2009. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis research & therapy* 11:257.
- Appay, V., and D. Sauce. 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of pathology* 214:231-241.
- Arhel, N. 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7:96.
- Badou, A., Y. Bennasser, M. Moreau, C. Leclerc, M. Benkirane, and E. Bahraoui. 2000. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J Virol* 74:10551-10562.
- Baenziger, S., M. Heikenwalder, P. Johansen, E. Schlaepfer, U. Hofer, R.C. Miller, S. Diemand, K. Honda, T.M. Kundig, A. Aguzzi, and R.F. Speck. 2009. Triggering TLR7 in mice induces immune

- activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 113:377-388.
- Bafica, A., C.A. Scanga, O. Equils, and A. Sher. 2004. The induction of Toll-like receptor tolerance enhances rather than suppresses HIV-1 gene expression in transgenic mice. *J Leukoc Biol* 75:460-466.
- Ball, H.J., H.J. Yuasa, C.J. Austin, S. Weiser, and N.H. Hunt. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41:467-471.
- Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Barach, Y.S., J.S. Lee, and X. Zang. 2010. T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion pathways and emerging therapeutics. *Trends in molecular medicine*
- Barral, D.C., and M.B. Brenner. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 7:929-941.
- Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautuet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
- Barreto-de-Souza, V., G.J. Pacheco, A.R. Silva, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, E.M. Saraiva, and D.C. Bou-Habib. 2006. Increased Leishmania replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis* 194:846-854.
- Barreto-de-Souza, V., T. Xavier Medeiros, M.C. Machado Motta, D.C. Bou-Habib, and E.M. Saraiva. 2008. HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes Infect* 10:642-649.
- Barton, G.M. 2007. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol* 19:33-40.
- Bayer, P., M. Kraft, A. Ejchart, M. Westendorp, R. Frank, and P. Rosch. 1995. Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* 247:529-535.
- Becker, Y. 2004a. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers--a review and hypothesis. *Virus genes* 28:5-18.
- Becker, Y. 2004b. HIV-1 gp120 binding to dendritic cell receptors mobilize the virus to the lymph nodes, but the induced IL-4 synthesis by FcepsilonRI+ hematopoietic cells damages the adaptive immunity--a review, hypothesis, and implications. *Virus genes* 29:147-165.
- Beimling, P., and K. Moelling. 1989. Isolation and characterization of the tax protein of HTLV-I. *Oncogene* 4:511-516.
- Bell, N.M., and A.M. Lever. 2013. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol* 21:136-144.
- Bennasser, Y., A. Badou, J. Tkaczuk, and E. Bahraoui. 2002. Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha. *Virology* 303:174-180.
- Bennasser, Y., and E. Bahraoui. 2002. HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-beta1 and -delta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:546-554.
- Bernstein, H.B., M.C. Plasterer, S.E. Schiff, C.M. Kitchen, S. Kitchen, and J.A. Zack. 2006. CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration. *J Immunol* 177:3669-3676.
- Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24:353-389.

- Boasso, A. 2011. Wounding the immune system with its own blade: HIV-induced tryptophan catabolism and pathogenesis. *Current medicinal chemistry* 18:2247-2256.
- Boasso, A., A.W. Hardy, A.L. Landay, J.L. Martinson, S.A. Anderson, M.J. Dolan, M. Clerici, and G.M. Shearer. 2008. PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin Immunol* 129:132-144.
- Boasso, A., J.P. Herbeuval, A.W. Hardy, S.A. Anderson, M.J. Dolan, D. Fuchs, and G.M. Shearer. 2007a. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109:3351-3359.
- Boasso, A., and G.M. Shearer. 2007. How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. *Current drug metabolism* 8:217-223.
- Boasso, A., and G.M. Shearer. 2008. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 126:235-242.
- Boasso, A., M. Vaccari, D. Fuchs, A.W. Hardy, W.P. Tsai, E. Trynieszewska, G.M. Shearer, and G. Franchini. 2009. Combined effect of antiretroviral therapy and blockade of IDO in SIV-infected rhesus macaques. *J Immunol* 182:4313-4320.
- Boasso, A., M. Vaccari, A. Hryniewicz, D. Fuchs, J. Nacs, V. Cecchinato, J. Andersson, G. Franchini, G.M. Shearer, and C. Chougnnet. 2007b. Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 81:11593-11603.
- Bochud, P.Y., M. Hersberger, P. Taffe, M. Bochud, C.M. Stein, S.D. Rodrigues, T. Calandra, P. Francioli, A. Telenti, R.F. Speck, and A. Aderem. 2007. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *Aids* 21:441-446.
- Boehme, K.W., and T. Compton. 2004. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol* 78:7867-7873.
- Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549-1555.
- Boise, L.H., A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten, and C.B. Thompson. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3:87-98.
- Boissier, M.C., E. Assier, G. Falgarone, and N. Bessis. 2008. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 75:373-375.
- Boo, K.H., and J.S. Yang. 2010. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei medical journal* 51:9-17.
- Borsetti, A., S. Baroncelli, M.T. Maggiorella, S. Moretti, E. Fanales-Belasio, L. Sernicola, A. Tripiciano, I. Macchia, Z. Michelini, R. Belli, S. Farcomeni, M.R. Pavone-Cossut, D. Negri, A. Caputo, S. Bellino, S. Butto, F. Titti, A. Cafaro, and B. Ensoli. 2009. Containment of infection in tat vaccinated monkeys after rechallenge with a higher dose of SHIV89.6P(cy243). *Viral immunology* 22:117-124.
- Brabers, N.A., and H.S. Nottet. 2006. Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia. *Eur J Clin Invest* 36:447-458.
- Braun, D., R.S. Longman, and M.L. Albert. 2005. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106:2375-2381.
- Brenchley, J.M., D.A. Price, T.W. Schacker, T.E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B.R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J.N. Martin, F.M. Hecht, L.J. Picker, M.M. Lederman, S.G. Deeks, and D.C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12:1365-1371.
- Brenchley, J.M., G. Silvestri, and D.C. Douek. 2010. Nonprogressive and progressive primate immunodeficiency lentivirus infections. *Immunity* 32:737-742.

- Brigati, C., M. Giacca, D.M. Noonan, and A. Albin. 2003. HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol Lett* 220:57-65.
- Brockman, M.A., D.S. Kwon, D.P. Tighe, D.F. Pavlik, P.C. Rosato, J. Sela, F. Porichis, S. Le Gall, M.T. Waring, K. Moss, H. Jessen, F. Pereyra, D.G. Kavanagh, B.D. Walker, and D.E. Kaufmann. 2009. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114:346-356.
- Brooks, D.G., S.J. Ha, H. Elsaesser, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and M.B. Oldstone. 2008. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20428-20433.
- Brooks, D.G., M.J. Trifilo, K.H. Edelmann, L. Teyton, D.B. McGavern, and M.B. Oldstone. 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12:1301-1309.
- Buisson, S., A. Benlahrech, B. Gazzard, F. Gotch, P. Kelleher, and S. Patterson. 2009. Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. *J Infect Dis* 199:1862-1871.
- Buonaguro, L., G. Barillari, H.K. Chang, C.A. Bohan, V. Kao, R. Morgan, R.C. Gallo, and B. Ensoli. 1992. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol* 66:7159-7167.
- Buscemi, L., D. Ramonet, and J.D. Geiger. 2007. Human immunodeficiency virus type-1 protein Tat induces tumor necrosis factor-alpha-mediated neurotoxicity. *Neurobiology of disease* 26:661-670.
- Butte, M.J., M.E. Keir, T.B. Phamduy, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
- Cabal-Hierro, L., and P.S. Lazo. 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular signalling* 24:1297-1305.
- Cafaro, A., A. Caputo, C. Fracasso, M.T. Maggiorella, D. Goletti, S. Baroncelli, M. Pace, L. Sernicola, M.L. Koanga-Mogtomo, M. Betti, A. Borsetti, R. Belli, L. Akerblom, F. Corrias, S. Butto, J. Heeney, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 1999. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat Med* 5:643-650.
- Campbell, G.R., and E.P. Loret. 2009. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology* 6:50.
- Campbell, G.R., E.P. Loret, and S.A. Spector. 2010. HIV-1 clade B Tat, but not clade C Tat, increases X4 HIV-1 entry into resting but not activated CD4+ T cells. *J Biol Chem* 285:1681-1691.
- Campbell, G.R., J.D. Watkins, K.K. Singh, E.P. Loret, and S.A. Spector. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *J Virol* 81:5919-5928.
- Canque, B., Y. Bakri, S. Camus, M. Yagello, A. Benjouad, and J.C. Gluckman. 1999. The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 93:3866-3875.
- Caputo, A., R. Gavioli, S. Bellino, O. Longo, A. Tripiciano, V. Francavilla, C. Sgadari, G. Paniccia, F. Titti, A. Cafaro, F. Ferrantelli, P. Monini, F. Ensoli, and B. Ensoli. 2009. HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development. *Int Rev Immunol* 28:285-334.
- Cardaci, S., M. Soster, F. Bussolino, and S. Marchio. 2013. The V1/V2 loop of HIV-1 gp120 is necessary for Tat binding and consequent modulation of virus entry. *FEBS Lett*
- Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.



- Carter, C.C., L.A. McNamara, A. Onafuwa-Nuga, M. Shackleton, J.t. Riddell, D. Bixby, M.R. Savona, S.J. Morrison, and K.L. Collins. 2011. HIV-1 utilizes the CXCR4 chemokine receptor to infect multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell host & microbe* 9:223-234.
- Cen, S., M. Niu, and L. Kleiman. 2004. The connection domain in reverse transcriptase facilitates the in vivo annealing of tRNA<sup>Lys3</sup> to HIV-1 genomic RNA. *Retrovirology* 1:33.
- Chang, W.L., N. Baumgarth, D. Yu, and P.A. Barry. 2004. Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol* 78:8720-8731.
- Che, K.F., R.L. Sabado, E.M. Shankar, V. Tjomsland, D. Messmer, N. Bhardwaj, J.D. Lifson, and M. Larsson. HIV-1 impairs in vitro priming of naive T cells and gives rise to contact-dependent suppressor T cells. *Eur J Immunol* 40:2248-2258.
- Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4:336-347.
- Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227-242.
- Chen, W. 2011. IDO: more than an enzyme. *Nature immunology* 12:809-811.
- Chen, Y.C., S.Y. Wang, and C.C. King. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 73:2650-2657.
- Chevalier, M.F., and L. Weiss. 2013. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* 121:29-37.
- Chiarugi, A., E. Meli, and F. Moroni. 2001. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *Journal of neurochemistry* 77:1310-1318.
- Chirmule, N., S. Than, S.A. Khan, and S. Pahwa. 1995. Human immunodeficiency virus Tat induces functional unresponsiveness in T cells. *J Virol* 69:492-498.
- Chu, W.M. 2013. Tumor necrosis factor. *Cancer letters* 328:222-225.
- Chung, D.J., M. Rossi, E. Romano, J. Ghith, J. Yuan, D.H. Munn, and J.W. Young. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood* 114:555-563.
- Cicala, C., J. Arthos, and A.S. Fauci. 2011. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of translational medicine* 9 Suppl 1:S2.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
- Clerici, M., and G.M. Shearer. 1993. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 14:107-111.
- Clerici, M., and G.M. Shearer. 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15:575-581.
- Clerici, M., T.A. Wynn, J.A. Berzofsky, S.P. Blatt, C.W. Hendrix, A. Sher, R.L. Coffman, and G.M. Shearer. 1994. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 93:768-775.
- Coffin, J., and R. Swanstrom. 2013. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3:a012526.
- Cohen, S.S., C. Li, L. Ding, Y. Cao, A.B. Pardee, E.M. Shevach, and D.I. Cohen. 1999. Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV Tat challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10842-10847.
- Coleman, C.M., C.S. Gelais, and L. Wu. 2013. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Advances in experimental medicine and biology* 762:109-130.

- Collette, Y., H. Dutartre, A. Benziane, and D. Olive. 1997. The role of HIV1 Nef in T-cell activation: Nef impairs induction of Th1 cytokines and interacts with the Src family tyrosine kinase Lck. *Research in virology* 148:52-58.
- Conant, K., A. Garzino-Demo, A. Nath, J.C. McArthur, W. Halliday, C. Power, R.C. Gallo, and E.O. Major. 1998. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3117-3121.
- Contreras, X., Y. Bennasser, and E. Bahraoui. 2004. IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes. *Microbes Infect* 6:1182-1190.
- Contreras, X., Y. Bennasser, N. Chazal, and E. Bahraoui. 2003. [HIV-1 Tat induces TNF-alpha production by human monocytes: involvement of calcium and PKC pathways]. *J Soc Biol* 197:267-275.
- Contreras, X., Y. Bennasser, N. Chazal, M. Moreau, C. Leclerc, J. Tkaczuk, and E. Bahraoui. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology* 332:316-328.
- Cooper, A., M. Garcia, C. Petrovas, T. Yamamoto, R.A. Koup, and G.J. Nabel. 2013. HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* 498:376-379.
- Cui, Z., J. Patel, M. Tuzova, P. Ray, R. Phillips, J.G. Woodward, A. Nath, and R.J. Mumper. 2004. Strong T cell type-1 immune responses to HIV-1 Tat (1-72) protein-coated nanoparticles. *Vaccine* 22:2631-2640.
- Cummins, N.W., and A.D. Badley. 2010. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell death & disease* 1:e99.
- D'Orso, I., and A.D. Frankel. 2010. HIV-1 Tat: Its Dependence on Host Factors is Crystal Clear. *Viruses* 2:2226-2234.
- D'Souza, M., A.P. Fontenot, D.G. Mack, C. Lozupone, S. Dillon, A. Meditz, C.C. Wilson, E. Connick, and B.E. Palmer. 2007. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol* 179:1979-1987.
- D'Souza, V., and M.F. Summers. 2005. How retroviruses select their genomes. *Nature reviews. Microbiology* 3:643-655.
- Daly, L.M., P.A. Johnson, G. Donnelly, C. Nicolson, J. Robertson, and K.H. Mills. 2005. Innate IL-10 promotes the induction of Th2 responses with plasmid DNA expressing HIV gp120. *Vaccine* 23:963-974.
- Dang, Y., W.E. Dale, and O.R. Brown. 2000. Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free radical biology & medicine* 28:615-624.
- Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, and B.D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443:350-354.
- Debaisieux, S., F. Rayne, H. Yezid, and B. Beaumelle. 2012. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13:355-363.
- Deeks, S.G., C.M. Kitchen, L. Liu, H. Guo, R. Gascon, A.B. Narvaez, P. Hunt, J.N. Martin, J.O. Kahn, J. Levy, M.S. McGrath, and F.M. Hecht. 2004. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104:942-947.
- Deregibus, M.C., V. Cantaluppi, S. Doublier, M.F. Brizzi, I. Deambrosis, A. Albin, and G. Camussi. 2002. HIV-1-Tat protein activates phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT-dependent survival pathways in Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem* 277:25195-25202.

- Dinareello, C.A., A. Simon, and J.W. van der Meer. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 11:633-652.
- Dinkins, C., J. Arko-Mensah, and V. Deretic. 2010. Autophagy and HIV. *Seminars in cell & developmental biology* 21:712-718.
- Donaghy, H., A. Pozniak, B. Gazzard, N. Qazi, J. Gilmour, F. Gotch, and S. Patterson. 2001. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98:2574-2576.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
- Dorner, M., S. Brandt, M. Tinguely, F. Zucol, J.P. Bourquin, L. Zauner, C. Berger, M. Bernasconi, R.F. Speck, and D. Nadal. 2009. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. *Immunology* 128:573-579.
- Dunham, R.M., S.N. Gordon, M. Vaccari, M. Piatak, Y. Huang, S.G. Deeks, J. Lifson, G. Franchini, and J.M. McCune. 2013. Preclinical evaluation of HIV eradication strategies in the simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque: a pilot study testing inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:207-214.
- Dyavar Shetty, R., V. Velu, K. Titanji, S.E. Bosinger, G.J. Freeman, G. Silvestri, and R.R. Amara. 2012. PD-1 blockade during chronic SIV infection reduces hyperimmune activation and microbial translocation in rhesus macaques. *J Clin Invest* 122:1712-1716.
- Eisele, E., and R.F. Siliciano. 2012. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 37:377-388.
- Ensoli, B., G. Barillari, S.Z. Salahuddin, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1990. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345:84-86.
- Ensoli, B., S. Bellino, A. Tripiciano, O. Longo, V. Francavilla, S. Marcotullio, A. Cafaro, O. Picconi, G. Paniccia, A. Scoglio, A. Arancio, C. Ariola, M.J. Ruiz Alvarez, M. Campagna, D. Scaramuzzi, C. Iori, R. Esposito, C. Mussini, F. Ghinelli, L. Sighinolfi, G. Palamara, A. Latini, G. Angarano, N. Ladisa, F. Soscia, V.S. Mercurio, A. Lazzarin, G. Tambussi, R. Visintini, F. Mazzotta, M. Di Pietro, M. Galli, S. Rusconi, G. Carosi, C. Torti, G. Di Perri, S. Bonora, F. Ensoli, and E. Garaci. 2010. Therapeutic immunization with HIV-1 Tat reduces immune activation and loss of regulatory T-cells and improves immune function in subjects on HAART. *PLoS One* 5:e13540.
- Ensoli, B., and A. Cafaro. 2000. Control of viral replication and disease onset in cynomolgus monkeys by HIV-1 TAT vaccine. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 14:22-26.
- Ensoli, B., V. Fiorelli, F. Ensoli, A. Cafaro, F. Titti, S. Butto, P. Monini, M. Magnani, A. Caputo, and E. Garaci. 2006. Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials. *Aids* 20:2245-2261.
- Ensoli, B., V. Fiorelli, F. Ensoli, A. Lazzarin, R. Visintini, P. Narciso, A. Di Carlo, A. Tripiciano, O. Longo, S. Bellino, V. Francavilla, G. Paniccia, A. Arancio, A. Scoglio, B. Collacchi, M.J. Ruiz Alvarez, G. Tambussi, C. Tassan Din, G. Palamara, A. Latini, A. Antinori, G. D'Offizi, M. Giuliani, M. Giulianelli, M. Carta, P. Monini, M. Magnani, and E. Garaci. 2009. The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine. *Vaccine* 28:371-378.
- Equils, O., E. Faure, L. Thomas, Y. Bulut, S. Trushin, and M. Arditi. 2001. Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *J Immunol* 166:2342-2347.
- Equils, O., M.L. Schito, H. Karahashi, Z. Madak, A. Yarali, K.S. Michelsen, A. Sher, and M. Arditi. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *J Immunol* 170:5159-5164.
- Este, J.A., and A. Telenti. 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet* 370:81-88.
- Estes, J.D., S.N. Gordon, M. Zeng, A.M. Chahroudi, R.M. Dunham, S.I. Staprans, C.S. Reilly, G. Silvestri, and A.T. Haase. 2008. Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in

- SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *J Immunol* 180:6798-6807.
- Evans, V.A., G. Khoury, S. Saleh, P.U. Cameron, and S.R. Lewin. 2012. HIV persistence: chemokines and their signalling pathways. *Cytokine & growth factor reviews* 23:151-157.
- Fallarino, F., U. Grohmann, and P. Puccetti. 2012. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *European journal of immunology* 42:1932-1937.
- Fan, H., F.L. Tansi, W.A. Weihofen, C. Bottcher, J. Hu, J. Martinez, W. Saenger, and W. Reutter. 2012. Molecular mechanism and structural basis of interactions of dipeptidyl peptidase IV with adenosine deaminase and human immunodeficiency virus type-1 transcription transactivator. *Eur J Cell Biol* 91:265-273.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, V. Fiorelli, A. Tripiciano, M.R. Pavone Cossut, A. Scoglio, B. Collacchi, F. Nappi, I. Macchia, S. Bellino, V. Francavilla, A. Caputo, G. Barillari, M. Magnani, M.E. Laguardia, A. Cafaro, F. Titti, P. Monini, F. Ensoli, and B. Ensoli. 2009. HIV-1 Tat addresses dendritic cells to induce a predominant Th1-type adaptive immune response that appears prevalent in the asymptomatic stage of infection. *J Immunol* 182:2888-2897.
- Fanales-Belasio, E., S. Moretti, F. Nappi, G. Barillari, F. Micheletti, A. Cafaro, and B. Ensoli. 2002. Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 168:197-206.
- Fantuzzi, L., C. Purificato, K. Donato, F. Belardelli, and S. Gessani. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 78:9763-9772.
- Favre, D., J. Mold, P.W. Hunt, B. Kanwar, P. Loke, L. Seu, J.D. Barbour, M.M. Lowe, A. Jayawardene, F. Aweeka, Y. Huang, D.C. Douek, J.M. Brenchley, J.N. Martin, F.M. Hecht, S.G. Deeks, and J.M. McCune. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2:32ra36.
- Favre, D., J. Mold, P.W. Hunt, B. Kanwar, P. Loke, L. Seu, J.D. Barbour, M.M. Lowe, A. Jayawardene, F. Aweeka, Y. Huang, D.C. Douek, J.M. Brenchley, J.N. Martin, F.M. Hecht, S.G. Deeks, and J.M. McCune. 2010. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Science translational medicine* 2:32ra36.
- Ferrantelli, F., M.T. Maggiorella, I. Schiavoni, L. Sernicola, E. Olivieri, S. Farcomeni, M.R. Pavone-Cossut, S. Moretti, R. Belli, B. Collacchi, I.K. Srivastava, F. Titti, A. Cafaro, S.W. Barnett, and B. Ensoli. 2011. A combination HIV vaccine based on Tat and Env proteins was immunogenic and protected macaques from mucosal SHIV challenge in a pilot study. *Vaccine* 29:2918-2932.
- Ford, E.S., C.E. Puronen, and I. Sereti. 2009. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS* 4:206-214.
- Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe. 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* 236:219-242.
- Freeman, G.J. 2008. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10275-10276.
- Freeman, G.J., E.J. Wherry, R. Ahmed, and A.H. Sharpe. 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203:2223-2227.
- Fu, X., M.A. Lawson, K.W. Kelley, and R. Dantzer. HIV-1 Tat activates indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Neuroinflammation* 8:88.
- Gallo, R.C., and M.S. Reitz, Jr. 1985. The first human retroviruses: are there others? *Microbiological sciences* 2:97-98, 101-104.
- Gandhi, N., Z. Saiyed, S. Thangavel, J. Rodriguez, K.V. Rao, and M.P. Nair. 2009. Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:691-699.

- Gavioli, R., S. Cellini, A. Castaldello, R. Voltan, E. Gallerani, F. Gagliardoni, C. Fortini, E.B. Cofano, C. Triulzi, A. Cafaro, I. Srivastava, S. Barnett, A. Caputo, and B. Ensoli. 2008. The Tat protein broadens T cell responses directed to the HIV-1 antigens Gag and Env: implications for the design of new vaccination strategies against AIDS. *Vaccine* 26:727-737.
- Gearing, A.J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A.H. Davidson, A.H. Drummond, W.A. Galloway, R. Gilbert, J.L. Gordon, and et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370:555-557.
- Gee, K., J.B. Angel, W. Ma, S. Mishra, N. Gajanayaka, K. Parato, and A. Kumar. 2006. Intracellular HIV-Tat expression induces IL-10 synthesis by the CREB-1 transcription factor through Ser133 phosphorylation and its regulation by the ERK1/2 MAPK in human monocytic cells. *J Biol Chem* 281:31647-31658.
- Gee, K., J.B. Angel, S. Mishra, M.A. Blahoianu, and A. Kumar. 2007. IL-10 regulation by HIV-Tat in primary human monocytic cells: involvement of calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated p38 MAPK and Sp-1 and CREB-1 transcription factors. *J Immunol* 178:798-807.
- Geiger, T.L., and S. Tauro. 2012. Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Human immunology* 73:232-239.
- Geleziunas, R., W. Xu, K. Takeda, H. Ichijo, and W.C. Greene. 2001. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* 410:834-838.
- Gerlier, D., and H. Valentin. 2009. Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Current topics in microbiology and immunology* 329:163-191.
- Glocker, E.O., D. Kotlarz, C. Klein, N. Shah, and B. Grimbacher. 2011. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246:102-107.
- Godin-Ethier, J., L.A. Hanafi, J.B. Duvignaud, D. Leclerc, and R. Lapointe. 2011. IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Molecular immunology* 49:253-259.
- Goldstone, D.C., V. Ennis-Adeniran, J.J. Hedden, H.C. Groom, G.I. Rice, E. Christodoulou, P.A. Walker, G. Kelly, L.F. Haire, M.W. Yap, L.P. de Carvalho, J.P. Stoye, Y.J. Crow, I.A. Taylor, and M. Webb. 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480:379-382.
- Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E.A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M.R. Boulassel, J.P. Routy, R.P. Sekaly, and P. Ancuta. 2010. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184:1604-1616.
- Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R.M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72:2733-2737.
- Granelli-Piperno, A., A. Golebiowska, C. Trumfheller, F.P. Siegal, and R.M. Steinman. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7669-7674.
- Grant, R.S., H. Naif, M. Espinosa, and V. Kapoor. 2000a. IDO induction in IFN-gamma activated astroglia: a role in improving cell viability during oxidative stress. *Redox report : communications in free radical research* 5:101-104.
- Grant, R.S., H. Naif, S.J. Thuruthyil, N. Nasr, T. Littlejohn, O. Takikawa, and V. Kapoor. 2000b. Induction of indolamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *J Virol* 74:4110-4115.
- Gray, P., J. Dagvadorj, K.S. Michelsen, C. Brikos, A. Rentsendorj, T. Town, T.R. Crother, and M. Arditi. 2011. Myeloid differentiation factor-2 interacts with Lyn kinase and is tyrosine

- phosphorylated following lipopolysaccharide-induced activation of the TLR4 signaling pathway. *J Immunol* 187:4331-4337.
- Gringhuis, S.I., M. van der Vlist, L.M. van den Berg, J. den Dunnen, M. Litjens, and T.B. Geijtenbeek. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol* 11:419-426.
- Grutter, M.G., and J. Luban. 2012. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Current opinion in virology* 2:142-150.
- Gupta, S., R. Boppana, G.C. Mishra, B. Saha, and D. Mitra. 2008. HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner. *J Immunol* 180:79-88.
- Gutheil, W.G., M. Subramanyam, G.R. Flentke, D.G. Sanford, E. Munoz, B.T. Huber, and W.W. Bachovchin. 1994. Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6594-6598.
- Hackstein, H., and A.W. Thomson. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4:24-34.
- Haig, D. 2012. Retroviruses and the placenta. *Current biology : CB* 22:R609-613.
- Herbein, G., and K.A. Khan. 2008. Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol* 29:61-67.
- Herbeuval, J.P., and G.M. Shearer. 2007. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 123:121-128.
- Hernandez, J.C., J. Arteaga, S. Paul, A. Kumar, E. Latz, and S. Urcuqui-Inchima. 2011. Up-regulation of TLR2 and TLR4 in dendritic cells in response to HIV type 1 and coinfection with opportunistic pathogens. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:1099-1109.
- Hernandez, J.C., M. Stevenson, E. Latz, and S. Urcuqui-Inchima. 2012. HIV type 1 infection up-regulates TLR2 and TLR4 expression and function in vivo and in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:1313-1328.
- Hill, M., S. Tanguy-Royer, P. Royer, C. Chauveau, K. Asghar, L. Tesson, F. Lavainne, S. Remy, R. Brion, F.X. Hubert, M. Heslan, M. Rimbart, L. Berthelot, J.R. Moffett, R. Josien, M. Gregoire, and I. Anegon. 2007. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *European journal of immunology* 37:3054-3062.
- Hofmeyer, K.A., H. Jeon, and X. Zang. 2011. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:451694.
- Hoshi, M., K. Saito, A. Hara, A. Taguchi, H. Ohtaki, R. Tanaka, H. Fujigaki, Y. Osawa, M. Takemura, H. Matsunami, H. Ito, and M. Seishima. The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. *J Immunol* 185:3305-3312.
- Hoshino, S., M. Konishi, M. Mori, M. Shimura, C. Nishitani, Y. Kuroki, Y. Koyanagi, S. Kano, H. Itabe, and Y. Ishizaka. 2010. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol* 87:1133-1143.
- Hu, W.S., and S.H. Hughes. 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:
- Huang, L., I. Bosch, W. Hofmann, J. Sodroski, and A.B. Pardee. 1998. Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J Virol* 72:8952-8960.
- Huengsberg, M., J.B. Winer, M. Gompels, R. Round, J. Ross, and M. Shahmanesh. 1998. Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. *Clinical chemistry* 44:858-862.
- Huigen, M.C., W. Kamp, and H.S. Nottet. 2004. Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur J Clin Invest* 34:57-66.

- Ipp, H., and A. Zemlin. 2013. The paradox of the immune response in HIV infection: when inflammation becomes harmful. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 416:96-99.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258-267.
- Ito, T., S. Hanabuchi, Y.H. Wang, W.R. Park, K. Arima, L. Bover, F.X. Qin, M. Gilliet, and Y.J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28:870-880.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
- Izmailova, E., F.M. Bertley, Q. Huang, N. Makori, C.J. Miller, R.A. Young, and A. Aldovini. 2003. HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med* 9:191-197.
- Jagodzinski, P.P., and W.H. Trzeciak. 2000. Differential expression of chemokine receptor CXCR4 in Th1 and Th2 subtypes of CD4+ lymphocytes. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 38:21-23.
- Janeway, C.A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1:1-13.
- Janeway, C.A., Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13:11-16.
- Janeway, C.A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jerala, R. 2007. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 297:353-363.
- Ji, J., and M.W. Cloyd. 2009. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *International immunology* 21:283-294.
- Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg, and B. Beutler. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6:565-570.
- Johnson, T.P., K. Patel, K.R. Johnson, D. Maric, P.A. Calabresi, R. Hasbun, and A. Nath. 2013. Induction of IL-17 and nonclassical T-cell activation by HIV-Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Johri, M.K., R. Mishra, C. Chhatbar, S.K. Unni, and S.K. Singh. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11:269-283.
- Jude, B.A., Y. Pobezinskaya, J. Bishop, S. Parke, R.M. Medzhitov, A.V. Chervonsky, and T.V. Golovkina. 2003. Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat Immunol* 4:573-578.
- Jurgens, B., U. Hainz, D. Fuchs, T. Felzmann, and A. Heitger. 2009. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood* 114:3235-3243.
- Kanwar, B., D. Favre, and J.M. McCune. 2010. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* 5:151-157.
- Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993.
- Karakhanova, S., S. Meisel, S. Ring, K. Mahnke, and A.H. Enk. 2010. ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur J Immunol* 40:254-266.
- Katsikis, P.D., Y.M. Mueller, and F. Villinger. 2011. The cytokine network of acute HIV infection: a promising target for vaccines and therapy to reduce viral set-point? *PLoS pathogens* 7:e1002055.
- Kaufmann, D.E., and B.D. Walker. 2008. Programmed death-1 as a factor in immune exhaustion and activation in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 3:362-367.

- Keating, S.M., E.S. Jacobs, and P.J. Norris. 2012. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine & growth factor reviews* 23:193-206.
- Kedzierska, K., and S.M. Crowe. 2001. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* 12:133-150.
- Kedzierska, K., S.M. Crowe, S. Turville, and A.L. Cunningham. 2003. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Reviews in medical virology* 13:39-56.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
- Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe. 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Current opinion in immunology* 19:309-314.
- Khaitan, A., and D. Unutmaz. 2011. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 8:4-11.
- Kim, B.O., Y. Liu, B.Y. Zhou, and J.J. He. 2004. Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein. *J Immunol* 172:1888-1895.
- Kim, N., S. Kukkonen, P. Martinez-Viedma Mdel, S. Gupta, and A. Aldovini. 2013. Tat engagement of p38 MAP kinase and IRF7 pathways leads to activation of interferon-stimulated genes in antigen-presenting cells. *Blood* 121:4090-4100.
- Kingsman, S.M., and A.J. Kingsman. 1996. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *European journal of biochemistry / FEBS* 240:491-507.
- Kinter, A.L., E.J. Godbout, J.P. McNally, I. Sereti, G.A. Roby, M.A. O'Shea, and A.S. Fauci. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181:6738-6746.
- Kittiworakarn, J., A. Lecoq, G. Moine, R. Thai, E. Lajeunesse, P. Drevet, C. Vidaud, A. Menez, and M. Leonetti. 2006. HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J Biol Chem* 281:3105-3115.
- Knosp, C.A., and J.A. Johnston. 2012. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology* 135:101-111.
- Kornfeld, C., M.J. Ploquin, I. Pandrea, A. Faye, R. Onanga, C. Apetrei, V. Poaty-Mavoungou, P. Rouquet, J. Estaquier, L. Mortara, J.F. Desoutter, C. Butor, R. Le Grand, P. Roques, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, O.M. Diop, and M.C. Muller-Trutwin. 2005. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest* 115:1082-1091.
- Krathwohl, M.D., T.W. Schacker, and J.L. Anderson. 2006. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 193:494-504.
- Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S.D. Lu. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53.
- Kuipers, H., F. Muskens, M. Willart, D. Hijdra, F.B. van Assema, A.J. Coyle, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur J Immunol* 36:2472-2482.
- Kulkarni, A., D.S. Ravi, K. Singh, S. Rampalli, V. Parekh, D. Mitra, and S. Chattopadhyay. 2005. HIV-1 Tat modulates T-bet expression and induces Th1 type of immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 329:706-712.
- Kuller, L.H., R. Tracy, W. Belloso, S. De Wit, F. Drummond, H.C. Lane, B. Ledergerber, J. Lundgren, J. Neuhaus, D. Nixon, N.I. Paton, and J.D. Neaton. 2008. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS medicine* 5:e203.
- Kumar, A., J.B. Angel, M.P. Daftarian, K. Parato, W.D. Cameron, L. Filion, and F. Diaz-Mitoma. 1998. Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals:



- association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clin Exp Immunol* 114:78-86.
- Kurt-Jones, E.A., L. Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones, R.A. Tripp, E.E. Walsh, M.W. Freeman, D.T. Golenbock, L.J. Anderson, and R.W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
- Kutsch, O., J. Oh, A. Nath, and E.N. Benveniste. 2000. Induction of the chemokines interleukin-8 and IP-10 by human immunodeficiency virus type 1 tat in astrocytes. *J Virol* 74:9214-9221.
- Lackner, A.A., M.M. Lederman, and B. Rodriguez. 2012. HIV pathogenesis: the host. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a007005.
- Lafeuillade, A. 2012. Eliminating the HIV reservoir. *Curr HIV/AIDS Rep* 9:121-131.
- Laguet, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474:654-657.
- Lambotin, M., S. Raghuraman, F. Stoll-Keller, T.F. Baumert, and H. Barth. 2010. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature reviews. Microbiology* 8:350-360.
- Landro, L., J.K. Damas, B. Halvorsen, B. Fevang, T. Ueland, K. Otterdal, L. Heggelund, S.S. Froland, and P. Aukrust. 2009. CXCL16 in HIV infection - a link between inflammation and viral replication. *Eur J Clin Invest* 39:1017-1024.
- Larsson, M., E.M. Shankar, K.F. Che, A. Saeidi, R. Ellegard, M. Barathan, V. Velu, and A. Kamarulzaman. 2013. Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection. *Retrovirology* 10:31.
- Latchman, Y., C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
- Lawson, M.A., K.W. Kelley, and R. Dantzer. Intracerebroventricular administration of HIV-1 Tat induces brain cytokine and indoleamine 2,3-dioxygenase expression: a possible mechanism for AIDS comorbid depression. *Brain Behav Immun* 25:1569-1575.
- Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh. 2012. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 12:168-179.
- Lee, S.J., B.C. Jang, S.W. Lee, Y.I. Yang, S.I. Suh, Y.M. Park, S. Oh, J.G. Shin, S. Yao, L. Chen, and I.H. Choi. 2006. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett* 580:755-762.
- Lee, Y.K., R. Mukasa, R.D. Hatton, and C.T. Weaver. 2009. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current opinion in immunology* 21:274-280.
- Leghmari, K., Y. Bennasser, and E. Bahraoui. 2008a. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur J Cell Biol* 87:947-962.
- Leghmari, K., Y. Bennasser, J. Tkaczuk, and E. Bahraoui. 2008b. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cell Immunol* 253:45-53.
- Leghmari, K., X. Contreras, C. Moureau, and E. Bahraoui. 2008c. HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-beta1 and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38. *Cell Immunol* 254:46-55.
- Leng, Q., Z. Bentwich, E. Magen, A. Kalinkovich, and G. Borkow. 2002. CTLA-4 upregulation during HIV infection: association with anergy and possible target for therapeutic intervention. *Aids* 16:519-529.
- Lewkowicz, P., N. Lewkowicz, A. Sasiak, and H. Tchorzewski. 2006. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 177:7155-7163.

- Li, C.J., D.J. Friedman, C. Wang, V. Meteleev, and A.B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268:429-431.
- Li, J.C., K.Y. Au, J.W. Fang, H.C. Yim, K.H. Chow, P.L. Ho, and A.S. Lau. 2011. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN-gamma signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *Aids* 25:15-25.
- Li, J.C., and A.S. Lau. 2007. A role for mitogen-activated protein kinase and Ets-1 in the induction of interleukin-10 transcription by human immunodeficiency virus-1 Tat. *Immunology* 121:337-348.
- Li, J.C., D.C. Lee, B.K. Cheung, and A.S. Lau. 2005. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett* 579:3055-3062.
- Li, J.C., H.C. Yim, and A.S. Lau. Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection. *Aids* 24:1609-1623.
- Li, J.C., H.C. Yim, and A.S. Lau. 2010. Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection. *Aids* 24:1609-1623.
- Li, L., S. Dahiya, S. Kortagere, B. Aiamkitsumrit, D. Cunningham, V. Pirrone, M.R. Nonnemacher, and B. Wigdahl. 2012. Impact of Tat Genetic Variation on HIV-1 Disease. *Advances in virology* 2012:123605.
- Liao, W., G. Tan, Z. Zhu, Q. Chen, Z. Lou, X. Dong, W. Zhang, W. Pan, and Y. Chai. HIV-1 Tat induces biochemical changes in the serum of mice. *Virology* 422:288-296.
- Lichterfeld, M., R.T. Gandhi, R.P. Simmons, T. Flynn, A. Sbrolla, X.G. Yu, N. Basgoz, S. Mui, K. Williams, H. Streeck, N. Burgett-Yandow, G. Roy, M. Janssens, L. Pedneault, P. Vandepapeliere, M. Koutsoukos, M.A. Demoitie, P. Bourguignon, L. McNally, G. Voss, and M. Altfeld. 2012. Induction of strong HIV-1-specific CD4+ T-cell responses using an HIV-1 gp120/NefTat vaccine adjuvanted with AS02A in antiretroviral-treated HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59:1-9.
- Lien, E., P. Aukrust, A. Sundan, F. Muller, S.S. Froland, and T. Espevik. 1998. Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood* 92:2084-2092.
- Liu, B., A.M. Woltman, H.L. Janssen, and A. Boonstra. 2009. Modulation of dendritic cell function by persistent viruses. *J Leukoc Biol* 85:205-214.
- Liu, J., A. Hamrouni, D. Wolowiec, V. Coiteux, K. Kuliczowski, D. Hetuin, A. Saudemont, and B. Quesnel. 2007. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110:296-304.
- Liu, Y., M. Jones, C.M. Hingtgen, G. Bu, N. Larabee, R.E. Tanzi, R.D. Moir, A. Nath, and J.J. He. 2000. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* 6:1380-1387.
- Lob, S., and A. Konigsrainer. 2008. Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction? *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 393:995-1003.
- Lob, S., A. Konigsrainer, H.G. Rammensee, G. Opelz, and P. Terness. 2009. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nature reviews. Cancer* 9:445-452.
- Loetscher, P., M. Ugucioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J.M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
- Lopez-Huertas, M.R., E. Mateos, M. Sanchez Del Cojo, F. Gomez-Esquer, G. Diaz-Gil, S. Rodriguez-Mora, J.A. Lopez, E. Calvo, G. Lopez-Campos, J. Alcami, and M. Coiras. 2013. The Presence of

- HIV-1 Tat Second Exon Delays Fas-Mediated Apoptosis in CD4+ T lymphocytes: a Potential Mechanism for Persistent Viral Production. *J Biol Chem*
- Lotz, M., and P. Seth. 1993. TGF beta and HIV infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 685:501-511.
- Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
- Luciw, P.A., S.J. Potter, K. Steimer, D. Dina, and J.A. Levy. 1984. Molecular cloning of AIDS-associated retrovirus. *Nature* 312:760-763.
- Luckheeram, R.V., R. Zhou, A.D. Verma, and B. Xia. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012:925135.
- Macagno, A., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 28:227-233.
- Macatangay, B.J., and C.R. Rinaldo. 2009. PD-1 blockade: A promising immunotherapy for HIV? *Cellscience* 5:61-65.
- MacKenzie, C.R., K. Heseler, A. Muller, and W. Daubener. 2007. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Current drug metabolism* 8:237-244.
- Mahajan, S.D., A. Agosto-Mojica, R. Aalinkeel, J.L. Reynolds, B.B. Nair, D.E. Sykes, J. Martinez, J. Adams, N. Singh, Z. Bernstein, C.B. Hsiao, and S.A. Schwartz. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396:348-352.
- Manches, O., and N. Bhardwaj. 2009. Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *J Clin Invest* 119:3512-3515.
- Manches, O., M.V. Fernandez, J. Plumas, L. Chaperot, and N. Bhardwaj. 2012. Activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by HIV controls a dendritic cell immunoregulatory phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14122-14127.
- Manches, O., D. Munn, A. Fallahi, J. Lifson, L. Chaperot, J. Plumas, and N. Bhardwaj. 2008. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* 118:3431-3439.
- Manel, N., B. Hogstad, Y. Wang, D.E. Levy, D. Unutmaz, and D.R. Littman. 2010. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467:214-217.
- Marcello, A., M. Lusic, G. Pegoraro, V. Pellegrini, F. Beltram, and M. Giacca. 2004. Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* 326:1-11.
- Marone, G., G. Florio, M. Triggiani, A. Petraroli, and A. de Paulis. 2000. Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection. *Critical reviews in immunology* 20:477-496.
- Marsili, G., A.L. Remoli, M. Sgarbanti, E. Perrotti, A. Fragale, and A. Battistini. 2012. HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion. *Cytokine & growth factor reviews* 23:255-270.
- Martinson, J.A., C.J. Montoya, X. Usuga, R. Ronquillo, A.L. Landay, and S.N. Desai. 2010. Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation. *Antimicrob Agents Chemother* 54:871-881.
- Mascarell, L., C. Bauche, C. Fayolle, O.M. Diop, M. Dupuy, N. Nougarede, R. Perraut, D. Ladant, and C. Leclerc. 2006. Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates. *Vaccine* 24:3490-3499.
- Masood, R., Y. Lunardi-Iskandar, T. Moudgil, Y. Zhang, R.E. Law, C.L. Huang, R.K. Puri, A.M. Levine, and P.S. Gill. 1994. IL-10 inhibits HIV-1 replication and is induced by tat. *Biochem Biophys Res Commun* 202:374-383.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.

- Mayne, M., C.P. Holden, A. Nath, and J.D. Geiger. 2000. Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages. *J Immunol* 164:6538-6542.
- McCloskey, T.W., M. Ott, E. Tribble, S.A. Khan, S. Teichberg, M.O. Paul, S. Pahwa, E. Verdin, and N. Chirmule. 1997. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 158:1014-1019.
- McNamara, L.A., and K.L. Collins. 2011. Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs. *Current opinion in HIV and AIDS* 6:43-48.
- McNamara, L.A., A. Onafuwa-Nuga, N.T. Sebastian, J.t. Riddell, D. Bixby, and K.L. Collins. 2013. CD133+ hematopoietic progenitor cells harbor HIV genomes in a subset of optimally treated people with long-term viral suppression. *J Infect Dis* 207:1807-1816.
- Mediouni, S., A. Darque, G. Baillat, I. Ravaux, C. Dhiver, H. Tissot-Dupont, M. Mokhtari, H. Moreau, C. Tamalet, C. Brunet, P. Paul, F. Dignat-George, A. Stein, P. Brouqui, S.A. Spector, G.R. Campbell, and E.P. Loret. 2012. Antiretroviral therapy does not block the secretion of the human immunodeficiency virus tat protein. *Infectious disorders drug targets* 12:81-86.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Meier, A., A. Bagchi, H.K. Sidhu, G. Alter, T.J. Suscovich, D.G. Kavanagh, H. Streeck, M.A. Brockman, S. LeGall, J. Hellman, and M. Altfeld. 2008. Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* 22:655-658.
- Mellor, A.L., and D.H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology* 4:762-774.
- Mezrich, J.D., J.H. Fechner, X. Zhang, B.P. Johnson, W.J. Burlingham, and C.A. Bradfield. 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185:3190-3198.
- Miller, E., and N. Bhardwaj. 2013. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological reviews* 254:170-189.
- Miller, S.I., R.K. Ernst, and M.W. Bader. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature reviews. Microbiology* 3:36-46.
- Mitola, S., S. Sozzani, W. Luini, L. Primo, A. Borsatti, H. Weich, and F. Bussolino. 1997. Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Blood* 90:1365-1372.
- Miyachi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov, and G.B. Melikyan. 2009. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137:433-444.
- Monini, P., A. Cafaro, I.K. Srivastava, S. Moretti, V.A. Sharma, C. Andreini, C. Chiozzini, F. Ferrantelli, M.R. Cossut, A. Tripiciano, F. Nappi, O. Longo, S. Bellino, O. Picconi, E. Fanales-Belasio, A. Borsetti, E. Toschi, I. Schiavoni, I. Bacigalupo, E. Kan, L. Sernicola, M.T. Maggiorella, K. Montin, M. Porcu, P. Leone, B. Collacchi, C. Palladino, B. Ridolfi, M. Falchi, I. Macchia, J.B. Ulmer, S. Butto, C. Sgadari, M. Magnani, M.P. Federico, F. Titti, L. Banci, F. Dalocchio, R. Rappuoli, F. Ensoli, S.W. Barnett, E. Garaci, and B. Ensoli. 2012. HIV-1 tat promotes integrin-mediated HIV transmission to dendritic cells by binding Env spikes and competes neutralization by anti-HIV antibodies. *PLoS One* 7:e48781.
- Moreno-Fernandez, M.E., P. Presicce, and C.A. Chougnet. 2012. Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection. *J Virol* 86:10262-10269.
- Morini, M., R. Benelli, D. Giunciuglio, S. Carlone, G. Arena, D.M. Noonan, and A. Albin. 2000. Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 273:267-271.
- Morse, M.A., H.K. Lyerly, and Y. Li. 1999. The role of IL-13 in the generation of dendritic cells in vitro. *J Immunother* 22:506-513.

- Mostowska, M., M. Wudarski, H. Chwalinska-Sadowska, and P.P. Jagodzinski. 2008. The programmed cell death 1 gene 7209 C>T polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *Clinical and experimental rheumatology* 26:457-460.
- Munn, D.H., M.D. Sharma, B. Baban, H.P. Harding, Y. Zhang, D. Ron, and A.L. Mellor. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22:633-642.
- Munn, D.H., M.D. Sharma, and A.L. Mellor. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 172:4100-4110.
- Muthumani, K., A.Y. Choo, D.J. Shedlock, D.J. Laddy, S.G. Sundaram, L. Hirao, L. Wu, K.P. Thieu, C.W. Chung, K.M. Lankaraman, P. Tebas, G. Silvestri, and D.B. Weiner. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces programmed death 1 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Virol* 82:11536-11544.
- Muthumani, K., D.S. Hwang, A.Y. Choo, S. Mayilvahanan, N.S. Dayes, K.P. Thieu, and D.B. Weiner. 2005. HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *International immunology* 17:103-116.
- Muthumani, K., D.J. Shedlock, D.K. Choo, P. Fagone, O.U. Kawalekar, J. Goodman, C.B. Bian, A.A. Ramanathan, P. Atman, P. Tebas, M.A. Chattergoon, A.Y. Choo, and D.B. Weiner. 2011. HIV-mediated phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase activation in APCs leads to programmed death-1 ligand upregulation and suppression of HIV-specific CD8 T cells. *J Immunol* 187:2932-2943.
- Myszka, D.G., R.W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P.D. Kwong, W.A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M.L. Doyle. 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9026-9031.
- Nasi, M., A. Riva, V. Borghi, R. D'Amico, C. Del Giovane, C. Casoli, M. Galli, E. Vicenzi, L. Gibellini, S. De Biasi, M. Clerici, C. Mussini, A. Cossarizza, and M. Pinti. 2013. Novel genetic association of TNF-alpha-238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*
- Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823-836.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
- Noonan, D., and A. Albin. 2000. From the outside in: extracellular activities of HIV Tat. *Adv Pharmacol* 48:229-250.
- O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13:453-460.
- Oh, D.Y., K. Baumann, O. Hamouda, J.K. Eckert, K. Neumann, C. Kucherer, B. Bartmeyer, G. Poggensee, N. Oh, A. Pruss, H. Jessen, and R.R. Schumann. 2009. A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *Aids* 23:297-307.
- Oh, D.Y., S. Taube, O. Hamouda, C. Kucherer, G. Poggensee, H. Jessen, J.K. Eckert, K. Neumann, A. Storek, M. Pouliot, P. Borgeat, N. Oh, E. Schreier, A. Pruss, K. Hattermann, and R.R. Schumann. 2008. A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis* 198:701-709.
- Omri, B., P. Crisanti, F. Alliot, M.C. Marty, J. Rutin, C. Levallois, A. Privat, and B. Pessac. 1994. CD4 expression in neurons of the central nervous system. *International immunology* 6:377-385.

- Opi, S., J.M. Peloponese, Jr., D. Esquieu, J. Watkins, G. Campbell, J. De Mareuil, K.T. Jeang, D.L. Yirrell, P. Kaleebu, and E.P. Lorent. 2004. Full-length HIV-1 Tat protein necessary for a vaccine. *Vaccine* 22:3105-3111.
- Orabona, C., M.T. Pallotta, C. Volpi, F. Fallarino, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, U. Grohmann, and P. Puccetti. 2008. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:20828-20833.
- Orsilles, M.A., E. Pieri, P. Cooke, and C. Caula. 2006. IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 114:55-60.
- Ott, M., J.L. Lovett, L. Mueller, and E. Verdin. 1998. Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors. *J Immunol* 160:2872-2880.
- Pallotta, M.T., C. Orabona, C. Volpi, C. Vacca, M.L. Belladonna, R. Bianchi, G. Servillo, C. Brunacci, M. Calvitti, S. Bicciato, E.M. Mazza, L. Boon, F. Grassi, M.C. Fioretti, F. Fallarino, P. Puccetti, and U. Grohmann. 2011. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* 12:870-878.
- Palm, N.W., and R. Medzhitov. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* 227:221-233.
- Palmer, B.E., C.P. Neff, J. Lecureux, A. Ehler, M. Dsouza, L. Remling-Mulder, A.J. Korman, A.P. Fontenot, and R. Akkina. 2013. In vivo blockade of the PD-1 receptor suppresses HIV-1 viral loads and improves CD4+ T cell levels in humanized mice. *J Immunol* 190:211-219.
- Papadopoulos, A.I., B. Ferwerda, A. Antoniadou, V. Sakka, L. Galani, D. Kavatha, P. Panagopoulos, G. Poulakou, K. Kanellakopoulou, J.W. van der Meer, E.J. Giamarellos-Bourboulis, and M.G. Netea. 2010. Association of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with increased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 51:242-247.
- Park, B.S., D.H. Song, H.M. Kim, B.S. Choi, H. Lee, and J.O. Lee. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195.
- Pauligk, C., M. Nain, N. Reiling, D. Gemsa, and A. Kaufmann. 2004. CD14 is required for influenza A virus-induced cytokine and chemokine production. *Immunobiology* 209:3-10.
- Pauza, C.D., P. Trivedi, M. Wallace, T.J. Ruckwardt, H. Le Buanec, W. Lu, B. Bizzini, A. Burny, D. Zagury, and R.C. Gallo. 2000. Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3515-3519.
- Pedersen, M., C.M. Nielsen, and H. Permin. 1991. HIV antigen-induced release of histamine from basophils from HIV infected patients. Mechanism and relation to disease progression and immunodeficiency. *Allergy* 46:206-212.
- Perez-Alvarez, L., E. Delgado, Y. Vega, V. Montero, T. Cuevas, A. Fernandez-Garcia, B. Garcia-Riart, S. Perez-Castro, R. Rodriguez-Real, M.J. Lopez-Alvarez, R. Fernandez-Rodriguez, M.J. Lezaun, P. Ordonez, C. Ramos, E. Bereciartua, S. Calleja, A.M. Sanchez-Garcia, and M.M. Thomson. 2013. Predominance of CXCR4 tropism in HIV-1 CRF14\_BG strains from newly diagnosed infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*
- Pestka, S., C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, and P.B. Fisher. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22:929-979.
- Peterlin, B.M., and D. Trono. 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3:97-107.
- Petitjean, G., M.F. Chevalier, F. Tibaoui, C. Didier, M.E. Manea, A.S. Liovat, P. Campa, M. Muller-Trutwin, P.M. Girard, L. Meyer, F. Barre-Sinoussi, D. Scott-Algara, and L. Weiss. 2012. Level of double negative T cells, which produce TGF-beta and IL-10, predicts CD8 T-cell activation in primary HIV-1 infection. *Aids* 26:139-148.
- Pfefferkorn, E.R. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:908-912.

- Pickl, W.F., O. Majdic, P. Kohl, J. Stockl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, and W. Knapp. 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 157:3850-3859.
- Pine, S.O., M.J. McElrath, and P.Y. Bochud. 2009. Polymorphisms in toll-like receptor 4 and toll-like receptor 9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1-infected individuals. *Aids* 23:2387-2395.
- Planes, R., and E. Bahraoui. 2013. HIV-1 Tat Protein Induces the Production of IDO in Human Monocyte Derived-Dendritic Cells through a Direct Mechanism: Effect on T Cells Proliferation. *PLoS One* 8:e74551.
- Poggi, A., A. Rubartelli, and M.R. Zocchi. 1998. Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 273:7205-7209.
- Poon, S., C.G. Moscoso, L. Xing, E. Kan, Y. Sun, P.R. Kolatkar, A.G. Vahlne, I.K. Srivastava, S.W. Barnett, and R.H. Cheng. 2013a. Putative role of Tat-Env interaction in HIV infection. *Aids*
- Poon, S., C.G. Moscoso, O.M. Yenigun, P.R. Kolatkar, R.H. Cheng, and A. Vahlne. 2013b. HIV-1 Tat protein induces viral internalization through Env-mediated interactions in dose-dependent manner. *Aids*
- Porichis, F., and D.E. Kaufmann. 2012. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 9:81-90.
- Potula, R., L. Poluektova, B. Knipe, J. Chrastil, D. Heilman, H. Dou, O. Takikawa, D.H. Munn, H.E. Gendelman, and Y. Persidsky. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. *Blood* 106:2382-2390.
- Pulko, V., X. Liu, C.J. Krco, K.J. Harris, X. Frigola, E.D. Kwon, and H. Dong. 2009. TLR3-stimulated dendritic cells up-regulate B7-H1 expression and influence the magnitude of CD8 T cell responses to tumor vaccination. *J Immunol* 183:3634-3641.
- Purvis, S.F., J.W. Jacobberger, R.M. Sramkoski, A.H. Patki, and M.M. Lederman. 1995. HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:443-450.
- Qian, Y., J. Deng, L. Geng, H. Xie, G. Jiang, L. Zhou, Y. Wang, S. Yin, X. Feng, J. Liu, Z. Ye, and S. Zheng. 2008. TLR4 signaling induces B7-H1 expression through MAPK pathways in bladder cancer cells. *Cancer investigation* 26:816-821.
- Quaranta, M.G., E. Tritarelli, L. Giordani, and M. Viora. 2002. HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4(+) T cell activation. *Experimental cell research* 275:243-254.
- Quigley, M., F. Pereyra, B. Nilsson, F. Porichis, C. Fonseca, Q. Eichbaum, B. Julg, J.L. Jesneck, K. Brosnahan, S. Imam, K. Russell, I. Toth, A. Piechocka-Trocha, D. Dolfi, J. Angelosanto, A. Crawford, H. Shin, D.S. Kwon, J. Zupkosky, L. Francisco, G.J. Freeman, E.J. Wherry, D.E. Kaufmann, B.D. Walker, B. Ebert, and W.N. Haining. 2010. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 16:1147-1151.
- Rana, T.M., and K.T. Jeang. 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Archives of biochemistry and biophysics* 365:175-185.
- Rassa, J.C., J.L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S.R. Ross. 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2281-2286.
- Ratner, L., R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1985. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 313:636-637.
- Rayne, F., S. Debaisieux, H. Yezid, Y.L. Lin, C. Mettling, K. Konate, N. Chazal, S.T. Arold, M. Pugniere, F. Sanchez, A. Bonhoure, L. Briant, E. Loret, C. Roy, and B. Beaumelle. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *Embo J* 29:1348-1362.

- Redpath, S., P. Ghazal, and N.R. Gascoigne. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9:86-92.
- Rezza, G., V. Fiorelli, M. Dorrucchi, M. Ciccozzi, A. Tripiciano, A. Scoglio, B. Collacchi, M. Ruiz-Alvarez, C. Giannetto, A. Caputo, L. Tomasoni, F. Castelli, M. Sciandra, A. Sinicco, F. Ensoli, S. Butto, and B. Ensoli. 2005. The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters. *J Infect Dis* 191:1321-1324.
- Rice, A.P. 2010. The HIV-1 Tat team gets bigger. *Cell host & microbe* 7:179-181.
- Rincon, M. 2012. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in immunology* 33:571-577.
- Robinson, C.M., K.A. Shirey, and J.M. Carlin. 2003. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 23:413-421.
- Rodriguez-Garcia, M., F. Porichis, O.G. de Jong, K. Levi, T.J. Diefenbach, J.D. Lifson, G.J. Freeman, B.D. Walker, D.E. Kaufmann, and D.G. Kavanagh. Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10. *J Leukoc Biol*
- Rodriguez-Garcia, M., F. Porichis, O.G. de Jong, K. Levi, T.J. Diefenbach, J.D. Lifson, G.J. Freeman, B.D. Walker, D.E. Kaufmann, and D.G. Kavanagh. 2011. Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10. *Journal of leukocyte biology* 89:507-515.
- Rodriguez-Plata, M.T., A. Urrutia, S. Cardinaud, M.J. Buzon, N. Izquierdo-Useros, J.G. Prado, M.C. Puertas, I. Erkizia, P.G. Coulon, S. Cedeno, B. Clotet, A. Moris, and J. Martinez-Picado. 2012. HIV-1 capture and antigen presentation by dendritic cells: enhanced viral capture does not correlate with better T cell activation. *J Immunol* 188:6036-6045.
- Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, and F. Annunziato. 2009. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol* 47:3-7.
- Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 91:1-12.
- Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff. 2009. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Archives of virology* 154:1579-1588.
- Rose-John, S. 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences* 8:1237-1247.
- Ross, T.M. 2001. Using death to one's advantage: HIV modulation of apoptosis. *Leukemia* 15:332-341.
- Rottenberg, M.E., A. Gigliotti Rothfuchs, D. Gigliotti, M. Ceausu, C. Une, V. Levitsky, and H. Wigzell. 2000. Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with Chlamydia pneumoniae. *J Immunol* 164:4812-4818.
- Roy, C.R., and E.S. Mocarski. 2007. Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* 8:1179-1187.
- Rubartelli, A., A. Poggi, R. Sitia, and M.R. Zocchi. 1998. HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 19:543-545.
- Sabado, R.L., M. O'Brien, A. Subedi, L. Qin, N. Hu, E. Taylor, O. Dibben, A. Stacey, J. Fellay, K.V. Shianna, F. Siegal, M. Shodell, K. Shah, M. Larsson, J. Lifson, A. Nadas, M. Marmor, R. Hutt, D. Margolis, D. Garmon, M. Markowitz, F. Valentine, P. Borrow, and N. Bhardwaj. 2010. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 116:3839-3852.
- Said, E.A., F.P. Dupuy, L. Trautmann, Y. Zhang, Y. Shi, M. El-Far, B.J. Hill, A. Noto, P. Ancuta, Y. Peretz, S.G. Fonseca, J. Van Grevenynghe, M.R. Boulassel, J. Bruneau, N.H. Shoukry, J.P. Routy, D.C. Douek, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 16:452-459.



- Sakaguchi, S., D.A. Vignali, A.Y. Rudensky, R.E. Niec, and H. Waldmann. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 13:461-467.
- Sakai, H., J. Sakuragi, S. Sakuragi, M. Kawamura, and A. Adachi. 1993. Compatibility of Tat and Rev transactivators in the primate lentiviruses. *Archives of virology* 129:1-10.
- Samikkannu, T., K.V. Rao, N. Gandhi, S.K. Saxena, and M.P. Nair. Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS. *J Neurovirol* 16:255-263.
- Samikkannu, T., K.V. Rao, N. Gandhi, S.K. Saxena, and M.P. Nair. 2010. Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS. *Journal of neurovirology* 16:255-263.
- Samikkannu, T., Z.M. Saiyed, K.V. Rao, D.K. Babu, J.W. Rodriguez, M.N. Papuashvili, and M.P. Nair. 2009. Differential regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by HIV type 1 clade B and C Tat protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:329-335.
- Samuel, C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809, table of contents.
- Sandanger, O., L. Ryan, J. Bohnhorst, A.C. Iversen, H. Husebye, O. Halaas, L. Landro, P. Aukrust, S.S. Froland, G. Elson, A. Visintin, O. Oktedalen, J.K. Damas, A. Sundan, D. Golenbock, and T. Espevik. 2009. IL-10 enhances MD-2 and CD14 expression in monocytes and the proteins are increased and correlated in HIV-infected patients. *J Immunol* 182:588-595.
- Sanders, C.M., J.M. Cruse, and R.E. Lewis. 2008. Toll-like receptors, cytokines and HIV-1. *Exp Mol Pathol* 84:31-36.
- Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology* 10:170-181.
- Sarkar, R., D. Mitra, and S. Chakrabarti. 2013. HIV-1 gp120 protein downregulates Nef induced IL-6 release in immature dendritic cells through interplay of DC-SIGN. *PLoS One* 8:e59073.
- Sarngadharan, M.G., A.L. DeVico, L. Bruch, J. Schupbach, and R.C. Gallo. 1984. HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Princess Takamatsu symposia* 15:301-308.
- Sauce, D., C. Elbim, and V. Appay. 2013. Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS* 8:125-131.
- Scadden, D.T. 2003. Stem cells and immune reconstitution in AIDS. *Blood reviews* 17:227-231.
- Scala, G., M.R. Ruocco, C. Ambrosino, M. Mallardo, V. Giordano, F. Baldassarre, E. Dragonetti, I. Quinto, and S. Venuta. 1994. The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med* 179:961-971.
- Schabbauer, G., J. Luyendyk, K. Crozat, Z. Jiang, N. Mackman, S. Bahram, and P. Georgel. 2008. TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages. *Mol Immunol* 45:2790-2796.
- Schott, M. 2006. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocrine-related cancer* 13:779-795.
- Schreiber, H.A., and M. Sandor. 2012. Monocyte-derived inflammatory dendritic cells in the granuloma during mycobacterial infection. *Advances in experimental medicine and biology* 946:277-293.
- Secchiero, P., D. Zella, S. Capitani, R.C. Gallo, and G. Zauli. 1999. Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *J Immunol* 162:2427-2431.
- Seo, Y.J., and B. Hahm. 2010. Type I interferon modulates the battle of host immune system against viruses. *Advances in applied microbiology* 73:83-101.
- Shan, M., P.J. Klasse, K. Banerjee, A.K. Dey, S.P. Iyer, R. Dionisio, D. Charles, L. Campbell-Gardener, W.C. Olson, R.W. Sanders, and J.P. Moore. 2007. HIV-1 gp120 mannoses induce immunosuppressive responses from dendritic cells. *PLoS pathogens* 3:e169.

- Shankar, E.M., K.F. Che, D. Messmer, J.D. Lifson, and M. Larsson. Expression of a Broad Array of Negative Costimulatory Molecules and Blimp-1 in T-cells Following Priming by HIV-1 Pulsed Dendritic Cells. *Mol Med*
- Shankar, E.M., K.F. Che, D. Messmer, J.D. Lifson, and M. Larsson. 2011. Expression of a broad array of negative costimulatory molecules and Blimp-1 in T cells following priming by HIV-1 pulsed dendritic cells. *Mol Med* 17:229-240.
- Sharp, P.M., and B.H. Hahn. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1:a006841.
- Shi, J., X. Qin, L. Zhao, G. Wang, and C. Liu. 2011. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces B7-H1 expression via ERK/MAPK signaling pathway. *Cell Immunol* 271:280-285.
- Shirey, K.A., W. Lai, A.J. Scott, M. Lipsky, P. Mistry, L.M. Pletneva, C.L. Karp, J. McAlees, T.L. Gioannini, J. Weiss, W.H. Chen, R.K. Ernst, D.P. Rossignol, F. Gusovsky, J.C. Blanco, and S.N. Vogel. 2013. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature* 497:498-502.
- Shojania, S., and J.D. O'Neil. 2010. Intrinsic disorder and function of the HIV-1 Tat protein. *Protein and peptide letters* 17:999-1011.
- Signoret, N., P. Poignard, D. Blanc, and Q.J. Sattentau. 1993. Human and simian immunodeficiency viruses: virus-receptor interactions. *Trends Microbiol* 1:328-333.
- Silvera, P., M.W. Richardson, J. Greenhouse, J. Yalley-Ogunro, N. Shaw, J. Mirchandani, K. Khalili, J.F. Zagury, M.G. Lewis, and J. Rappaport. 2002. Outcome of simian-human immunodeficiency virus strain 89.6p challenge following vaccination of rhesus macaques with human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol* 76:3800-3809.
- Skinner, N.A., C.M. MacIsaac, J.A. Hamilton, and K. Visvanathan. 2005. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* 141:270-278.
- Smed-Sorensen, A., K. Lore, J. Vasudevan, M.K. Louder, J. Andersson, J.R. Mascola, A.L. Spetz, and R.A. Koup. 2005. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* 79:8861-8869.
- Smith, D.G., G.J. Guillemin, L. Pemberton, S. Kerr, A. Nath, G.A. Smythe, and B.J. Brew. 2001. Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat. *J Neurovirol* 7:56-60.
- Sodora, D.L., and G. Silvestri. 2008. Immune activation and AIDS pathogenesis. *Aids* 22:439-446.
- Sodroski, J., R. Patarca, C. Rosen, F. Wong-Staal, and W. Haseltine. 1985. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229:74-77.
- Stack, J., I.R. Haga, M. Schroder, N.W. Bartlett, G. Maloney, P.C. Reading, K.A. Fitzgerald, G.L. Smith, and A.G. Bowie. 2005. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* 201:1007-1018.
- Stylianou, E., P. Aukrust, D. Kvale, F. Muller, and S.S. Froland. 1999. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 116:115-120.
- Subramanyam, M., W.G. Gutheil, W.W. Bachovchin, and B.T. Huber. 1993. Mechanism of HIV-1 Tat induced inhibition of antigen-specific T cell responsiveness. *J Immunol* 150:2544-2553.
- Sumpter, T.L., and A.W. Thomson. 2011. The STATus of PD-L1 (B7-H1) on tolerogenic APCs. *Eur J Immunol* 41:286-290.
- Sundquist, W.I., and H.G. Krausslich. 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a006924.
- Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt. 2012. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12:136-148.
- Swanstrom, R., and J. Coffin. 2012. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a007443.

- Swiecki, M., Y. Wang, W. Vermi, S. Gilfillan, R.D. Schreiber, and M. Colonna. 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med* 208:2367-2374.
- Switzer, W.M., S. Tang, S. Ahuka-Mundeke, A. Shankar, D.L. Hanson, H. Zheng, A. Ayouba, N.D. Wolfe, M. LeBreton, C.F. Djoko, U. Tamoufe, A. Esteban, W. Heneine, M. Peeters, L.L. Wright, J.J. Muyembe-Tamfum, E.O. Wemakoy, P. Mulembakani, N.A. Hoff, and A.W. Rimo. 2012. Novel simian foamy virus infections from multiple monkey species in women from the Democratic Republic of Congo. *Retrovirology* 9:100.
- Tabb, B., D.R. Morcock, C.M. Trubey, O.A. Quinones, X.P. Hao, J. Smedley, R. Macallister, M. Piatak, Jr., L.D. Harris, M. Paiardini, G. Silvestri, J.M. Brenchley, W.G. Alvord, J.D. Lifson, and J.D. Estes. 2013. Reduced inflammation and lymphoid tissue immunopathology in rhesus macaques receiving anti-tumor necrosis factor treatment during primary simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 207:880-892.
- Takikawa, O. 2005. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications* 338:12-19.
- Tan, C., and I. Gery. 2012. The unique features of Th9 cells and their products. *Critical reviews in immunology* 32:1-10.
- Tangsinmankong, N., N.K. Day, R.A. Good, and S. Haraguchi. 2000. Monocytes are target cells for IL-10 induction by HIV-1 Nef protein. *Cytokine* 12:1506-1511.
- Teijaro, J.R., C. Ng, A.M. Lee, B.M. Sullivan, K.C. Sheehan, M. Welch, R.D. Schreiber, J.C. de la Torre, and M.B. Oldstone. 2013. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* 340:207-211.
- Terness, P., T.M. Bauer, L. Rose, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, and G. Opelz. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine* 196:447-457.
- Thibault, S., R. Fromentin, M.R. Tardif, and M.J. Tremblay. 2009. TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology* 6:42.
- Tian, T., S. Yu, and D. Ma. 2013. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets* 17:113-125.
- Tortorella, D., B.E. Gewurz, M.H. Furman, D.J. Schust, and H.L. Ploegh. 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18:861-926.
- Trabattoni, D., M. Saresella, M. Biasin, A. Boasso, L. Piacentini, P. Ferrante, H. Dong, R. Maserati, G.M. Shearer, L. Chen, and M. Clerici. 2003. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood* 101:2514-2520.
- Tran, T.A., M.G. de Goer de Herve, H. Hendel-Chavez, B. Dembele, E. Le Nevot, K. Abbed, C. Pallier, C. Goujard, J. Gasnault, J.F. Delfraissy, A.M. Balazuc, and Y. Taoufik. 2008. Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. *PLoS One* 3:e3305.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12:1198-1202.
- Trepiakas, R., A.E. Pedersen, O. Met, M.H. Hansen, A. Berntsen, and I.M. Svane. 2008. Comparison of alpha-Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients. *Vaccine* 26:2824-2832.
- Trono, D. 1995. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* 82:189-192.
- Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta, and M. Giacca. 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276:3254-3261.

- Urbinati, C., S. Mitola, E. Tanghetti, C. Kumar, J. Waltenberger, D. Ribatti, M. Presta, and M. Rusnati. 2005. Integrin alphavbeta3 as a target for blocking HIV-1 Tat-induced endothelial cell activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:2315-2320.
- van Baalen, C.A., O. Pontesilli, R.C. Huisman, A.M. Geretti, M.R. Klein, F. de Wolf, F. Miedema, R.A. Gruters, and A.D. Osterhaus. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* 78 ( Pt 8):1913-1918.
- van der Kuyl, A.C. 2012. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology* 9:6.
- Van Grol, J., C. Subauste, R.M. Andrade, K. Fujinaga, J. Nelson, and C.S. Subauste. 2010. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One* 5:e11733.
- Velu, V., K. Titanji, B. Zhu, S. Husain, A. Pladevega, L. Lai, T.H. Vanderford, L. Chennareddi, G. Silvestri, G.J. Freeman, R. Ahmed, and R.R. Amara. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458:206-210.
- Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
- Vignali, D.A., and V.K. Kuchroo. 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology* 13:722-728.
- Viscidi, R.P., K. Mayur, H.M. Lederman, and A.D. Frankel. 1989. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 246:1606-1608.
- Vives, E., P. Charneau, J. van Rietschoten, H. Rochat, and E. Bahraoui. 1994. Effects of the Tat basic domain on human immunodeficiency virus type 1 transactivation, using chemically synthesized Tat protein and Tat peptides. *J Virol* 68:3343-3353.
- Wang, B., K. Koga, Y. Osuga, I. Cardenas, G. Izumi, M. Takamura, T. Hirata, O. Yoshino, Y. Hirota, M. Harada, G. Mor, and Y. Taketani. 2011. Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology* 152:4984-4992.
- Wang, X., Z. Zhang, S. Zhang, J. Fu, J. Yao, Y. Jiao, H. Wu, and F.S. Wang. 2008. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 38:3226-3236.
- Wang, X.C., Y.S. Fan, Z.Q. Zhou, H.Q. Li, Z. Zhang, T. Zhang, L. Wang, X.P. Yang, L. Mao, R.H. Xie, S.Y. Lei, H. Wu, and F.S. Wang. 2010. [Expression of B7-H1 on peripheral myeloid dendritic cells in patients with HIV infection and its correlation with diseases progression]. *Zhonghua yi xue za zhi* 90:588-592.
- Watanabe, T., A. Bertoletti, and T.A. Tanoto. 2010. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *Journal of viral hepatitis* 17:453-458.
- Watkins, J.D., S. Lancelot, G.R. Campbell, D. Esquieu, J. de Mareuil, S. Opi, S. Annappa, J.P. Salles, and E.P. Loret. 2006. Reservoir cells no longer detectable after a heterologous SHIV challenge with the synthetic HIV-1 Tat Oyi vaccine. *Retrovirology* 3:8.
- Werner, E.R., D. Fuchs, A. Hausen, H. Jaeger, G. Reibnegger, G. Werner-Felmayer, M.P. Dierich, and H. Wachter. 1988. Tryptophan degradation in patients infected by human immunodeficiency virus. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 369:337-340.
- Westendorp, M.O., R. Frank, C. Ochsenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K.M. Debatin, and P.H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375:497-500.
- Whittall, T., B. Peters, D. Rahman, C.I. Kingsley, R. Vaughan, and T. Lehner. 2011. Immunogenic and tolerogenic signatures in human immunodeficiency virus (HIV)-infected controllers compared with progressors and a conversion strategy of virus control. *Clin Exp Immunol* 166:208-217.
- Wijewardana, V., A.C. Soloff, X. Liu, K.N. Brown, and S.M. Barratt-Boyes. 2010. Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS pathogens* 6:e1001235.

- Williams, M.A., R. Trout, and S.A. Spector. 2002. HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of hematology & stem cell research* 11:829-847.
- Wilson, E.B., and D.G. Brooks. 2011. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Current topics in microbiology and immunology* 350:39-65.
- Wilson, E.B., Y. Kidani, H. Elsaesser, J. Barnard, L. Raff, C.L. Karp, S. Bensinger, and D.G. Brooks. 2012. Emergence of distinct multiarmed immunoregulatory antigen-presenting cells during persistent viral infection. *Cell host & microbe* 11:481-491.
- Wilson, E.B., D.H. Yamada, H. Elsaesser, J. Herskovitz, J. Deng, G. Cheng, B.J. Aronow, C.L. Karp, and D.G. Brooks. 2013. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340:202-207.
- Wong, J.K., G.R. Campbell, and S.A. Spector. 2010. Differential induction of interleukin-10 in monocytes by HIV-1 clade B and clade C Tat proteins. *J Biol Chem* 285:18319-18325.
- Wu, L., and V.N. KewalRamani. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6:859-868.
- Xiao, H., C. Neuveut, H.L. Tiffany, M. Benkirane, E.A. Rich, P.M. Murphy, and K.T. Jeang. 2000. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11466-11471.
- Xu, H., X. Wang, B. Pahar, T. Moroney-Rasmussen, X. Alvarez, A.A. Lackner, and R.S. Veazey. Increased B7-H1 expression on dendritic cells correlates with programmed death 1 expression on T cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques and may contribute to T cell dysfunction and disease progression. *J Immunol* 185:7340-7348.
- Xu, H., X. Wang, B. Pahar, T. Moroney-Rasmussen, X. Alvarez, A.A. Lackner, and R.S. Veazey. 2010. Increased B7-H1 expression on dendritic cells correlates with programmed death 1 expression on T cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques and may contribute to T cell dysfunction and disease progression. *J Immunol* 185:7340-7348.
- Xu, H., G.X. Zhang, B. Ciric, and A. Rostami. 2008. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett* 121:1-6.
- Yamazaki, S., and A. Morita. 2013. Dendritic Cells in the Periphery Control Antigen-Specific Natural and Induced Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology* 4:151.
- Yang, Y., J. Wu, and Y. Lu. 2010. Mechanism of HIV-1-TAT induction of interleukin-1beta from human monocytes: Involvement of the phospholipase C/protein kinase C signaling cascade. *Journal of medical virology* 82:735-746.
- Yeager, M. 2011. Design of in vitro symmetric complexes and analysis by hybrid methods reveal mechanisms of HIV capsid assembly. *Journal of molecular biology* 410:534-552.
- Yeung, A.W., W. Wu, M. Freewan, R. Stocker, N.J. King, and S.R. Thomas. 2012. Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 91:657-666.
- Yu, D., M. Batten, C.R. Mackay, and C. King. 2009. Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells. *Current opinion in immunology* 21:619-625.
- Zagury, D., A. Lachgar, V. Chams, L.S. Fall, J. Bernard, J.F. Zagury, B. Bizzini, A. Gringeri, E. Santagostino, J. Rappaport, M. Feldman, A. Burny, and R.C. Gallo. 1998. Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3851-3856.
- Zanoni, I., C. Bodio, A. Broggi, R. Ostuni, M. Caccia, M. Collini, A. Venkatesh, R. Spreafico, G. Capuano, and F. Granucci. 2012. Similarities and differences of innate immune responses elicited by smooth and rough LPS. *Immunol Lett* 142:41-47.
- Zhai, R.R., A.P. Jiang, H.B. Wang, L. Ma, X.X. Ren, J.F. Jiang, L. Wu, J.F. Wei, and J.H. Wang. 2013. Histamine enhances HIV-1-induced modulation of dendritic cells to skew naive T cell differentiation toward regulatory T cells. *Virology*

- Zhang, J.Y., Z. Zhang, X. Wang, J.L. Fu, J. Yao, Y. Jiao, L. Chen, H. Zhang, J. Wei, L. Jin, M. Shi, G.F. Gao, H. Wu, and F.S. Wang. 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109:4671-4678.
- Zhang, M., X. Li, X. Pang, L. Ding, O. Wood, K. Clouse, I. Hewlett, and A.I. Dayton. 2001. Identification of a potential HIV-induced source of bystander-mediated apoptosis in T cells: upregulation of trail in primary human macrophages by HIV-1 tat. *Journal of biomedical science* 8:290-296.
- Zhang, X., and F. Wang. 2012. Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs: from basic drug delivery mechanism to application. *Expert opinion on drug delivery* 9:457-472.
- Zheng, L., Y.D. Yang, G.C. Lu, and M.S. Salvato. 2005. Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6:668-672.
- Zhu, B.T. 2010. Development of selective immune tolerance towards the allogeneic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites (Review). *International journal of molecular medicine* 25:831-835.
- Zidovetzki, R., J.L. Wang, P. Chen, R. Jeyaseelan, and F. Hofman. 1998. Human immunodeficiency virus Tat protein induces interleukin 6 mRNA expression in human brain endothelial cells via protein kinase C- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:825-833.
- Zocchi, M.R., A. Poggi, and A. Rubartelli. 1997. The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells. *Aids* 11:1227-1235.
- Zocchi, M.R., A. Rubartelli, P. Morgavi, and A. Poggi. 1998. HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol* 161:2938-2943.

# Remerciements

---

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse le professeur Elmostafa Bahraoui. Merci de m'avoir accepté dans votre laboratoire dès mon stage de M1 et de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre investissement dans mon travail, votre aide, votre disponibilité, et votre soutien.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères aux professeurs Uriel Hazan, Pierre Corbeau, Hervé Prats, Hugues Chap et au docteur Stéphane Emiliani pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et avoir lu mon manuscrit avec attention.*

*Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé cette grande aventure. Ceux qui m'ont aidé dans mon travail, motivé, écouté, et soutenu sans oublier ceux avec qui j'ai partagé des moments de détente.*

*Je pense particulièrement aux nouveaux docteurs Olfa (N36 et C34 spécialiste) et Nawal (Tat-TLR4 spécialiste) avec qui j'ai eu le plaisir de travailler tout au long de ma thèse.*

*Je remercie aussi les « anciens » du laboratoire d'immuno-virologie Fabrice et Kaoutar.*

*Un grand MERCI à toute l'équipe Davrinche/Izopet,*

*Les permanents : Christian, Jacques, Nabila, Stéphane, Eric, Bernard, Faouzi, Hélène, les deux Florence, Sabine, Stéphanie, Pierre et Christophe.*

*Les nouveaux et futurs docteurs de l'équipe: Jérôme, Johan, Emeline, Charline, Adrien, Maude, Claire et Sébastien.*

*Les étudiants et docteurs de l'INSERM : Karim, Laurent, Svet, Nicolas, Christophe, Etienne, Jean-Paul, et Pascal.*

*Un grand merci à l'animalerie de l'UPS et plus particulièrement à Séverine et Jacques qui m'ont été d'une aide précieuse pour manipuler les souris, parfois très agitées !*

*Je tiens également à remercier, ma famille, mes amis, et ma chérie pour m'avoir soutenu, encouragé, et motivé tout au long de la réalisation de ce grand projet.*





# Annexe 1 : Poster

---



Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de présenter un poster au congrès « Frontiers of Retrovirology »



# HIV-1 Tat protein induces the production of IDO in human monocyte derived-dendritic cells through a direct mechanism: effect on T cells proliferation

Rémi Planès<sup>1,3,\*</sup>, Elmostafa Bahraoui<sup>1,3,\*</sup>

1: Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France  
2: INSERM, U1043, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France  
3: CNRS, U5282, CPTP, CHU purpan, BP3028, 31024, Toulouse, Cedex3, France

\* Corresponding Author: [bahraoui@cict.fr](mailto:bahraoui@cict.fr)

## Abstract

### Background

During HIV-1 infection, an increase of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression, and dendritic cells (DC) dysfunction were often associated with AIDS disease progression [1].

### Materials and methods

In this work, we investigated the effect of Tat recombinant protein from HIV-1 Lai and SF-2 strains on the expression of IDO, in Monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) generated following 5 days of culture in the presence of GM-CSF and IL-4. IDO expression was analysed by SDS-PAGE and western blotting, intracellular labelling or by measuring kynurenine production by Ehrlich's assay. The capacity of Tat-treated MoDC to stimulate T cell proliferation was analysed by following CFSE dilution in the presence or absence of IDO inhibitor (1-methyl-tryptophane).

### Results

We show that Tat induces IDO protein expression and activity in a dose dependent manner by acting at the cell membrane level. Using different Tat-fragments, we show that the N-Terminal domain, Tat 1-45, but not the central region, Tat 30-72, is sufficient to induce the expression of active IDO. Tat protein is also able to induce several cytokines in MoDCs, including IFN- $\gamma$ , a strong inducer of IDO. In order to understand whether IDO is induced directly by Tat protein or indirectly following IFN- $\gamma$  production, complementary experiments were performed and showed that: i) at the kinetic level, Tat induced IDO expression before the production of IFN- $\gamma$  ii) treatment of MoDCs with Tat-conditioned medium was unable to stimulate IDO expression, iii) coculture of MoDCs in a transwell cell system did not allow IDO expression in MoDCs not previously treated by Tat, iv) direct contact between Tat-treated and untreated MoDCs was not sufficient to induce IDO expression in a Tat-independent manner, and v) treatment of MoDCs in the presence of IFN- $\gamma$  pathway inhibitors, Jak I and Ly294002, inhibited IFN- $\gamma$ -induced IDO but had no effect on Tat-induced IDO. At the functional level, our data showed that treatment of MoDCs with Tat led to the inhibition of their capacity to stimulate T cell proliferation. This impairment was totally abolished when the stimulation was performed in the presence of 1MT, an inhibitor of IDO activity, arguing for the implication of the kynurenine pathway.

### Conclusions

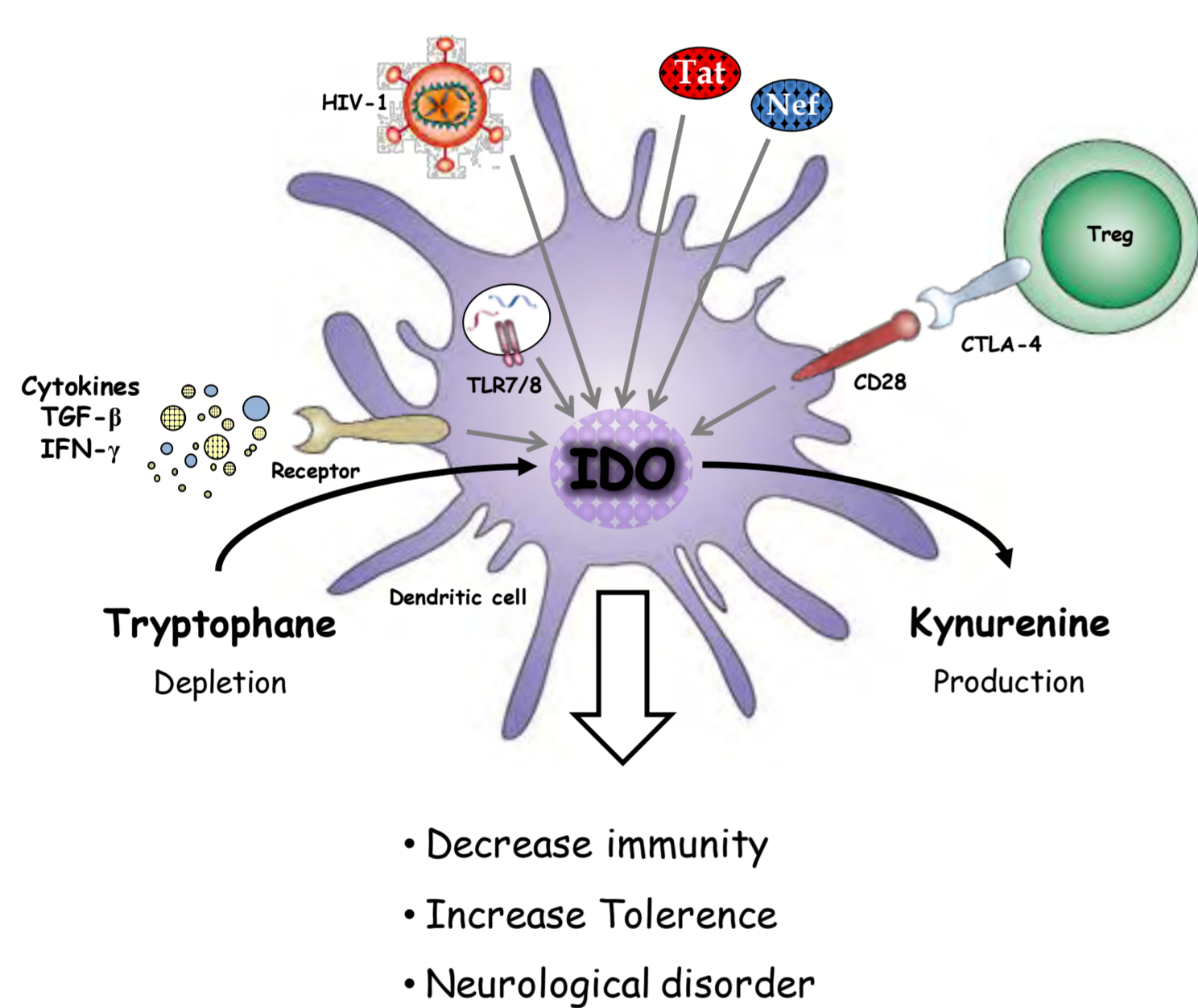
By inducing IDO, Tat protein may be considered, as a viral pathogenic factor, in the dysregulation of the DC functions during HIV-1 infection.

### References

1. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2: 32ra36.

## Background

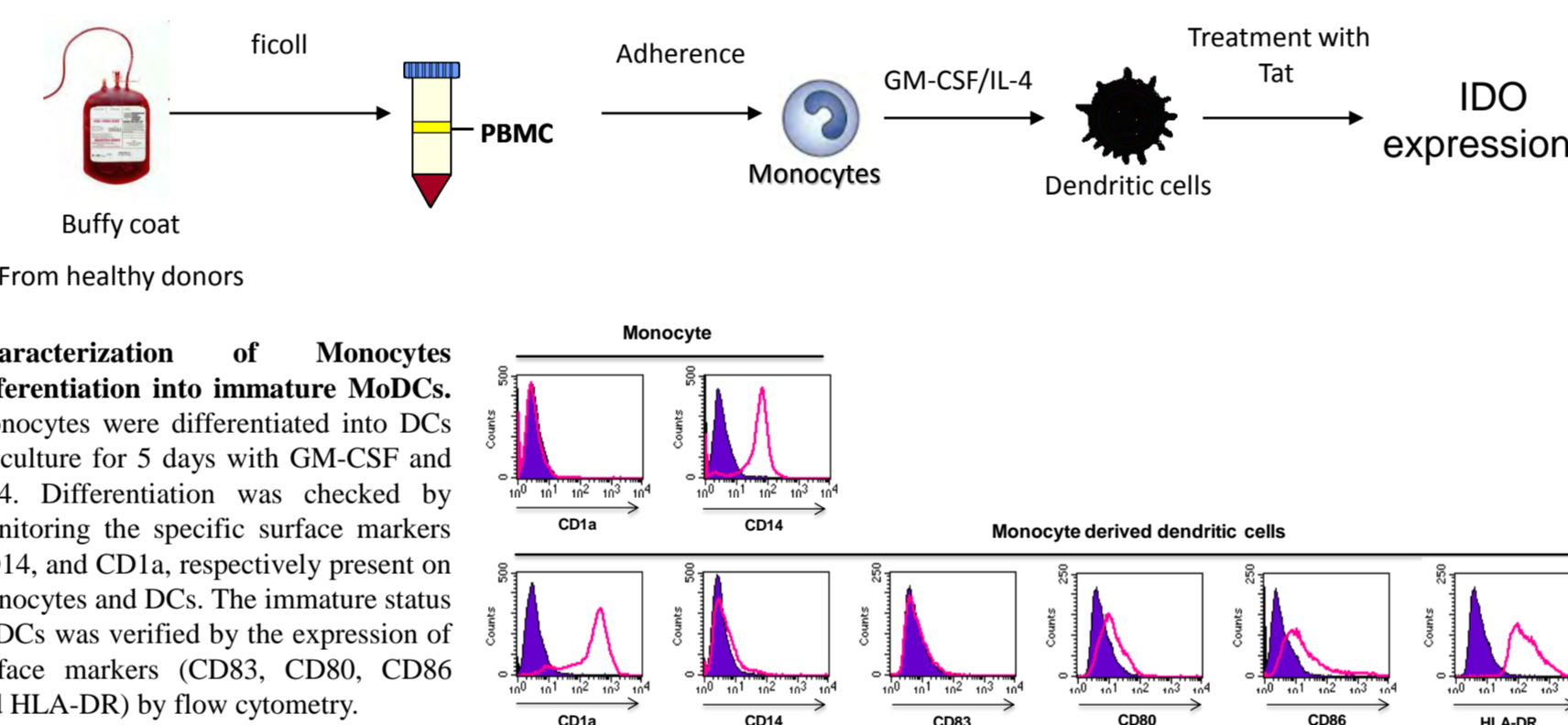
### Increased IDO protein expression is associated with HIV-1 disease progression



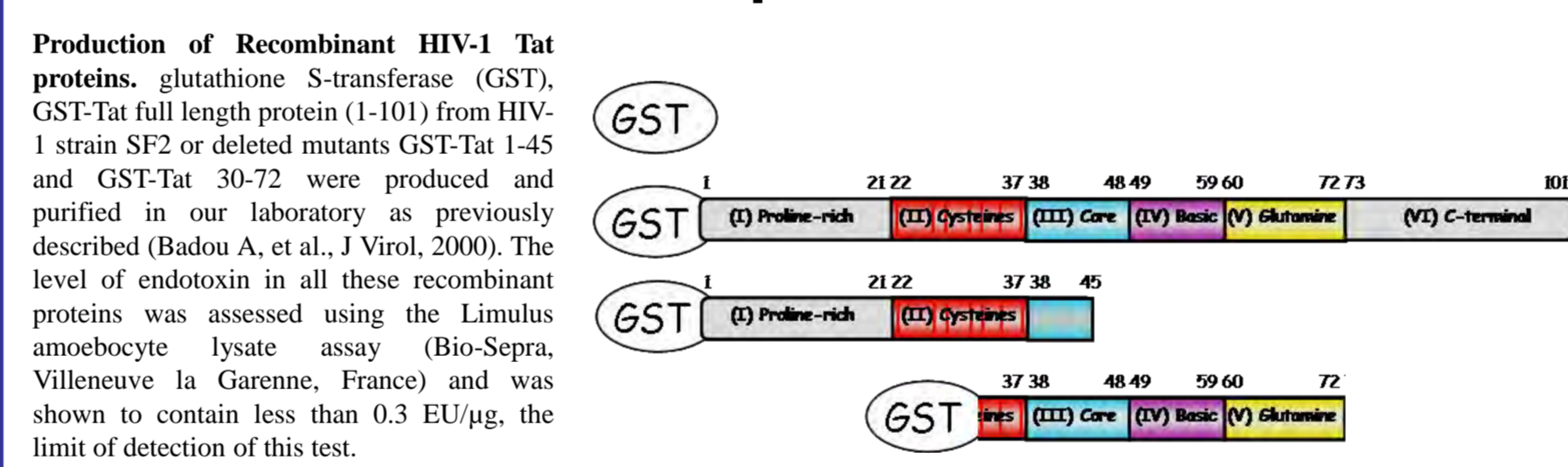
- Decrease immunity
- Increase Tolerance
- Neurological disorder

## Materials and methods

### Generation of monocyte-derived dendritic cells

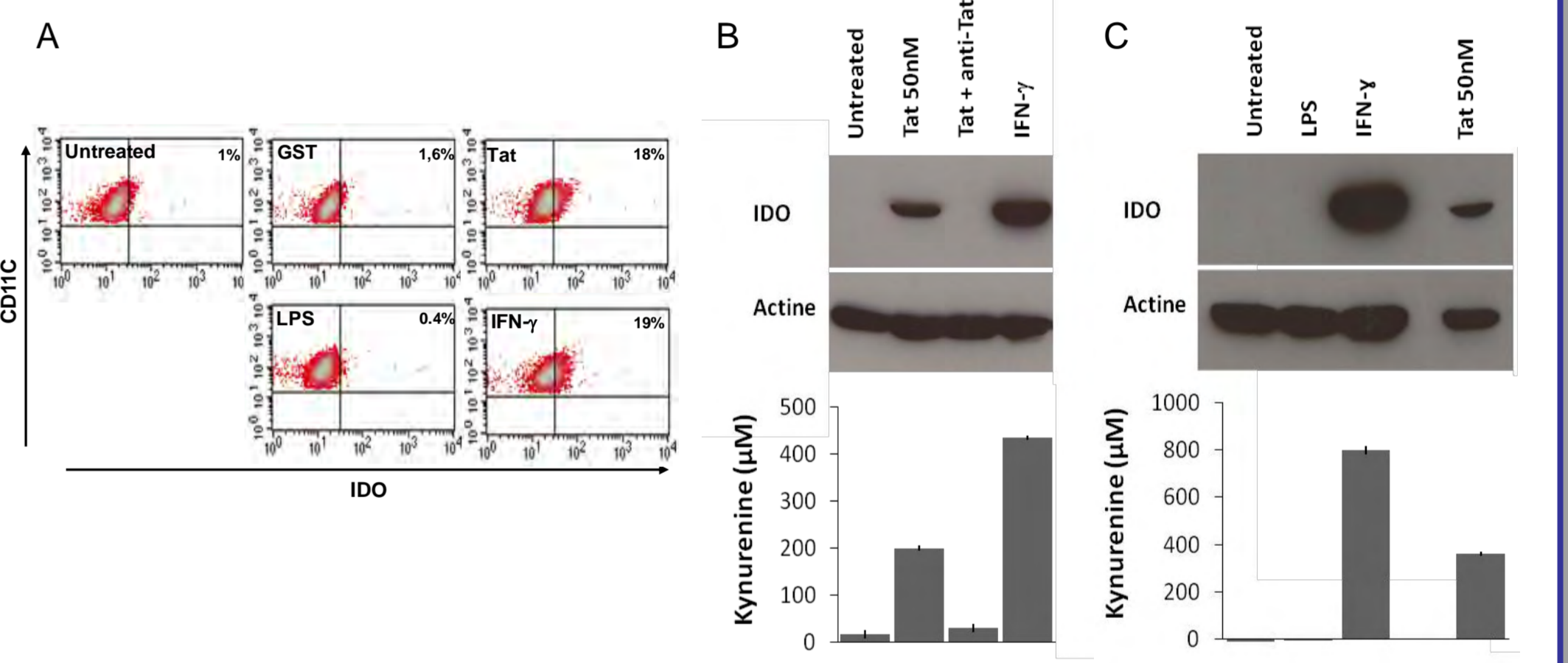


### Recombinant HIV-1 Tat protein



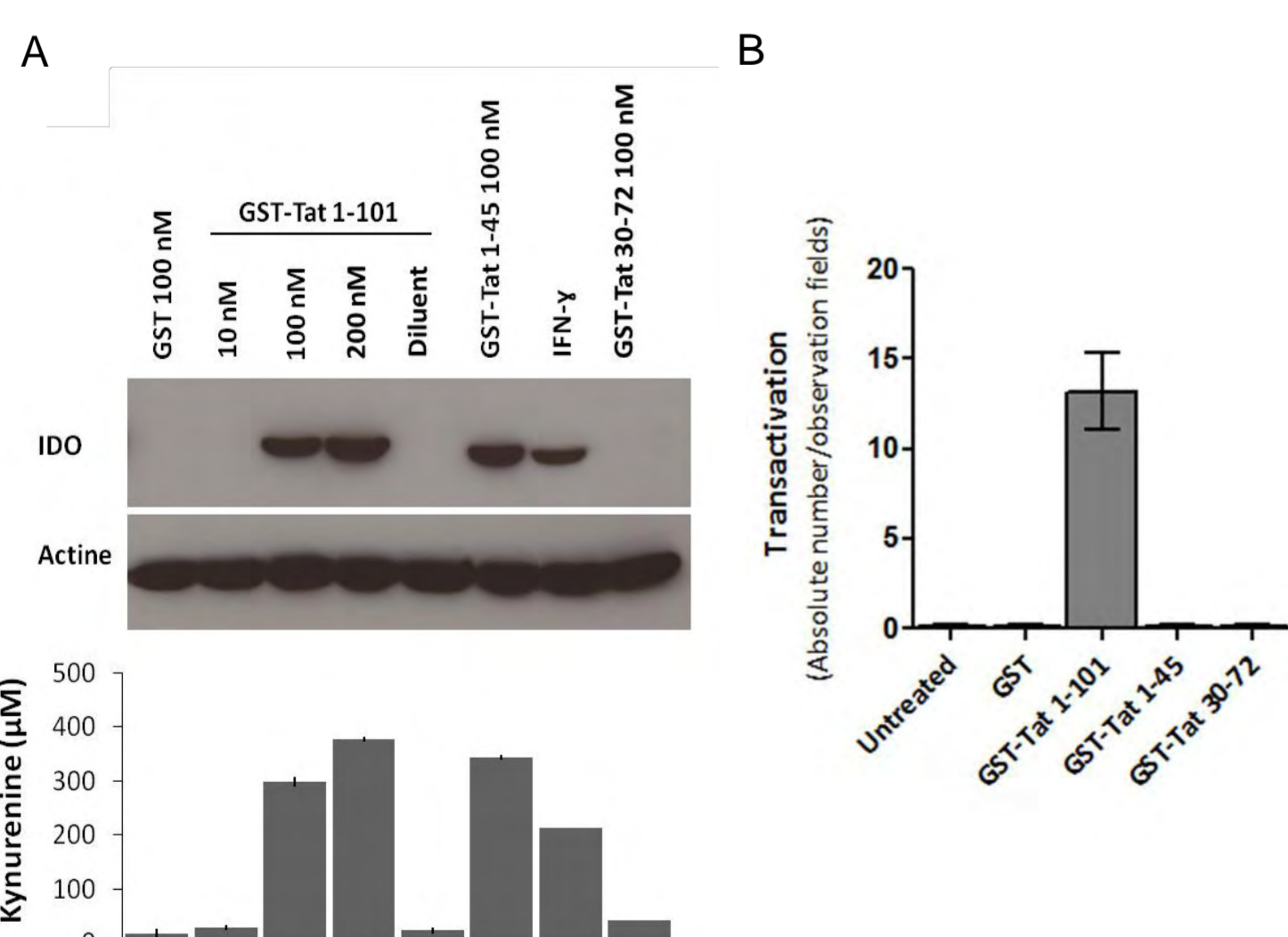
## Results

### Tat induces IDO protein expression and activity in MoDC



**HIV-1 Tat induces IDO protein expression and activity in MoDCs.**  
(A) Intracellular IDO protein expression was assessed by flow cytometry in CD11c positive MoDCs after stimulation for 24 hr with GST (100 nM), GST-Tat (100 nM), LPS (1  $\mu$ g/ml) IFN- $\gamma$  (500 ng/ml), or untreated MoDC. The settings were made on the control isotype. (B) MoDC were treated for 24 hr with Tat protein (50 nM). Untreated and IFN- $\gamma$ -treated (500 ng/ml) cells were used as negative and positive controls respectively. The specificity of Tat was evaluated by treating MoDCs with Tat (50 nM) previously incubated with anti-Tat antibodies (3  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37°C. (C) MoDCs (2.10<sup>6</sup>) were treated with LPS (1  $\mu$ g/ml), IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml), GST-Tat 1-101 (50 nM), or kept untreated for 24 hr. For each experiment, the upper panel shows IDO protein expression by immunoblot, and the loading control ( $\beta$ -actine) in the second line. Lower panels' shows the tryptophan catabolism activity determined by Ehrlich's spectrophotometric assay. Data are representative of three to four independent experiments.

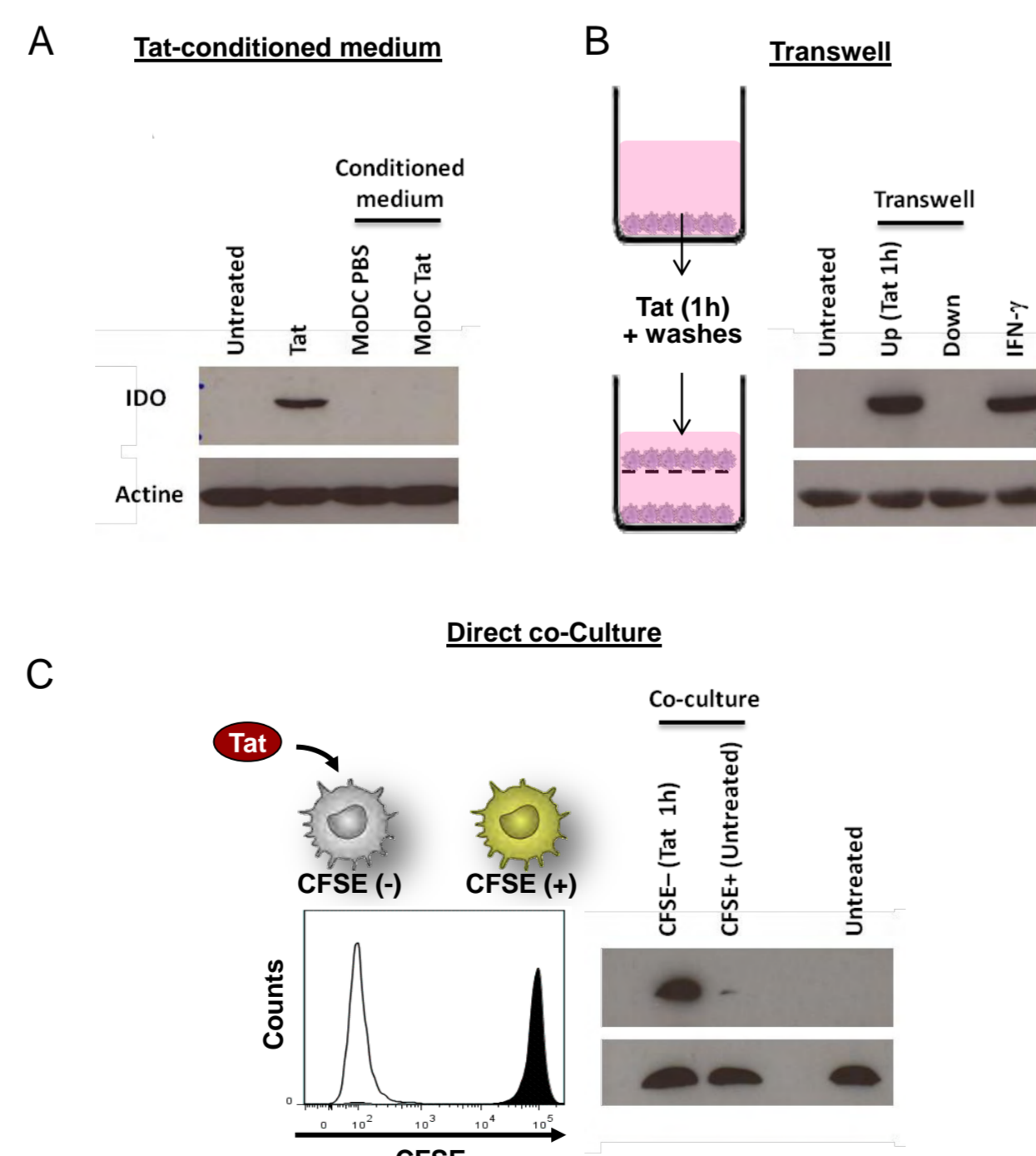
### Trans-activation function of Tat is dispensable for IDO induction



### Tat-induced IDO protein expression is independent from trans-activation and involves N-terminal domain of Tat.

(A) MoDCs (2.10<sup>6</sup>) were treated with increasing amounts (10, 100, and 200 nM) of full length recombinant GST-Tat 1-101 (SF11 strain) or with the truncated forms GST-Tat 1-45, and GST-Tat 30-72 (100 nM). GST protein alone (100 nM) and IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) were used as negative and positive controls respectively. Eluent corresponds to the fraction of GST-Tat not retained following incubation of GST-Tat (100 nM) with anti-Tat/anti-GST coupled to protein A sepharose beads (pharmacia biotech). (B) Equal amounts of GST, GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45 and GST-Tat 30-72 (1  $\mu$ M) proteins were tested for trans-activation activity. HeLa cells line stably transfected with a plasmid encoding the  $\beta$ -galactosidase protein under the control of the LTR promoter of HIV-1 were incubated with 1  $\mu$ M GST, GST-Tat 1-101 and GST-Tat 1-45 proteins. After 24 hr, cells were washed with PBS, fixed with PBS 0.5% glutaraldehyde and incubated with X-gal as  $\beta$ -galactosidase substrate (0.4mg/ml X-gal, 5 mM potassium ferriicyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). After 24 hr, the number of blue dyed cells, corresponding to transactivated cells were counted in optical microscopes magnifying 400x. The results are represented as numbers of blue cells per field.

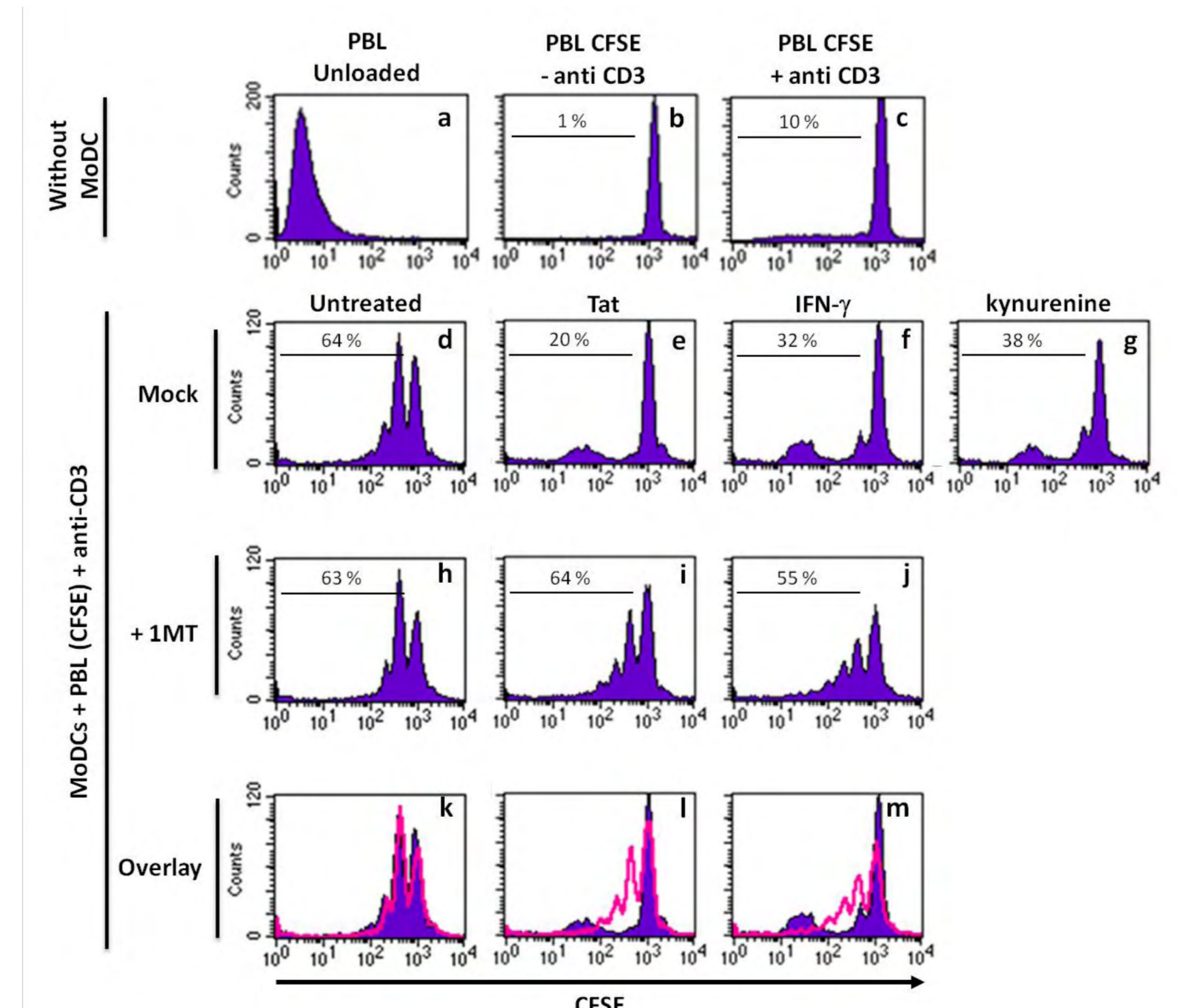
### Tat induces IDO expression through a direct mechanism



### Tat stimulates IDO expression via a direct mechanism.

In order to decipher the mechanism used by Tat to induce IDO protein expression, three different protocols were used. In (A) MoDCs (2.10<sup>6</sup>) were incubated in medium conditioned by Tat 100 nM or PBS for 24 hr. Unconditioned medium or direct treatment by Tat (50 nM) were used as controls. In (B) autologous Tat-treated (2.10<sup>6</sup>) or untreated MoDCs (2.10<sup>6</sup>) separated by a 1  $\mu$ M transwell insert were put in co-culture for 24h. In the bottom part, MoDCs were untreated and, in the upper chamber, MoDCs had been previously treated with Tat 100 nM for 1h. MoDCs alone and direct IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) stimulation were used as negative and positive controls respectively. In (C) autologous MoDCs (10<sup>6</sup>) treated, or not, by Tat for 1 h and washed were kept in direct coculture. To discriminate between the two conditions, untreated cells were previously labelled with CFSE (1  $\mu$ M) whereas Tat-treated cells were kept unlabelled. After 24 h, CFSE positive and CFSE negative MoDC were sorted (lower panel) and analyzed separately for IDO expression.

### Tat-induced IDO in dendritic cells is associated with the inhibition of T Cell proliferation

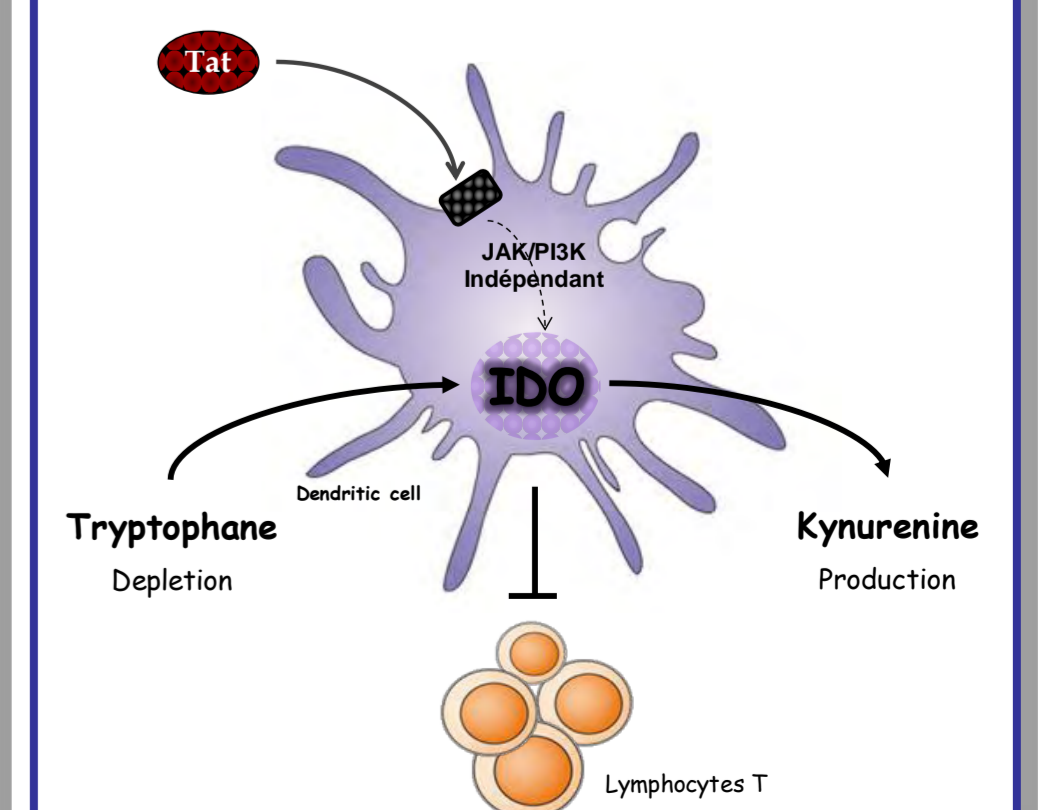


### Tat treated MoDC inhibits T cell proliferation in an IDO dependent mechanism.

Immature MoDCs were incubated for 48 hr with Tat (50 nM), IFN- $\gamma$  (500 ng/ml), or PBS at 37°C. After washing with PBS, MoDCs were put back into culture with or without IDO inhibitor 1MT (500  $\mu$ M). After 2 hr, 2.10<sup>6</sup> MoDCs were cocultured with 4.10<sup>6</sup> autologous PBL (a CD14 negative fraction) labelled with 2  $\mu$ M CFSE, and stimulated with anti-CD3, OKT3, Mab (10 ng/ml) or left unstimulated. Direct treatment with kynurenine (500  $\mu$ M) was used as a control. After 5 days, autologous T cell proliferation was monitored by FACS analysis by following CFSE dilution analysis in the CD3 positive population. Overlay show T cell proliferation performed in the absence (purple) or in the presence (red) of 1MT. Histogram plots are representative of two independent experiments.

## Conclusion

In this study, we have shown that HIV-1 Tat protein induces the expression of IDO in MoDCs. Using Tat-deleted mutants, we showed that the Tat active domain is located at the N-terminal region 1-45 of the protein. Because this active domain lacks the basic region 47-57, which is essential for Tat internalization, we can deduce that Tat protein activates IDO production by acting at the cell membrane level. Because Tat protein is able to induce IFN- $\gamma$ , a strong inducer of IDO, the production of IDO could be induced either directly by Tat or by an indirect pathway via Tat-induced IFN- $\gamma$ . Complementary experiments showed that Tat induced IDO expression by a mechanism that can be considered IFN- $\gamma$  independent for the following reasons: i) Treatment of MoDCs with Tat-conditioned medium was unable to stimulate IDO expression; ii) Coculture of MoDCs in a transwell cell system did not allow IDO expression in MoDCs not previously treated by Tat when they were cultured in the lower compartment; iii) Moreover, we showed that direct contact between previously Tat treated and untreated MoDCs was not sufficient to induce IDO in untreated MoDCs. In agreement with the implication of IDO in the impairment of T-cell response, the present study shows that treatment of MoDCs with Tat leads to an alteration of their capacity to stimulate T cell proliferation. The fact that this inhibitory effect can be abolished in the presence of 1MT, an inhibitor of IDO activity, argues for the implication of Tat-induced immunosuppressive IDO, via the kynurenine pathway, in the inhibition of T cell proliferation. Overall, our study has shown that HIV-1, by its Tat protein, is able to stimulate IDO expression/activity with the potential to inhibit MoDC-mediated T-cell proliferation. These data argue for the involvement of Tat protein in the weakening of the immune response during HIV-1 infection.



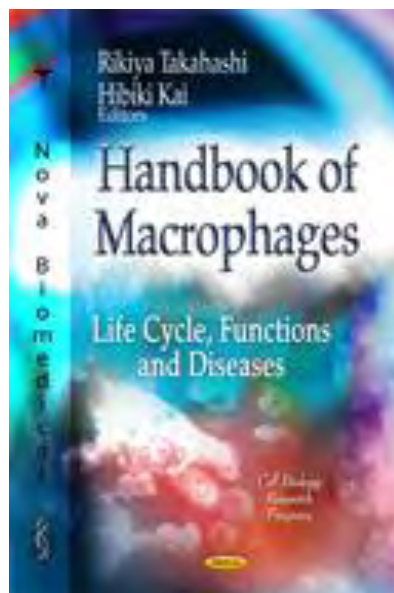


## Annexe 2 : Revue

---

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'écriture d'une revue décrivant les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu par la protéine Tat du VIH-1 pour conduire à l'induction de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  dans les monocytes et les macrophages. Cette revue a fait l'objet d'une publication dans le livre :

### Handbook of Macrophages: Life Cycle, Functions and Diseases



**Disponible sur le site:** [www.novapublishers.com](http://www.novapublishers.com)

**Editors:** Rikiya Takahashi and Hibiki Kai



## **HIV-1 TAT PROTEIN INDUCES TNF- $\alpha$ AND IL-10 IN HUMAN MONOCYTE/MACROPHAGE CELLS**

*Planès Rémi<sup>1</sup>, Mzoughi Olfa<sup>1</sup>, Ben Haij Nawal<sup>1</sup>,  
Leghmari Kaoutar<sup>1</sup>, Contreras Xavier<sup>2</sup>  
and Bahraoui Elmostafa<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Equipe: Infections virales : persistance, réponse de l'hôte et physiopathologie ou CPTP  
(Inserm / UPS / CNRS) – France

<sup>2</sup>CNRS UPR1142, IGH, Montpellier, 34090 France

### **ABSTRACT**

In HIV positive patients, a dysfunction of the immune system, linked to the progressive disturbance of the cytokine network, is observed well before the decrease in TCD4+ lymphocyte number. This dysfunction is mainly due to the action of viral proteins such as Tat, a protein necessary for viral genome transcription. Secreted by infected cells, Tat protein can be captured and internalized by other cells, whether they are infected or not, in which it can exert many functions including apoptosis or modulation of the expression of numerous cytokine and membrane receptor genes. Thus, for example, in HIV positive patients, an increase in the level of IL-10, an immunosuppressive Th2 cytokine, and TNF- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine involved in HIV associated dementia, during the progression of HIV infection towards AIDS.

By acting at membrane receptor, Tat protein induces TNF- $\alpha$  and IL-10. This activation is mediated by the N-Terminal domain 1-45 of Tat protein. Signal transduction analysis showed that the protein kinase C is crucial for this induction. Among the 8 PKC isoforms present in human monocyte/macrophages Tat activates PKC- $\beta$ II and  $\delta$ . Downstream from PKC, Tat activates ERK1/2 and P38 MAPkinases and NF- $\kappa$ B whose activation is necessary for IL-10 and TNF- $\alpha$  activation. In addition to these pathways, Tat protein induces in monocytes/macrophages a calcium signal by mobilizing calcium from extracellular stores. This stimulation is mediated via the 20-45 domain of Tat and is totally blocked in the presence of DHP receptor inhibitors such as nimodipine or calcicludine. Interestingly we showed that Tat-induced calcium mobilization is tightly

---

\* Corresponding author: Bahraoui@cict.fr

linked to TNF- $\alpha$  production, thus indicating that Tat induced mobilization and TNF- $\alpha$  production are entirely mediated by DHP receptors.

Thus, Tat by acting on infected and non infected cells activates multiple pathways leading to both AIDS and neurological disease progression.

## INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus (HIV-1) infects CD4 positive cells, essentially CD4+ lymphocytes, monocytes/macrophages and dendritic cells (Cameron et al., 1996; Fauci, 1988). This infection results in profound and selective depletion of CD4+ cells during the progression toward AIDS. However, before CD4+ T-lymphocyte depletion in HIV-1-infected patients, a generalized immune dysfunction is observed, which impairs a variety of immune functions, including both specific and innate immunity. This immune disorder is associated mainly with the loss of the T-cell proliferative response to stimulation with recall antigens and with the alteration of cytokine production. HIV infection is accompanied by an increase production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and immunosuppressive cytokine IL-10 as well as a decrease in IL-12 and IL-2. This perturbation in cytokine production impacts the balance between Th1/Th2 immune responses. (Clerici and Shearer, 1993; Clerici and Shearer, 1994; Emilie et al., 1994a; Emilie et al., 1994b; Graziosi, Pantaleo, and Fauci, 1994). Indeed, several studies have suggested that, during infection, HIV-1 patients develop a progressive loss of the Th1 cellular immune response, the most potent effectors against viruses. In parallel to the decrease in Th1 response, an increase in the Th2 immune response was observed, but this seems to be inefficient against HIV-1 infection.

This perturbation of cytokine production plays a major role in the physiopathology of HIV infection. In agreement with this finding, HIV-1 infected patients have been reported to have high levels of TNF- $\alpha$  in sera, brain (Wesselingh et al., 1993) and *in vitro* in supernatants of monocytes, PBMC, and alveolar macrophages from AIDS patients (Wright et al., 1988). Moreover, several studies have demonstrated that TNF- $\alpha$  plays a major role in progression to AIDS: it does so by acting directly on HIV-1 replication through the activation of NF- $\kappa$ B (Duh et al., 1989) and indirectly through cytotoxicity mediated by the alteration of the cellular redox state (Folks et al., 1989; Westendorp et al., 1995). TNF- $\alpha$  is believed to contribute to the development of neurological diseases, known as HIV-associated dementia (Said et al.) (Said et al., ; Talley et al., 1995). About 20 % and 80 % respectively of HIV-1 infected adults and children develop some level of HAD (Tardieu et al., 2000). In fact, in the central nervous system HIV-1 by infecting monocytes/macrophages and microglial cells could induce the toxic cytokine TNF- $\alpha$  which can act directly on adjacent neurons, oligodendrocytes and astrocytes to cause neurotoxicity and neurodegeneration (Talley et al., 1995).

By inducing TNF- $\alpha$  HIV-1 appears to contribute actively as a pathogenic factor to disease progression. In addition to TNF- $\alpha$ , peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HIV-1 infected patients produce high levels of interleukin-10, a highly immunosuppressive cytokine, paralleling the progressive loss of T helper function as the infection progresses, toward AIDS (Ameglio et al., 1994; Clerici et al., 1994). The cellular and molecular mechanisms of this attenuation of the immune system cannot be explained solely by the direct



effect of the virus on T-CD4 infected cells, but would involve viral factors including Tat, Nef, gp120/41 (Herbein et al.). In this review we will focus on HIV-1 Tat protein effect.

HIV-1 protein, Tat, is known to stimulate the production of many cytokines and chemokines including IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and MCP-1 (Badou et al., 2000; Bennasser et al., 2002; Bennasser and Bahraoui, 2002; Clerici and Shearer, 1993; Contreras et al., 2005; Moore et al., 1993; Nath et al., 2000). Tat contributes, also, to immune cell disorders by inducing apoptosis of T lymphocytes (Li et al., 1995) and interferes with the cell-mediated immune response by inhibiting the expression of MHC class I and II molecules (Huang et al., 1998), NK cell activity (Zocchi et al., 1998), and IL-12 production by dendritic cells (Poggi, Rubartelli, and Zocchi, 1998) and monocytes (Ito et al., 1998).

Since IL-10 levels have been shown to progressively increase as the disease progresses toward AIDS, one can hypothesize that this event can play a crucial role in the immune deregulation observed during HIV-1 infection. In line with this hypothesis, Shearer's group in a study including more than 1000 patients identified four patient classes depending on the capacity of their CD4 T lymphocytes to respond to different stimuli (mitogen, alloantigen, influenza virus, and HIV antigens). The progressive loss of the response of the immune system to these stimuli was found to be associated with a course leading to AIDS. Considerable production of IL-10 by peripheral blood mononuclear cells was observed in these patients and paralleled the alteration in CD4 T cell proliferative function. In addition, the immunosuppressive effect of IL-10 also correlated with the restoration of the capacity of isolated mononuclear cells of patients infected by HIV and immunodepressed to proliferate *in vitro* after stimulation by peptide antigens of HIV-1 envelope glycoprotein in the presence of a neutralizing anti-IL-10 antibody (Clerici et al., 1994). In another study, Stylianou et al evaluated the level of IL-10 in the sera of HIV-1 infected patients at different stages of infection (Stylianou et al., 1999). In agreement with Shearer's conclusion, they showed an increase in IL-10 level with disease progression. They also showed a decrease in IL-10 level in patients under highly active retroviral therapy (HAART). Inversely, it was reported an increase of IL-10 levels in patients with failure in tri-therapy treatment. Similarly low level of IL-10 was observed in HIV-1 long term non progressors or elite controllers (Stylianou et al., 1999). Inversely, it was showed that the persistence of a great level of IL-10 in the sera correlates with the failure in HAART (Stylianou et al., 1999). Other studies have shown that monocyte/macrophage lineage are the major source of IL-10 production in HIV-infected individuals (Hagiwara et al., 1996).

IL-10 is known to have immunoregulatory functions that participate in producing a Th2-type response. The ability of IL-10 to block activation of cytokine synthesis and several accessory functions of macrophages renders this cytokine a potent suppressor of the effector functions of macrophages, T cells and natural killer cells (Moore et al., 2001; Moore et al., 1993). It inhibits expression of major histocompatibility complex class II molecules, thus impairing the presentation of antigens to CD4<sup>+</sup> T cells; blocks the expression of costimulatory molecules B7.1/B7.2 in monocytes and macrophages (Akdis and Blaser, 2001); and induces anergy of T lymphocytes. As an anti-inflammatory molecule, IL-10 inhibits the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Redpath, Ghazal, and Gascoigne, 2001) and other cytokines, including IL-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-3 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Moore et al., 2001). IL-10, also stimulates B lymphocyte proliferation and differentiation (Itoh and Hirohata, 1995; Levy and Brouet, 1994).

Cells from the monocyte/macrophage lineage play a central role in HIV-1 infection and pathogenesis. Indeed, monocyte/macrophage cells are important effectors for HIV-1 transmission and dissemination (Hirsch et al., 1998). Primary infection is mostly initiated and carried out by macrophage-tropic viruses, which are using, in addition to CD4, CCR5 as a coreceptor. Thus macrophages, which are bearing CCR5 at their surface, are a primary target cell during the first steps of viral dissemination in the organism of infected individuals. Macrophages are also one of the main reservoirs of HIV-1. This latter property, is related to the low level of cytopathic effects in macrophages which increases their half-life when compared to infected CD4 positive lymphocytes (Embretson et al., 1993; Orenstein, Fox, and Wahl, 1997), as suggested by studies showing that macrophages sustained high viral loads after the peak of T-lymphocyte infection in SIV infected rhesus macaques (Shibata et al., 1999). Furthermore, it has been demonstrated that current therapies that target HIV replication are not as efficient in macrophages as they are on lymphocytes (Llewellyn et al., 2006). As consequence, macrophages, in contrast to CD4 positive T cells are not depleted during the course of HIV-1 infection. Thus, better understanding of HIV replication in macrophages and finding efficient therapeutics are a major challenge.

In our laboratory, we have shown that by acting at the cell membrane level, HIV-1 Tat protein induces production of TNF- $\alpha$  and IL-10 by human peripheral blood monocytes/macrophages (Badou et al., 2000; Bennasser et al., 2002; Bennasser and Bahraoui, 2002). In this paper, we will review data on the signaling pathways activated by Tat protein in monocyte/macrophage cells to produce TNF- $\alpha$  and IL-10.

## I. THE TAT PROTEIN

The main function of HIV Tat protein is to transactivate the HIV long term repeat for retroviral transcription. Produced early after infection, Tat is essential for gene expression, replication, and infectivity (Wu and Marsh, 2003). Its molecular weight is 14–16 kDa, and its amino acid sequence varies in number from 86 to 104, according to which HIV isolates are present. Despite the absence of signal peptide sequence, HIV-1 Tat protein is secreted by infected cells early into the extracellular medium (Chang et al., 1997; Ensoli et al., 1990). Extracellular Tat is then taken up by neighbouring cells, where it modulates viral and/or cellular function resumed in Figure 19 depending on protein concentration, differentiation state and cell type (Ensoli et al., 1990; Frankel and Pabo, 1988). Pleiotropic functions have been described for Tat, including a capacity to enhance expression of CCR5 and CXCR4 HIV-1 coreceptors (Huang et al., 1998), apoptosis of T lymphocytes and inhibition of their proliferation (Li et al., 1995), inhibition of the T helper Th1-type cytokine interleukin (IL)-12 production (Ito et al., 1998) and stimulation of production of Th2-type cytokines, such as IL-4, IL-6 and IL-10 (Bennasser et al., 2002; Bennasser and Bahraoui, 2002; Buonaguro et al., 1992; Rubartelli et al., 1998; Scala et al., 1994).

Overall, these effects lead to dysfunction in and orientation of the immune system towards a Th2-type response (Clerici and Shearer, 1993; Maggi et al., 1994), which seems to be inefficient against HIV-1 infection (Rubartelli et al., 1998). Tat gene is encoded by two exons. The first exon encodes the 72 first amino acids, a fragment that is sufficient for the transactivation of HIV-1 LTR in vitro (Vives, 2003). The 101 amino acids form of Tat is

predominant in clinical isolates. At least, six potential functional domains of Tat can be identified, including N-terminal a proline and cysteine rich region, an hydrophobic core, a basic region followed by a glutamine rich region and a C terminal domain that contain a tripeptide RGD (Arginine, glycine, aspartatic acid) (Figure 1). The basic domain region, also called protein transduction domain (PTD) is essential for cytoplasmic membrane translocation and nuclear localization of Tat protein. This basic region is also essential for the transactivation activity of Tat.

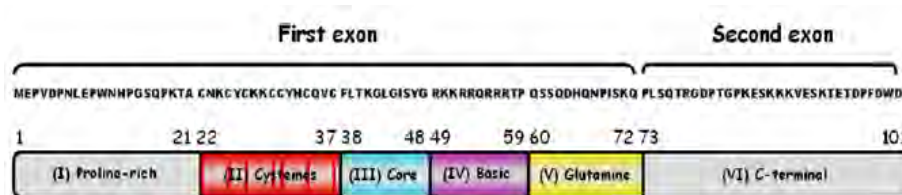


Figure 1. Organization of HIV-1 Tat protein: primary amino acids sequence and different domain of Tat. Tat protein is encoded by 2 exons in the HIV genome. This primary sequence of the protein contains several regions including (I) N-terminal region is a rich proline region, (II) cysteine-rich region, (III) Core region, (IV) Basic region, (V), Glutamine-rich region, (VI) C-terminal region.

## II. TAT ACTIVATES THE PRODUCTION OF TNF- $\alpha$ AND IL-10 IN HUMAN MONOCYTES/MACROPHAGES

Results obtain in our laboratory and other groups show that HIV-1 Tat plays a major role in cytokine production in monocytes/macrophages lineage. Monocytes or peripheral blood human monocytes-derived macrophages obtained by adherence were stimulated for 24 h in the presence of total GST-Tat (1-101), Tat (1-86) or N-terminal GST-Tat (1-45) that lacks the basic region essential for its internalization (Figure 2A) at 1, 10 or 100 nM. The kinetics and amounts of IL-10 and TNF- $\alpha$  produced in cell supernatants were measured by ELISA. No significant IL-10 production was detected in the supernatant of unstimulated macrophages or macrophages cultured in the presence of GST alone (Figure 2A). Human macrophages treated with various concentrations of GST-Tat (1-101) induced dose-dependant IL-10 production from amounts of  $27.5 \pm 4.9$  pg/ml with 1 nM GST-Tat (1-101) and up to  $697 \pm 14.14$  pg/ml with 100 nM (Figure 2A). When macrophages were stimulated with Tat (1-86) (data not shown) or GST-Tat (1-45), a similar dose-response effect was obtained (Figure 2A). The production of IL-10 varies from  $13 \pm 5.65$  pg/ml with 1 nM Gst-Tat (1-45) to  $526 \pm 7.07$  pg/ml with 100 nM (Figure 2A). This later result indicates that despite the absence of basic region 47-57, a domain that is crucial for Tat internalization, Tat stimulates the production of IL-10 in macrophages. Thus, these results suggest that Tat acts directly at the cell membrane level. Stimulation of human macrophages by Gst-Tat (1-101) led to time-dependent production TNF- $\alpha$  starting at 3 h and peaking at 6 h. Similarly, TNF- $\alpha$  production depends upon the interaction of Tat at the cell membrane level. Specificity of Tat effect was demonstrated by showing that chemically modified Tat, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation, becomes unable to stimulate TNF- $\alpha$  and IL-10 production. The specificity of Tat effect was further demonstrated by showing that when the stimulation of monocytes/macrophages was

performed in the presence of anti-Tat antibodies, TNF- $\alpha$  and IL-10 production by monocytes was totally inhibited (Badou et al., 2000).

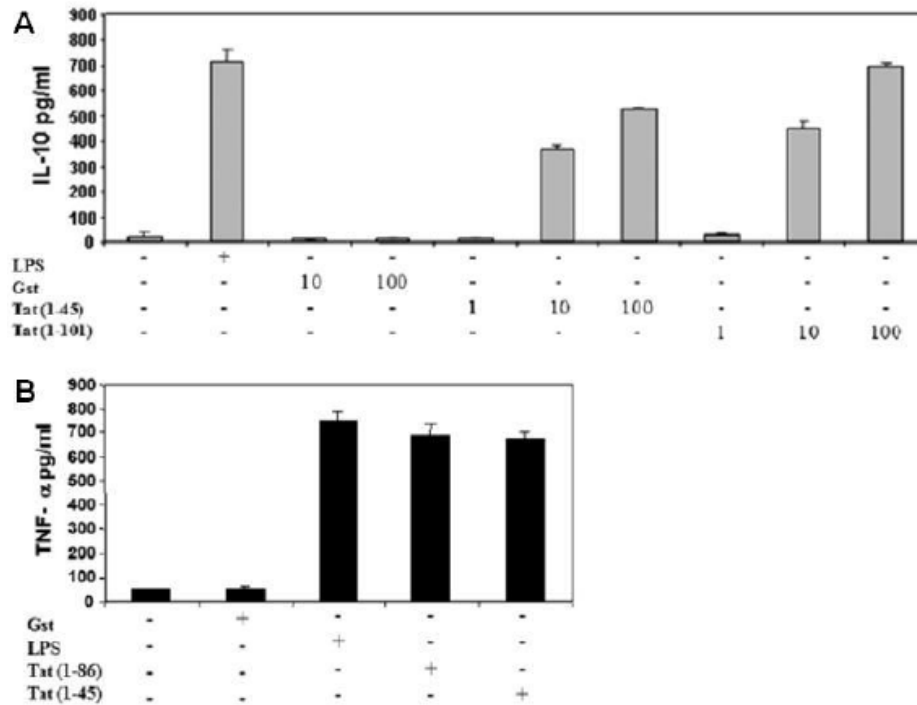


Figure 2. Tat induces IL-10 and TNF- $\alpha$  by acting at the membrane level. (A) Macrophages ( $5.10^5$  cells) were incubated with GST-Tat 1-101 (1, 10, 100 nM), GST-Tat 1-45 (1, 10, 100 nM) for 24 h. (B) Macrophages ( $5.10^5$  cells) were incubated with Tat 1-86 or with GST-Tat 1-45 (10 nM) for 6 h. As negative controls, cells were untreated or treated with GST (10, 100 nM) for 6 or 24 h. LPS was used as a positive control, at 100 ng/ml. Culture supernatants were recovered and the IL-10 and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. The results are expressed in pg/ml.

This production is observed with as low a concentration as 1- 10 nM of Tat protein. Interestingly it was shown that soluble HIV-1 Tat protein has been detected in sera of HIV-1-infected patients at the nanomolar level (Goldstein, 1996; Westendorp et al., 1995), but this concentration may be underestimated, since Tat may be trapped by its potential receptors, particularly the heparan sulfates, molecules which are widely expressed on cell surfaces.

Furthermore, this concentration would be higher near the productively infected cells (Pantaleo, Graziosi, and Fauci, 1993) and can act on other cells, whether they are infected or not (Figure 19).

### III. SIGNALING PATHWAYS ACTIVATED BY TAT IN MONOCYTE / MACROPHAGE CELLS

HIV-1 infection affects cellular signalling leading to the dysregulation of the physiological cytokine network. The most important signalling pathways involved in cytokine

production include the PKC, NF- $\kappa$ B, MAP kinases and calcium pathways. These pathways are activated after ligand-receptor interaction. Subsequently, this interaction activates phospholipase C which then cleaves its substrate PIP2 (phosphoinositol biphosphate) in IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate), responsible of the mobilization of intracellular calcium and to DAG (diacylglycerol), which initiates PKC activation.

Downstream, these two pathways lead to the phosphorylation and activation of cellular proteins (mitogen-activated protein (MAP) kinase and of transcriptional factors including NF-AT, NF- $\kappa$ B, CREB and AP-1 responsible for the induction of cytokine genes (Fraser, Straus, and Weiss, 1993).

In our laboratory we have accumulated several data on the signaling pathways recruited by Tat protein to stimulate the production of the highly immunosuppressive cytokine IL-10 and the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ . In the following part we will analyse the activation by HIV-1 Tat protein of each signaling pathway and the effect of this activation on cytokine production.

## A. PKC Pathway

PKCs constitute a family of serine/threonine kinases classified into three groups on the basis of their structure and ability to bind cofactors. So far, 11 PKC isozymes have been described (Ron and Kazanietz, 1999; Williams et al., 1997).

In addition to membrane phospholipids (phosphatidylserine [PS]), activation of classical PKC isozymes ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\gamma$ ) depends on calcium and diacylglycerol (DAG). Activity of novel PKC isozymes ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\mu$  and  $\eta$ ) depends only on DAG. Activity of atypical PKCs ( $\zeta$  and  $\lambda/\tau$ ), is independent of calcium and DAG (Goekjian and Jirousek, 2001). (Figure 3).

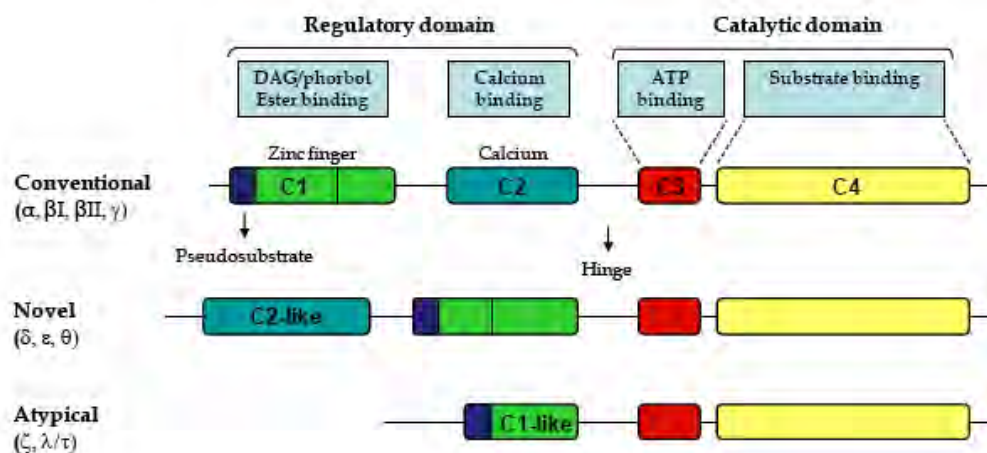


Figure 3. Organization of PKC protein. PKC proteins have 4 conserved domains : C1 corresponds to the diacylglycerol (DAG) and phorbol ester binding sites and posses 1 or 2 cysteine-rich motifs. C2 contains the recognition site for acidic lipids and in some enzymes the calcium binding site. C3 and C4 form the ATP and substrate binding domains of the catalytic site. The C2 domain of novel PKCs lacks amino acids to bind calcium. Atypical PKCs have only 1 cysteine-rich motif, and phorbol ester binding has not been detected.

In inactivated cells, PKC is mainly localized in the cytoplasm in an inactive form. After activation, calcium and/or phosphoinositides induce a conformational change of the PKC structure leading to the catalytic site being accessible to anchoring proteins, called receptors for activated C-kinase (RACK) or substrates that interact with C-kinase (TICK). These modifications, including phosphorylation, lead to the translocation of the activated PKCs from the cytoplasm to the cell membrane (Nishizuka, 1992). Thus, PKC translocation can be used as an index of activation for these kinases (Ron and Kazanietz, 1999; Williams et al., 1997).

#### ***A.1. Role of the PKC Pathway in IL-10 and TNF- $\alpha$ Production***

To investigate the role of the PKC pathway in Tat-induced IL-10 and TNF- $\alpha$  production, we first depleted the cellular pool of PKCs by pretreating macrophages with 100 ng/ml PMA, an activator of classical and novel PKCs, for 24 or 48 h. The treated macrophages were then stimulated by 10 nM Gst-Tat (1-45), and IL-10 or TNF- $\alpha$  production was measured 24 h and 6 h later, respectively (Figure 4A, B). The obtained results showed a strong blockade of Tat-induced production of IL-10 (up to 80%) in the macrophages pretreated with PMA for 24 h. The inhibition of Tat-induced TNF- $\alpha$  production was up to 50% after 24 h of PMA treatment and became total at 48 h. These results indicate that classical and novel, but not atypical, PKC isoforms have a role in the mechanism of Tat-induced IL-10 and TNF- $\alpha$  production in human macrophages.

#### ***A.2. PKC- $\beta$ II and PKC- $\delta$ Are Required for Tat-Induced IL-10 But Not of TNF- $\alpha$ Production***

To further investigate the role of the Tat-activated PKC isoforms in the control of IL-10 and TNF- $\alpha$  induction, we pre-incubated macrophages with non toxic concentrations RO31-8220 an inhibitor of all PKC isoforms (1 or 5  $\mu$ M), Rottlerin, a PKC- $\delta$  inhibitor (1 or 5  $\mu$ M) and Hispidin, a PKC- $\beta$ II inhibitor (2 or 20  $\mu$ M), 30 min before stimulating them with 10 nM of Gst-Tat (1-45) protein. Results described in Figure 4C, D showed a dose-dependent inhibition of IL-10 and TNF- $\alpha$  production.

At 1  $\mu$ M RO31-8220, inhibitions were at 60% and 63.4%, respectively, and reached 100% at 5  $\mu$ M (Figure 4C, D). Inhibition of PKC- $\delta$  and PKC- $\beta$ II leads to a strong and dose-dependent inhibition of IL-10 production, which becomes total at 1  $\mu$ M Rottlerin and 2  $\mu$ M Hispidin (Figure 5C). In contrast, neither Rottlerin nor Hispidin had an effect on TNF- $\alpha$  production in macrophages, while complete inhibition was obtained with 5  $\mu$ M RO31-8220 (Figure 5D).

Thus the true PKC isoforms, implicated in the control of TNF- $\alpha$  production in macrophages stimulated by Tat, seem to be different from PKC- $\beta$ II and - $\delta$  isoforms and remain to be determined.

In agreement with these data we showed that Tat proteins able to activate both PKC $\beta$ II and PKC $\delta$  isoforms in monocytes/macrophages. In this assay PKC activation was evaluated by measuring PKC translocation from the cytoplasm to the membrane compartments in monocytes/macrophages previously stimulated by Tat protein during 30 to 60 min (Figure 5A-B).

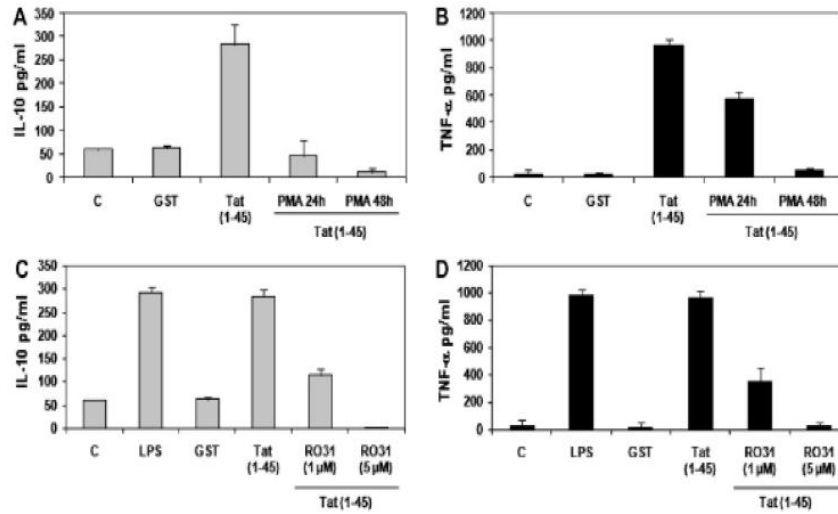


Figure 4. Role of PKC pathway in IL-10 and TNF-  $\alpha$  production. (A) and (B) The cellular pool of PKC was depleted by pre-treating macrophages with PMA (100 ng/ml), for 24 or 48 h. The cells were washed, then stimulated or not, by GST-Tat 1-45 protein (10 nM). (C) and (D) Macrophages were pretreated or not for 60 min with total PKC inhibitor RO31-8220 (1, 5  $\mu$ M) before stimulation by GST-Tat 1-45 (10 nM). As a negative control, untreated cells or GST protein (10 nM) stimulated cells were used. TNF-  $\alpha$  and IL-10 production was measured, respectively, 6 or 24 h later by ELISA. GST was used as control. Results are expressed in pg/ml.

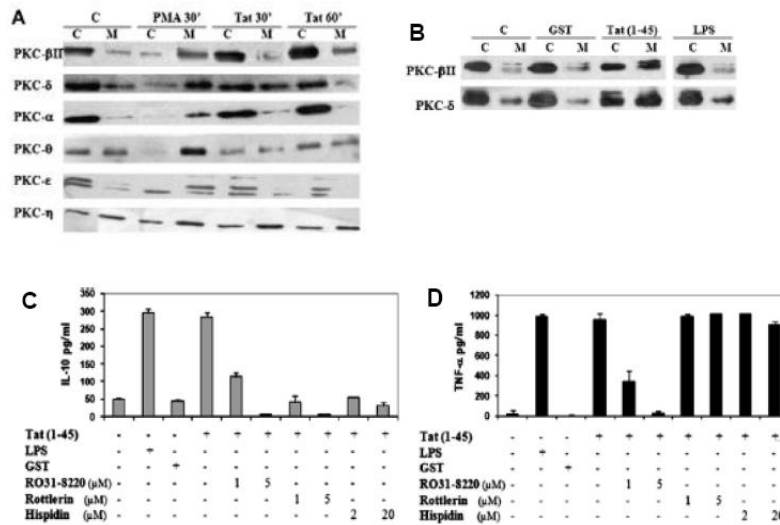


Figure 5. Several PKC isoforms are expressed in macrophages but only PKC- $\beta$ II and  $\delta$  are activated by Tat. (A) Macrophages were stimulated with Tat 1-86 (10 nM) or, as a positive control, with PMA for 30 min or 60 min. (B) Macrophages were stimulated with GST-Tat 1-45 (10 nM), or LPS (100 ng/ml) for 60 min. Membrane (M) and cytoplasmic (C) proteins were extracted and separated on 10% SDS page gel. PKC isoforms were blotted and visualized by chemiluminescence using specific antibodies. (C and D) Macrophages were pretreated or not by global PKC inhibitor RO31-8220 (1, 5  $\mu$ M), PKC- $\delta$  inhibitor Rottlerin (1, 5  $\mu$ M) or PKC $\beta$ II inhibitor Hispidin (2, 20  $\mu$ M) for 30 min. GST-Tat 1-45 was then added for 24 h. Culture supernatants were collected and (C) IL-10 or (D) TNF- $\alpha$  production was analyzed by ELISA. Results are expressed in pg/ml. The values are representative of three independent experiments.

These data confirm that PKCs play an important role in the mechanism of IL-10 and TNF- $\alpha$  induction by Tat and suggest the crucial role of PKC- $\beta$ II and PKC- $\delta$  in the signaling pathway leading to production of IL-10, but not of TNF- $\alpha$ , in human macrophages stimulated by Tat.

Activation of MAP kinases, including p38 and ERK1/2, has been implicated in the induction of multiple responses involving the regulation of cytokine genes by NF- $\kappa$ B activity (Baeuerle and Baltimore, 1996). In the second part of our study, we determined whether stimulation of human macrophages by Tat leads to the activation of these effectors and how activation might affect the production of IL-10 and TNF- $\alpha$ .

### ***A.3. Downstream PKC HIV-1 Tat Protein Activates p38 and ERK1/2 MAP Kinases in Human Macrophages***

To determine whether Tat stimulation of macrophages leads to activation of MAP kinases, human macrophages were treated or not with 10 nM Tat (1-86) protein for 10, 30 or 60 min. Cytoplasmic extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies specific against phosphorylated or non phosphorylated corresponding kinases. Untreated cells showed no significant phosphorylation of ERK1/2 or p38; however, after 10 min, Tat induced the phosphorylation of ERK1/2, which decreased slightly after 30 and 60 min (Figure 6A). As expected, a positive signal was obtained with LPS treatment. A similar analysis with anti-phospho-p38 MAP kinases antibodies was performed and demonstrated that Tat induced p38 activation, as indicated by its phosphorylation. This activation persisted for at least 60 min after Tat stimulation (Figure 6B). Similar data were obtained when the experiments were performed with the promonocytic U937 cells.

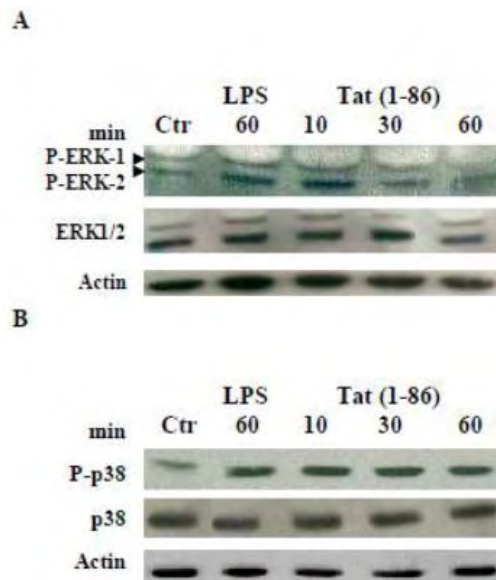


Figure 6. Tat induces MAP kinases p38 and ERK1/2 and NF- $\kappa$ B/p65 activation. Macrophages were treated or not with Tat 1-86 (10 nM), or LPS (100 ng/ml), for 10, 30 or 60 min. Cytoplasmic and nuclear extracts were analyzed by Western blot using specific antibodies for (A) ERK1/2 or phospho-ERK1/2, (B) p38 or phospho-p38. Cytoplasmic and nuclear fractions were normalized by anti-actin and anti-TFIIB, respectively.



## B. HIV-1 Tat Protein Activates NF- $\kappa$ B

In inactivated cells, NF- $\kappa$ B is sequestered in the cytoplasm by the inhibitory protein I $\kappa$ B, which masks its nuclear localization sequence. The involvement of NF- $\kappa$ B was first tested by the capacity of Tat to activate the nuclear translocation of this factor by using the mobility shift technic assay. These experiments were performed with an oligonucleotide containing an NF- $\kappa$ B site and showed the formation of a complex with nuclear extracts of monocytes stimulated with Tat (Figure 7). The observed interaction between NF- $\kappa$ B and the probe seems to be specific, since no complex was observed when the protein extract was incubated in the same conditions with the mutated NF- $\kappa$ B site (Badou et al., 2000). This result is in agreement with the nuclear translocation of p65 after stimulation of monocytes/macrophages with Tat protein.

NF- $\kappa$ B is a major transcriptional regulator for the expression of cytokines that are involved in the control of the immune and inflammatory response (Baeuerle and Baltimore, 1996; Baldwin, 1996). NF- $\kappa$ B is a dimeric transcription factor that consists of REL family members, including RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 and p52 (Li and Verma, 2002). p50 and p52 are derived from the larger precursors p105 and p100 respectively, through proteolytic processing by the proteasome. All NF- $\kappa$ B proteins contain a highly conserved REL-homology domain that is responsible for DNA binding, dimerization, nuclear translocation and interaction with the inhibitory I $\kappa$ B proteins within the cytoplasm. The I $\kappa$ B proteins bind to NF- $\kappa$ B and block its nuclear import, thereby inhibiting its transcriptional activity.

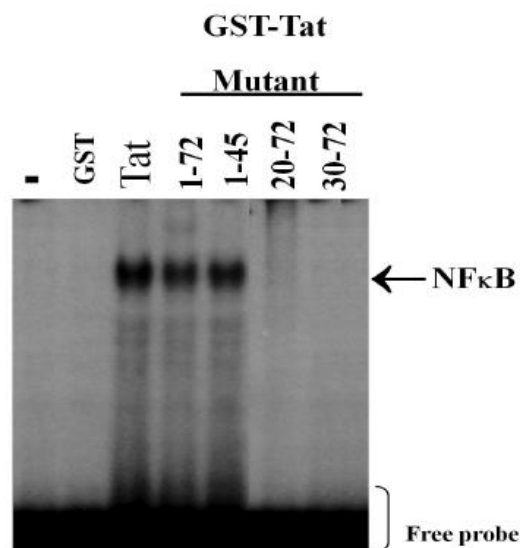


Figure 7. Activation of NF- $\kappa$ B by HIV-1 Tat 1-45 in human monocytes. Nuclear protein extracts of human monocytes treated with wild type GST-Tat 1-101 or Tat deleted mutants or negativ control GST at 10 nM for 16 h were incubated with a  $^{32}$ P-labeled NF- $\kappa$ B probe sequence containing the wild type NF- $\kappa$ B site.

The p105 and p100 precursors also contain the I $\kappa$ B-like repeats that must be degraded to generate the mature p50 and p52 subunits, respectively. In contrast to the other NF- $\kappa$ B family

members, p50 lacks a transactivation domain and, therefore, usually forms heterodimers with p65 to bind to NF- $\kappa$ B sites in the nucleus. Homodimers p50:p50 can also be formed but they act as a suppressor of inflammatory cytokine gene expression (Ghosh, May, and Kopp, 1998).

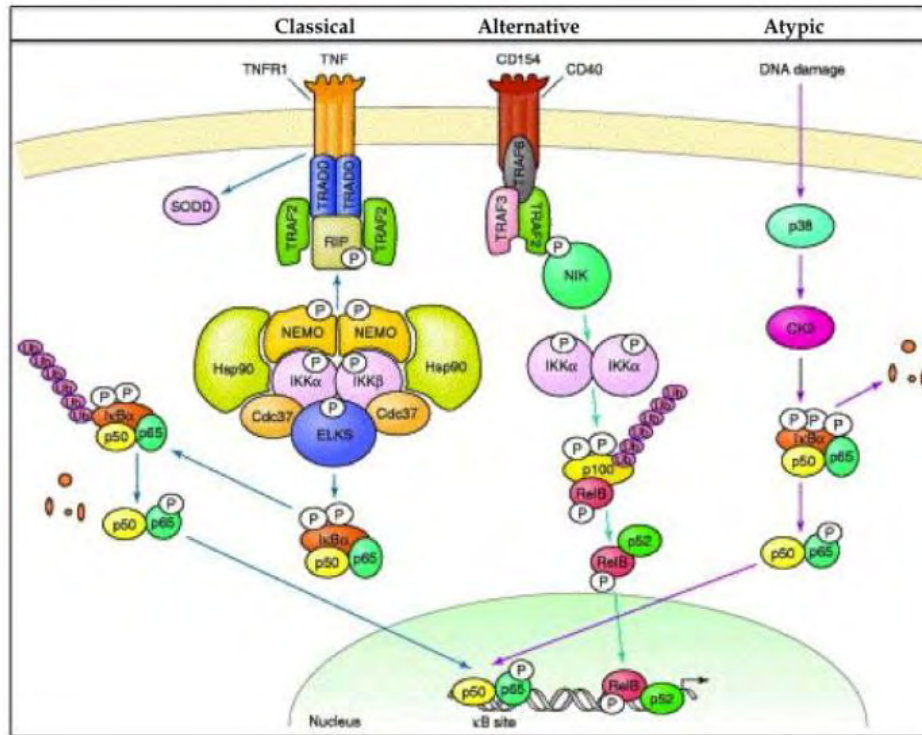


Figure 8. Three pathways of NF- $\kappa$ B modified from Viatour and al. 2005. The classical, alternative and atypical NF- $\kappa$ B-activating pathways as illustrated by the TNF- $\alpha$ -mediated, CD40-mediated and DNA-damage-mediated NF- $\kappa$ B activation pathways, respectively. In the classical NF- $\kappa$ B-activating pathway, upon binding of TNF- $\alpha$  to TNFR1, SODD is released from the receptor and triggers the sequential recruitment of the adaptors TRADD, RIP and TRAF2 to the membrane. Then, TRAF2 mediates the recruitment of the IKK complex composed of IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and NEMO. Hsp90 and Cdc37 are also part of the IKK complex and are required for IKK activation. Activation of the IKK complex leads to the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  at specific residues, ubiquitination and its degradation via the proteasome pathway. Then, the heterodimer p50-p65 is released and migrates to the nucleus where it binds to specific  $\kappa$ B sites and activates a variety of NF- $\kappa$ B target genes. The alternative pathway is triggered by binding of the CD40 ligand to its receptor, leading to recruitment of TRAF proteins and the sequential activation of NIK and IKK $\alpha$ , which induces the processing of the inhibitory protein p100. p100 proteolysis releases p52 which forms heterodimers with RelB. This pathway is NEMO independent and relies on IKK $\alpha$  homodimers. The atypical pathway, which is triggered by DNA damage relies on sequential p38 and CK2 activations, and involves phosphorylation and degradation of subsequent I $\kappa$ B $\alpha$  via an IKK-independent pathway. Abbreviations: CK2, casein kinase 2; ELKS, Glu-Leu-Lys-Ser; Hsp90, heat shock protein 90; I $\kappa$ B, inhibitor of NF- $\kappa$ B; IKK, I $\kappa$ B kinase; NEMO, NF- $\kappa$ B essential modulator; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; NIK, NF- $\kappa$ B-inducing kinase; RIP, receptor-interacting protein; RSK1, ribosomal S6 kinase 1; SODD, silencer of death domains; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; TNFR1, TNF receptor 1; TRADD, TNF-receptor-associated death domain protein; TRAF, TNFreceptor-associated factor; Ub, ubiquitin.

Three distinct NF- $\kappa$ B-activating pathways have emerged (Figure 8) (Viatour et al., 2005). Most of our knowledge concerns the “classical” pathway, which mostly targets ubiquitous

heterodimers p65:p50 and p50:c-Rel. The critical event in initiating this pathway is activation of an I $\kappa$ B-phosphorylating protein kinase, IKK $\beta$ /IKK2, which occurs within the “IKK signalosome”, in association with a structurally homologous kinase, IKK $\alpha$ /IKK1, and an adaptor protein, IKK $\gamma$ /NEMO (Yamaoka et al., 1998). IKK $\beta$ -mediated phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  leads to its proteasomal degradation and hence activation of its associated NF- $\kappa$ B dimer that translocates in the nucleus. This pathway is normally triggered in response to microbial and viral infections or exposure to pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor TNF- $\alpha$ . In contrast, the “alternative” pathway occurs independently of IKK $\beta$  or NEMO but is dependent on NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and IKK $\alpha$ . Activation of this pathway leads to a limited proteasomal processing of the NF- $\kappa$ B2/p100 precursor protein, allowing the resulting p52 fragment to translocate to the nucleus in association with one of several NF- $\kappa$ B proteins (mainly RelB) (Xiao, Harhaj, and Sun, 2001). This pathway is triggered by cytokines such as lymphotoxin  $\beta$  (Dejardin et al., 2002), or CD40 ligand (Coope et al., 2002), and by viruses such as the Epstein-Barr virus (Eliopoulos et al., 2003). The third signaling pathway is classified as “atypical” because it is independent of IKK proteins but it still requires the proteasome and is triggered by DNA damage such as UV oxidative stress (Imbert et al., 1996; Tergaonkar et al., 2003).

However, recent data suggest another role for IKK $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in response to cytokine treatment (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Independently of its previously described cytoplasmic role, IKK- $\alpha$  functions in the nucleus by activating the expression of NF- $\kappa$ B-responsive genes after TNF- $\alpha$  stimulation. IKK- $\alpha$  recruited to NF- $\kappa$ B-responsive promoters, interacts with the histone acetyltransferase CBP/p300 (CREB-binding protein). Then it mediates the phosphorylation and subsequent acetylation of specific residues of histone H3 leading to NF- $\kappa$ B binding site accessibility (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) by chromatin remodeling.

### ***B.1. Tat Induces the Nuclear Translocation of p65 and p52 NF- $\kappa$ B Subunits***

To further characterize the relationship between Tat-induced NF- $\kappa$ B activation and IL-10 production, we first monitored the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B p65 and p52 proteins.

Nuclear extracts from primary monocytes treated or not with Tat 1-86 protein (Tat) were analyzed by western blot using specific antibodies against each protein. As expected, p65 was not found in the nucleus of the unstimulated cells but, after 10 min of stimulation, Tat induced p65 nuclear translocation, which was still detectable up to 60 min of stimulation (Figure 9A).

Thus, HIV-1 Tat protein activates the classical pathway, leading to p65 nuclear translocation. More interestingly, as found with HTLV-1 Tax protein (Qu et al., 2004), HIV-1 Tat protein also induced the activation of p52, which was found in the nucleus after 30 min and accumulated up to 60 min in primary monocytes treated by Tat (Figure 9A). This result suggests that the alternative pathway is also activated by Tat, while TNF- $\alpha$  activates classical NF- $\kappa$ B pathway only, as showed by its capacity to induce p65 nuclear translocation (Figure 9A).

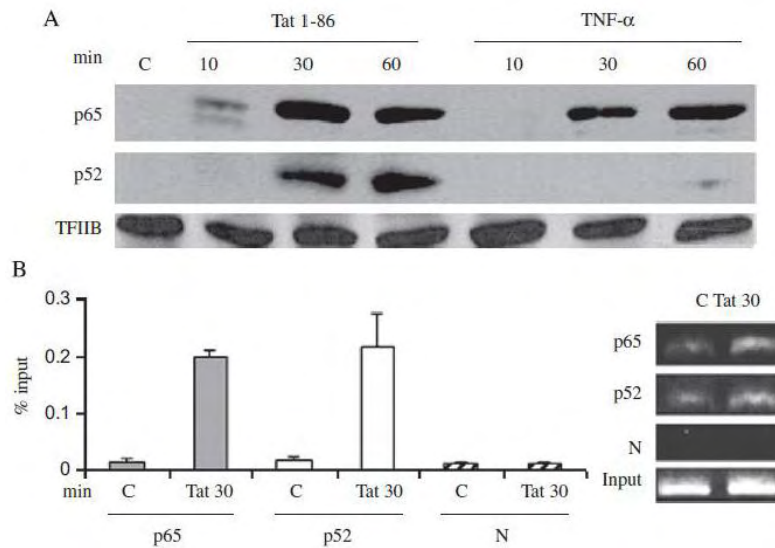


Figure 9. Tat induces recruitment of p65 and p52 to the IL-10 promoter. (A) Primary monocytes (107 cells) were stimulated or not with Tat 1-86 (10 nM) or TNF- $\alpha$  (20 ng/ml). Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot. Anti-TFIIB was used as a loading control. (B) Monocytes were treated or not with 10nM Tat 1-86 for 30 min, and ChIP assays were performed with anti-p65, anti-p52 or without (N) antibodies. The proportion of co-immunoprecipitated IL-10 promoter was analyzed by quantitative realtime PCR.

### B.2. The Nuclear p65 and p52 NF- $\kappa$ B Subunits Bind to the IL-10 Gene Promoter

However, to be active, the nuclear NF- $\kappa$ B proteins of each pathway (p65 and p52) must be able to reach their binding sites on the IL-10 gene promoter, otherwise they return to the inactive form in the cytoplasm. The recruitment of NF- $\kappa$ B proteins p65 and p52 at the IL-10 promoter region was monitored using the ChIP assay.

To this end, monocytes were treated or not by Tat for 30 min, and nuclear extracts were analyzed by ChIP using specific antibodies directed against p65 or p52. Quantitative real time PCR analysis was used to monitor the recruitment of p65 or p52 to the IL-10 promoter on the putative NF- $\kappa$ B binding site. The results depicted in figure 9B show the recruitment of p65 and p52 to the IL-10 promoter after 30 min of Tat stimulation. Consistent with this result, final time PCR with the same specific primers of IL-10 promoter showed a positive signal when the ChIP was performed with anti-p65 or anti-p52 antibodies 30 min after Tat stimulation (Figure 9B-C). This result is in agreement with the data showing the capacity of Tat to activate the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B proteins and IL-10 production described above. There was no IL-10 DNA immunoprecipitation in unstimulated control cells (Figure 9B). The specificity of the ChIP assay was confirmed by the lack of IL-10 promoter immunoprecipitation, in the absence of p65 or p52 specific antibodies (N).

### B.3. Tat-Induced NF- $\kappa$ B Activation Requires NIK, IKK $\alpha$ and IKK $\beta$ Kinases

The results depicted in figure 9, suggest that Tat protein activates two NF- $\kappa$ B pathways in order to induce IL-10 production by monocytes. So we investigated whether NF- $\kappa$ B activation induced by Tat required NIK, IKK $\alpha$  and/or IKK $\beta$  kinases implicated in the

different NF- $\kappa$ B pathways. In this aim, *trans*-dominant negative mutants NIK KK429/430AA, IKK $\alpha$  K44M and IKK $\beta$  K44A, which lack their kinase activity, were expressed in the transactivation model. Transfected cells were then incubated in the presence of Tat 1-86 (Figure 10A) or Gst-Tat 1-45 (Figure 10B).

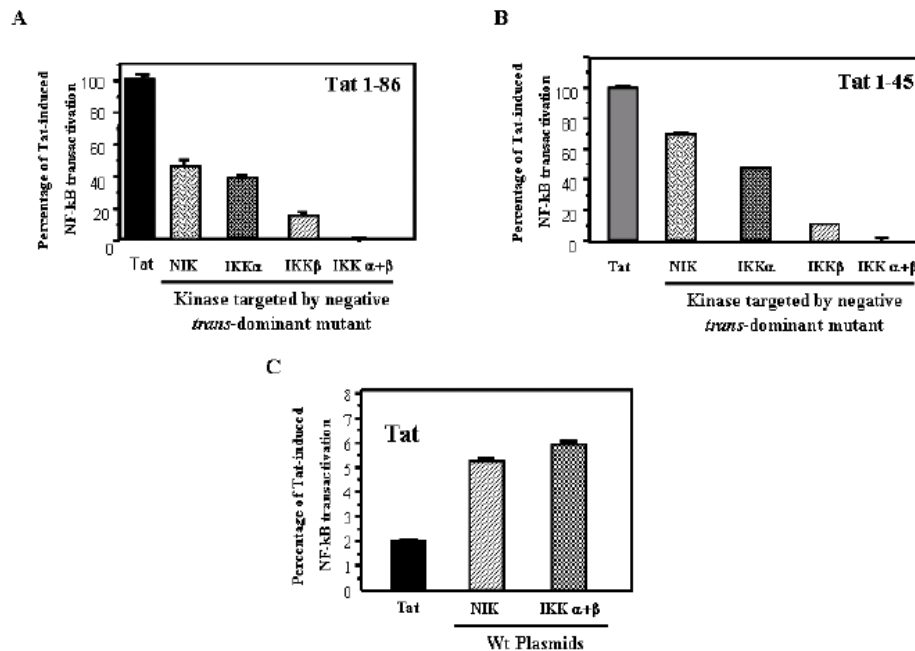


Figure 10. The NF- $\kappa$ B activation by Tat implicates NIK, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . U937 cells ( $5 \cdot 10^5$ ) were transfected with pNF- $\kappa$ B-Luc, pCMV- $\beta$ -galactosidase and plasmids encoding (A, B) *trans*-dominant kinase-negative NIKKK429/430AA, IKK $\alpha$ K44M and IKK $\beta$ K44A or (C) wild-type NIK or IKK $\alpha$ + $\beta$ . After 24 h, transfected monocytes were stimulated by (A, C) Tat 1-86 or (B) Gst-Tat 1-45 at 10nM for an additional 24 h. Unstimulated or vector-transfected cells were used as controls. The transactivation by NF- $\kappa$ B was evaluated by measuring luciferase activity and normalized by  $\beta$ -galactosidase activity.

The results demonstrated that inhibition of endogenous NIK by its dominant negative mutant led to a decrease in NF- $\kappa$ B transactivation by 53 % and 30 % in the presence of Tat 1-86 and Gst-Tat 1-45 respectively (i.e. 47 % and 70 % of NF- $\kappa$ B transactivation). Similarly, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  dominant negative mutants reduced, by 60% and 82% respectively, the luciferase gene transactivation induced by Tat 1-86 (i.e. 40% and 18% of NF- $\kappa$ B transactivation) and by 50 % and 88 % respectively when cells were activated by Gst-Tat 1-45 (i.e. 50 % and 12 % of NF- $\kappa$ B transactivation). Interestingly, when the two *trans*-dominant negative mutants were expressed simultaneously in the cells, luciferase gene transactivation induced by Tat was totally inhibited (100 %) (Figure 10A, B). These results indicate the implication of NIK, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  in NF- $\kappa$ B activation induced by Tat (Figure 10A, B). In accordance with this result, overexpression of wild-type proteins NIK or IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  simultaneously in U937 cells resulted in a 5.5- and 6.2-fold induction respectively of the NF- $\kappa$ B activation induced by Tat protein (Figure 10C).

These results demonstrate that the kinases NIK, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are involved in the NF- $\kappa$ B activation induced by extracellular Tat via signaling through the cell membrane, and

suggest the activation of both the classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways as shown by the implication of the IKK $\beta$  and NIK/IKK $\alpha$  kinases respectively.

#### ***B.4. Tat Protein Induces the Nuclear Translocation of Endogenous IKK $\alpha$ in Monocytes***

Recent studies have shown that IKK $\alpha$  but not IKK $\beta$ , constitutively shuttles between cytoplasm and nucleus (Birbach et al., 2002), thus suggesting that it plays a role in the nucleus as reported for the first time by (Anest et al., 2003) and (Yamamoto et al., 2003). These studies demonstrated a nuclear accumulation of IKK $\alpha$  in TNF- $\alpha$  stimulated mouse embryo fibroblasts (MEFs) and suggested the importance of the nucleosome in NF- $\kappa$ B dependent gene expression by acting on the histone H3 phosphorylation (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

We addressed the question whether Tat protein, in addition to its effect in the activation of classical and alternative NF- $\kappa$ B pathways, was also able to activate a nucleosomal function for IKK $\alpha$ , by inducing its nuclear translocation and kinase action on the histone H3 proteins associated with IL-10 promoter. To this end, nuclear extracts from human monocytes stimulated with Tat or TNF- $\alpha$  (positive control) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against IKK $\alpha$ . Stimulation of monocytes with Tat, as with TNF- $\alpha$ , resulted in marked nuclear accumulation of IKK $\alpha$  from 10 to 120 min (Figure 11A). Moreover, the N terminal fragment, Gst-Tat 1-45, was also sufficient to induce IKK $\alpha$  nuclear translocation (Figure 11B). In control experiments, no IKK $\alpha$  was observed in the nuclear fraction of unstimulated cells or after Gst treatment. These results suggest that Tat induced a nuclear translocation of endogenous IKK $\alpha$  by acting at the cell membrane level in monocytes.

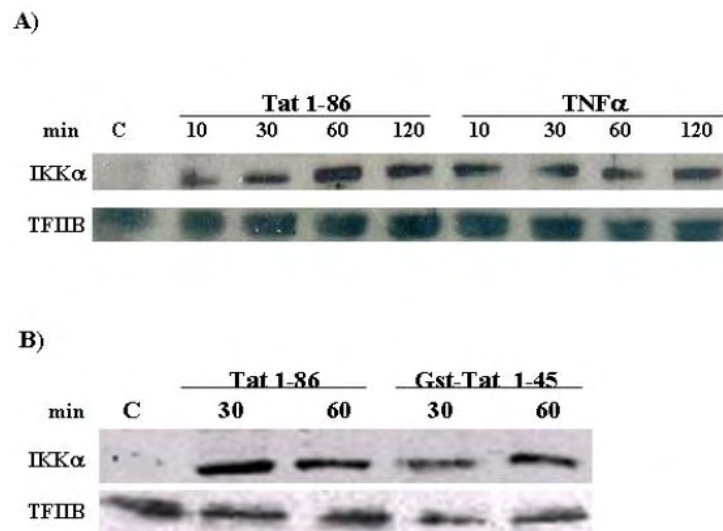


Figure 11. Tat induces nuclear accumulation of endogenous IKK $\alpha$ . Monocytes were stimulated or not with 10nM Tat 1-86 (A, B), 20 ng/ml TNF- $\alpha$  (A), or 10nM Gst-Tat 1-45 (B), for the times indicated. Unstimulated cells or treatment with 10nM Gst for 60 min were used as negative controls. Nuclear extracts were analyzed by Western blot. Anti-TFIIB was used as a loading control.

### B.5. Tat-Induced IKK $\alpha$ Nuclear Translocation is Associated with Histone H3 Modifications in the IL-10 Gene Promoter

It has been shown that the nuclear IKK $\alpha$  plays a crucial role in NF- $\kappa$ B dependent gene expression by inducing a direct histone H3 phosphorylation and subsequent chromatin remodelling (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Therefore, we investigated whether IKK $\alpha$  was recruited to the NF- $\kappa$ B binding site on the IL-10 gene promoter region, in Tat-stimulated human monocytes, and whether it was associated with chromatin remodelling activities.

With this aim, human monocytes were treated for various times with Tat and ChIP assays were performed on the nuclear extracts by using specific antibodies directed against IKK $\alpha$ , CBP, phospho-histone H3 (Ser10) and acetyl-histone H3 (Lys14). Quantitative real time PCR analysis was used to determine the percentage of IL-10 promoter input DNA that was bound to these proteins. In response to stimulation with Tat, the recruitment of IKK $\alpha$  and CBP to the IL-10 promoter was detected 30 min after treatment and was present for at least 60 min (Figure 12A). In contrast, when the same experiments were performed in the absence of specific antibodies, no positive IL-10 gene expression was detected (N) (Figure 12A).

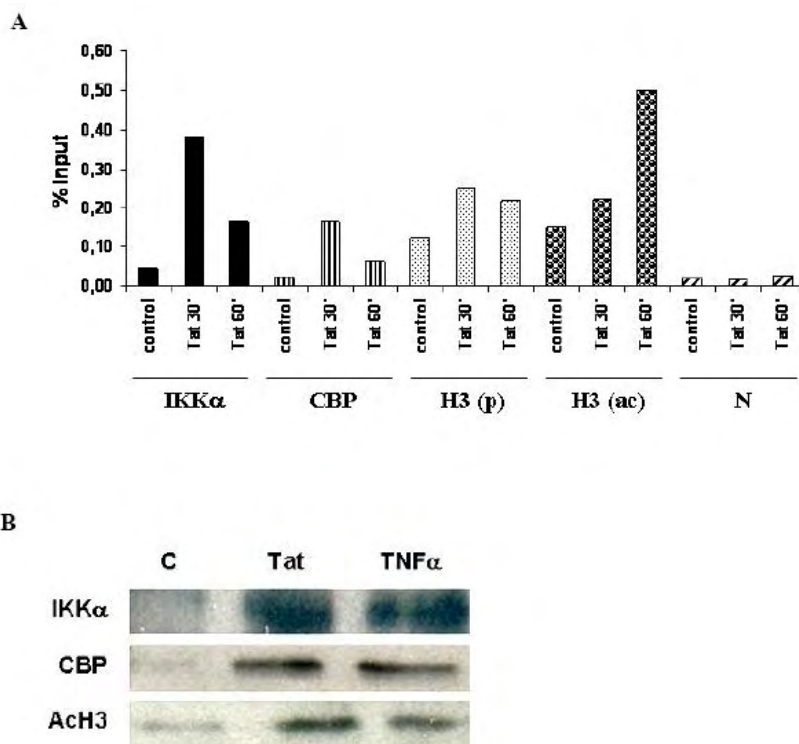


Figure 12. Tat treatment leads to IKK $\alpha$  association and histone H3 modifications on the IL-10 promoter. (A) Monocytes ( $10^7$  cells) were treated with 10nM Tat 1-86 for 30 or 60 min, and ChIP assays were performed with the indicated antibodies. The proportion of co-immunoprecipitated IL-10 promoter was analyzed by quantitative real-time PCR. (B) After treatment of monocytes with Tat or TNF- $\alpha$ , the nuclear fraction of monocytes was incubated with anti-IKK $\alpha$ -specific antibodies at 4°C overnight before incubation for 2 h at 4°C with protein A and G agarose. Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot.

Further, we showed that the treatment of monocytes with Tat resulted in increased phosphorylation of serine 10 and acetylation of Lysine 14 in histone H3 at 30 and 60 min of stimulation (Figure 12A). The high standard deviation is due to the difference of responses between the three donors from which monocytes were isolated.

Phosphorylation of histone H3 is associated with several distinct biological processes including the mitogen-induced and cytokine-induced activation of specific genes and the compaction of chromosome at the onset of mitosis (Cheung, Allis, and Sassone-Corsi, 2000; Strahl and Allis, 2000). One potential effect of histone H3 phosphorylation has been proposed to be associated with the recruitment and activation of histone acetyltransferases (HAT) (Cheung, Allis, and Sassone-Corsi, 2000; Lo et al., 2000). The HAT activity of CBP acetylates the N-terminal tails of histone H3 during transcriptional activation (Lo et al., 2000; Strahl and Allis, 2000). Given the fact that IKK $\alpha$  plays a role in the phosphorylation of serine 10 of histone H3 (Anest et al., 2003), it was possible that IKK $\alpha$  might form a complex with CBP and histone H3 on IL-10 promoter to increase transcription. The interactions of these proteins were analyzed in the nuclear extracts prepared from monocytes stimulated for 60 min by Tat or by TNF $\alpha$  as a positive control. After immunoprecipitation by IKK $\alpha$  antibodies, both CBP and acetylated histone H3 were clearly bound to their respective antibodies in western blot analysis. This finding suggested that there were interactions between IKK $\alpha$ , CBP and acetylated histone H3, and the formation of DNA-protein complex mediated by Tat stimulation and IKK $\alpha$  (Figure 12B).

### C. Tat Induces an Intracellular Calcium Increase

A variety of functions have been associated with HIV-1 Tat protein, including induction of apoptosis (Westendorp et al., 1995), immunosuppressions (Badou et al., 2000), stimulation or inhibition of cytokine production (Nath et al., 2000; Zocchi et al., 1998), vaccinating properties (Fanales-Belasio et al., 2002a) and of mobilization calcium (Mayne et al., 2000).

In our group we showed, as reported by Albini et al. for macrophages, astrocytes and neurones and by Canani et al. for human intestinal epithelial cells (Albini et al., 1998; Canani et al., 2003), that Tat protein induces an increase in the concentration of cytoplasmic calcium in primary human monocytes (Figure 13) and that this may then be used as a second messenger for activating signaling pathways leading to cytokine gene expression and the production of TNF- $\alpha$ .

However the findings of Albini et al., Canani et al., and ourselves differ from the data of Poggi et al. (Poggi, Rubartelli, and Zocchi, 1998) in two respects: the opposite effect of Tat on calcium mobilization and the proposed active domain of Tat (aa65-80). This latter result is in disagreement with the common active domain (Tat 24-51 and Tat 20-45) determined respectively by Albini et al and by us (Figure 14) and with data showing that the Tat deletion mutant  $\Delta$ 31-61 can no longer trigger a rise in intracellular calcium (Self et al., 2004). Moreover, the recent data of Fanales-Belasio et al., (Fanales-Belasio et al., 2002b) who found that Tat can stimulate IL-12 production and MHC antigen up-regulation, do not support either the hypothesis advanced by Poggi et al. either.



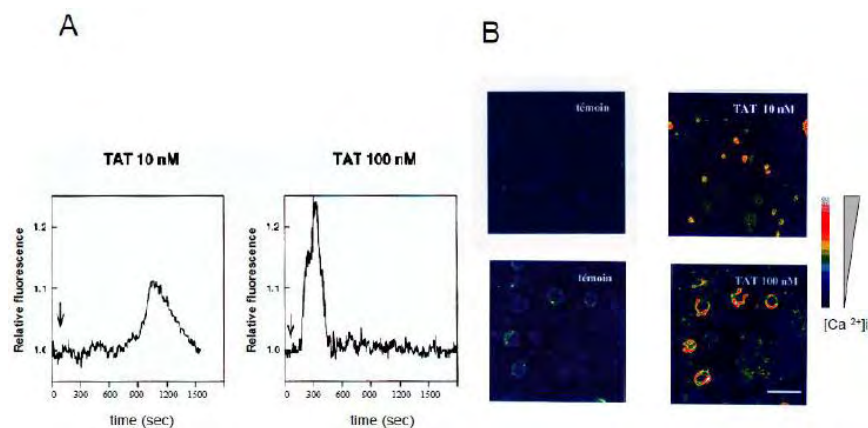


Figure 13. Analysis of the intracellular variation of calcium concentration by microspectrofluorimetry (A) or confocal microscopy (B). (A) Monocytes preincubated with fluo-3-AM (5  $\mu$ M) for 30 min before microscopic observation. After two washes, monocytes were stimulated by Tat 1–86 from HIV-1 Lai (10 and 100 nM) at the time indicated by the arrows. Relative fluorescence corresponds to the ratio of fluorescence emitted by stimulated cells to fluorescence emitted by resting cells. Each panel is a representative result of three independent experiments, in which  $34 \pm 8\%$  of stimulated cells were positive. (B) Monocytes preincubated for 30 min with fluo-3-AM were observed with a confocal microscope (Zeiss, LSM 410) and stimulated by Tat (10 and 100 nM). Images with pseudocolors represent fluorescence variations in resting monocytes (control) and after stimulation by Tat. The images presented here correspond to the maximum response ( $t = 6$  min for 10 nM Tat and  $t = 4$  min for 100 nM Tat). On the color ladder, blue represents low levels of Ca<sup>2+</sup> and red high levels. Similar results were obtained using HIV-1 SF-2 Tat.

Another more fundamental question concerns the origin of the mobilized calcium. Our results indicate that it seems to have an extracellular origin (Figure 15) since i) no signal was observed when monocytes were stimulated with Tat in a calcium-free medium, ii) the calcium increase induced by Tat was not affected when stimulation was performed in the presence of Xestospongine C or TMB8, two inhibitors of intracellular stores, mediated respectively by IP<sub>3</sub> and ryanodine receptors (Figure 15). The latter conclusion disagrees with the reports of Mayne et al. showing the implication of IP<sub>3</sub>-sensitive stores in the calcium increase generated by Tat in macrophages (Mayne et al., 2000) and astrocytes (Mayne et al., 1998). On the other hand, our results do agree with those of Albin et al. (Albin et al., 1998), who showed a strong implication of extracellular calcium in the signal induced by Tat. This contradiction could be due in part to the different cell types and sources of Tat used in each study.

At the structural and functional levels, molecular, biochemical and immunochemical studies have shown that DHP receptors consist of complexes formed by five protein subunits. The  $\alpha$  subunit (200 kDa) represents the main part of the channel. At least six isoforms of the  $\alpha$  subunit have been described, including  $\alpha 1S$  and  $\alpha 1C$ , the most abundant DHP-receptor isoforms in skeletal and cardiac muscle respectively. This variety underlies the characteristic electrophysiological parameters of voltage-dependent calcium channels (VDCC) (Jones, 1998).

In addition to the  $\alpha 1$  subunit, the DHP receptor channel consists of the  $\beta$  subunit (60 kDa) and a disulfide connecting complex of  $\alpha 2$  and  $\delta$  subunits (170 kDa). The  $\alpha 1$  subunit is the receptor for calcium antagonist and can function as a voltage gated channel. DHP receptor channel activity is in part regulated by phosphorylation via protein kinase.

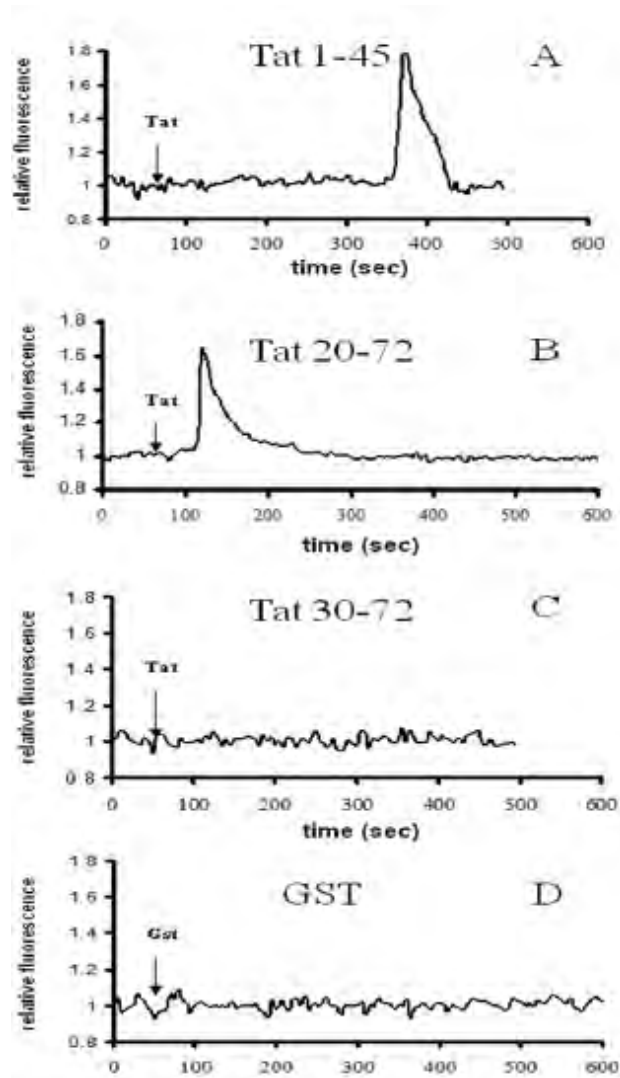


Figure 14. HIV-1 Tat domain involved in the calcium signal triggered in human monocytes. Monocytes were loaded with fluo-3-AM as described in the legend to figure 1 and were then stimulated by different deleted Tat mutants (A: Tat1-45; B: Tat20-72; C: Tat30-72; D: GST) at the times indicated by the arrows. Time-course of fluorescence was then analyzed by microspectrofluorimetry. Relative fluorescence corresponds to the ratio of fluorescence emitted by stimulated cells to fluorescence emitted by resting cells. Each panel is a representative result of three independent experiments, in which 31 +/- 6 % of stimulated cells were positive.

In addition to the modulation of DHP receptor channels by PKC (Savignac et al., 2001a), other protein kinases were also implied, including cyclic GMP-dependent protein kinase, which seems to act by decreasing L-type calcium channel current (Jiang et al., 2000).

Our results indicate the expression of DHP receptors (L-type calcium channels), mostly  $\alpha 1D$ , on primary human monocytes as shown by RT-PCR, SDS-PAGE and western blot analysis (Figure 16), and inhibition of DHP receptor expression by specific antisense oligonucleotides (Figure 17).

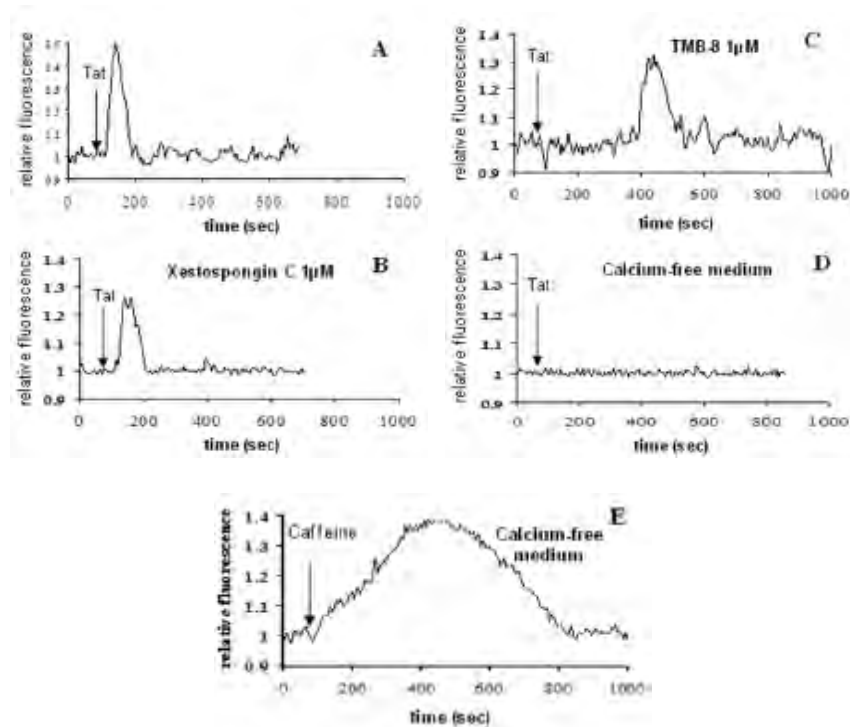


Figure 15. Origin of the calcium influx stimulated by Tat in monocytes. (A) calcium increase following stimulation by Tat. (B, C) microspectrofluorimetric analysis of the involvement of intracellular stores of calcium using Xestospongin C, 1  $\mu$ M (B) and TMB-8, 1  $\mu$ M (C), inhibitors of intracellular calcium stores stimulate respectively by IP<sub>3</sub> and ryanodine. To assess the role of the extracellular calcium, cells were preincubated with calcium-free medium prior to stimulation by Tat (D) or caffeine (E), an activation of intracellular calcium stores. Relative fluorescence corresponds to the ratio of fluorescence emitted by stimulated cells to fluorescence emitted by resting cells. Each panel is a representative result of three independent experiments, in which 36  $\pm$  9 % of stimulated cells were positive.

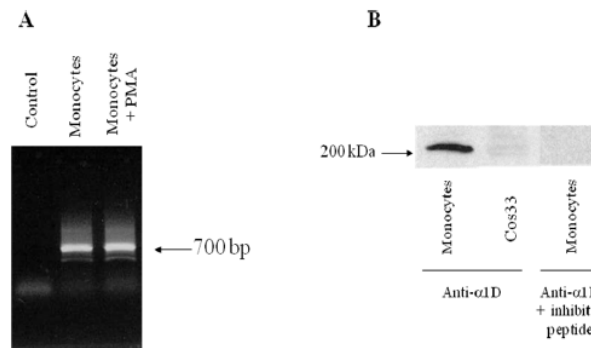


Figure 16. Presence of DHP receptors in human monocytes. (A) RT-PCR using oligonucleotides 5'-catgtagaagctgatgaa-3' and 5'-ttctcatgatgaacatctt-3' on mRNA from human monocytes. (B) Western Blot: 100  $\mu$ g of membrane proteins from human monocytes and Cos33 cells were electrophoresed on an acrylamide gel, then an antibody raised against the  $\alpha$ 1D subunit of DHP receptors was used for revelation. As a control for specificity the same antibody previously incubated with its specific peptide (5  $\mu$ g/ml) was used.

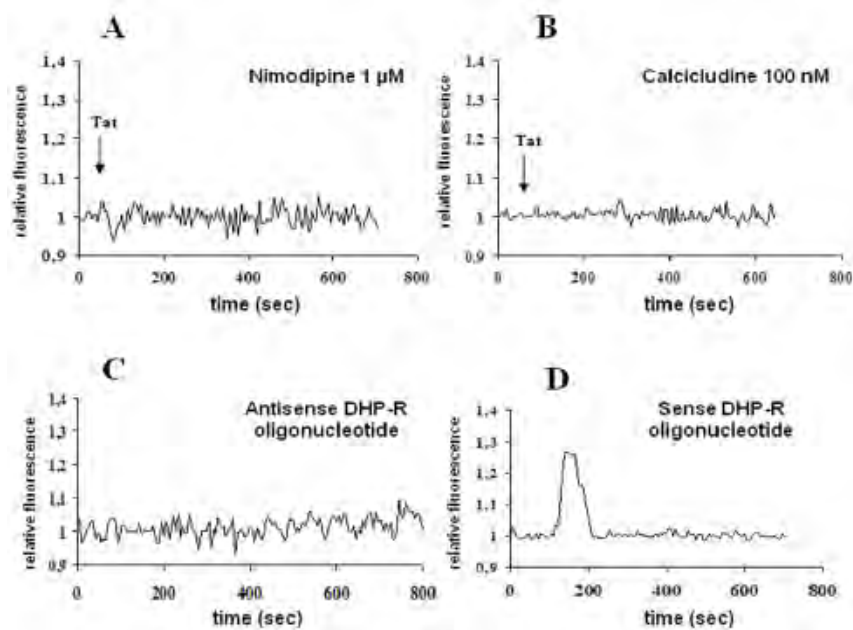


Figure 17. Microspectrofluorimetric demonstration of the involvement of DHP-receptors in the calcium increase in monocytes following stimulation by Tat. Monocytes were preincubated with DHP receptor inhibitors (A: nimodipine, B: calcicludine) or antisense oligonucleotides directed against the  $\alpha 1D$  subunit of DHP-Receptors (C) prior to stimulation by Tat. As a negative control, the corresponding sense oligonucleotide was used (D). Relative fluorescence corresponds to the ratio of fluorescence emitted by stimulated cells to fluorescence emitted by resting cells. Each panel is a representative result of three independent experiments in which  $33 \pm 7\%$  of stimulated cells were positive.

In addition to their presence in primary human monocytes, several lines of evidence support that these channels are also functional. Firstly, the stimulation of human monocytes by BayK8644-, a DHP receptor agonist, induced an intracytoplasmic increase of calcium level similar to that obtained with Tat. Secondly, preincubation of monocytes with nimodipine or calcicludine, two antagonists of DHP receptors, completely blocked the ability of Tat to stimulate calcium entry into cells. It is interesting to note that these channels seem to be voltage-independent since no calcium increase was induced following stimulation of monocytes with 50 mM KCl (data not shown). This statement is in agreement with previous results showing that L-type calcium channels (DHP receptors) in immune cells, including dendritic and NK cells, are also independent of voltage (Poggi, Rubartelli, and Zocchi, 1998; Zocchi et al., 1998). More recently it was shown that DHP receptors can be selectively expressed on Th2 but not Th1 T lymphocytes (Savignac et al., 2001a; Savignac et al., 2001b), thus suggesting that DHP receptors are directly implicated in the production of IL-4 cytokine and in the modulation of Th2 effector function. Interestingly the same group using the Norway rat model, described a direct relationship between DHP sensitive calcium channels and the autoimmune disease induced by chronic injection of gold salts. Indeed, treatment of the rats with calcium channel blockers appeared to prevent development of the disease (Fournie et al., 2002).

Finally, we have shown that Tat-induced calcium mobilization and TNF- $\alpha$  production is entirely mediated via DHP receptors, since there was a total inhibition of its release in the

presence of nimodipine or calcicludine, inhibitors of DHP receptors, or in the presence of specific  $\alpha$ 1D antisense oligonucleotides (Figure 18).

Taken together, these results show that DHP receptors are expressed at the membrane of human monocytes, are apparently functional and are recruited for the mediation of a calcium increase following stimulation by HIV-1 Tat protein.

Calcium signaling is known to be crucial for a great number of immune functions. In the different studies discussed above, the calcium signal induced by Tat seems to be associated with the dysregulation of the complex cytokine network and thus with the alteration of certain immune functions (Albini et al., 1998).

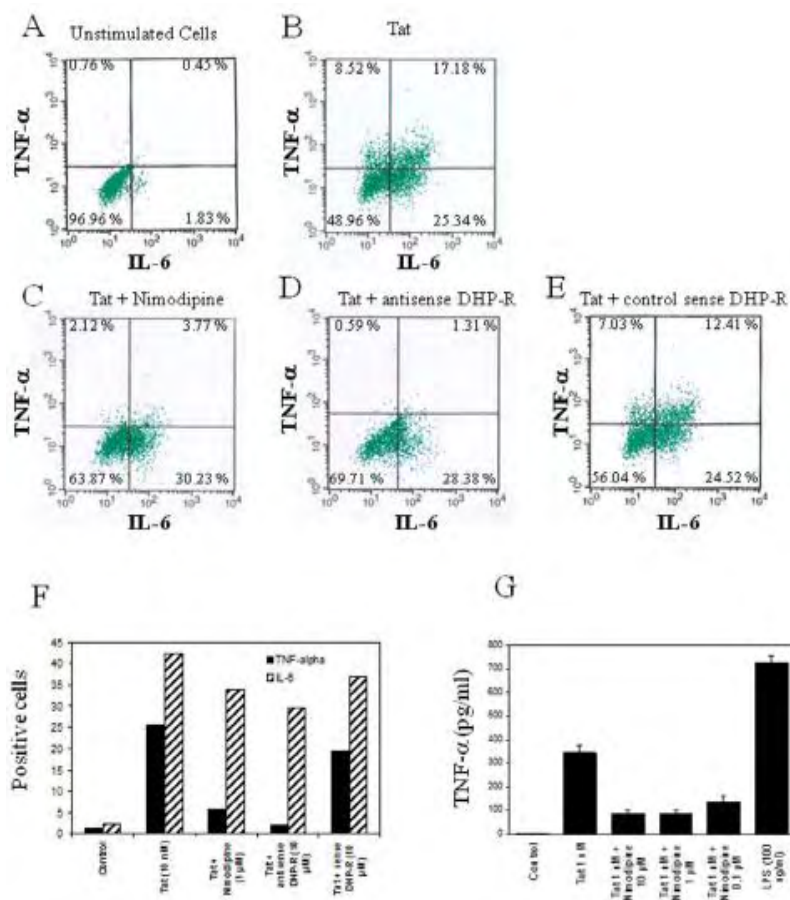


Figure 18. Cytokine expression in HIV-1 Tat-stimulated monocytes. Monocytes ( $10^6$  cells), stimulated or not, were treated with monensin (6 h) in order to block cytokine secretion prior to their analysis by FACS as described in materials and methods. Briefly, cells were stained with anti-CD14 monoclonal antibody (APC), fixed with formaldehyde and then stained with anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-6 monoclonal antibodies. Only CD14+ cells (monocytes) were analysed for the presence of these cytokines. (A) control unstimulated cells (B-D) HIV-1 Tat stimulated cells (10 nM) pretreated with nimodipine, 1  $\mu$ M, (C) antisense oligonucleotides for DHP-receptors, 10  $\mu$ M (D) or control sense oligonucleotides (E). Results are quantified in the histogram F. In G, monocytes ( $10^6$  cells), pretreated or not with nimodipine (10, 1, 0.1  $\mu$ M), were stimulated by Tat (1 nM). Supernatants were collected 6h later and TNF- $\alpha$  concentration was assessed by ELISA. Data from one donor are shown, representative of three different experiments carried out on cells from three different donors.

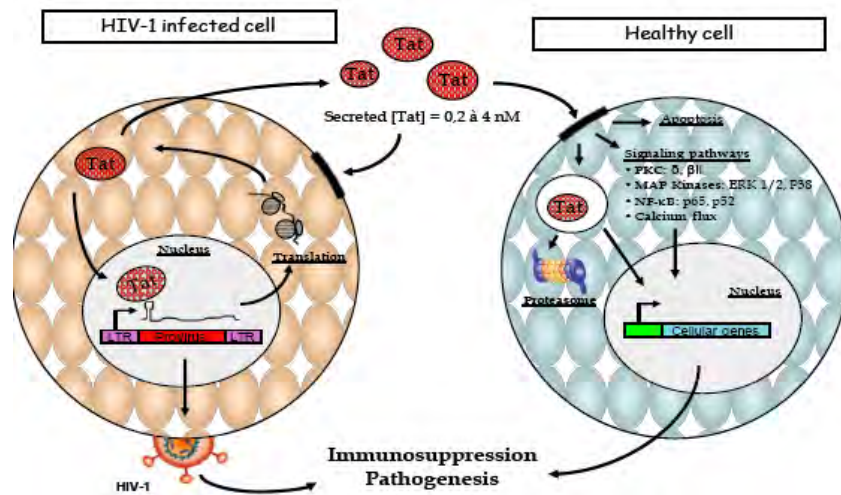


Figure 19. Autocrin and paracrin action of HIV-1 secreted Tat. In HIV-1 infected cells, Tat protein stimulates HIV-1 replication by trans-activation of viral genes. Secreted Tat also acts both on infected and non infected cells and stimulates various signalling pathways including PKC, MAP Kinase, NF- $\kappa$ B and calcium pathways. Those activations can exert many functions including apoptosis and modulation of cytokines production and various membranes receptors expression leading both to immunosuppression and pathogenesis.

Currently, some therapeutic strategies are targeting DHP receptors with some success, using nimodipine in HIV-1-infected patients (Navia et al., 1998).

In our recent work (Badou et al., 2000; Bennasser and Bahraoui, 2002), we have shown that Tat protein is able to induce the production of TNF- $\alpha$  in monocytes and macrophages and that this production is critically dependent on the presence of calcium in the extracellular medium. Moreover, we show in the present study that TNF- $\alpha$  is produced by human monocytes as a consequence of the mobilization of calcium triggered by Tat by recruiting DHP-receptors.

## CONCLUSION

In HIV infected patients, an increase in the level of IL-10, an immunosuppressive Th2 cytokine, and TNF- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine involved in HIV associated dementia, were observed during the progression of HIV infection towards AIDS.

By inducing TNF- $\alpha$  and IL-10, Tat appears to contribute actively as a pathogenic and immunosuppressive factor, to disease progression. As Tat protein is necessary for HIV-1 replication and is involved in a number of physiopathological effects, therapeutic approaches targeting Tat could be particularly effective in reducing the physiopathological effects of HIV-1 infection.

In addition, the understanding of the regulation of TNF- $\alpha$  and IL-10 expression, essentially by monocytes/macrophages, in HIV infection is important for deciphering the dysregulation of the cytokine network induced by HIV and, more broadly, understanding how HIV infection induces a state of immunodeficiency.

Targeting the NF- $\kappa$ B or calcium pathways might be a potential strategy for treating and preventing HAD and immune response depression in HIV-1 infected patients.

Taking into account the toxic and immunosuppressive effect of Tat, it is important to continue to develop preventive and therapeutic HIV-vaccines based on HIV-1 Tat.

## REFERENCES

- Akdis, C. A., and Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 103(2), 131-6.
- Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M. G., Proudfoot, A. E., Alouani, S., Wells, T. N., Mariani, G., Rabin, R. L., Farber, J. M., and Noonan, D. M. (1998). HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(22), 13153-8.
- Ameglio, F., Capobianchi, M. R., Castilletti, C., Cordiali Fei, P., Fais, S., Trento, E., and Dianzani, F. (1994). Recombinant gp120 induces IL-10 in resting peripheral blood mononuclear cells; correlation with the induction of other cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 95(3), 455-8.
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003). A nucleosomal function for I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  in NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. *Nature* 423(6940), 659-63.
- Badou, A., Bennasser, Y., Moreau, M., Leclerc, C., Benkirane, M., and Bahraoui, E. (2000). Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J. Virol.* 74(22), 10551-62.
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996). NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell* 87(1), 13-20.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-83.
- Bennasser, Y., Badou, A., Tkaczuk, J., and Bahraoui, E. (2002). Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF- $\alpha$ . *Virology* 303(1), 174-80.
- Bennasser, Y., and Bahraoui, E. (2002). HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C- $\beta$ II and - $\delta$ . *Faseb J.* 16(6), 546-54.
- Birbach, A., Gold, P., Binder, B. R., Hofer, E., de Martin, R., and Schmid, J. A. (2002). Signaling molecules of the NF- $\kappa$ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 277(13), 10842-51.
- Buonaguro, L., Barillari, G., Chang, H. K., Bohan, C. A., Kao, V., Morgan, R., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1992). Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J. Virol.* 66(12), 7159-67.
- Cameron, P. U., Lowe, M. G., Sotzik, F., Coughlan, A. F., Crowe, S. M., and Shortman, K. (1996). The interaction of macrophage and non-macrophage tropic isolates of HIV-1 with thymic and tonsillar dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 183(4), 1851-6.
- Canani, R. B., Cirillo, P., Mallardo, G., Buccigrossi, V., Secondo, A., Annunziato, L., Bruzzese, E., Albano, F., Selvaggi, F., and Guarino, A. (2003). Effects of HIV-1 Tat

- protein on ion secretion and on cell proliferation in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124(2), 368-76.
- Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L., and Ensoli, B. (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *Aids* 11(12), 1421-31.
- Cheung, P., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103(2), 263-71.
- Clerici, M., and Shearer, G. M. (1993). A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14(3), 107-11.
- Clerici, M., and Shearer, G. M. (1994). The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15(12), 575-81.
- Clerici, M., Wynn, T. A., Berzofsky, J. A., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Sher, A., Coffman, R. L., and Shearer, G. M. (1994). Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J. Clin. Invest.* 93(2), 768-75.
- Contreras, X., Bennasser, Y., Chazal, N., Moreau, M., Leclerc, C., Tkaczuk, J., and Bahraoui, E. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology* 332(1), 316-28.
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G., Johnston, L. H., and Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J.* 21(20), 5375-85.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17(4), 525-35.
- Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S., and Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(15), 5974-8.
- Eliopoulos, A. G., Caamano, J. H., Flavell, J., Reynolds, G. M., Murray, P. G., Poyet, J. L., and Young, L. S. (2003). Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* 22(48), 7557-69.
- Embretson, J., Zupancic, M., Beneke, J., Till, M., Wolinsky, S., Ribas, J. L., Burke, A., and Haase, A. T. (1993). Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and in situ hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(1), 357-61.
- Emilie, D., Fior, R., Crevon, M. C., Maillot, M. C., Boue, F., and Galanaud, P. (1994a). Cytokines from lymphoid organs of HIV-infected patients: production and role in the immune disequilibrium of the disease. *Res. Immunol.* 145(8-9), 595-600; discussion 600-2.
- Emilie, D., Fior, R., Jarrousse, B., Marfaing-Koka, A., Merrien, D., Devergne, O., Crevon, M. C., Maillot, M. C., and Galanaud, P. (1994b). Cytokines in HIV infection. *Int. J. Immunopharmacol.* 16(5-6), 391-6.



- Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345(6270), 84-6.
- Fanales-Belasio, E., Cafaro, A., Cara, A., Negri, D. R., Fiorelli, V., Butto, S., Moretti, S., Maggiorella, M. T., Baroncelli, S., Michelini, Z., Tripiciano, A., Sernicola, L., Scoglio, A., Borsetti, A., Ridolfi, B., Bona, R., Ten Haaf, P., Macchia, I., Leone, P., Pavone-Cossut, M. R., Nappi, F., Vardas, E., Magnani, M., Laguardia, E., Caputo, A., Titti, F., and Ensoli, B. (2002a). HIV-1 Tat-based vaccines: from basic science to clinical trials. *DNA Cell Biol.* 21(9), 599-610.
- Fanales-Belasio, E., Moretti, S., Nappi, F., Barillari, G., Micheletti, F., Cafaro, A., and Ensoli, B. (2002b). Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J. Immunol.* 168(1), 197-206.
- Fauci, A. S. (1988). The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239(4840), 617-22.
- Folks, T. M., Clouse, K. A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J. H., and Fauci, A. S. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(7), 2365-8.
- Fournie, G. J., Saoudi, A., Druet, P., and Pelletier, L. (2002). Th2-type immunopathological manifestations induced by mercury chloride or gold salts in the rat: signal transduction pathways, cellular mechanisms and genetic control. *Autoimmun Rev.* 1(4), 205-12.
- Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55(6), 1189-93.
- Fraser, J. D., Straus, D., and Weiss, A. (1993). Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol. Today* 14(7), 357-62.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-60.
- Goekjian, P. G., and Jirousek, M. R. (2001). Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 10(12), 2117-40.
- Goldstein, G. (1996). HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nat. Med.* 2(9), 960-4.
- Graziosi, C., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1994). Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res. Immunol.* 145(8-9), 602-5; discussion 605-7.
- Hagiwara, E., Sacks, T., Leitman-Klinman, S. F., and Klinman, D. M. (1996). Effect of HIV infection on the frequency of cytokine-secreting cells in human peripheral blood. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12(2), 127-133.
- Herbein, G., Gras, G., Khan, K. A., and Abbas, W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7, 34.
- Hirsch, V. M., Sharkey, M. E., Brown, C. R., Brichacek, B., Goldstein, S., Wakefield, J., Byrum, R., Elkins, W. R., Hahn, B. H., Lifson, J. D., and Stevenson, M. (1998). Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nat. Med.* 4(12), 1401-8.
- Huang, L., Bosch, I., Hofmann, W., Sodroski, J., and Pardee, A. B. (1998). Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J. Virol.* 72(11), 8952-60.

- Imbert, V., Rupec, R. A., Livolsi, A., Pahl, H. L., Traenckner, E. B., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P. A., and Peyron, J. F. (1996). Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 86(5), 787-98.
- Ito, M., Ishida, T., He, L., Tanabe, F., Rongge, Y., Miyakawa, Y., and Terunuma, H. (1998). HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14(10), 845-9.
- Itoh, K., and Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol.* 154(9), 4341-50.
- Jiang, L. H., Gawler, D. J., Hodson, N., Milligan, C. J., Pearson, H. A., Porter, V., and Wray, D. (2000). Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275(9), 6135-43.
- Jones, S. W. (1998). Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg Biomembr* 30(4), 299-312.
- Levy, Y., and Brouet, J. C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Invest.* 93(1), 424-8.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Meteleev, V., and Pardee, A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268(5209), 429-31.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2(10), 725-34.
- Llewellyn, N., Zioni, R., Zhu, H., Andrus, T., Xu, Y., Corey, L., and Zhu, T. (2006). Continued evolution of HIV-1 circulating in blood monocytes with antiretroviral therapy: genetic analysis of HIV-1 in monocytes and CD4+ T cells of patients with discontinued therapy. *J. Leukoc Biol.* 80(5), 1118-26.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., and Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* 5(6), 917-26.
- Maggi, E., Mazzetti, M., Ravina, A., Annunziato, F., de Carli, M., Piccinni, M. P., Manetti, R., Carbonari, M., Pesce, A. M., del Prete, G., and et al. (1994). Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* 265(5169), 244-8.
- Mayne, M., Bratanich, A. C., Chen, P., Rana, F., Nath, A., and Power, C. (1998). HIV-1 tat molecular diversity and induction of TNF-alpha: implications for HIV-induced neurological disease. *Neuroimmunomodulation* 5(3-4), 184-92.
- Mayne, M., Holden, C. P., Nath, A., and Geiger, J. D. (2000). Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages. *J. Immunol.* 164(12), 6538-42.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-90.
- Nath, A., Haughey, N. J., Jones, M., Anderson, C., Bell, J. E., and Geiger, J. D. (2000). Synergistic neurotoxicity by human immunodeficiency virus proteins Tat and gp120: protection by memantine. *Ann. Neurol.* 47(2), 186-94.

- Navia, B. A., Dafni, U., Simpson, D., Tucker, T., Singer, E., McArthur, J. C., Yiannoutsos, C., Zaborski, L., and Lipton, S. A. (1998). A phase I/II trial of nimodipine for HIV-related neurologic complications. *Neurology* 51(1), 221-8.
- Nishizuka, Y. (1992). Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci. Res.* 15(1-2), 3-5.
- Orenstein, J. M., Fox, C., and Wahl, S. M. (1997). Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 276(5320), 1857-61.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993). The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *Aids* 7 Suppl 1, S19-23.
- Poggi, A., Rubartelli, A., and Zocchi, M. R. (1998). Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* 273(13), 7205-9.
- Qu, Z., Qing, G., Rabson, A., and Xiao, G. (2004). Tax deregulation of NF-kappaB2 p100 processing involves both beta-TrCP-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 279(43), 44563-72.
- Redpath, S., Ghazal, P., and Gascoigne, N. R. (2001). Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 9(2), 86-92.
- Ron, D., and Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J.* 13(13), 1658-76.
- Rubartelli, A., Poggi, A., Sitia, R., and Zocchi, M. R. (1998). HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol. Today* 19(12), 543-5.
- Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. C., Haddad, E. K., and Sekaly, R. P. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat. Med.* 16(4), 452-9.
- Savignac, M., Badou, A., Moreau, M., Leclerc, C., Guery, J. C., Paulet, P., Druet, P., Ragab-Thomas, J., and Pelletier, L. (2001a). Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *Faseb J.* 15(9), 1577-9.
- Savignac, M., Moreau, M., Leclerc, C., Paulet, P., Druet, P., and Pelletier, L. (2001b). [Calcium-dependent pathways involved in the production of cytokines in lymphocytes]. *J. Soc. Biol.* 195(3), 309-17.
- Scala, G., Ruocco, M. R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I., and Venuta, S. (1994). The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J. Exp. Med.* 179(3), 961-71.
- Self, R. L., Mulholland, P. J., Nath, A., Harris, B. R., and Prendergast, M. A. (2004). The human immunodeficiency virus type-1 transcription factor Tat produces elevations in intracellular Ca<sup>2+</sup> that require function of an N-methyl-D-aspartate receptor polyamine-sensitive site. *Brain Res.* 995(1), 39-45.
- Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M. W., and Martin, M. A. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* 5(2), 204-10.

- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765), 41-5.
- Stylianou, E., Aukrust, P., Kvale, D., Muller, F., and Froland, S. S. (1999). IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 116(1), 115-20.
- Talley, A. K., Dewhurst, S., Perry, S. W., Dollard, S. C., Gummuluru, S., Fine, S. M., New, D., Epstein, L. G., Gendelman, H. E., and Gelbard, H. A. (1995). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol. Cell Biol.* 15(5), 2359-66.
- Tardieu, M., Le Chenadec, J., Persoz, A., Meyer, L., Blanche, S., and Mayaux, M. J. (2000). HIV-1-related encephalopathy in infants compared with children and adults. French Pediatric HIV Infection Study and the SEROCO Group. *Neurology* 54(5), 1089-95.
- Tergaonkar, V., Bottero, V., Ikawa, M., Li, Q., and Verma, I. M. (2003). IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy. *Mol. Cell Biol.* 23(22), 8070-83.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* 30(1), 43-52.
- Vives, E. (2003). Cellular uptake [correction of uptake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J. Mol. Recognit.* 16(5), 265-71.
- Wesselingh, S. L., Power, C., Glass, J. D., Tyor, W. R., McArthur, J. C., Farber, J. M., Griffin, J. W., and Griffin, D. E. (1993). Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann. Neurol.* 33(6), 576-82.
- Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375(6531), 497-500.
- Williams, D. S., Liu, X., Schlamp, C. L., Ondek, B., Jaken, S., and Newton, A. C. (1997). Characterization of protein kinase C in photoreceptor outer segments. *J. Neurochem.* 69(4), 1693-702.
- Wright, S. C., Jewett, A., Mitsuyasu, R., and Bonavida, B. (1988). Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients. *J. Immunol.* 141(1), 99-104.
- Wu, Y., and Marsh, J. W. (2003). Gene transcription in HIV infection. *Microbes Infect* 5(11), 1023-7.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* 7(2), 401-9.
- Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423(6940), 655-9.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93(7), 1231-40.
- Zocchi, M. R., Rubartelli, A., Morgavi, P., and Poggi, A. (1998). HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J. Immunol.* 161(6), 2938-43.