

MÉLISSA SIROIS

**INTERACTIONS VIH-HÔTE :  
Modulation de l'expression de facteurs cellulaires**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2012

© Mélissa Sirois, 2012

## Résumé

La pathogenèse du VIH-1 reflète les différentes propriétés biologiques du VIH et de la réponse immune des cellules hôtes. L'expression différentielle de ces deux composants majeurs détermine le devenir final d'une infection par le VIH-1: survie à long terme ou le développement du SIDA. L'implication de facteurs autre que le virus lui-même pouvant déterminer l'infection par le VIH et la pathogenèse demeure une importante considération scientifique. Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat ont pour but de mieux comprendre l'implication des facteurs cellulaires lors d'une infection par le VIH-1 des cellules T CD4+ et des macrophages. Dans ce dessein, mon projet de doctorat a ciblé deux caractéristiques de la pathogenèse du VIH : la présence préférentielle de R5 en début d'infection et l'implication de la réponse IFN lors d'une infection des macrophages par le VIH-1.

L'objectif premier consistait à identifier les voies cellulaires modulées lors d'une infection des cellules T CD4+ par le virus X4 et le virus R5. Les résultats obtenus démontrent une plus grande habilité de la souche R5 à moduler des gènes cellulaires que la souche X4. La liaison des virus aux cellules T CD4+ non-stimulées induit des événements de signalisation, comme la signalisation via le RCT et l'organisation de l'actine, qui sont favorables à l'activation des cellules T CD4+. Ce phénomène pourrait expliquer en partie pourquoi R5 est la principale souche observée tôt dans le processus naturel d'une infection. Le deuxième objectif consistait à identifier les facteurs de la réponse IFN modulés par le VIH chez les macrophages. TRAF6 a été identifié comme un facteur cellulaire de la réponse IFN ayant une propriété antivirale, tandis qu'IRF7 contribue positivement à la réplication du VIH-1. Plus précisément, la présence d'IRF7 active la transcription de CARM1 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 et celui-ci semblerait augmenter la transcription du virus.



## Abstract

HIV pathogenesis reflects the various biologic properties of HIV and the host's immune response to the virus. The differential expression of these two major components of HIV infection determines the final outcome: long-term survival or development of AIDS. Whether factors other than HIV itself determine HIV infection and pathogenesis has been an important question. The main objectives of this doctoral thesis consisted of the understanding of cellular factors collaborating in the HIV life cycle. To this purpose, two features of HIV pathogenesis were examined: 1- the presence of the R5 strains at the early stage of infection and 2- modulation of the IFN response in HIV-1 infection of macrophages.

The principal goal was to identify cellular pathways that could provide a rationale for the preferred replication of R5 viruses after viral replication. We provide evidence that R5 viruses modulate, to a greater extent than X4 viruses, the gene expression of the CD4<sup>+</sup> T cells. Indeed, modulation of the TCR signaling and the actin organization appeared associated with R5-exposition. The data suggest that the ability for R5 viruses to modulate the TCR-mediated actin polymerization and signaling create a favorable environment for CD4<sup>+</sup> T cell activation after TCR stimulation and may partly explain why R5 is the primary strain observed early in the natural infection process. The second aim was to identify factors belonging to the IFN pathway that could be modulated by HIV-1 and contribute to the modulation of viral replication. Our results imply a potential role of TRAF6 in the antiviral immunity against HIV-1 and point to a positive contribution of IRF7 in the process of HIV-1 infection of primary macrophages. Furthermore, the presence of IRF7 favors the transcriptional activation of the gene CARM1. CARM1 seems to contribute to increased viral output.

## Avant-propos

Je tiens à remercier en premier lieu Jacques pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et conseillée dans la réalisation de mon travail de doctorat, tout en me laissant une grande liberté. Je remercie également tous les membres de l'équipe pour leur sympathie et leur aide scientifique ou non : Lynda Robitaille, Frédéric Raymond, Thibault Varin, Sébastien Boisvert, Marc-André Nolin, Miguel Retamal et Robin Allary.

Je tiens également à remercier deux anciennes collègues de travail et surtout amies, Jessyka Fortin et Nancy Boucher, sans qui mon doctorat ne serait pas ce qu'il est. Merci les filles d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons moments de mon doctorat comme dans les moments difficiles!

Merci à mes parents pour leur incroyable et indéfectible soutien durant tous ces moments. Sans leur appui et leurs encouragements, je ne serais sûrement pas rendue au point où j'en suis. Je vous aime énormément.

Merci à mes deux sœurs chéries, Marie-Pierre et Andréane, pour leur soutien inconditionnel et pour tous les agréables moments passés ensemble. Vous êtes si précieuses pour moi!

Finalement, je veux remercier par-dessus tout l'homme de ma vie, Yan Sergerie. C'est grâce à son amour, sa compréhension, ses conseils et son appui que j'ai réussi à passer au travers les moments les plus difficiles. Cet être si merveilleux rempli ma vie d'inoubliables moments et je sais que bien d'autres nous attendent... À Arnaud, mon petit coco, qui m'a donné l'énergie et la motivation de faire les derniers miles. Je suis une maman comblée. Je vous aime plus que tout au monde!

*À ma famille, mon amour et mon bébé, vous  
êtes la force qui me permet d'accomplir de  
grandes choses.*

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	x
Mot d'introduction.....	xv
CHAPITRE I- LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE .....	16
1.1- L'ÉPIDÉMIE DU SIDA.....	16
1.1-1. Épidémiologie.....	16
1.1-2. Découverte du virus.....	17
1.1-3. Origines du VIH .....	18
1.2- LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE.....	18
1.2-1. Classification .....	18
1.2-2. Morphologie de la particule virale .....	20
1.2-3. Architecture génomique .....	21
1.3- LE TROPISME .....	24
1.3-1. Récepteurs et corécepteurs cellulaires.....	24
1.3-2. Sous-types cellulaires susceptibles à l'infection par le VIH .....	26
1.4- LE CYCLE VIRAL .....	36
1.4-1. Attachement.....	37
1.4-2. Entrée.....	38
1.4-3. Transcriptase inverse .....	39
1.4-4. Intégration.....	41
1.4-5. Assemblage.....	42
1.4-6. Maturation .....	43
1.5- LA TRANSMISSION ET LA PATHOGENÈSE DU VIH .....	43
1.5-1. Transmission du VIH .....	43
1.5-2. Pathogenèse virale.....	44
1.6- L'IMMUNOLOGIE DU VIH .....	47
1.6-1. Immunité innée .....	47
1.6-2. Immunité humorale .....	49
1.6-3. Réponse immune des cellules T .....	50
1.7- LES TRAITEMENTS .....	51
1.7-1. Agents antirétroviraux .....	52
1.7-2. Effets secondaires .....	54
1.7-3. Immunothérapie.....	54
1.7-4. Développement de vaccins .....	55
CHAPITRE II- SOUCHES VIRALES.....	58
2.1- CORÉCEPTEURS .....	58
2.1-1. CXCR4 .....	58
2.1-2. CCR5 .....	58



2.1-3. Signalisation des récepteurs de chimiokine.....	59
2.2- CARACTÉRISTIQUES.....	62
2.2-1. Diversité des virus lors de la transmission et infection.....	62
2.3- Activation des lymphocytes T CD4+ et réplication différentielle des virus X4 et R5.....	64
CHAPITRE III- DÉFENSES CELLULAIRES ANTIVIRALES.....	67
3.1- INTERFÉRONS.....	67
3.1-1. IFNs de type I.....	67
3.1-2. IFNs de type II.....	68
3.1-3. IFNs de type III.....	68
3.2- FACTEURS DE RÉGULATION DES INTERFÉRONS.....	69
3.2-1. Famille des IRFs et leur structure.....	69
3.3- PRODUCTION DES INTERFÉRONS.....	73
3.3-1. Induction du gène <i>Ifn</i> .....	73
3.4- RÉPONSES AUX INTERFÉRONS.....	79
3.4-1. Voie de signalisation induite par les IFNs.....	79
3.5- VIH.....	81
3.5-1. IFNs et VIH.....	81
3.5-2. IRFs et VIH.....	84
CHAPITRE IV- HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	87
4.1- Hypothèses recherche.....	87
4.2- Objectifs de recherche.....	88
4.3- Aperçu des résultats.....	89
CHAPITRE V- Modulation différentielle de l'expression génique des cellules T CD4+ naïves par les virus X4 et R5.....	90
5.1- Résumé.....	90
5.2- Article.....	91
CHAPITRE VI- TRAF6 et IRF7 module la réplication du VIH-1 dans les macrophages..... I	
6.1- Résumé.....	125
6.2- Article.....	175
CHAPITRE VII- Activation transcriptionnelle de CARM1 par IRF7 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1.....	175
7.1- Résumé.....	175
7.2- Rationnelle.....	176
7.3- Matériel et Méthodes.....	176
CHAPITRE VIII- DISCUSSION GÉNÉRALE.....	186
8.1- La modulation de facteurs cellulaires par les souches X4 et R5 lors d'une infection des lymphocytes T CD4+.....	188
8.1-1. Modulation des gènes associés à l'activation des cellules T par la souche R5.....	188
8.1-2. Réorganisation du cytosquelette d'actine.....	189
8.2- La modulation de facteur cellulaire par le VIH-1 lors d'une infection des macrophages.....	191
8.2-1. Utilisation de l'IFN $\alpha$ 2 et immunité innée.....	191
8.2-2. TRAF6 est un facteur important dans la réponse antivirale induite par les IFNs.....	191

8.2-3. IRF7 contribue positivement à la réplication virale .....	192
8.2-4. IRF7 ne lie pas directement le LTR du VIH-1 .....	193
8.2-5. IRF7 favorise l'activation transcriptionnelle de CARM1 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 .....	194
8.2-6. CARM1 favorise la réplication dans les macrophages.....	195
8.3- PERSPECTIVES .....	196
8.3-1. Rôle des corécepteurs .....	197
8.3-2. Protéines impliquées dans la modulation de TRAF6 .....	198
8.3-3. Complexe de transcription impliquant IRF7 .....	198
8.3-4. CARM1 .....	199
CHAPITRE IX- CONCLUSION GÉNÉRALE .....	201
BIBLIOGRAPHIE.....	202

## Liste des tableaux

Tableau 1. Distribution inégale du VIH à travers le monde. ....	20
Tableau 2. Rôles des protéines régulatrices et accessoires du VIH-1. ....	23
Tableau 3. Caractéristiques des isolats X4 et R5 du VIH. ....	26
Tableau 4. Les approches vaccinales contre le VIH . ....	55

## Liste des figures

<b>Figure 1. La prévalence mondiale du VIH en 2009. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 2. La structure du VIH. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 3. Organisation du génome du VIH-1. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 4. Génération des lymphocytes T CD4+ mémoires centrales et effectrices. ....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 5. Cycle du VIH-1 dans le lymphocyte T CD4+. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 6. Attachement et fusion du VIH à la cellule hôte. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 7. Pathogenèse du VIH-1. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 8 Les classes de médicaments antirétroviraux et leurs sites d'action ....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 9. Voies de signalisation des récepteurs de chimiokine. ....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 10. Structure des différents IRFs humains. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 11. Voies des PRRs cytosoliques. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 12. Principales voies de signalisation des TLR. ....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 13. Voie de signalisation JAK/STAT. ....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 14. Facteurs de restriction du VIH-1. ....</b>	<b>82</b>



## Liste des abréviations

$\alpha$	Alpha
ABI	<i>Abelson-Interactor</i>
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNvdb	ADN viral double brin
APOBEC	<i>Apolipoprotein B Editing Complex Catalytic Subunit</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN POL II	ARN polymérase II
ARNm	ARN messenger
ARP2/3	<i>Actin-Related Protein 2/3</i>
AZT	Azidothymidine
$\beta$	Bêta
BST-2	<i>Bone marrow Stromal Antigen 2</i>
CA	Capside
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CARM1	<i>Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1</i>
CD	Cellule dendritique
CDK9	<i>Cyclin-Dependant Kinase 9</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPI	Complexe de pré-intégration
CRM1	<i>Chromosome Maintenance Region 1</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
DAG	Diacylglycérol
DAI	<i>Double-stranded RNA Activated Inhibitor</i>
DBD	<i>DNA binding Domain</i>
DExD/H	<i>DEAD box</i>
$\epsilon$	Epsilon

EBV	Virus Epstein-Barr
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
ESCRT-1	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FADD	<i>FAS-associated via Death Domain</i>
gp	Glycoprotéine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanosine triphosphatase
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HMG1(Y)	<i>High Mobility Group Protein</i>
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i>
IFN	Interférons
IFNAR	<i>IFN<math>\alpha/\beta</math> Receptor</i>
I $\kappa$ B	Inhibiteur kappa-B
IKK	<i>I-kappa B Kinase</i>
IL	Interleukine
IN	Intégrase
INNTI	Inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IP	Inhibiteur de protéase
IP3	Inositol triphosphate
IRAK1	<i>IL-1 Receptor-Associated kinase 1</i>
IRF	<i>IFN Regulatory Factor</i>
ISG	<i>IFN Stimulated Gene</i>
ISGF3	<i>IFN-Stimulated Gene Factor 3</i>
ISRE	<i>Interferon Stimulated Response Element)</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
$\kappa$	Kappa
$\lambda$	Lambda
LMP1	<i>Latent Membrane protein-1</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>

MA	Matrice
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP2	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-2</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Gene 5</i>
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
Mx	Myxovirus
MYD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene</i>
NC	Nucléocapside
NEMO	<i>NFκB Essential Modulator</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	Natural Killer
NKT	NK T cells
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NRE	<i>Negative Regulatory Element</i>
NTF2	<i>Nuclear Transport Factor 2</i>
OAS	Oligoadénylates synthétases
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PI	Particule infectieuse
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase R
PLC	Phospholipase C
PR	Protéase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>

PYK2	<i>Proline-rich Tyrosine Kinase 2</i>
RAN	<i>RAS-related Nuclear Protein</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RCT	Récepteur Cellule T
RIG-I	<i>Retinoicacid Inducible Gene I</i>
RLH	<i>Retinoicacid Inducible Gene I (RIG-I)-like helicase</i>
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
SIDA	Syndrome immunodéficience acquise
SLN	Signaux de localisation nucléaire
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SUMO	<i>Small-Ubiquitin-like Modifier</i>
SV	Synapse Virologique
$\tau$	Tau
TAK1	<i>TGF-beta Activated Kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF-family-member-associated NF<math>\kappa</math>B activator</i>
TAR	<i>Tat-Activation-Response element</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TI	Transcriptase inverse
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
Tmc	Cellule T mémoire centrale
Tme	Cellule T mémoire effectrice
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRIF	<i>TIR Domain Adaptor protein</i>
TRIM5 $\alpha$	<i>Tripartite motif TRIM protein-<math>\alpha</math></i>
TSG101	<i>Tumor Susceptibility Gene 101</i>
TYK2	Tyrosine kinase 2



VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VISA	<i>Virus-Induced Signaling Adaptor</i>
VLP	Virus-like Particle
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
ω	Oméga
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE2	<i>WASP family Verprolin-homologous protein 2)</i>

## Mot d'introduction

Ces dernières années, l'interaction du VIH-1 avec les cellules de l'hôte a fait l'objet de plusieurs études. Parmi celles-ci, l'étude de la réplication préférentielle du virus R5 comparativement au virus X4 à la suite de la transmission du virus intéresse plusieurs équipes de recherche. En effet, différentes observations ont montré que le virus R5 requiert des conditions moins stringentes d'activation des lymphocytes T CD4+ que le virus X4, en plus de leur habilité à se répliquer dans les macrophages. D'autres équipes s'intéressent à l'identification de facteurs ayant un effet sur la réplication virale. Il est connu que les IFNs de type I induisent des facteurs antiviraux en réponse à une infection. Cependant, le VIH-1 réussit à contourner partiellement cette réponse en détournant la modulation de la réponse IFN à son avantage.

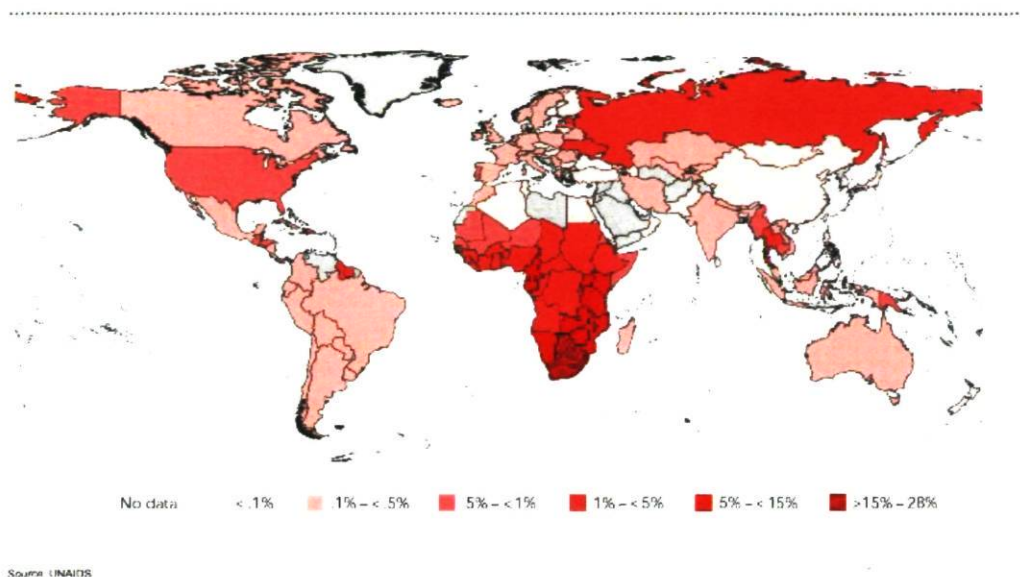
Les projets de cette thèse de doctorat ont été entrepris sur la base de l'ensemble de ces travaux afin d'identifier les facteurs cellulaires modulés par le VIH-1 dans les deux situations présentées ci-haut soit la réplication préférentielle du virus R5 en début d'infection et la modulation de la réponse IFN par le VIH-1. Le premier chapitre porte sur les caractéristiques générales du VIH alors que le second décrit les différences entre les deux souches virales X4 et R5 et que le troisième présente la réponse IFN. Les objectifs de recherche sont énoncés au chapitre IV. Les chapitres V à VII contiennent des résultats scientifiques obtenus dans le cadre de mon doctorat. Pour terminer, le chapitre VIII fait part d'une discussion générale entourant ce projet de doctorat ainsi que les perspectives futures en lien avec les résultats obtenus jusqu'à ce jour alors que le chapitre IX termine sur une conclusion générale.

# **CHAPITRE I- LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE**

## **1.1- L'ÉPIDÉMIE DU SIDA**

### **1.1-1. Épidémiologie**

À l'échelle mondiale, on estime à 33,3 millions le nombre de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 2009[1]. La figure 1 donne un aperçu mondial des infections par le VIH en 2009. L'Afrique subsaharienne est la région la plus durement touchée par le VIH. Elle représente 67% du total des personnes vivant avec le VIH et 72% des décès dus au syndrome immunodéficience acquise (SIDA) en 2010 [1]. Grâce à la prise des antirétroviraux, le nombre annuel de nouvelles infections diminue légèrement depuis la fin des années 90 [1]. Cependant, le SIDA demeure un fléau considérable surtout dans les pays émergents.



**Figure 1. La prévalence mondiale du VIH en 2009.** (Adaptée de [1])

## 1.1-2. Découverte du virus

Les premiers cas de SIDA ont été décrits aux États-Unis en 1981. À cette époque, le terme SIDA n'était pas encore utilisé pour décrire le nouveau syndrome d'immunodéficience inexplicable. Il portait plusieurs noms, comme le « gay syndrome », puisqu'il fut initialement identifié chez des homosexuels. Suivant la première description de cette maladie, plusieurs recherches ont été entreprises sur le plan mondial. En 1983, Barré-Sinoussi et ses collègues de l'Institut Pasteur ont découvert la première indication que le SIDA pourrait être causé par un rétrovirus [2]. En effet, ils ont isolé un virus contenant une activité de transcriptase inverse (TI) d'un patient atteint d'une lymphadénopathie persistente et généralisée. Par la



suite, Gallo et ses collègues ont caractérisé un autre rétrovirus humain qu'ils ont nommé HTLV-III (en anglais, *Human T-lymphotropic virus*) [3-6]. Dans la même période de temps, Levy et ses collègues reportaient l'identification d'un rétrovirus qu'ils ont nommé virus associé au SIDA [7]. C'est en 1986, que le comité international de la taxonomie des virus ont recommandé de nommer le virus du SIDA, le VIH [8]. Finalement, la découverte du VIH a été reconnue à l'équipe française et le prix Nobel de médecine leur a été attribué en 2008.

### **1.1-3. Origines du VIH**

L'origine de l'émergence du VIH dans la population ainsi que sa répartition en différents groupes et clades ne sont pas encore clairement définies. Plusieurs investigateurs proposent que le VIH-1 a émergé dans la population humaine à partir des singes, il y a 30 à 100 ans [9-12]. Des analyses similaires ont permis de découvrir la première souche du sous-type B aux États-Unis autour de 1967 [9, 13] et du sous-type C en Afrique au milieu des années 1960 [14].

## **1.2- LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE**

### **1.2-1. Classification**

#### **1.2-1.1. La sous-famille des *lentivirinae***

Le VIH est membre du genre des lentivirus dans la famille des *Retroviridae*. Les rétrovirus ont la caractéristique de transcrire leur génome d'acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique (ADN) à l'intérieur de la cellule par la TI. Les rétrovirus se subdivisent en trois sous-familles : les lentivirinae, les oncovirinae et les spumavirinae. Les lentivirus contiennent plusieurs membres chez les animaux et les humains. Ces virus sont

exogènes, non-oncogènes et infectent principalement les cellules du système immunitaire. Par conséquent, les infections lentivirales provoquent des immunodéficiences sur des périodes relativement longues. Par ailleurs, cette sous-famille a la capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas et/ou en différenciation terminale. Le génome des lentivirus contient tous les gènes nécessaires à l'expression des protéines virales. De plus, les lentivirus peuvent établir un état de latence dans les cellules infectées en réduisant l'expression des protéines virales. Cet état peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus.

#### 1.2-1.2. Les groupes et clades de VIH

Il existe deux types de VIH, soit les types 1 et 2. Ils se différencient par l'organisation de leur génome, leur origine géographique et leur lien de parenté avec le virus de l'immunodéficience simienne. Le VIH-1 serait originaire du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* [15] et le VIH-2 origine de du singe *Cercocebus torquatus* [16]. Le VIH-1 est divisé en trois groupes selon l'analyse des séquences génomiques : les groupes M, O et N. Le plus répandu à travers le monde, le groupe M, se divisent en 9 clades (ou sous-types) désignés A à D, F à H, J et K [17, 18]. Le sous-type B se retrouve majoritairement en Amérique, en Europe, en Asie et en Australie, alors que les clades A, C, D et E se retrouvent principalement en Afrique. Par contre, il y a de plus en plus de sous-types non B retrouvés en Amérique. Le VIH-2 est quant à lui, divisé en 8 groupes (A à H) [19]. La distribution de chaque groupe de VIH-1 et VIH-2 à travers le monde est présentée dans le tableau 1.

**Tableau 1. Distribution inégale du VIH à travers le monde en 2005.** (Adapté de [20]).

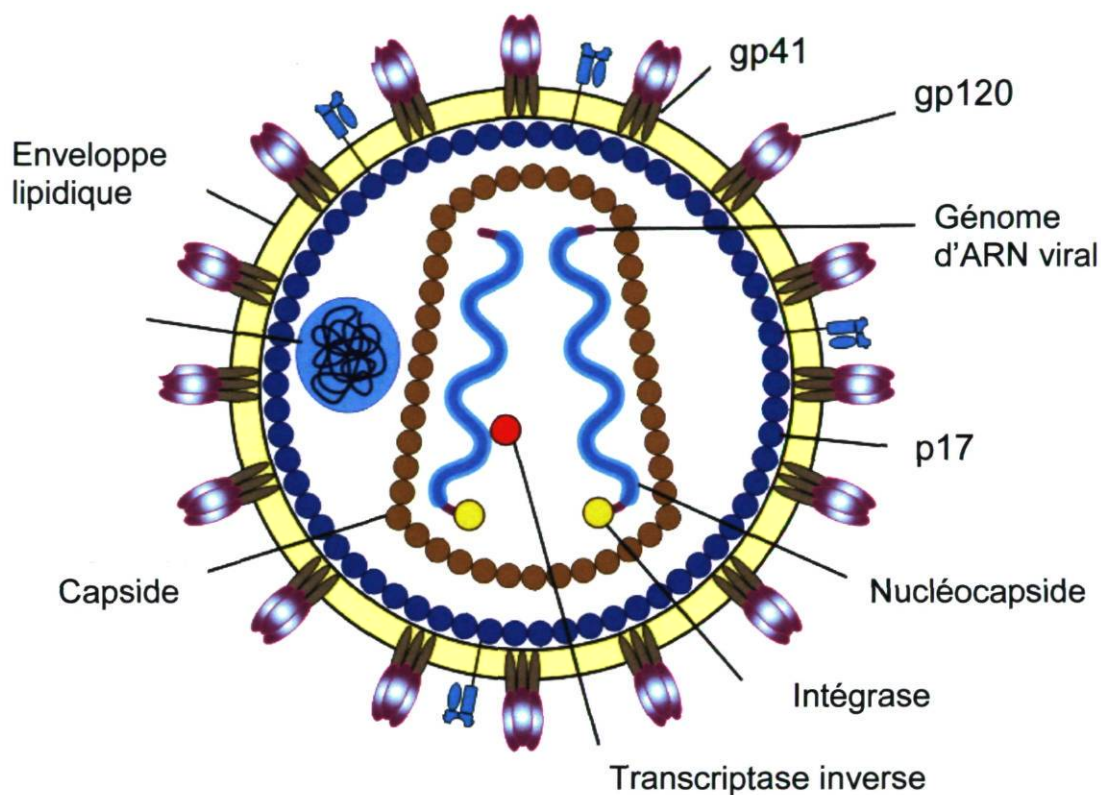
Groupe ou sous-type de VIH	No. d'infections (% total)
<b>VIH-1</b>	
Groupe M	45, 000,000 (99,6)
Groupe N	6 (0,000013)
Groupe O	100,000 (0,22)
<b>VIH-2</b>	
Groupe A	50,000 (0,11)
Groupe B	25,000 (0,06)
Groupe C	1 (0,0000002)
Groupe D	1 (0,0000002)
Groupe E	1 (0,0000002)
Groupe F	1 (0,0000002)
Groupe G	1 (0,0000002)
Groupe H	1 (0,0000002)

### 1.2-2. Morphologie de la particule virale

Le VIH a un aspect sphérique de diamètre variant de 80 à 120 nanomètres [21]. Les virus infectieux contiennent une enveloppe et trois protéines de structure Gag : la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24) et la nucléocapside (NC, p7) [22]. MA forme une coquille à l'intérieur de l'enveloppe de la particule, CA, de forme conique, entoure l'ARN génomique viral et NC interagit avec l'ARN viral à l'intérieur de CA (figure 2). L'enveloppe virale est recouverte de deux types de glycoprotéines (gp) : la gp41 et la gp120. Le génome du VIH,



contenu dans NC, est constitué d'un simple brin d'ARN d'environ 9,6 kb en double exemplaire accompagné d'enzymes : la TI, (p66/51) qui transcrit l'ARN virale en ADN, l'intégrase (IN, p32) qui intègre l'ADN viral à l'ADN cellulaire et la protéase (PR, p10) qui participe à l'assemblage et à la maturation du virus.

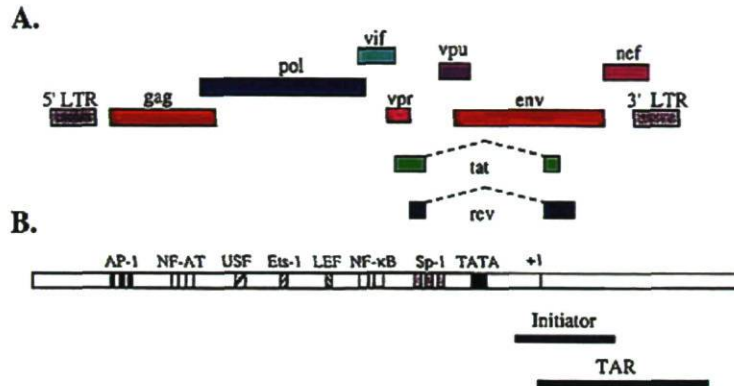


**Figure 2. La structure du VIH.** (Adaptée de <http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.gif>).

### 1.2-3. Architecture génomique

Le génome du VIH-1 se compose de trois gènes principaux : *gag*, *pol* et *env* qui définissent la structure du virus (figure 3). Le produit de ces gènes se retrouve sous la forme de précurseurs (polyprotéines). Le gène *gag* est traduit en précurseur Gag (Pr55), qui va se cliver en quatre protéines : CA, MA, NC et p6. Le précurseur Pol est autoclivé pour

produire les enzymes virales : TI, IN et Pr. Finalement, le gène *env* produit les protéines de l'enveloppe : la glycoprotéine de surface gp120 et la protéine transmembranaire gp41 issue du clivage du précurseur Env (gp160).



**Figure 3. Organisation du génome du VIH-1.**

(<http://www.bioscience.org/1997/v2/d/gottfred/3.htm>)

Diverses protéines régulatrices et accessoires sont générées à la suite de plusieurs événements d'épissage. Parmi celles-ci on retrouve Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpu et Vif. Leurs fonctions affectent la réplication virale de différentes manières et sont résumées dans le tableau 2.



**Tableau 2. Rôles des protéines régulatrices et accessoires du VIH-1.** (Adapté de [23])

PROTÉINES	FONCTIONS
Tat	Régulateur positif de la transcription
Rev	Exportation des transcrits non épissés hors du noyau
Nef	Pléiotropique, essentielle à la réplication virale
Vpr	Aide à la réplication virale; transactivation et maintien le cycle cellulaire en phase G2
Vpu	Aide à la libération du virus; dissocie les complexes gp160 :CD4
Vif	Augmente l'infectivité virale et la transmission cellule à cellule; aide à la synthèse de l'ADN proviral et/ou dans l'assemblage du virion

Deux séquences promotrices répétées, appelées longues répétitions terminales (*Long Terminal Repeat* ou LTR) bordent les extrémités du génome viral. Ces séquences contiennent plusieurs sites actifs reconnus par la protéine virale Tat et divers facteurs de transcription cellulaires. Trois régions nommées U3, R (site d'initiation) et U5 composent le LTR [24] (figure 3). Elles contiennent quatre domaines fonctionnels responsables de la transcription du VIH-1 : la région d'activation de la transcription (*Tat-Activation-Response element* ou TAR) se situant en aval du site d'initiation, la région promotrice contenant la boîte TATA, la région amplificatrice et la région modulatrice. Cette dernière contient une région de régulation négative (*Negative Regulatory Element* ou NRE) contrôlant négativement la transcription virale [25]. Ces régions contiennent divers sites consensus de liaison à certains facteurs de transcription cellulaire. L'activation de ces facteurs de transcription influence la transcription du VIH-1.

## 1.3- LE TROPISME

### 1.3-1. Récepteurs et corécepteurs cellulaires

#### 1.3-1.1 CD4

Une des premières découvertes dans l'étude du VIH a été la caractérisation de son principal récepteur cellulaire, la molécule CD4 [26-30]. Cette protéine de 51 kilodalton (kDa) fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Elle contient quatre domaines immunoglobulines dans sa partie extracellulaire. Les domaines D1 et D3 ressemblent aux domaines variables des immunoglobulines et les domaines D2 et D4 ressemblent aux domaines constants des immunoglobulines. CD4 possède également un court domaine intracellulaire qui contient une séquence permettant l'interaction avec la protéine tyrosine kinase p56<sup>Lck</sup> [31]. Le VIH s'attache à CD4 grâce à ses trimères de gp120. Chacun des monomères de la gp120 contient un site de liaison pour le CD4 [32]. Les domaines D1 et D2 sont impliqués dans la liaison du CD4 à la gp120 [33-35]. Cette protéine est exprimée à la surface des lymphocytes T CD4+, des cellules T régulatrices (Treg), des monocytes, des macrophages et de certaines cellules dendritiques (CDs). Le CD4 est connu pour stabiliser les interactions entre le récepteur des cellules T (RCT) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II lors d'une présentation antigénique.

#### 1.3-1.2. Les corécepteurs

Plusieurs évidences quant à l'insuffisance de l'unique liaison du CD4 pour l'entrée virale ont mené à la découverte de la participation de récepteurs de chimiokine, comme site d'attachement cellulaire secondaire. Bien que d'autres corécepteurs soient connus,

notamment le CCR2b, le CCR3, le CCR8, le CXCR1 et le CXCL16, le CCR5 et le CXCR4 sont les deux principaux corécepteurs permettant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire [36-41].

Les récepteurs de chimiokine sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées aux petites protéines G. Leurs principales fonctions consistent à lier des chimiokines et déclencher une cascade de signalisation menant à la migration des cellules au site inflammatoire où les chimiokines sont sécrétées. Le ligand naturel de CXCR4 est SDF-1 (en anglais, *Stromal cell-Derived Factor 1*), alors que CCR5 lie RANTES, MIP-1 $\alpha/\beta$  et MCP2 (en anglais, *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*, *Macrophage Inflammatory Protein-1* et *Monocyte Chemoattractant Protein-2*, respectivement).

La liaison de la gp120 aux corécepteurs se fait en grande partie par des charges électrostatiques puisque la gp120 est chargée positivement et que les récepteurs de chimiokine portent des charges négatives [42-44].

À la même époque de la découverte des corécepteurs, plusieurs résultats expérimentaux suggéraient l'existence de deux souches virales différentes : une souche de type lymphocytaire T et l'autre macrophagique. Il a été démontré que l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre des corécepteurs détermine le tropisme des souches virales du VIH-1 (X4, R5, X4/R5). Les souches X4 infectent les cellules exprimant le CXCR4 (cellules T CD4+ naïves, mémoires centrales (T<sub>mc</sub>) et mémoires effectrices (T<sub>me</sub>)). Les souches R5 infectent préférentiellement les cellules exprimant le CCR5 (macrophages, CD8, cellules T CD4+ activées). Les souches X4/R5 n'ont aucune préférence et infectent les cellules exprimant l'un ou l'autre des corécepteurs. Les caractéristiques des différentes souches du VIH-1 sont présentées dans le tableau 3. Par ailleurs, 2 ou 3 changements dans la boucle V3 de la gp120 du virus changent un virus R5 en un virus X4. Les souches du VIH-1 étant en partie sujet de cette thèse, elles seront traitées en de plus amples détails dans le chapitre II.



**Tableau 3. Caractéristiques des isolats X4 et R5 du VIH.** (Adapté de [23])

Caractéristique	<u>Associé à</u>	
	R5	X4
Utilisation du récepteur CD4	++	++
Utilisation du corécepteur	CCR5	CXCR4
Croissance dans les macrophages	++	±
Croissance dans les lignées de cellules T	-	++
Effet cytopathique	-	++
Perte substantielle des cellules T CD4+	-	++
Maladie du système nerveux central	++	-

### 1.3-2. Sous-types cellulaires susceptibles à l'infection par le VIH

Les cellules de Langerhans et les CD8 retrouvées dans le sang, la peau et les muqueuses expriment le CD4, le CCR5 et le CXCR4 et sont susceptibles à l'infection par le VIH. Par leur localisation dans le tractus génital, ces cellules sont considérées comme les cibles initiales lors d'une infection par le VIH. Les premières cellules infectées lors d'une infection par voie intraveineuse sont les cellules T CD4+ retrouvées dans le sang et les ganglions lymphatiques. Subséquemment, les CD8 folliculaires seront une source abondante de particules virales. La transmission par les muqueuses (canal vaginal et anal)

implique les cellules de Langerhans ainsi que les CD8, les macrophages tissulaires et les cellules T CD4+.

### 1.3-2.1. Lymphocytes T CD4+

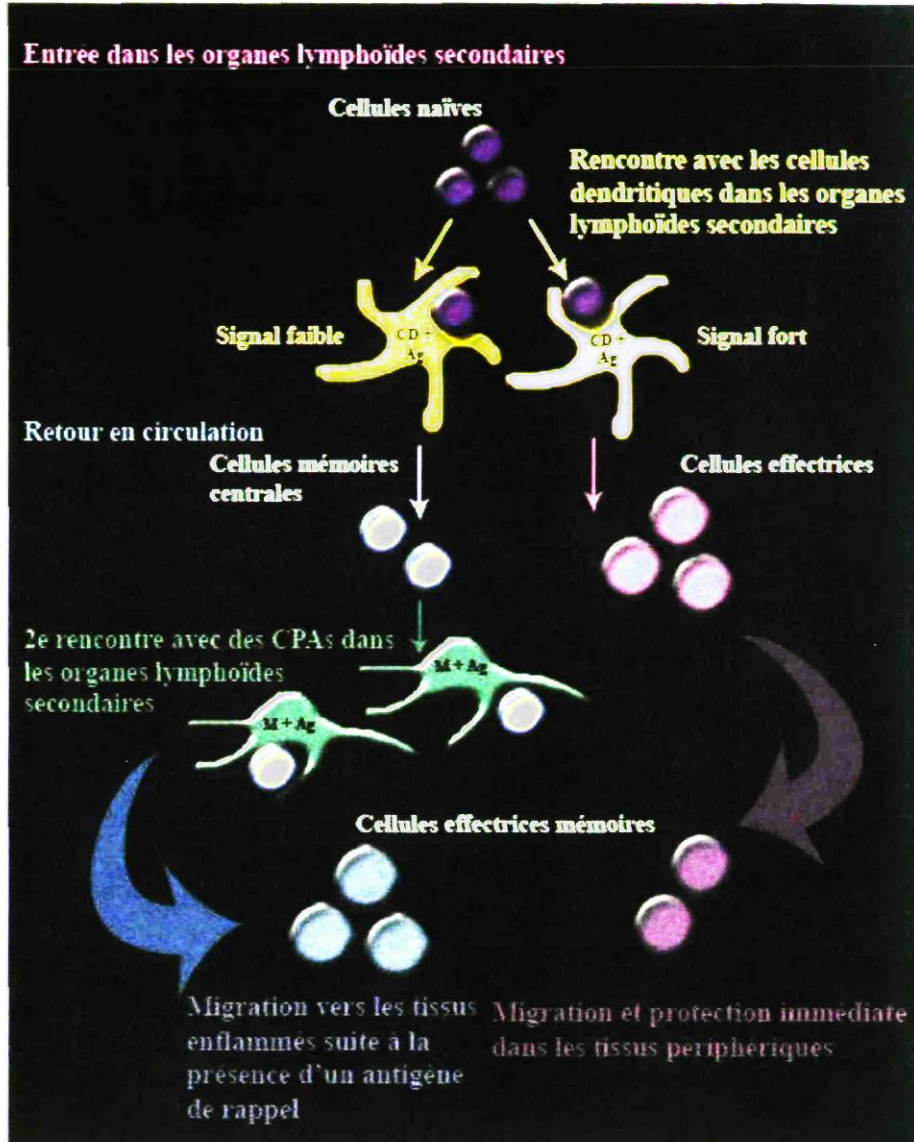
Les principales cellules productrices de VIH-1 sont les lymphocytes T CD4+ et elles sont considérées comme constituant le principal réservoir empêchant l'éradication du virus par les traitements antirétroviraux. Ces cellules expriment des quantités élevées de CD4 et selon leur état d'activation cellulaire, différents niveaux de molécules CXCR4 et CCR5. Issus du thymus, les lymphocytes T CD4+ sont essentiellement des cellules naïves qui n'ont jamais rencontré un antigène. Ils ne se divisent pas ou très peu (état quiescent) et peuvent vivre très longtemps [45]. Les lymphocytes T CD4+ naïfs se distinguent par l'expression de l'isoforme RA de la phosphatase CD45 [46, 47], une protéine participant aux événements de signalisation intracellulaire [48]. De plus, ils expriment des niveaux élevés de CD62L et de CCR7, deux molécules nécessaires au recrutement des cellules naïves dans les ganglions [49-51]. Les lymphocytes T CD4+ naïfs circulent constamment dans les systèmes sanguin et lymphatique. Ce sont dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) que les lymphocytes T CD4+ naïfs entrent en contact avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA), comme les DCs [52]. Ce contact produit des signaux qui engendrent la stimulation des lymphocytes T CD4+. Selon l'intensité du signal et des cytokines présentes, le lymphocyte T CD4+ naïf s'active et se différencie en cellule effectrice ou non effectrice (figure 4) [53-55].

Lors d'un fort signal, les cellules se différencient en cellules effectrices de type TH1, TH2, TH17 ou Treg et activent la réponse immune [56, 57] [53-55]. La distinction de ces types cellulaires se fait par la production différentielle de cytokines et selon les cellules qu'elles activent. L'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs entraîne un changement dans l'expression des récepteurs à la surface de la cellule. En effet, les cellules cessent d'exprimer le CD62L et le CCR7 et expriment d'autres molécules comme le CCR5, le



CCR4 et le CXCR3, des molécules nécessaires à leur entrée dans les tissus non-lymphoïdes [55, 58]. Les cellules effectrices se rendent au site d'inflammation et/ou d'infection où elles sécrètent différentes cytokines servant au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires [52]. La migration des cellules TH1 vers les tissus périphériques entraîne leur différenciation en cellules Tme [54, 55]. D'une autre façon, elles organisent la réponse immune à médiation cellulaire impliquant les cellules cytotoxiques (*Cytotoxic T lymphocytes* ou CTL) ainsi que l'activation des lymphocytes T CD8+ naïfs. Tandis que les cellules TH2 stimulent les lymphocytes B pour qu'elles produisent des anticorps spécifiques [52].

Lorsque le signal est plus faible, le lymphocyte T CD4+ se différencie en cellule non effectrice de type Tmc. Tout comme les cellules naïves, les cellules Tmc n'ont pas de fonction effectrice et continuent de circuler dans le sang et la lymphe jusqu'à ce qu'elles rencontrent pour une deuxième fois un antigène [54]. Ce deuxième signal engendre la prolifération et la différenciation des cellules Tmc en cellules Tme.



**Figure 4. Génération des lymphocytes T CD4+ mémoires centrales et effectrices.**

(Adaptée de[59])

L'infection par le VIH-1 dépend fortement de l'état d'activation des lymphocytes T CD4+. En effet, le VIH-1 entre dans les cellules naïves, mais la transcription inverse et l'intégration y sont peu efficaces puisque ces cellules sont métaboliquement peu actives [60, 61]. Cependant, les Tmc contiennent plus de facteurs cellulaires favorisant la

transcription inverse, l'intégration et la transcription du VIH-1 [62]. Malgré tout, les cellules T activées demeurent la principale cible du virus puisqu'elles expriment le CXCR4 et le CCR5 et contiennent de nombreux facteurs de transcription activés [63]. Les différentes caractéristiques de l'infection des lymphocytes T CD4+ par les souches X4 et R5 sont abordées dans le chapitre II.

### 1.3-2.2. Les macrophages

Les macrophages sont des CPA participant à l'immunité innée ainsi qu'à l'immunité adaptative [52]. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes ainsi que de stimuler les lymphocytes. Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes lorsque ceux-ci infiltrer les tissus. Les monocytes, puis les macrophages sont attirés vers le lieu d'une inflammation par chimiotactisme. Les signaux d'appel sont constitués de différents stimuli, dérivés de cellules endommagées (par nécrose ou apoptose), de pathogènes, et de produits libérés par les cellules présentes au site. La durée de vie d'un macrophage va de plusieurs mois à des années. Comme il s'agit de cellules complètement différenciées, elles ne se divisent pas. Ces cellules expriment à leur surface le CD4, le CXCR4 et le CCR5, ce qui les rend susceptibles à l'infection par le VIH-1 [64-66].

Comme les lymphocytes T CD4+, une variété de facteurs peuvent influencer l'étendue de l'infection des macrophages par les différentes souches. Ces différences sont reliées à la souche virale et la cible virale impliquée : nombre de CD4 et/ou CCR5 exprimé à la surface de la cellule, des souches virales pour CCR5 et/ou un blocage des étapes subséquentes à l'entrée virale [67, 68].

Contrairement aux souches R5 qui se répliquent très bien dans les macrophages, les souches X4 les infectent à un faible niveau en utilisant le CXCR4 à leur surface [66, 68-



70]. Le défaut d'une réplication substantielle des souches X4 chez les macrophages est relié à un délai de la transcription inverse et des étapes subséquentes à l'entrée virale [67]. La production virale peut aussi dépendre de la fonction appropriée des gènes *vpr*, *vpu*, et *nef* [71]. Habituellement, la différenciation des monocytes en macrophages est nécessaire pour une infection productive [72-75]. Les macrophages tissulaires présents dans les poumons, le foie, le placenta et le cerveau, sont également susceptibles à l'infection virale [76-78].

L'infection des macrophages par le VIH-1 altère leurs fonctions et leur profil de sécrétion de cytokines. Contrairement aux lymphocytes T CD4+, les macrophages sont beaucoup plus résistants aux effets cytopathiques du virus et peuvent ainsi constituer des réservoirs viraux à plus long terme et contribuer à l'affaiblissement général du système immunitaire ainsi qu'à la dégénérescence du système nerveux central [79, 80].

### 1.3-2.3. Les autres types cellulaires

#### Cellules dendritiques

Les CD sont des CPA qui jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse immunitaire. Les CD sont largement distribués dans tout le corps. On les retrouve sous forme immature et mature. Lorsqu'elles sont immatures, les CD ont des mécanismes de captation de l'antigène plus développés que les autres CPA. Après la capture de l'antigène, les cellules se différencient en cellules matures et migrent aux organes lymphoïdes secondaires et permettent l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs [52]. Cette présentation antigénique se fait via le CMH-II présent à la surface cellulaire et va mener à l'initiation de la réponse immunitaire spécifique.

Les CD expriment peu de CD4 et de corécepteurs du VIH-1. Il est possible pour le VIH-1 d'infecter les CD, comme les cellules de Langerhans ou les CD myéloïdes provenant

respectivement des muqueuses génitales et du sang [81]. Par contre la fusion du virus à la cellule, n'est pas le procédé qui survient principalement lors d'une infection des CD4 par le VIH-1. En effet, la capture de la particule virale par endocytose est le processus le plus souvent rencontré et est facilitée par le récepteur de lectine de type C (DC-SIGN) et non pas le CD4. Cependant, le virus demeure à la surface de la membrane plasmique et peut être ainsi transféré aux lymphocytes T CD4+ lors de la synapse virologique (SV). Ce type de transfert est appelé infection en *trans* [82-85]. Finalement, les virus issus d'une infection productive des CD4 peuvent également être transférés aux lymphocytes T CD4+ lors des contacts cellule-cellule, on parle alors d'une infection en *cis* [81].

#### Les neutrophiles

Les neutrophiles ont un rôle primordial de phagocytose et participent donc à la réponse immunitaire non spécifique en se présentant les premiers au site d'inflammation [52]. Le VIH-1 n'infecte pas les neutrophiles, mais ceux-ci peuvent lier les différentes souches du VIH-1 et les transférer aux lymphocytes T CD4+ [86].

#### Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ naïfs se différencient en CTL [52]. De façon générale, le VIH-1 infecte très peu ou pas ce type cellulaire. Les lymphocytes T précurseurs peuvent être infectés par l'expression de CD4 à leur surface. Cette susceptibilité à l'infection par le VIH-1 est plus souvent observée chez des lymphocytes T CD4+ CD8+ néonataux. Par ailleurs, des études ont montré l'apparition de souches virales utilisant le CD8 comme récepteur et le CXCR4 comme corécepteur, mais ces résultats doivent être confirmés car



l'infection des cellules T CD8+ par ces virus est bloquée par des anticorps ciblant le CD4 [87, 88].

### Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de l'immunité humorale puisqu'ils ont pour rôle de fabriquer des anticorps. La susceptibilité des lymphocytes B à l'infection par le VIH-1 est controversée. Certaines études indiquent que le VIH-1 entre dans les lymphocytes B, mais que l'ADN n'est pas intégré [89, 90]. Cependant, il a été suggéré qu'une fois opsonisé avec des molécules du complément, le virus attaché aux lymphocytes B peut être transféré aux lymphocytes T CD4+[91].

### Les cellules NK et NKT

Les cellules tueuses naturelles (*Natural Killer cells* ou NK) sont des cellules de l'immunité innée. En fait, ces cellules reconnaissent et détruisent les cellules infectées ou les cellules tumorales indépendamment du CMH. Les cellules NK expriment à la fois le CD4, le CCR5 et le CXCR4, les rendant permissives à l'infection par l'ensemble des souches virales [92, 93] [94].

Le VIH-1 infecte aussi les cellules T NK (*Natural Killer T cells* ou NKT) qui sont un groupe hétérogène de lymphocytes T. Les cellules NKT possèdent des marqueurs de lymphocytes T et de cellules NK. Les NKT expriment un récepteur des cellules T  $\alpha/\beta$  et le CD3, mais également des marqueurs typiquement associés aux cellules NK, comme NK1.1. De façon similaire aux cellules NK, les cellules NKT participent à la réponse innée et anti-tumorale. Seulement les souches R5 les infectent, malgré le fait qu'elles expriment le CD4

ainsi que le CXCR4 et le CCR5 [95-97]. Quoiqu'elles soient permissives à l'infection, les cellules NK et NKT sont surtout impliquées dans la résistance à l'infection. En effet, il y a une corrélation inverse entre la virémie et la suppression de la réplication virale médiée par ces cellules [98].

### Les mastocytes

Les mastocytes sont principalement localisés dans les tissus conjonctifs. Néanmoins, des mastocytes sont également présents dans les muqueuses. Les mastocytes sont des cellules dites inflammatoires qui participent à la réponse innée et acquise. Elles interviennent lors des réactions allergiques et/ou des réponses inflammatoires [99]. Ces cellules se différencient dans les tissus *in situ* à partir de précurseurs circulants. Ces précurseurs expriment les corécepteurs CCR3, CCR5 et CXCR4 ainsi qu'un faible niveau de CD4. Ces cellules peuvent être infectés de manière productive par des virus R5 ou X4/R5 [100, 101]. Considérant que ces précurseurs circulent dans plusieurs tissus et que les mastocytes ont une longue durée de vie, ceux-ci pourraient constituer des réservoirs viraux [101].

### Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales constituent l'épithélium en tapissant les différentes muqueuses et servent de barrières contre les invasions microbiennes. Ces cellules expriment le CXCR4 et le CCR5, mais pas le récepteur CD4 [102, 103]. Par ailleurs, elles expriment des molécules servant à capturer le virus tels que les galactosylcéramides et les héparanes sulfates [104-106]. Les cellules épithéliales localisées dans la prostate, le col de l'utérus et le vagin ne permettent pas la réplication du VIH-1. Toutefois, elles séquestrent le virus et le transfèrent aux lymphocytes T CD4+ [107]. D'autres cellules localisées dans l'intestin, au niveau des plaques de Peyer, internalisent également le virus pour le transférer aux cellules

immunitaires [108]. Finalement, les trophoblastes, les cellules épithéliales du placenta, sont susceptibles à l'infection par le VIH-1.

#### Les cellules adipeuses

Les cellules adipeuses ou adipocytes sont des cellules présentes dans les tissus adipeux, spécialisées dans le stockage de la graisse. Ces cellules ont la particularité d'être les seules cellules non immunitaires qui expriment le récepteur et les corécepteurs du VIH-1. Par ailleurs, il a été démontré que les deux souches du VIH-1 peuvent infecter faiblement les cellules adipeuses [109].

#### Les astrocytes

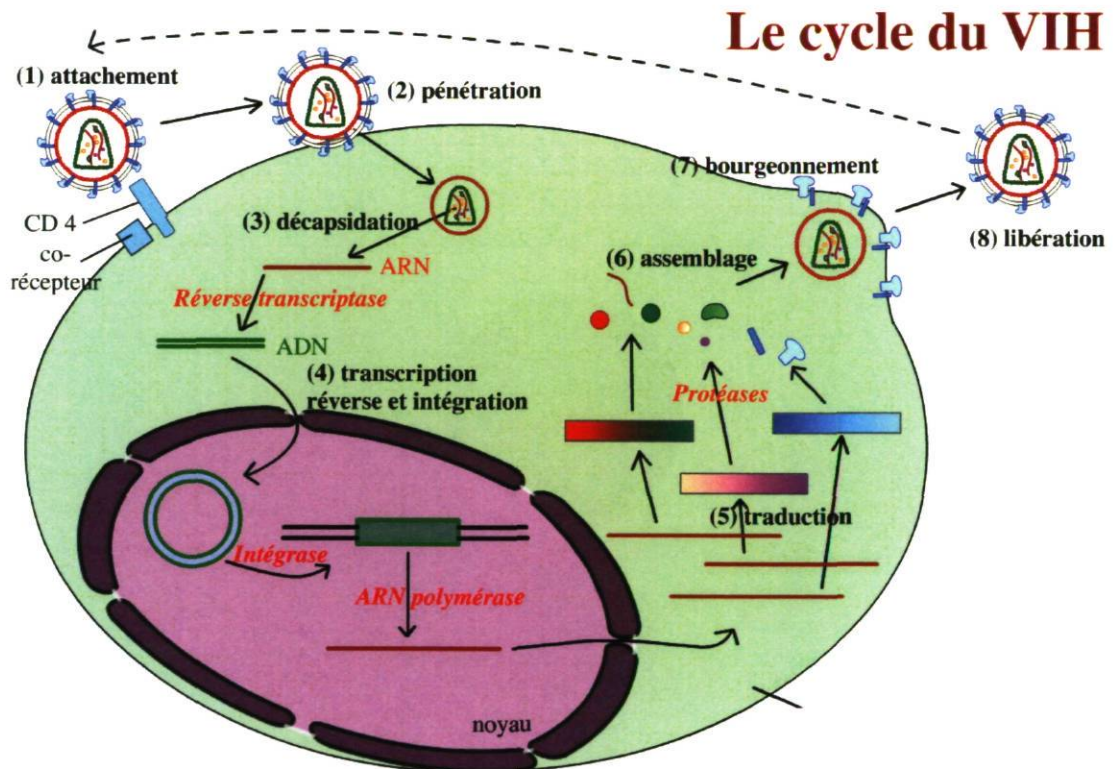
Les astrocytes sont des cellules gliales que l'on retrouve généralement dans le cerveau et plus généralement dans le système nerveux central. Ces cellules jouent un rôle de soutien en permettant de nourrir les neurones, ainsi qu'en collaborant à la communication nerveuse [110-112]. Les astrocytes n'expriment pas le récepteur CD4, mais expriment les récepteurs CXCR4 et le CCR5 [113]. Dernièrement, il a été montré que le récepteur du mannose pourrait servir de récepteur au VIH-1 en dépit du manque de CD4 et que l'ADN viral était intégré dans ces cellules [114].

#### Les microglies

Les microglies sont une population de cellules constituée de macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière formant une défense immunitaire du système nerveux central. Les microglies et les macrophages sont les principales cellules cibles du VIH du point de vue cérébral. Les microglies expriment le CD4 ainsi que le récepteur CCR5 et CCR3 [115].



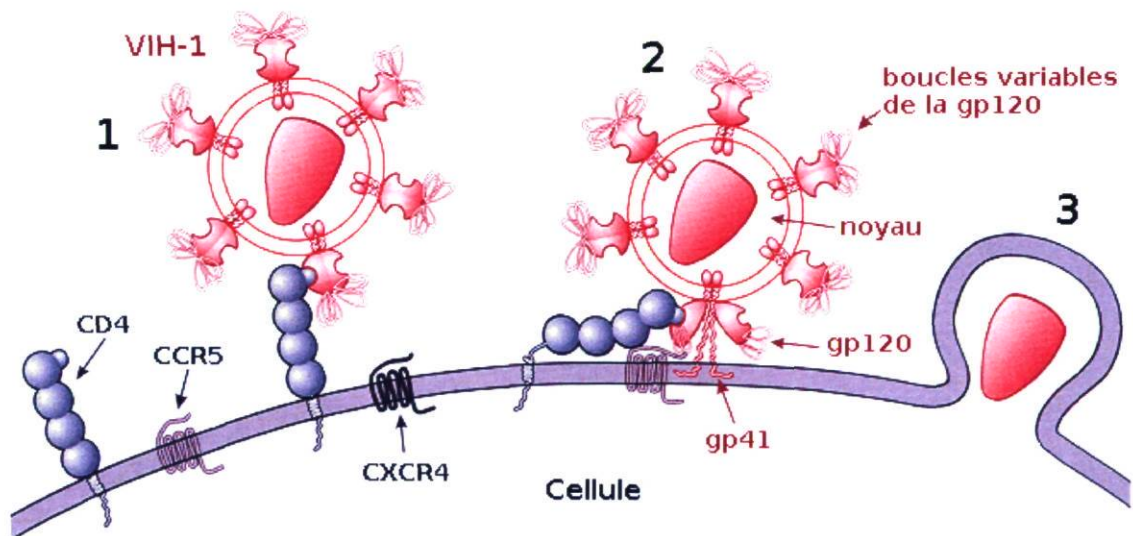
## 1.4- LE CYCLE VIRAL



**Figure 5. Cycle du VIH-1 dans le lymphocyte T CD4+.** (Adaptée de [http://nicolabricot.free.fr/public/lycee/svt/partie-6/Cycle\\_VIH.png](http://nicolabricot.free.fr/public/lycee/svt/partie-6/Cycle_VIH.png))

### 1.4-1. Attachement

L'attachement du virus à la cellule est la première étape menant à l'infection productive du VIH-1. Le virus se fixe à la cible cellulaire par l'interaction spécifique entre les protéines de surface du virus et les récepteurs sur les cellules permissives (figure 6). Plus précisément, des études ont démontré que cette première interaction était principalement régie par des interactions entre la gp120 et des récepteurs cellulaires. L'attachement du trimère de la gp120 au CD4 est la première interaction entraînant un changement important de la conformation de la gp120 [26, 116, 117]. Un mouvement de ses boucles V1 et V2 libère la boucle V3 qui peut alors se lier à un corécepteur [118]. L'interaction entre la gp120 et le corécepteur enclenche un réarrangement de la gp41 nécessaire à la fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique [119-121].



**Figure 6. Attachement et fusion du VIH à la cellule hôte.**

([http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/72/HIV\\_attachment\\_fr.png](http://fr.academic.ru/pictures/frwiki/72/HIV_attachment_fr.png))



Toutefois, d'autres interactions sont également possibles. En effet, puisque l'affinité de la gp120 pour le CD4 est relativement faible, l'attachement de molécules de surface cellulaire à la gp120 du virus, comme les lectines, ou les interactions virus-cellule excluant la gp120, comme la liaison des molécules de l'hôte incorporées dans l'enveloppe du virus et leurs contre-ligands naturels sur les cellules cibles, [122] serviraient à concentrer le virus à la surface d'une cellule cible avant l'engagement du CD4 par le VIH-1. Dans ce contexte, la présence des facteurs d'attachement, augmenterait abondamment l'adhésion du VIH-1 aux cellules.

En résumé, toute interaction permettant une liaison du VIH-1 aux cellules cibles permet également un rapprochement entre la gp120 et le CD4 facilitant ainsi les contacts avec les corécepteurs. L'entrée est l'étape subséquente qui mène à une infection productive [123-125]. L'entrée du virus se fait par fusion ou par endocytose.

## **1.4-2. Entrée**

### **1.4-2.1. Fusion**

Comme mentionné auparavant, l'interaction entre la gp120 et le corécepteur entraîne un changement de conformation au niveau de la gp41, permettant l'insertion de son peptide de fusion, une sous-unité hautement hydrophobe de la protéine, dans la membrane plasmique. Suivant cette première étape, un second réarrangement de la gp41 se produit, menant à la formation d'un complexe à 6 hélices. La formation de ce complexe est critique pour la fusion des bicouches lipidiques du virus et de la cellule [126, 127].

L'étape de fusion dépend également de la disponibilité du récepteur et des corécepteurs. La densité des récepteurs du VIH-1 est augmentée par le biais des radeaux lipidiques. En effet, ce modèle évoque le recrutement du CD4 et des corécepteurs dans une région spécifique de la membrane plasmique. Les radeaux lipidiques sont des structures mobiles à l'intérieur de la membrane plasmique. Ils contiennent des domaines transmembranaires riches en

cholestérol, en sphingolipides et en protéines liées au glycosylphosphatidylinositol [128]. Leur taille et leur composition varient selon les types cellulaires et l'état d'activation des cellules. L'engagement des récepteurs déclenche une cascade de signalisation, menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine et au recrutement de plusieurs protéines de signalisation vers les radeaux lipidiques. Leur participation dans l'entrée virale s'expliquerait donc par la concentration des récepteurs et/ou corécepteurs et par la réorganisation des protéines au niveau de la membrane ce qui faciliterait la fusion virale. Il n'est toutefois pas clair si les corécepteurs du VIH-1 se retrouvent effectivement dans les radeaux lipidiques, ni même si le virus utilise les CD4 qui s'y retrouvent. Finalement, à la suite de la fusion des membranes virales et cellulaires, la capsid virale peut pénétrer à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. La fusion se produit de manière pH indépendante [125] et ne requiert pas l'endocytose du virus [129, 130].

#### 1.4-2.2. Endocytose

L'endocytose est un mécanisme d'internalisation participant à une grande variété de processus cellulaires [131, 132]. Plusieurs études ont démontré que le VIH-1 utilise certaines de ces voies d'entrée pour pénétrer à l'intérieur des cellules, tel que l'endocytose dépendante des puits de clathrines (lymphocytes T CD4+, monocytes, cellules épithéliales) et la macropinocytose (macrophages) [133, 134]. Par ailleurs, en absence de corécepteurs disponibles pour la fusion, les lymphocytes T CD4+ internalisent le VIH-1 [135]. Chez les macrophages, l'entrée du virus se fait principalement par macropinocytose [134]. Le VIH-1 est internalisé de façon non spécifique et indépendante de la gp120 [134].

#### 1.4-3. Transcriptase inverse

Lorsque la capsid se retrouve dans le cytoplasme, sa structure se déstabilise et son contenu est libéré dans l'environnement intracellulaire. Des travaux ont démontré que certaines protéines cellulaires, comme les MAPK (en anglais, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) de



même que l'action de la cyclophiline A, influencent la décapsidation [136, 137]. Par ailleurs, la protéine virale Nef intervient dans ce processus en s'associant à une pompe à proton, laquelle induit un changement local de pH et déstabilise la structure de la capsid [138].

La décapsidation provoque le relâchement du complexe de transcription inverse dans le cytoplasme. Ce complexe est composé des deux brins d'ARN viraux, de l'amorce ARN de transfert lysine 3 (ARNt<sup>lys3</sup>), de la TI, de l'IN, de la MA, de la NC et de la protéine virale Vpr. La transcription inverse débute par la liaison de l'ARNt<sup>lys3</sup> à une séquence complémentaire sur le brin d'ARN viral. La TI utilise l'ARNt<sup>lys3</sup> comme amorce pour la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) [139]. Une fois le premier brin d'ADN synthétisé, la TI, avec son activité RNase H, dégrade le brin d'ARN apparié à l'ADNc et termine la synthèse de l'ADN proviral en produisant le second brin d'ADN [140]. Pendant cette étape, la TI commet de nombreuses erreurs (1 mutation pour 10<sup>4</sup>) [141]. Le taux de mutations important et la production d'un grand nombre de virions en peu de temps résulte en l'apparition de quasi-espèce virale se définissant comme une population de virions de même espèce, mais hétérogène et changeant.

Après la synthèse de l'ADN viral double brin (ADNvdb), le VIH-1 met en oeuvre un système de transport actif de l'ADNvdb à l'intérieur du noyau par l'intermédiaire de la machinerie d'import nucléaire de la cellule. La première étape de ce système est la formation du complexe de pré-intégration (CPI) qui peut se composer par exemple de l'ADNvdb, de la MA, de l'IN, du Vpr, de la TI et de protéines de l'hôte liant l'ADN, les HMGI(Y) (en anglais, *High Mobility Group Protein*) [142]. La formation de ce complexe impliquerait aussi la participation du cytosquelette [143]. Les différents constituants du CPI contribuent à l'importation nucléaire du VIH-1 par plusieurs mécanismes : MA et IN possèdent des signaux de localisation nucléaire (SLN) fonctionnels pour interagir avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$  (protéines transporteuses) [144-147] et Vpr régule ce procédé en augmentant l'affinité entre l'importine  $\alpha$  et les SLN [148]. En plus des importines  $\alpha$  et  $\beta$ , d'autres facteurs participent au transport, incluant la protéine Ran (en anglais, *RAS-related Nuclear protein*) à activité guanosine triphosphatase (GTPase) et la protéine qu'elle lie, le

facteur de transport nucléaire 2 (*Nuclear Transport Factor 2* ou NTF2). Ces protéines travaillent de concert afin de délivrer le CPI dans le noyau de la cellule infectée.

#### **1.4-4. Intégration**

Une fois à l'intérieur du noyau, l'ADN est intégré au génome de la cellule infectée par l'action de l'IN. L'intégration peut avoir lieu en dehors de toute synthèse d'ADN par la cellule. Une cellule au repos peut donc être infectée au même titre qu'une cellule en période d'activité. Le virus est alors sous sa forme de provirus. ADN proviral s'intègre de préférence à l'intérieur de gènes actifs, mais jamais dans les centromères [149, 150].

#### **1.4-5. Transcription**

La régulation de l'expression génique implique plusieurs interactions complexes entre l'ADNvdb, les facteurs de transcription cellulaire et la protéine virale Tat. La transcription se divise en deux étapes. Le premier stade est médié par des interactions entre les facteurs de transcription cellulaire et certains éléments situés dans le promoteur du VIH-1. Le deuxième stade dépend de l'accumulation suffisante de Tat pendant le premier stade [151]. À partir du promoteur viral situé en 5' du LTR, les copies intégrées d'ADN du VIH-1 servent de matrice pour la synthèse d'ARN messagers (ARNm) viraux grâce à l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et les interactions coordonnées de la protéine Tat et des facteurs de transcription. La protéine Tat est requise pour l'élongation complète des transcrits d'ARN. Tat contient deux sites de fixation situés dans le même domaine appelé domaine de transactivation. Le premier de ces sites permet la fixation de Tat à une protéine cellulaire, la cycline T1. Par la suite, le second site induit la fixation de Tat à une séquence d'ARN située dans le LTR du virus, la région TAR. Cette interaction augmente le niveau de transcription du génome viral induit par l'élimination des facteurs inhibiteurs de l'élongation qui bloquent l'activité de l'ARN Pol II [52].



L'épissage du transcrit d'ARNvdb par l'ARN Pol II aboutit à l'ARNm codant pour les protéines virales. Les protéines Gag et Gag-Pol sont traduites à partir de l'ARNm avant épissage; Vif, Vpr, Vpu et Env sont traduites à partir d'un ARNm épissé une seule fois; Tat, Rev et Nef sont traduites à partir d'un ARNm épissé plusieurs fois. Les cellules eucaryotes possèdent des mécanismes qui empêchent l'exportation depuis le noyau des transcrits qui ne sont pas entièrement épissés. L'exportation depuis le noyau et la traduction des trois protéines du VIH-1 codées par les transcrits entièrement épissés, Tat, Nef et Rev, sont assurés par les processus cellulaires classiques d'exportation des ARNm. Lorsque produite, la protéine Rev pénètre dans le noyau et se fixe à une séquence particulière de l'ARN viral, l'élément de réponse à Rev (*Rev Responsive Element* ou RRE). Rev se fixe également à une protéine de transport nucléocytoplasmique de l'hôte, la protéine CRM1 (en anglais, *Chromosome Maintenance Region 1*), qui permet l'utilisation des voies cellulaires pour exporter les ARNm viraux vers le cytoplasme à travers les pores nucléaires [52].

#### 1.4-6. Assemblage

Gag est la protéine centrale de l'assemblage du VIH-1. En effet, le domaine MA de Pr55<sup>Gag</sup> permet de diriger et de lier Gag à la membrane cellulaire ainsi que d'incorporer l'enveloppe virale. La multimérisation de Gag force la bicouche lipidique de la cellule à se courber vers l'extérieur. Le domaine NC de Gag lie l'ARN permettant l'encapsidation du génome viral. Les enzymes virales, soit la TI, la PR, et l'IN, sont incorporées dans les virions via des interactions avec Gag (Pr55<sup>Gag</sup> ou Pr160<sup>Gag-Pol</sup>). Le domaine C-terminal de Gag, p6, contient un site de liaison des composantes de la machinerie cellulaire de triage endosomal telles que le complexe ESCRT-1 (en anglais *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) et la protéine TSG101 (en anglais, *Tumor Susceptibility Gene 101*) [152]. Ces protéines font partie de la voie de dégradation cellulaire qui est requise pour la séparation de l'enveloppe virale de la membrane cellulaire. Le site principal d'assemblage est la membrane plasmique, mais dans certains types cellulaires incluant les macrophages,

l'assemblage et le bourgeonnement se produisent au niveau des membranes des endosomes tardifs [153].

### **1.4-7. Maturation**

Suite au bourgeonnement, les particules virales sont immatures. Une dernière modification impliquant la PR est nécessaire à la maturation des virions. La PR clive les précurseurs de Gag et de Gag-Pol et génère les protéines p17, p24, p6 et p7 de même que les enzymes virales. La capsid se réassemble en une forme conique qui contient toutes les composantes décrites précédemment ainsi que la matrice protectrice [154-156]. Une maturation adéquate est essentielle pour la production de virions infectieux [157-159].

## **1.5- LA TRANSMISSION ET LA PATHOGÉNÈSE DU VIH**

### **1.5-1. Transmission du VIH**

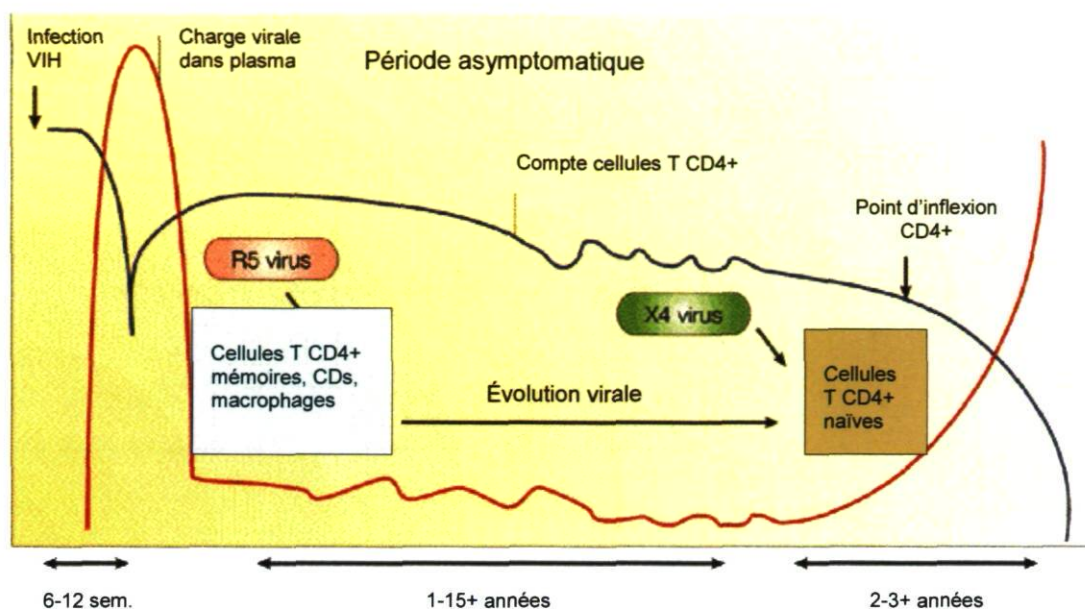
La fréquence de la transmission du VIH est influencée par la quantité d'agent infectieux contenu dans le fluide corporel et l'étendue du contact qu'a un individu avec ce fluide corporel. Les trois principaux moyens pour transmettre le virus sont par le sang (toxicomanie, transfusions sanguines), par le contact sexuel non protégé (homosexuels masculins, hétérosexuels) et par la transmission de la mère à l'enfant pendant la grossesse, à l'accouchement ou lors de l'allaitement. Ces moyens peuvent être expliqués par la concentration relative du VIH retrouvée dans les différents fluides corporels : sang, sperme, sécrétions vaginales et lait maternel.

Les muqueuses présentes dans la bouche, le vagin, le col de l'utérus, le rectum et le colon représentent une excellente voie d'entrée pour le VIH-1. Lorsque la muqueuse est intacte, le virus traverse la barrière épithéliale et infecte les cellules immunitaires présentes dans les couches internes de l'épithélium (cellules Langerhans, cellules Tme et macrophages). Lorsqu'il y a bris de la muqueuse pendant une relation sexuelle, le virus qui n'a pas à traverser la barrière épithéliale atteint plus facilement les cellules [160-162]. Par la suite, les cellules infectées migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires par le système lymphatique.

### **1.5-2. Pathogenèse virale**

La pathogenèse du VIH-1 peut être divisée en trois phases majeures suivant une infection (figure 7). Dans la première phase, une réduction du nombre de cellules T CD4+ est observée et les fonctions immunitaires reflètent une infection virale. Par la suite, ces paramètres continuent de diminuer en association avec une réplication lente mais persistante du virus. Des mois à des années plus tard, un deuxième niveau de virémie arrive simultanément avec l'apparition de symptômes cliniques. La hausse de la virémie continue pendant la phase terminale (c.-à-d. le développement du SIDA).





**Figure 7. Pathogenèse du VIH-1.** (Adaptée de [163])

#### 1.5-2.1. Primo-infection

Les premiers jours suivant une infection, la réplication virale se déroule au site d'entrée du virus, plus probablement dans les cellules T CD4+, les CD8 et les macrophages situés dans les muqueuses ou les tissus lymphoïdes [164, 165]. Une quantité suffisante de cellules doit être infectée pour maintenir l'infection. Celle-ci est établie, lorsque le virus se déplace du site initial de l'infection aux ganglions lymphatiques (à l'intérieur de 2 jours) [164-166].

En 5 à 7 jours, la virémie résulte à plus de 5000 particules infectieuses (PI)/ml, ou  $>10^7$  molécules d'ARN virale par millilitre de plasma. Après 10 à 14 jours, plus de 200 000 milliards de cellules T CD4+ peuvent être infectées [167]. Comme observé chez d'autres infections virales, le nombre de cellules T CD8+ augmente lors de la primo-infection [168]. Par ailleurs, une production de cytokines, principalement des cytokines proinflammatoires



et des chimiokines, attirent plus de cellules cibles au site d'infection. Cependant, les cytokines antivirales de la réponse innée (e.g. les interférons (IFNs) de Type I) et les cellules T CD8+ de la réponse adaptative arrivent trop tard pour prévenir l'établissement de l'infection [169, 170]. C'est d'ailleurs pour ces raisons qu'un grand nombre de cellules deviennent infectées durant la primo-infection avant qu'une réponse antivirale suffisante se développe. Généralement, au bout de quelques semaines de primo-infection, la virémie est réduite substantiellement. La population virale à ce stade est normalement homogène [171, 172].

#### 1.5-2.2. Phase asymptomatique

3 à 6 mois après l'infection primaire, le nombre de cellules T CD4+ revient à un niveau près de la normale, mais reste inférieur à celle-ci. Durant la phase asymptomatique, la réplication du VIH-1 continue, mais généralement à un faible niveau, puisque une partie des cellules infectées sont rapidement éliminées par le système immunitaire. La population virale devient hétérogène [173]. La suppression continue de la réplication virale durant cette période apparaît comme étant médiée par les cellules T CD8+[174, 175].

#### 1.5-2.3. Phase symptomatique

Sans traitement, plusieurs individus infectés développent des symptômes à l'intérieur de 10 ans suivant l'infection : le compte de cellules T CD4+ diminue habituellement sous les 350 cellules/ $\mu$ l, la charge virale augmente substantiellement, et la réduction de la réponse antivirale induite par les cellules T CD8+ sont observés [176-178]. Des événements similaires arrivent dans les organes lymphoïdes secondaires où la réplication virale augmente en concomitance avec la destruction des tissus lymphoïdes [179]. Le changement dans l'évolution clinique apparaît comme étant directement relié à la réduction de la

réponse immunitaire cellulaire, particulièrement l'activité antivirale des cellules T CD8+ [174, 180-182]. Tous ces événements présagent le développement du SIDA.

Durant la période symptomatique et surtout quand les individus développent le SIDA, la quantité de VIH augmente dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires à un haut niveau et la population virale redevient relativement homogène. Dans cette phase finale de la maladie, les cellules T CD4+ sont la source majeure de virus [183]. De nos jours, l'espérance de vie ne cesse d'augmenter avec la prise des traitements antirétroviraux.

## **1.6- L'IMMUNOLOGIE DU VIH**

### **1.6-1. Immunité innée**

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre les organismes infectieux. Étant la première réponse à l'entrée de pathogènes, elle est la plus importante pour prévenir l'infection par le VIH et pour la contrôler [184, 185]. Ce système produit des cytokines (e.g. IFN- $\alpha$ ) qui ont des effets anti-pathogènes (tel que la fièvre) et qui activent le système immunitaire inné (e.g. cellules NK) et le système immunitaire adaptatif (e.g. lymphocytes T) [184]. Cependant, cette réponse est insuffisante pour enrayer complètement le VIH. Les IFNs étant en partie sujet de cette thèse, ils seront traités en de plus amples détails dans le chapitre III.

#### **1.6-1.1. Sous-types cellulaires impliqués**

Cellules dendritiques

Les CD8 jouent un rôle important dans l'immunité innée en induisant les réponses immunitaires. En effet, les CD8 capturent les antigènes et les présentent au système immunitaire via les molécules du CMH sur leur surface cellulaire [186]. Cependant, les CD8 possèdent une variété de lectine qui joue un rôle dans l'attachement et l'infection du VIH [187].

En particulier, les plasmacytoïdes répondent aux pathogènes en produisant une grande quantité d'IFN de type I qui augmente l'expression du CMH I et II, ce qui procure une présentation efficace aux lymphocytes T [188].

#### Cellules NK

Les cellules NK fonctionnent par l'interaction de leur surface cellulaire avec des molécules activatrices ou inhibitrices [189]. Elles reconnaissent les cellules infectées par un virus car celles-ci expriment moins de molécules du CMH I. Par ailleurs, elles produisent des cytokines régulatrices tel que le facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor Necrosis Factor alpha* ou TNF- $\alpha$ ) qui a des activités cytotoxiques [189].

#### Lymphocytes T $\gamma\delta$

Tout comme les cellules NK, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont des fonctions effectrices, telles que des activités cytotoxiques et la production de cytokines. Par ailleurs, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  lient les antigènes par un mécanisme indépendant des molécules du CMH qui ne requiert pas les CPA.



## Macrophages tissulaires

Les macrophages tissulaires ont des récepteurs de surface reconnaissant les composants moléculaires de beaucoup de bactéries. Parmi ces récepteurs, il y a le récepteur du mannose, le récepteur des glycanes et la protéine liant le lipopolysaccharide bactérien.

### **1.6-2. Immunité humorale**

#### 1.6-2.1. Production d'anticorps

La séroconversion arrive quelques jours à quelques semaines après l'infection. Gag est la première protéine virale à être reconnue, suivi de Nef, Rev et Env. IgG1 est la sous-classe d'anticorps dominant dans toutes les phases cliniques [190]. Les autres classes d'anticorps peuvent varier selon la phase clinique [191].

Une réponse conventionnelle de l'hôte contre une infection virale est la production d'anticorps qui s'attachent au virus et l'inactive. Les anticorps neutralisants apparaissent habituellement 1 à 2 semaines suivant une infection aiguë et sont dirigés contre la protéine Env. Cependant, la sélection de mutants échappant aux anticorps neutralisants a été largement suggérée dans de nombreuses études. Une étude a démontré qu'au cours du suivi d'un patient accidentellement infecté dans un laboratoire, des variants de plus en plus résistants à plusieurs d'anticorps dirigés contre la gp120, et décrits pour leur activité neutralisante, ont été isolés après 3 et 7 ans d'infection[192]. L'analyse des mutations a révélé que l'évolution de l'enveloppe du virus ne s'était pas faite de manière aléatoire, mais que la sélection était la conséquence de la pression immunitaire.

Des anticorps liant le virus et augmentant la réplication virale ont été identifiés chez des individus en progression vers la maladie. Le mécanisme expliquant ce phénomène pourrait impliquer le complément et les récepteurs Fc [193-196]. La différence entre la neutralisation et l'augmentation de la réplication virale serait liée à l'affinité de liaison des anticorps au virion [197]. Par ailleurs, le VIH-1 peut muter et devenir résistant à la



neutralisation ou être augmenté par le même anticorps qui le neutralisait auparavant. Il peut aussi subir des changements et devenir sensible à l'augmentation médiée par les anticorps. Des changements d'ordre linéaire et de conformation de l'enveloppe (e.g. glycosylation) peuvent être impliqués dans la sensibilité du virus aux anticorps.

#### 1.6-2.2. Complément

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* ou ADCC) pourrait être pertinente d'un point de vue clinique, car elle détruit les cellules infectées [198]. Cependant, le processus semble dépendre de la fonction des cellules hôtes effectrices (e.g. macrophages et cellules NK). Le complément joue un rôle dans la réponse antivirale en augmentant la lyse des virions médiée par les anticorps (immunité adaptative) ou en détruisant les virus et les cellules infectées par la liaison et l'activation des voies classiques ou alternatives [199]. Le complément interagit aussi avec les récepteurs du complément sur les cellules NK ce qui occasionne la lyse directe des cellules infectées et non-infectées [200]. Par ailleurs, cette protéine a aussi un rôle lors de l'immunité adaptative en augmentant l'effet antiviral des anticorps neutralisants [201-203].

### 1.6-3. Réponse immune des cellules T

Lors d'une infection par le VIH-1, la réponse immune adaptative des cellules T est dirigée contre le virus par la reconnaissance de protéines virales associées au virus ou aux cellules infectées.

#### 1.6-3.1. Activités cytotoxiques des cellules T

Comme mentionné auparavant, il y a deux catégories majeures de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> : les cellules naïves et les cellules mémoires. Les cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices

répondent à une infection au VIH-1 par la production de cytokines. Les cellules peuvent être séparées en 2 groupes : TH1 et TH2, dépendant des cytokines produites [204-208]. Généralement, la réponse de type 1 est associée à une forte réponse à médiation cellulaire, tandis que la réponse de type 2 corrèle avec une réponse humorale. Les cellules T CD4+ cytotoxiques ont la capacité de tuer les cellules infectées ou non-infectées par la sécrétion de perforine [209-212] et/ou l'induction de l'apoptose [213]. Les cellules T CD8+ cytotoxiques, similaires aux cellules T CD4+, se différencient en cellules effectrices avec des activités cytotoxiques ou en cellules mémoires qui peuvent être stimulés par un antigène.

Les cellules T CD8+ cytotoxiques réagissent à une variété de peptides viraux (e.g., Gag et Nef) [214-218]. La reconnaissance des peptides Env est faible. Cependant, le VIH-1 peut échapper aux cellules T cytotoxiques en changeant les épitopes reconnus par celles-ci. Le VIH-1 peut faire ces changements en sélectionnant les virus ayant subi des mutations dans l'épitope reconnu [219-223], en diminuant l'expression du CMH [224-227] ou en induisant l'anergie des cellules T CD8+ [228, 229].

#### 1.6-3.2. Activités non-cytotoxiques

En plus de l'activité cytotoxique antivirale associée aux cellules T CD8+, un sous-ensemble de cellules T ont la propriété de supprimer la réplication virale des cellules T CD4+ sans les tuer. La réponse antivirale des cellules T CD8+ non cytotoxiques corrèle avec le stade clinique. En effet, cette réponse est fortement présente chez les individus asymptomatiques et elle disparaît lorsqu'il y a progression vers la maladie. La suppression de la réplication virale chez les cellules T CD4+ et les macrophages a été démontrée [174, 230, 231].

## 1.7- LES TRAITEMENTS

Les traitements antirétroviraux ciblent différentes étapes du cycle du VIH. Durant la dernière décennie, plusieurs drogues ciblant différentes fonctions du VIH ont été évaluées. De nos jours, plus de 20 drogues sont utilisées [232, 233]. Malheureusement, plusieurs effets secondaires y sont associés et le coût des médicaments est très élevé. Par ailleurs, ces traitements ne permettent pas d'éradiquer le virus, ni de rétablir complètement le système immunitaire, mais de maintenir en vie les personnes infectées. En effet, grâce aux traitements, le SIDA est considéré maintenant comme une maladie chronique.

### **1.7-1. Agents antirétroviraux**

Trois principaux groupes d'agents antirétroviraux, développés sur la base des séquences génomiques de la TI et de la PR sont actuellement utilisés en clinique [234]. Il s'agit des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et des inhibiteurs de la protéase (IP) (figure 8). Les INTI entrent en compétition avec les nucléosides naturels et empêchent l'élongation de la chaîne d'ADN [235, 236]. La première drogue antirétrovirale découverte a été un INTI, l'azidothymidine (AZT). Cette molécule avait été synthétisée pour une utilisation contre le cancer [237]. Rapidement, cet analogue de nucléosides a démontré son efficacité en prévenant l'apparition des symptômes d'une infection par le VIH-1 [238]. Cependant, l'administration de l'AZT est aussi associée à de fréquents effets secondaires, tel que la toxicité de la moelle osseuse [239]. Pendant les 20 dernières années, 7 INTI ont été introduits comme traitement. Malheureusement, leur administration a été associée à diverses toxicités comme la pancréatite et la neuropathie périphérique. Par ailleurs, leur efficacité est réduite avec le temps avec l'apparition de mutations qui rendent le virus résistant.

Trois INNTI ont été introduit comme traitement sur le marché (p.ex., nevirapine, delavirine et efavirenz). Comme les INTI, ils agissent sur la TI, mais d'une manière différente des



analogues de nucléosides. En effet, ils agissent comme antagonistes non compétitifs en se liant à une région hydrophobique adjacente au site catalytique de la TI [240, 241].

Les IP inhibent l'activité protéolytique de la PR en s'attachant à son site actif [242] de sorte que les virus nouvellement produits sont défectueux et incapables d'infecter de nouvelles cellules.

Par ailleurs, des inhibiteurs d'intégrase sont aussi utilisés pour cibler le VIH. Ces molécules bloquent l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule infectée. Elle souvent utilisé lors d'apparition de résistance aux antirétroviraux pris précédemment [243].

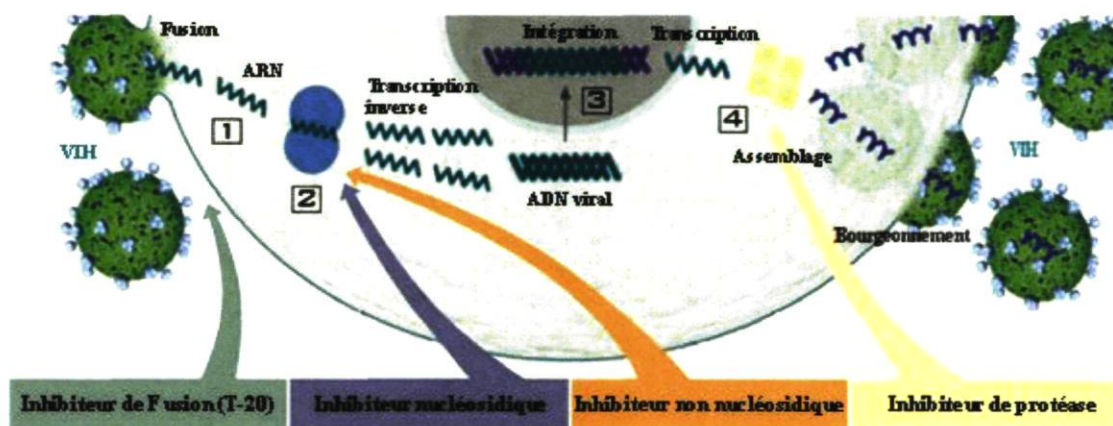


Figure 8 Les classes de médicaments antirétroviraux et leurs sites d'action [59].

La thérapie HAART (en anglais, *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) est le traitement prescrit de nos jours. Le HAART, qui inclut trois drogues et plus, débuta en 1996. Malheureusement, la prise du HAART n'empêche pas l'apparition de résistance aux drogues. Par conséquent, le traitement doit généralement être suivi et modifié à plusieurs reprises.



### **1.7-2. Effets secondaires**

Malgré le fait que les drogues antivirales ont des effets bénéfiques sur l'infection par le VIH et sur le développement de la maladie, les effets secondaires peuvent être très nuisibles pour l'individu infecté. Les effets secondaires incluent des anomalies dans la distribution des gras et dans le métabolisme des lipides et du glucose, des maladies cardiaques ainsi que des désordres au niveau du pancréas, des reins et du foie [244-247]. Cette toxicité des médicaments occasionne une mauvaise observance du traitement de la part des patients. Or, le succès thérapeutique et la prévention de l'émergence de souches résistantes sont basés sur la prise des antirétroviraux. Devant la toxicité des molécules administrées, de même que l'émergence de souches virales résistantes, le besoin de nouvelles approches est devenu une priorité.

### **1.7-3. Immunothérapie**

La prise du HAART peut parfois compromettre la fonction du système immunitaire, c'est pourquoi les thérapies basées sur le système immunitaire utilisent des cytokines (e.g. interleukine (IL) -2, IL-12, IL-15, IL-16 et IL-17) qui aident à restaurer l'immunité à médiation cellulaire ou sur des approches qui diminuent les effets toxiques de produits cellulaires comme le TNF- $\alpha$  [248-251]. La prise d'antirétroviraux combinée à une immunothérapie semble être l'approche la plus appropriée pour contrôler le VIH. L'immunothérapie passive qui administre des anticorps spécifiques artificiels monoclonaux et l'approche antivirale basée sur les anticorps sont d'autres possibilités de traitements pour une infection par le VIH. Cependant, ces approches étudiées n'ont pas encore démontré d'effets bénéfiques cohérents.

### 1.7-4. Développement de vaccins

Malgré la promesse de thérapies de plus en plus efficaces, le plus grand défi pour le contrôle du VIH dans le monde est la prévention de l'infection. Plusieurs aspects de l'infection et de la transmission par le VIH ont été considérés dans le développement d'un vaccin.

Le tableau 4 montre les différentes approches utilisées dans le développement d'un vaccin pour prévenir l'infection par le VIH. Ces approches incluent par e.x. l'utilisation de virus atténués, de noyaux viraux et de gp120 purifié de l'enveloppe seule ou en combinaison avec des vecteurs d'expression vivants (virus ou bactéries).

**Tableau 4. Les approches vaccinales contre le VIH** (Adapté de [23]).

- 
- Virus complètement tués (inactivés)
  - Variants vivants (atténués) (e.g. délétion de Nef)
  - Vaccin de sous-unités : gp de l'enveloppe (gp120, gp160, gp41); Protéines Gag
  - Protéines virales dans des vecteurs vivants (e.g. virus de la polio, virus herpes simplex, adénovirus, baculovirus, et une variété de bactérie)
  - Noyaux viraux avec des protéines de l'enveloppe : pseudovirions (*Virus-like Particles* ou VLP)
  - Séquences dérivé de peptides du VIH (e.g. épitopes V3)
  - Anticorps neutralisants anti-idiotypes
  - Protéines dérivés de plante
-

Les objectifs généraux d'un vaccin contre le VIH sont de réduire l'infection dans la population, de réduire le virus dans les fluides biologiques et diminuer la transmission du VIH et de protéger les individus contre une infection et contre le développement de la maladie.

Le vaccin idéal serait un vaccin qui est sécuritaire et qui donne une protection à long terme contre toutes les souches. Il devrait induire une immunité locale avec des réponses immunitaires humorales et cellulaires de type inné et adaptatif, comme produire des anticorps neutralisants et non des anticorps augmentant l'efficacité de l'infection [184, 252-254].

Parmi les exemples concrets de vaccins développés, l'inoculation avec des virus atténués a donné les meilleures protections lors des études chez les animaux [255]. Cependant, ce type de vaccin est inacceptable pour des essais chez les humains parce qu'il y a un risque d'apparition de revertants qui permettrait la ré-acquisition de la pathogénicité des virus atténués. Jusqu'à ce jour, la procédure la plus sécuritaire et efficace pour l'immunisation est de sensibiliser l'hôte avec un vecteur vivant (e.x. adénovirus) exprimant des protéines du VIH, suivi d'une relance avec une sous-unité d'une protéine dans un vecteur vivant viral. Le succès de la vaccination peut être augmenté par la co-administration de cytokines ou d'agonistes des récepteurs Toll (*Toll-like Receptor* ou TLR) qui augmentent la réponse immunitaire [256].

Plusieurs vaccins sont présentement en étude clinique de phase I chez les humains. Parmi ces études, il y a un vaccin de la compagnie GlaxoSmithKline construit à partir d'un vecteur adénovirus de type 35 qui encode pour le gène Gag, RT, IN et Nef de clade A et qui est adjuventé [257]. Le vaccin MRkAd5 de la compagnie Merck est aussi un vaccin constitué d'un vecteur vivant adénovirus de type 5 qui exprime Gag de clade B [258-260]. Un vaccin composé d'un adénovirus de type 2 exprimant Gag de clade C est aussi en essai clinique de phase I [261-263]. Une autre étude compare l'administration d'ADVAX, un vaccin d'ADN exprimant Env, Gag, Nef, Tat et Pol de clade B et C [264-266] en

combinaison avec TBC-M4, un vaccin MVA (en anglais, *Modified Vaccinia Ankara*) exprimant les gènes Env, Gag, Tat, Rev, Nef et RT de clade C [267]. Finalement, pGA2/JS7 est un vaccin MVA encodant des VLP non-infectieux [268]. Cependant, leur efficacité reste à être déterminée et les recherches pour le développement d'un vaccin continuent.

### **1.7-5. La prophylaxie pré-exposition**

La prophylaxie pré-exposition consiste à donner dans des populations à haut risque, une combinaison d'antirétroviraux aux séronégatifs pour les protéger de l'infection par le VIH en cas d'exposition. Très récemment, une étude a indiqué que l'utilisation d'antirétroviraux chez des personnes non-infectées réduit le risque d'infection de 44% [269]. Beaucoup de travail reste à faire, mais ce sont des progrès importants au niveau de la prévention.



## CHAPITRE II- SOUCHES VIRALES

### 2.1- CORÉCEPTEURS

Comme mentionné auparavant, les corécepteurs les plus pertinents à la réplication du VIH-1 *in vivo* sont CCR5 et CXCR4. Ce sont deux récepteurs de chimiokine membre de la famille des protéines à sept domaines transmembranaires couplées aux petites protéines G. *In vitro*, la réplication virale du VIH-1 dans les cellules primaires est normalement bloquée complètement par des inhibiteurs spécifiques de CCR5 ou CXCR4 [270-279]. *In vivo*, l'absence de CCR5 est une protection contre l'infection à VIH-1, ce qui met en évidence l'importance de ce corécepteur pour la réplication virale [280-282]. Par ailleurs, les souches du virus de l'immunodéficience simienne qui infectent naturellement ou expérimentalement les macaques n'utilisent presque jamais le corécepteur CXCR4 [283-285].

#### 2.1-1. CXCR4

En 1996, Feng et ses collaborateurs ont découvert la protéine CXCR4 [286]. SDF-1 est le ligand naturel de ce récepteur et la présence de cette cytokine peut bloquer l'infection des cellules T par le VIH [287, 288]. Le domaine amino-terminal de CXCR4 est impliqué dans la liaison du VIH [289]. Des mutations dans ce domaine affectent l'infection chez certaines souches de VIH-1 [290]. En général, plusieurs domaines de CXCR4 interagissent avec les virus X4, mais surtout la structure de la deuxième boucle extracellulaire [291].

#### 2.1-2. CCR5

Les ligands naturels de CCR5 sont connus comme inhibiteurs de l'infection à VIH-1 *in vitro*. Le domaine amino-terminal ainsi que la première région extracellulaire de CCR5 participe à l'interaction avec l'enveloppe du VIH-1 [292-294]. Un antagoniste compétitif du récepteur CCR5, le maraviroc, est utilisé comme traitement antiviral. Il prévient l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles.

Certaines populations ont hérité d'une mutation de 32 paires de base (CCR5 $\Delta$ 32), résultant en la délétion génétique d'un segment du gène CCR5. Cette mutation introduit un décalage du cadre de lecture qui produit une protéine manquant le domaine C-terminal. CCR5 $\Delta$ 32 a été relié à la résistance au VIH [280-282]. En effet, des études ont démontré que des cellules mononucléaires du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* ou PBMC) obtenues d'individus à haut risque d'être séropositif et qui sont homozygotes pour l'allèle mutante de CCR5, sont résistantes à une infection par le virus R5 [280, 295, 296]. Dans certaines études, un délai dans la progression de la maladie est observé chez des individus hétérozygotes pour l'allèle muté [280-282]. Environ 1 sur 100 caucasiens serait homozygote pour cet allèle, mais elle est rarement détectée parmi les autres groupes ethniques [297].

### **2.1-3. Signalisation des récepteurs de chimiokine**

#### **2.1-3.1. Signalisation des corécepteurs à la suite de l'interaction avec leurs ligands naturels**

La signalisation provenant des corécepteurs est connue comme étant diverse. Elle est couplée à des voies de signalisation distinctes qui médient la migration cellulaire, l'activation de la transcription et la croissance ainsi que la différenciation cellulaire (Figure 9). La liaison de CXCR4 ou CCR5 à leurs ligands naturels active des protéines G et une

multitude de voies de signalisation en aval. Par exemple, les protéines G activent la phospholipase C (PLC)- $\gamma$  qui par la suite, hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) pour générer l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Ces événements mènent à un flux de calcium et à l'activation de plusieurs isoformes de la protéine kinase C (PKC) [298, 299] (Figure 9A). Parmi les voies impliquées, il y a la voie activant la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) et PI3K $\gamma$  qui mène à l'activation des composantes du complexe d'adhésion focale qui sont importantes pour la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire [300-303]. L'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (en anglais, *Nuclear Factor kappa B*) est aussi une conséquence de la liaison au récepteur de chimiokine [301, 304] (Figure 9B). Par ailleurs, une modulation du cytosquelette d'actine ainsi qu'un réarrangement des microtubules sont aussi associés à la signalisation via CXCR4 et CCR5 [305, 306](Figure 9C). Finalement, la voie JAK/STAT (en anglais, *Janus kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) peut être activée indépendamment des protéines G [307-311] (Figure 9D).

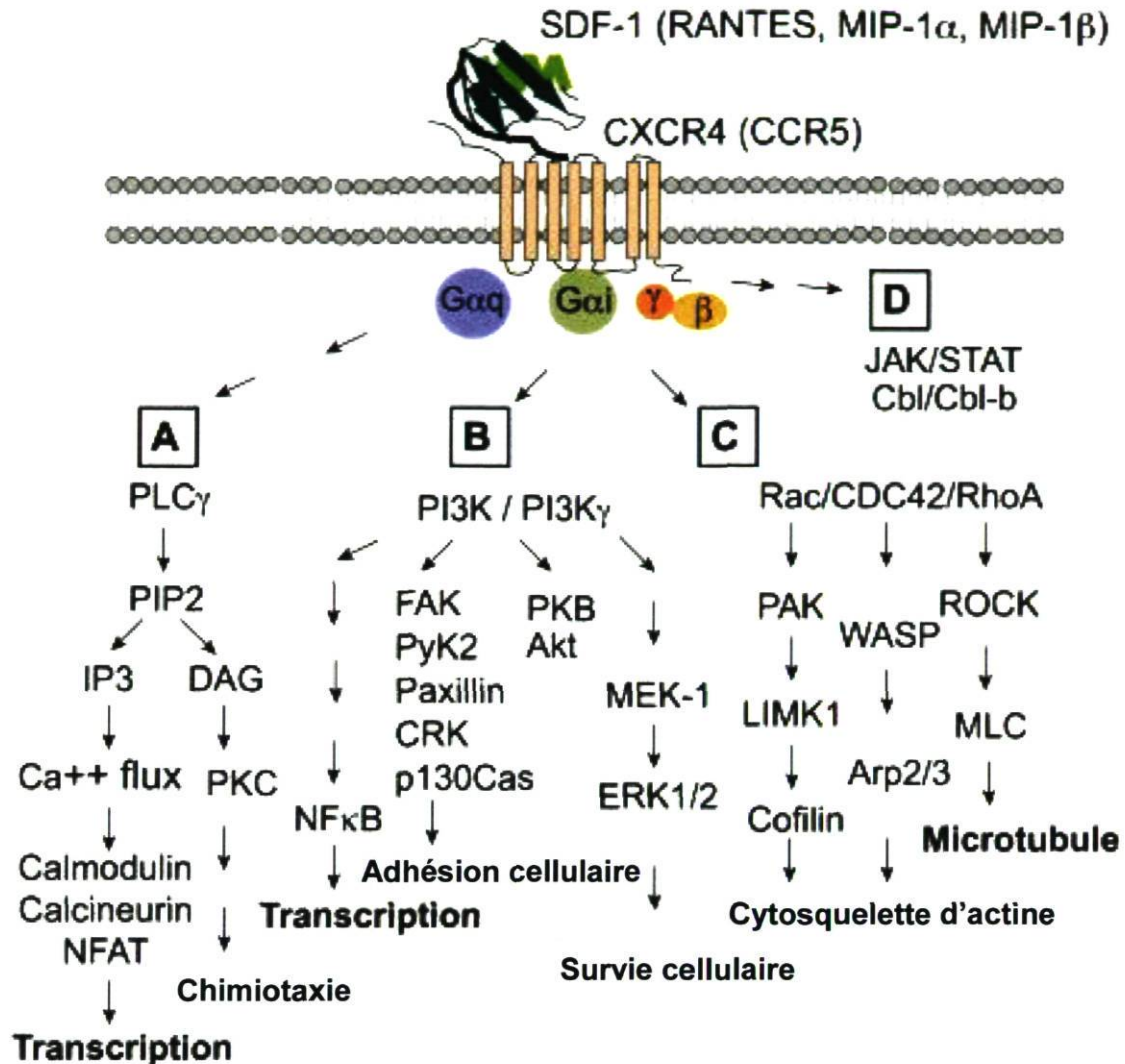


Figure 9. Voies de signalisation des récepteurs de chimiokine. (adaptée de [312])

En résumé, la plupart des molécules impliquées dans la signalisation via CXCR4 et CCR5 sont des composantes des voies de signalisation qui médient des réponses de chimotaxie pour le réarrangement du cytosquelette, la polarisation cellulaire et la migration [313-315], aussi bien que pour l'activation de la transcription, la survie cellulaire et la prolifération [301, 316, 317].



### 2.1-3.2. Signalisation des corécepteurs à la suite de l'interaction avec le VIH-1

Cohérent avec la diversité de signal connue à la suite de l'interaction des corécepteurs, la liaison du VIH-1 à ceux-ci provoque l'activation de différentes molécules telles que PYK2 (en anglais *Proline-rich Tyrosine Kinase 2*) [300], PI3K, protéine kinase B (PKB) [318, 319], Erk-1/2 (de l'anglais *Extracellular signal-Regulated Kinase*) [319], et la translocation nucléaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (*Nuclear Factor of Activated T cells* ou NFAT) dépendant du CD4/CXCR4 [320]. Récemment, il a aussi été démontré que la gp120 médie la chémotaxie, le réarrangement du cytosquelette [319, 321], et l'activation de la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine [321].

## 2.2- CARACTÉRISTIQUES

### 2.2-1. Diversité des virus lors de la transmission et infection

#### 2.2-1.1. Primo-infection

Le virus R5 est préférentiellement exprimé après une primo-infection. Le virus X4 prévaut rarement dans les premières années d'une infection par le VIH-1. Les raisons de cette dominance du virus R5 est encore une question majeure que se pose la communauté scientifique. Certaines études ont suggéré la transmission préférentielle des virus R5 en raison de l'expression des corécepteurs et de leurs ligands aux sites des muqueuses après l'entrée du virus par voie sexuelle [102, 322]. En lien avec cette hypothèse, les CD4 présentes à l'épithélium expriment 10 fois plus de CCR5 que de CXCR4 à leur surface et produisent sélectivement les souches R5 [323, 324]. Parmi celles-ci, les cellules de

Langerhans, pourraient jouer un rôle important dans les premières étapes de la transmission sexuelle [322]. Habituellement, CXCR4 n'est pas détecté sur ces cellules, alors que CCR5 est présent à un faible niveau [325]. L'expression de CCR5, mais pas de CXCR4 à la surface des cellules épithéliales intestinales peut aussi être pertinent à la transmission préférentielle du virus R5 via la voie rectale [102, 326]. Par ailleurs, le haut niveau d'expression du SDF-1 dans le lumen intestinal pourrait aussi être un facteur supprimant la transmission du virus X4 [327]. Malheureusement, ces explications ne sont pas entièrement satisfaisantes puisque parfois les deux phénotypes viraux sont détectés lors de la transmission initiale [328-331]. De plus, les virus X4 peuvent aussi infecter les CD4 [69, 332] et les virus R5 prédominent lors d'une primo-infection par voie intraveineuse où les cellules T CD4+ sont les cibles majeures.

Une autre éventualité est que l'environnement peut influencer l'expression d'un virus en particulier à la suite d'une infection aiguë. Par exemple, l'activation du système immunitaire augmente l'expression de CCR5 ce qui pourrait favoriser la persistance du virus R5 [333, 334]. D'ailleurs, les virus R5 peuvent plus facilement infecter les cellules non-activées [335, 336]. Dans le même sens, il a été démontré que le CPI du virus R5 peut entrer plus facilement dans le noyau des cellules non-activées [337]. Par ailleurs, le virus X4 est beaucoup plus léthal pour les lymphocytes T CD4 + que le virus R5 [338].

#### 2.2-1.2. Changements du phénotype du VIH

Chez la moitié des individus infectés par le VIH, le virus X4 apparaît après une certaine période de temps en concomitance avec le déclin rapide des cellules T CD4+ ainsi que l'avancement vers le SIDA [273, 339]. La raison de ce changement n'est pas connue et une variété d'équipes de recherche a étudié cette question.

Une des possibilités est qu'un virus virulent présent tôt dans l'infection est supprimé ou éliminé par le système immunitaire antiviral, et qu'un virus moins cytopathique domine.

Après la diminution de la réponse immunitaire anti-VIH, le virus avec une plus grande virulence réapparaît [181].

D'autres études suggèrent que les virus R5 évoluent pour utiliser CXCR4 ainsi que CCR5 et deviennent éventuellement des virus X4 [340]. Très peu de changements d'acides aminés (2 ou 3) dans la boucle V3 de la gp120 change un virus R5 en un virus X4 [341-343]. Par ailleurs, il est aussi probable que les deux tropismes et leurs intermédiaires coexistent.

### **2.3- Activation des lymphocytes T CD4+ et réplication différentielle des virus X4 et R5**

À l'intérieur de la première année de la découverte des corécepteurs, plusieurs groupes de chercheurs ont commencé à tester si la signalisation via les corécepteurs était requise pour l'entrée et les étapes subséquentes de la réplication du VIH. Les résultats obtenus sont très controversés. En effet, plusieurs équipes ont montré que la fonction de signalisation des corécepteurs n'est pas requise pour l'entrée ou la réplication virale [41, 292, 344-348]. Tandis que d'autres études suggèrent l'implication de la signalisation des corécepteurs dans les étapes suivant l'entrée virale [321, 349-357]. Les observations contradictoires de ses groupes semblent être reliées à l'utilisation de cellules à différents stades d'activation. En effet, comme il a été mentionné dans le chapitre I, l'état d'activation des lymphocytes T CD4+ détermine le niveau de réplication du VIH-1. Par ailleurs, la polarisation des macrophages en macrophages activés de manière classique (M1) ou alternative (M2a, M2b, M2c) change la capacité de ces cellules à supporter une infection productive [358-361]. En effet, la polarisation des macrophages en cellules M1 prévient l'infection par le VIH-1 et la polarisation en cellules M2a inhibe la réplication virale après l'étape d'intégration [359]. Par ailleurs, plusieurs différences ont été remarquées selon la souche infectant les cellules.



Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont réfractaires à la réplication virale. La magnitude de la réplication virale dans ces cellules est reliée à leur état d'activation [362]. Plusieurs études ont montré une différence entre les deux souches virales dans l'établissement d'une infection dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et celles-ci en lien avec l'activation des cellules par les virus. Récemment, il a été montré que l'enveloppe du virus R5 délivre un signal qui active les cellules T [363], lequel pourrait assister le virus R5 suivant son entrée dans la cellule pour accomplir la transcription inverse, le transport nucléaire et l'intégration. Dans cette même étude, l'enveloppe du virus R5 augmente l'expression de gènes appartenant aux voies de signalisation des MAPK et des gènes régulant le cycle cellulaire dans une plus grande mesure que le virus X4. Par ailleurs, une autre étude a montré que le virus R5 avait un avantage répliatif significatif sur le virus X4 pour certains clones de cellules T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2 et Th0) [364]. Cependant, la restimulation du RCT des cellules Th1 et Th2 avec un anticorps anti-CD3 augmente considérablement la réplication du virus X4. La dépendance de la réplication virale par rapport à l'activation des cellules T obtenue via le RCT ou par la stimulation de cytokine a été démontrée dans plusieurs modèles [365-369]. Plus spécifiquement, dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> stimulés par le RCT, le virus R5, mais pas le virus X4, se réplique efficacement en l'absence de la signalisation via MEK/ERK (en anglais, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/ Extracellular Regulated Kinase*), alors que l'importation nucléaire du virus X4 est dépendante de la voie MEK/ERK [370]. Même que récemment, il a été montré qu'il y a une réplication sélective du virus R5 suivant les interactions entre les CD8 et les cellules T CD4<sup>+</sup>. Cette réplication préférentielle n'est pas reliée à une augmentation de l'infectivité du virus R5 par rapport au virus X4 dans les CD8, mais elle est plutôt due au stade d'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> quand elles rencontrent les virus à la SV. Durant la présentation de l'antigène entre les CD8 et les cellules T CD4<sup>+</sup>, la transmission des virus est similaire pour les deux souches, mais une fois que le virus R5 est intégré dans les cellules T CD4<sup>+</sup> faiblement activées, un délai dans la progression du cycle viral du virus X4 comparé au virus R5 est observé [371].

Toutes les observations démontrant que le virus R5 requiert des conditions moins stringentes d'activation cellulaire, en plus de leur habilité à se répliquer dans les macrophages, procurent une explication supplémentaire à leur plus grande capacité à se



greffer après la transmission virale comparé au virus X4. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène ne sont pas très bien connues. Ces voies de signalisation ont été étudiées par notre équipe. Nous avons identifié des gènes impliqués dans la signalisation du RCT et de l'organisation de l'actine qui sont augmentés par la souche R5 comparé à la souche X4 dans des lymphocytes T CD4+ non-stimulés. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre V.

# CHAPITRE III- DÉFENSES CELLULAIRES ANTIVIRALES

## 3.1- INTERFÉRONS

Les IFNs sont des glycoprotéines naturelles produites par les cellules de la plupart des vertébrés en réponse à des agents extérieurs, comme les organismes infectieux (virus, bactéries, champignons et parasites) et les cellules tumorales. Les IFNs peuvent être produit par des cellules du système immunitaire inné et adaptatif ainsi que par des cellules non-immunes comme les fibroblastes et les cellules épithéliales.

### 3.1-1. IFNs de type I

Les IFNs de type I forment une superfamille de cytokines innées comprenant l'IFN- $\alpha$  (alpha) avec ses 13 sous-types, l'IFN- $\beta$  (beta), l'IFN- $\omega$  (omega), l'IFN- $\tau$  (tau), l'IFN- $\kappa$  (kappa), l'IFN- $\epsilon$  (epsilon), l'IFN- $\lambda$  (lambda), et l'IFN- $\zeta$  (zeta) [372]. Seulement l'IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  et IFN- $\epsilon$  sont exprimés chez les humains. Tous les sous-types de l'IFN- $\alpha$  sont sécrétés par les leukocytes alors que l'IFN- $\beta$  est aussi produit par les fibroblastes. L'IFN- $\tau$  est exprimé exclusivement chez les ruminants à une étape spécifique de la grossesse [373], tandis que l'IFN- $\kappa$  est exprimé par les kératinocytes humains [374].

Il y a 17 gènes humains de l'IFN de type I, tous regroupés sur le chromosome 9. Ces gènes ont la caractéristique de ne contenir aucun intron. Les IFNs de type I sont génétiquement et structurellement très similaires. Ils ont une longueur de 161 à 208 acides aminés et un poids moléculaire de 15 à 24 kDa [375]. Les différents sous-types de l'IFN- $\alpha$  ont

approximativement 50% d'identité dans leur séquence d'acides aminés, tandis que l'IFN- $\alpha$  partage 22% de similarité de séquence avec l'IFN- $\beta$  et 37% avec l'IFN- $\omega$  [375].

### **3.1-2. IFNs de type II**

Il y a seulement un IFN de type II, l'IFN- $\gamma$  (gamma), découvert en 1965 [376]. L'IFN- $\gamma$  est exclusivement produit par les cellules immunes, comme les cellules T et les cellules NK [377]. Le gène de l'IFN- $\gamma$  se retrouve sur le chromosome 12. L'IFN- $\gamma$  est un homodimère non-covalent composé de deux chaînes polypeptidiques identiques de 166 résidus de long et de 17 kDa [378].

### **3.1-3. IFNs de type III**

Récemment, une nouvelle classe similaire aux IFNs de type I humains, nommée IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) et IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), a été identifié [379] [380, 381]. Ils sont fonctionnellement similaires aux IFNs de type I, car ils sont induits lors d'une infection virale ou par de l'ARNdb et ils activent les mêmes voies de signalisation intracellulaires. Cependant, ils proviennent de deux familles distinctes. En effet, la similarité de séquence entre les IFNs de type III et les IFNs de type I n'est que de 15-19% l'identité d'a.a. et les trois gènes des IFN- $\lambda$  sont regroupés sur le chromosome 19 et comprennent 5 exons pour l'IFN- $\lambda$ 1 et 6 exons pour l'IFN- $\lambda$ 2 et l'IFN- $\lambda$ 3 [381]. Ils encodent pour des protéines monomériques de 196 à 200 acides aminés de 20 à 22 kDa chacune. Les IFNs de type III se retrouvent également chez d'autres espèces comme la souris, l'oiseau et le poisson.

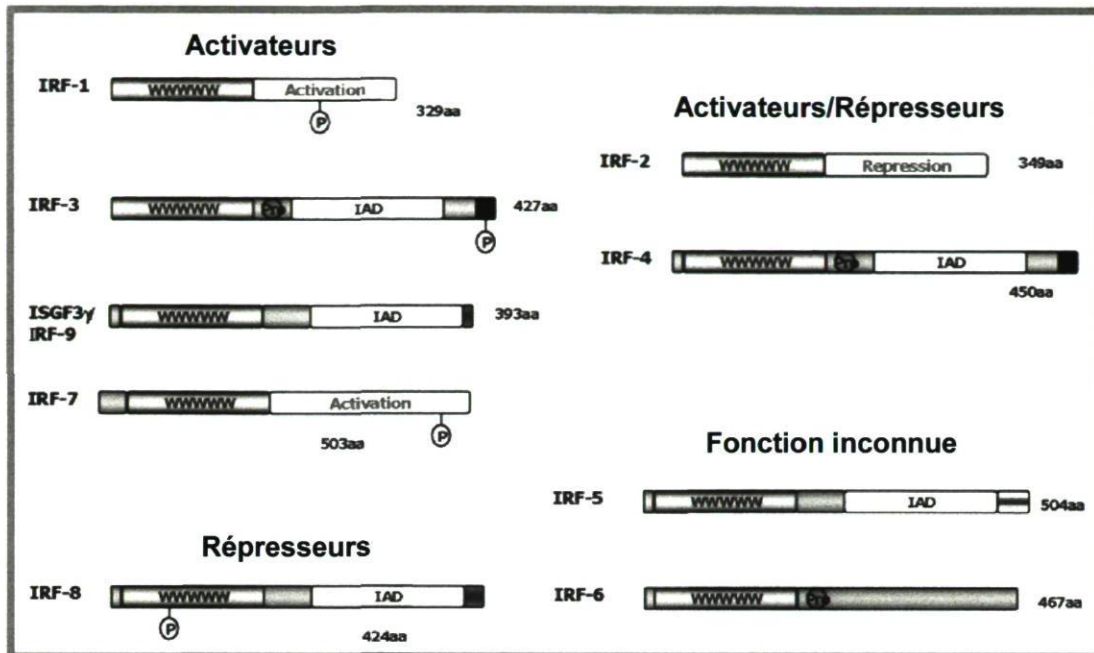


## 3.2- FACTEURS DE RÉGULATION DES INTERFÉRONS

### 3.2-1. Famille des IRFs et leur structure

La famille des facteurs de régulation des IFNs (*IFN Regulatory Factor* ou IRFs) comprend 9 membres chez les humains et les souris : IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 et IRF9 [382, 383]. IRF10 a, quant à lui, uniquement été identifié chez le poulet [384]. Les IRFs sont impliqués dans une multitude de processus biologiques, incluant la régulation des réponses immunitaires et des défenses de l'hôte, la signalisation des cytokines, la régulation de la croissance cellulaire et le développement hématopoïétique [383, 385].

Tous les membres partagent une homologie dans les 115 premiers acides aminés englobant le domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding Domain* ou DBD) (figure 10). Par leur DBD, les IRFs lient des séquences similaires d'ADN présentes à l'intérieur des promoteurs des gènes *Ifn* et de la plupart des gènes stimulés par les IFNs (*IFN Stimulated Genes* ou ISGs). Le domaine le moins bien conservé est le domaine C-terminal qui agit comme une région régulatrice et classifie les IRFs en 3 groupes : 1- ceux qui activent (IRF1, IRF3, IRF7 et IRF9), 2- ceux qui répriment (IRF2, IRF8), et 3- ceux qui activent ou inhibent la transcription génique dépendamment du gène ciblé (IRF2, IRF4, IRF8). Plus spécifiquement, IRF1, IRF3, IRF5, IRF7 et IRF8 sont reconnus comme étant des régulateurs positifs de l'induction du gène *Ifn* de type I. Les IRFs sont exprimés constitutivement ou suivant un traitement avec l'IFN ou d'autres cytokines, ou en réponse à une infection virale dans une variété de type cellulaire, à l'exception d'IRF8 et IRF4, qui sont exprimés exclusivement dans les cellules immunitaires.



**Figure 10. Structure des différents IRFs humains.** (Adaptée de [386])

Chaque IRF a des rôles distincts résultants de la petite différence dans la spécificité de liaison à l'ADN, du patron d'expression, des modifications post-transcriptionnelles et/ou de l'association avec d'autres régulateurs (e.x. d'autres IRFs, STATs) [383, 387-389]. Les interactions avec ses participants modifient les activités de liaison aux ISRE (en anglais *Interferon Stimulated Response Element*) ainsi que la formation de complexes d'initiation de la transcription [390].

### 3.2-1.1. IRF7

Puisqu'IRF7 est en partie sujet de cette thèse, ce facteur de transcription est décrit plus en détail. Le gène *Irf7* a été cloné en 1997 dans le contexte d'une infection latente du virus Epstein-Barr (EBV) où la protéine IRF7 encodée se lie à et régule le promoteur du virus

[391]. Le gène humaine *Irf7* est localisé sur le chromosome 11p15.5 et encode 4 isoformes; IRF7A, -B, -C, -D (-H) [392]. IRF3 est le membre de la famille des IRFs étant le plus près d'IRF7.

#### Activation d'IRF7

L'activation d'IRF7 est un pré-requis pour ses fonctions de facteur de transcription. L'infection par un pathogène déclenche la phosphorylation d'IRF7 et sa translocation au noyau, où il forme un complexe de transcription avec d'autres co-activateurs qui se lient à des régions promotrices de gènes cibles pour en activer la transcription [393, 394]. Des études de cristallographie de structure avec IRF3 ont permis d'identifier un modèle d'activation : le domaine d'association d'IRF3 a une surface hydrophobique couverte par un domaine d'autoinhibition et la phosphorylation, découvre la surface hydrophobique pour permettre la dimérisation et les interactions fonctionnelles avec des co-activateurs [395, 396]. Des études de structure avec IRF5 ont confirmé ce modèle comme mécanisme général pour l'activation des IRFs [397]. Par ailleurs, la délétion du domaine d'autoinhibition d'IRF7 peut générer une forme constitutivement active de la protéine [398].

#### Régulation d'IRF7

IRF7 est constitutivement exprimé dans le cytoplasme des cellules B, des pDCs, des monocytes et des PBMCs. Il est induit par les IFNs de type I, les infections virales et autres stimuli tels que le TNF- $\alpha$  et le lipopolysaccharide chez une variété de types cellulaires [391, 399].

#### Modifications d'IRF7

Comme d'autres facteurs de transcription, IRF7 subit une variété de modifications post-transcriptionnelles, la plus importante étant la phosphorylation. Les kinases effectuant la



phosphorylation d'IRF7 incluent, IKK (en anglais, *I-kappa B Kinase*)- $\epsilon$ ,  $-\alpha$ , TBK1 (en anglais, *TRAF-family-member-associated NF $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase 1*) et IRAK1 (en anglais, *IL-1 Receptor-Associated kinase 1*) [400-405]. Les sites critiques de phosphorylation d'IRF7 sont les sérines 477 et 479. Il a été démontré que la suppression de la phosphorylation, empêche la transactivation des gènes *ifn* [398]. Il est aussi connu que LMP1 (en anglais, *Latent Membrane protein-1*), une oncoprotéine du virus EBV, promouvoit la phosphorylation et l'activation d'IRF7 en ciblant les mêmes sites [406]. IRF7 est dégradé lors de certaines infections virales via la voie d'ubiquitination [407-409]. Par ailleurs, les niveaux cellulaires d'IRF7 sous des conditions physiologiques normales sont aussi contrôlés par ubiquitination [407]. Récemment, il a été montré que la ligase E3 de TRAF6 polyubiquitine IRF7 menant à l'activation de la transcription des gènes *ifn* [410]. Les protéines SUMO (en anglais, *Small-Ubiquitin-like Modifier*) sont des ubiquitines incluant SUMO1, -2 et -3. La sumoylation régule négativement l'activité transcriptionnelle d'IRF7 [411]. En plus de la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation, IRF7 peut subir l'acétylation d'une lysine en réponse à une infection par un virus, comme le virus de la maladie Newcastle. Cette acétylation réduit l'activité de liaison à l'ADN d'IRF7 [412].

## Fonctions

En plus de la régulation de la réponse immune par la production d'IFN de type I, IRF7 joue un rôle dans la régulation de l'oncogénèse et de l'apoptose [413-416]. Par exemple, IRF7 est induit et activé par LMP1 lors de la latence d'EBV laquelle est associée à une variété de tumeurs [417]. Inversement, IRF7 a des effets anti-tumeurs chez les macrophages par l'induction de ligand TNF qui résulte en l'apoptose dépendante de la caspase 8 dans les cellules tumorales, mais pas dans les cellules normales [418]. La régulation de l'oncogénèse par IRF7 semble être type cellulaire dépendante. Une autre étude a démontré que le variant fonctionnel rs1131665 (Q421R) d'IRF7 est associé au lupus érythémateux disséminé [419]. Par ailleurs, IRF7 est impliqué dans la pathogénèse du diabète de type I [420]. L'habileté d'IRF7 à réguler un grand nombre de gènes cibles, lesquels peuvent être

impliqués dans différents processus cellulaires, laisse supposer qu'il y a d'autres fonctions associées à cette protéine étant encore inconnues.

### 3.3- PRODUCTION DES INTERFÉRONS

Les prochains points décrivant les IFNs se concentrent sur les IFNs de type I puisque ceux-ci sont en partie sujet de cette thèse. Comme mentionnée dans le chapitre I, la production des IFNs de type I est un processus essentiel à la réponse immunitaire innée, la première ligne de défense contre un pathogène invasif [421]. Les IFNs exercent des actions auto- et paracrine à l'intérieur de quelques heures en réponse à une infection virale. Leur fonction protectrice est double : 1- IFNs induisent un état cellulaire antiviral et 2- permettent de débarrasser les cellules infectées en activant l'apoptose en synergie avec des agents proapoptotiques tel que les membres de la famille des TNFs [422]. Les IFNs de type I sont typiquement produits par les macrophages, neutrophiles, CD8 et autres cellules somatiques en réponse à plusieurs virus et quelques pathogènes.

#### 3.3-1. Induction du gène *Ifn*

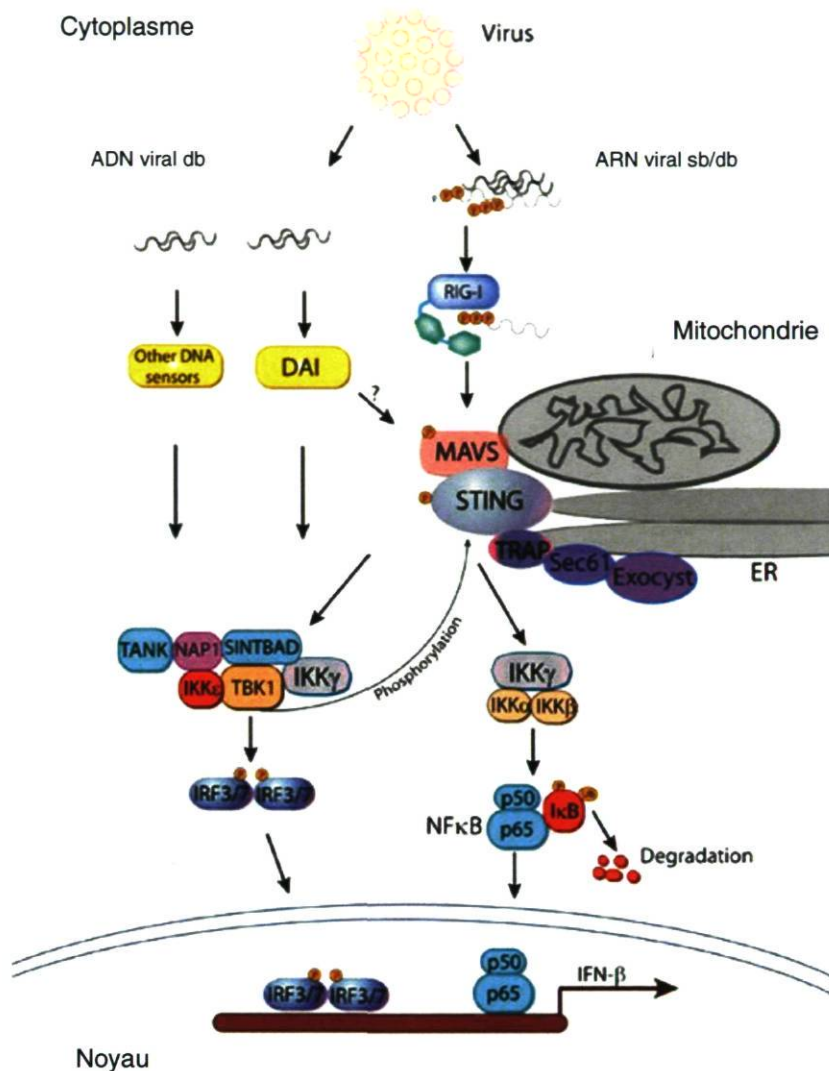
La reconnaissance des pathogènes invasifs est primordiale au système immunitaire de l'hôte. IRF3 et IRF7 sont les principaux responsables de l'activation des gènes *Ifn* de type I. IRF1, IRF5 et IRF8 peuvent aussi y contribuer. L'activation des gènes *Ifn* de Type I se produit à la suite de l'activation des récepteurs de reconnaissance de patrons (*Pattern Recognition Receptor* ou PRRs). Les PRRs reconnaissent des patrons moléculaires associés à des pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern* ou PAMPs), tels que des patrons moléculaires conservés d'ARNdb. IRF1, IRF3, IRF5 et IRF8 peuvent aussi induire l'expression de cytokines proinflammatoires et d'autres gènes en réponse à l'activation des PRRs. Deux classes de PRR ont été identifiées; les PRRs cytosoliques et les TLRs [423,

424]. La reconnaissance d'une variété de PAMPs dérivés de bactéries, de virus, de champignons et/ou de protozoaires initie une réponse immunitaire, incluant l'induction de gènes pro-inflammatoires et de gènes *Ifn* de Type I. Leur activité varie selon le type cellulaire [425].

### 3.3-1.1. Signalisation par les PRR cytosoliques

Les PRRs cytosoliques incluent les protéines regroupées sous le terme RLH (en anglais *Retinoicacid Inducible Gene I (RIG-I)-like helicase*), la protéine kinase R (PKR), la protéine DAI (en anglais, *Double-stranded RNA Activated Inhibitor*), et les protéines NOD (en anglais, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) [423, 424, 426] (figure 11). Les RLH reconnaissent l'ARNv cytoplasmique et sont essentielles à l'activation des IRFs. PKR détecte l'ARNdb intracellulaire [427] tandis que plusieurs membres de la famille NOD reconnaissent les PAMPs et sont impliqués dans l'activation de NFκB et de caspases. Cependant une implication des IRFs dans les voies NOD n'a pas été identifiée. DAI est un détecteur de l'ADN cytoplasmique nouvellement identifié.





**Figure 11. Voies des PRRs cytosoliques.** (Adaptée de [428])

RIG-I et MDA5 (en anglais, *Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) sont deux RLHs essentielles à la reconnaissance des ARNv intracellulaires et qui induisent les gènes *Ifn* de type I [429-432]. RIG-I et MDA5 sont constitués d'un domaine DExD/H (en anglais *DEAD box*) et de deux domaines d'activation et de recrutement des caspases (*Caspase Activation and Recruitment Domain* ou CARDs) [433], qui sont nécessaires à l'activation de NF $\kappa$ B et d'IRF3. Le domaine hélicase est responsable de la détection de l'ARN viral,

tandis que les domaines CARDS activent la cascade de signalisation. La liaison de l'ARN induit un changement de conformation qui expose les domaines CARDS aux protéines de signalisation. Au domaine CARD de RIG-I et MDA5, va se lier un autre domaine CARD de la protéine VISA (en anglais, *Virus-Induced Signaling Adaptor*) (aussi nommée : MAVS, IPS-1, Cardif) [434-437]. En effet, VISA contient un domaine N-terminal CARD qui a une homologie avec les domaines CARDS de RIG-I et MDA5. Cette liaison va engendrer une cascade de signalisation menant à l'activation des IRFs ainsi qu'à la transcription des gènes *Ifn* de type I. VISA est essentiel à la réponse engagée par RIG-I/MDA5 puisque l'absence de cette protéine dans des souris déficientes empêche la signalisation qui mène à l'activation des IRFs et NFκB par RIG-I et MDA5, mais pas par les TLRs [438, 439]. Cependant, la façon dont VISA retransmet le signal n'est pas connue. Une étude récente suggère que NEMO (en anglais, *NFκB Essential Modulator*) et IKKγ interagissent avec la kinase qui phosphoryle IRF3 et IRF7, TBK1. VISA interagit aussi avec plusieurs protéines de signalisation telles que TRAF3 et TRAF6 (en anglais, *TNF Receptor-Associated Factor*), FADD (en anglais, *FAS-associated via Death Domain*) et RIP-1 (en anglais, *Receptor Interacting Protein-1*) [434, 436]. Une autre suggestion est que VISA pourrait former un complexe avec NEMO/IKKγ ainsi qu'avec TRAF3 [440, 441].

Les deux membres de la famille des IRFs qui ont la plus grande homologie, IRF3 et IRF7, sont essentiels pour l'induction du gène *Ifn* de type I par la voie de signalisation RIG-I/MDA5. Chez les cellules non-stimulées, IRF3 et IRF7 sont sous leur forme latente dans le cytosol. Lors d'une infection, un résidu sérine spécifique est phosphorylé en C-terminal, ce qui permet la translocation des IRFs au noyau [442, 443]. La phosphorylation va permettre la formation d'homodimère et d'hétérodimère d'IRF. Ces dimères vont par la suite se lier à une séquence d'ADN cible tel que l'ISRE à l'intérieur des promoteurs des gènes *Ifn* type I ainsi que certains gènes de chimiokines.

### 3.3-1.2. Signalisation par les TLRs

Souvent, l'expression des IFNs de type I est induite par l'engagement des TLRs. À ce jour, 13 différents TLRs ont été identifiés (10 chez l'humain et 12 chez la souris) [444-446]. Les TLRs sont des PRR transmembranaires qui possèdent un domaine extracellulaire contenant des répétitions riches en leucine (*Leucine Rich Region* ou LRR), un domaine transmembranaire, et un domaine de signalisation intracellulaire, connu sous le nom de domaine Toll/IL-1R/résistant (TIR). Le domaine TIR interagit avec une variété de molécules adaptatrices telles que MyD88 (en anglais, *Myeloid Differentiation Primary Response Gene*) et TRIF (en anglais, *TIR Domain Adaptor protein*) [423, 424, 447]. La signalisation transmise par les TLRs peut être divisée en deux voies de signalisation distinctes selon l'interaction avec le domaine TIR : 1- la voie dépendante de MyD88 et 2- la voie dépendante de TRIF [448, 449] (figure 12). Tous les TLRs à l'exception de TLR3 activent la voie dépendante de MyD88. Par contre, TLR3 et TLR4 font intervenir TRIF. Ces deux voies conduisent à l'activation d'au moins trois molécules majeures communes: NFκB, MAPKs et les IRFs [423, 444, 447, 450-452].

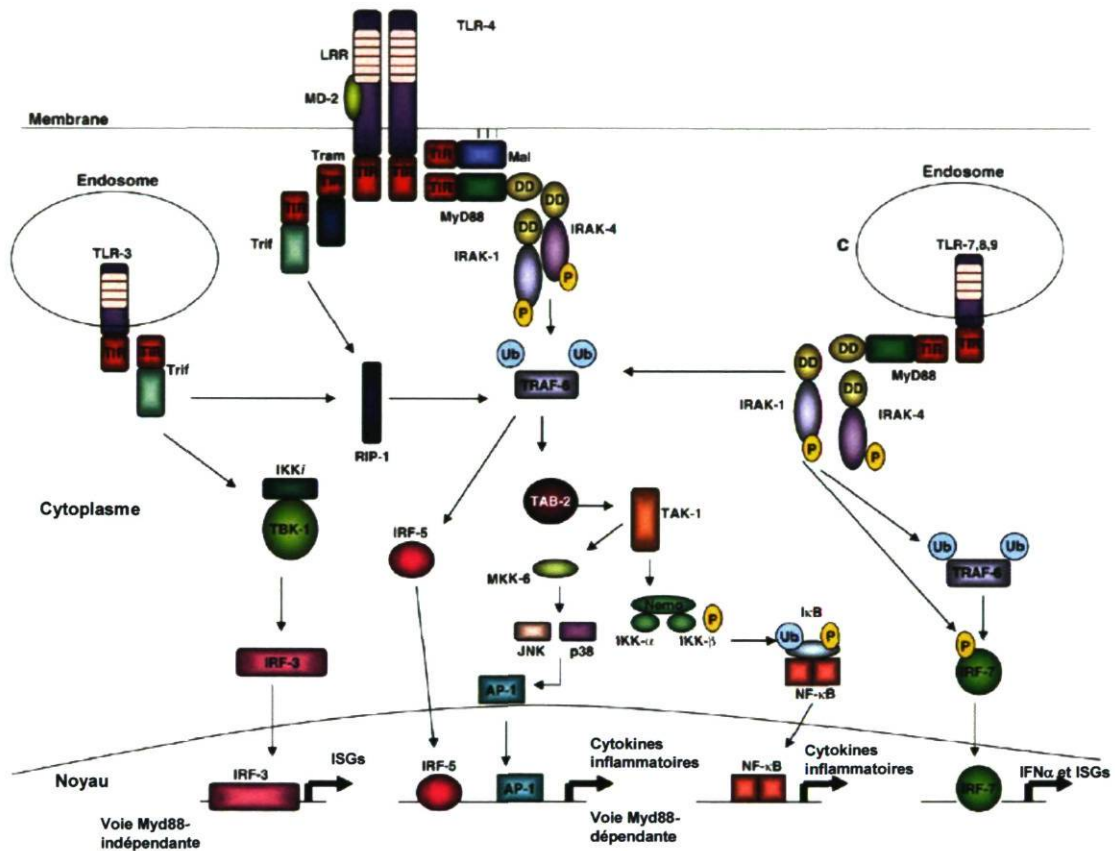
#### Voie MyD88-dépendante

La voie dépendante de MyD88 recrute en premier lieu les kinases associées au récepteur IL-1 (IRAK1/4) pour ensuite recruter TRAF6 et TAK1 (en anglais, *TGF-beta Activated Kinase 1*) [423, 452-456]. TAK1 phosphoryle ensuite le complexe NEMO/IKKα/β qui conduit à l'activation de NFκB. Par ailleurs, plusieurs IRFs sont aussi recrutés au complexe multimoléculaire contenant MyD88 et TRAF6. Par exemple, MyD88, IRAK1/4 et TRAF6 sont directement associés avec IRF7 [405, 457-460]. Plus précisément, IRAK1 doit être associé à MyD88 via le domaine TIR pour permettre l'activation d'IRF7. Par ailleurs, une étude récente a montré qu'IKKα est essentielle pour l'activation d'IRF7 [402]. IRF5 et IRF1 sont également activés par la voie dépendante de MyD88 [461, 462].

#### Voie Myd88-indépendante



L'adaptateur essentiel dans la voie Myd88-indépendante est TRIF [463, 464]. TRIF forme des complexes avec TBK1, IKK $\epsilon$  et IRF3. Ces interactions résultent en la phosphorylation d'IRF3 par TBK1 et IKK $\epsilon$ . IRF5 et IRF7 sont également activés par TRIF induisant la production de cytokines inflammatoires.



**Figure 12. Principales voies de signalisation des TLR.** (Adaptée de [465])

### 3.3-1.3. Facteurs de transcription des gènes *Ifn*

L'induction de la transcription des gènes *Ifn* de type I est principalement contrôlée par les facteurs de transcription NFκB, IRF3 et IRF7. Dans son état d'inactivation NFκB est maintenu dans le cytosol par les membres de la famille d'inhibiteur κB (IκB). Lors de la

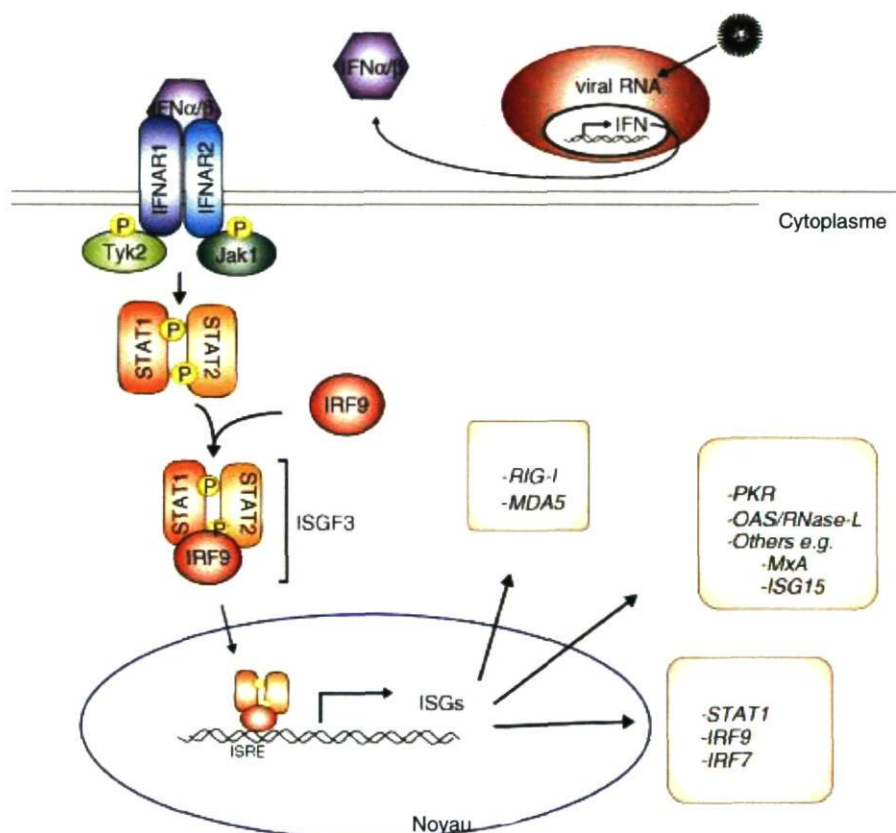
présence d'un virus, IKK est activée et phosphoryle I $\kappa$ B, lequel est subséquentement ubiquitiné et dégradé dans le protéasome. NF $\kappa$ B libre migre dans le noyau, où il augmente la transcription des gènes cibles. Comme NF $\kappa$ B, la forme inactive d'IRF3 est cytosolique. En réponse à une infection virale, IRF3 est phosphorylé par 2 kinases similaires à IKK : TBK1 et IKK $\epsilon$ . La phosphorylation d'IRF3 mène à sa dimérisation et sa translocation dans le noyau [442, 443]. IRF7 est exprimé à un faible niveau dans la plupart des cellules. Il est aussi phosphorylé par TBK1 et IKK $\epsilon$  ainsi qu'IKK $\alpha$  [466]. IRF3 et IRF7 contiennent un domaine d'autoinhibition qui supprime leur activité transcriptionnelle [398, 467-469]. La phosphorylation active les IRFs en déclenchant des changements de conformation qui modifient le segment C-terminal ce qui lui attribue un rôle d'inhibition à un rôle de dimérisation [383, 397]. La dimérisation des IRFs est l'étape clé pour l'activation. Il peut y avoir homo- ou hétérodimérisation entre IRF3 et IRF7 et ces interactions essentielles à la stimulation de la transcription des gènes *Ifn* [398, 470]. L'induction des gènes *Ifn* est distincte selon la dimérisation des IRFs [398, 471]. NF $\kappa$ B, IRF3, IRF7 et des protéines nucléaires s'assemblent en un complexe dans le noyau qui remodèle la chromatine dans les promoteurs des gènes *Ifn*, résultant en l'augmentation de l'initiation de la transcription.

### 3.4- RÉPONSES AUX INTERFÉRONES

#### 3.4-1. Voie de signalisation induite par les IFNs

Les IFNs de Type I lient les mêmes récepteurs des IFNs (*IFN $\alpha$ / $\beta$  Receptor* ou IFNAR) à la surface cellulaire. Ces récepteurs comprennent deux unités transmembranaires : IFNAR1 et IFNAR2 [472-474]. La liaison du ligand engendre l'activation de différentes molécules de signalisation impliquées dans la voie JAK/STAT (figure 13) [472]. La liaison aux récepteurs spécifiques active JAK1 et la tyrosine kinase 2 (TYK2) par la phosphorylation d'un résidu tyrosine. Les kinases activées induisent la formation du facteur de transcription

ISGF3 (en anglais, *IFN-Stimulated Gene Factor 3*), lui-même composé de deux éléments, ISGF3 $\alpha$  et ISGF3 $\gamma$ . ISGF3 $\alpha$  est formé de deux peptides cytoplasmiques, STAT1 et STAT2. ISGF3 $\gamma$  est un membre de la famille des IRFs, aussi nommé IRF9. La protéine IRF9 a un domaine conservé de liaison à l'ADN et un domaine liant STAT. Lorsque activé, ISGF3 se lie à un ISRE sur le promoteur d'ISGs pour réguler la transcription génique [475, 476].



**Figure 13. Voie de signalisation JAK/STAT.** (Adaptée de [477])

Les résidus tyrosine phosphorylés des protéines JAK activées servent comme sites d'accostage pour STAT1 et STAT2, lesquels seront phosphorylés sur un résidu tyrosine par les protéines JAK [478]. La phosphorylation de STAT1 et STAT2 induit leur relâchement



et leur dimérisation. Les hétérodimères STAT1-STAT2 migrent alors au noyau pour former le complexe ISGF3 avec IRF9. Par la suite, ISGF3 interagit directement avec l'ISRE. Les ISGs peuvent contenir une ou plusieurs séquences ISRE dans leur promoteur [478].

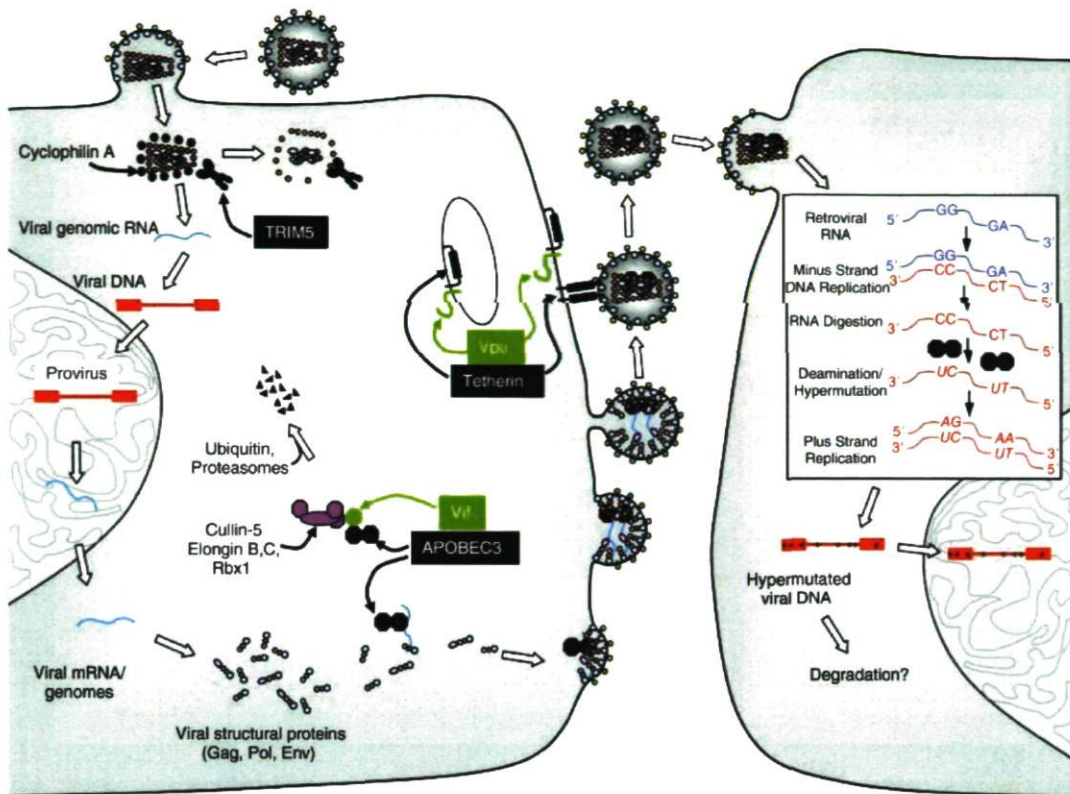
L'activation de ce signal conduit à l'augmentation de l'expression génique, incluant les gènes des protéines antivirales comme les 2'-5' oligoadénylates synthétases (OAS), les protéines Myxovirus (Mx) et PKR qui protègent la cellule d'une infection virale [479-481]. En fait, une multitude de gènes sont exprimés en réponse aux IFNs, dont plusieurs pour lesquels leurs rôles restent à être déterminés.

La différence de l'affinité aux récepteurs IFNAR entre les IFNs de type I pourrait expliquer la diversité des signaux générés par les différents IFNs [482]. Notamment, il est évident que les IFN- $\alpha$  forment un complexe de signalisation avec IFNAR distinct d'avec IFN- $\beta$  [483-487].

### 3.5- VIH

#### 3.5-1. IFNs et VIH

L'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$  inhibent directement les infections par le VIH *in vitro* [488-490]. Parmi les IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\alpha$ 2 est l'inhibiteur de la réplication du VIH-1 le plus fort et l'IFN- $\alpha$ 1 est le plus faible [491]. L'interférence des IFNs avec la réplication virale est médiée par les ISGs [492, 493]. Trois facteurs de restriction ayant le potentiel d'inhiber la réplication du VIH-1 ont été identifiés et sont énormément étudiés [494-496] (figure 14). Ces facteurs de restriction sont exprimés constitutivement dans certaines cellules, mais peuvent être induits par les IFNs de type I chez les autres. Parmi ces facteurs, il y a APOBEC (en anglais, *Apolipoprotein B Editing Complex Catalytic Subunit*), TRIM5 $\alpha$  (en anglais, *Tripartite motif TRIM protein- $\alpha$* ) et BST-2 (en anglais, *Bone marrow Stromal Antigen 2*).



**Figure 14. Facteurs de restriction du VIH-1[497].**

### 3.5-1.1. Famille APOBEC3

Le premier gène cellulaire identifié comme un inhibiteur de la réplication du VIH-1 encode une cytidine déaminase nommée APOBEC [498]. Par la suite, plusieurs membres de la famille APOBEC3 ayant des effets inhibiteurs sur le VIH-1 et d'autres rétrovirus ont été découverts [498-502]. D'intenses efforts ont mené à la connaissance de certains aspects du mécanisme par lequel ces enzymes inhibent la réplication du VIH-1. Plus spécifiquement,

les protéines APOBEC3 peuvent être incorporées à l'intérieur des particules du VIH-1 [503-507] par des interactions avec l'ARN et conduire à une nouvelle cellule cible par le virion. En général, APOBEC3 induit des hypermutations (mutations faux-sens et non-sens) dans l'ADN rétroviral qui peuvent être létales pour un rétrovirus. Les différentes enzymes APOBEC3 exhibent différents degrés d'activité antivirale. APOBEC3G est celui qui est le plus actif contre les rétrovirus [499, 508, 509].

### 3.5-1.2. TRIM5 $\alpha$

L'identification de TRIM5 $\alpha$  comme la protéine responsable de la résistance cellulaire au VIH-1 [496] a mené à plusieurs études sur la compréhension du mécanisme d'action. Cependant, plusieurs difficultés techniques dans l'étude des étapes particulières du cycle viral ciblées par TRIM5 $\alpha$  ont mené au développement de nouvelles méthodes d'analyse et font en sorte que plusieurs aspects du fonctionnement de cette protéine restent encore incompris. Des études ont démontré que le domaine C-terminal de TRIM5 $\alpha$  reconnaît la capsid virale [510, 511]. Les événements moléculaires qui mènent à l'inactivation des virus ne sont pas bien connus, mais il semble qu'une lésion irréversible et létale se produit dans la capsid virale, à l'intérieur de quelques minutes à la suite de l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible [512]. TRIM5 $\alpha$  induirait le désassemblage prématuré du virus et l'inhibition de la synthèse de l'ADNv. Cependant, des études utilisant des inhibiteurs de protéasome préviennent la synthèse de l'ADN par TRIM5 $\alpha$ , mais ne renversent pas l'inhibition de l'infection par cette protéine [513, 514]. Ces observations suggèrent que le mécanisme essentiel bloquant l'infection n'est pas encore connu et n'est pas un mécanisme simple. Cependant, il peut y avoir sélection de mutants du VIH-1 qui permettent à celui-ci d'échapper à l'inhibition par TRIM5 $\alpha$  pendant l'infection [515, 516].

### 3.5-1.3. BST-2



De récents travaux ont identifié une protéine antivirale utilisant un nouveau mécanisme qui inhibe la sortie des particules du VIH-1 des cellules infectées [494, 517]. BST-2, aussi nommée théterine, induit la formation et est peut-être un composant des protéines qui causent la rétention des particules virales à la surface cellulaire. Les particules virales retenues sont complètement formées et matures [518]. BST-2 semble agir après la formation de la particule virale et prévient la dissémination en liant la membrane cellulaire et le virion. Subséquemment, les virions retenus peuvent être réinternalisés dans la cellule infectée et ciblés par les endosomes où ils sont gardés ou détruits par des lysosomes [518]. Une observation commune chez les cellules primaires, particulièrement chez les macrophages et les cellules T CD4+, est que l'IFN- $\alpha$  bloque la sortie du virus et induit l'accumulation de cellules associés aux virions [489, 519-522]. Nous savons maintenant, que cet effet est dû à l'induction de BST-2 [494, 523]. Cependant, BST-2 contient plusieurs résidus rendant la protéine sensible à Vpu [524-527].

### **3.5-2. IRFs et VIH**

#### **3.5-2.1. IRF1**

La séquence génomique du VIH-1 homologue à ISRE est un site de liaison aux IRFs, en particulier IRF1 et IRF2 [528, 529]. IRF1 est induit très tôt suivant une infection par le VIH-1 et avant la production de Tat [529]. Lors d'une infection, il y a liaison d'IRF1 à la séquence cible sur le LTR du VIH-1 qui résulte en l'activation de la transcription du LTR du VIH-1 conduisant à l'activation de la transcription de Tat. En retour, Tat amplifie l'expression génique dirigée par le LTR. IRF1 se lie aussi à Tat et coopère avec le transactivateur viral pour activer la transcription. IRF1 peut donc moduler l'activité du promoteur LTR du VIH-1 en agissant aussi comme un pont entre Tat et les composants de la machinerie transcriptionnelle de la cellule (Cyclin T1 et CDK9 (en anglais, *Cyclin-*

*Dependant Kinase 9*) [530]. Un rôle durant la réactivation virale lors de la latence a aussi été proposé [531].

### 3.5-2.2. IRF2

Le rôle d'IRF2 associé à sa liaison au LTR du VIH-1 n'est pas établi. Étonnamment, la surexpression d'IRF2 n'interagit pas avec l'effet positif d'IRF1 sur le LTR [529]. Il a même été montré qu'il y avait une augmentation de l'expression d'IRF2 spécifique à l'augmentation de certains gènes impliqués dans la régulation positive du VIH-1 [532]. En lien avec ces résultats, l'augmentation constitutive d'IRF2 dans des cellules T Jurkat augmente la réplication du VIH-1 [386]. Ce qui porte à croire qu'IRF2 pourrait agir comme un agoniste plutôt que comme un antagoniste d'IRF1 dans le contexte du LTR du VIH-1.

### 3.5-2.3. IRF3

Récemment, des études ont montré que l'infection par le VIH-1 n'active pas IRF3, mais diminue son niveau d'expression chez différents types cellulaires [533, 534]. Par ailleurs, ces mêmes résultats ont été observés au niveau du système nerveux central où IRF3 dirige une réponse antivirale contrôlant la réplication du VIH-1 dans les microglies, mais que le niveau d'IRF3 est diminué par le virus, lui permettant d'échapper au système de défense [535]. Plus précisément, la dégradation d'IRF3 semblerait associée à son ubiquitination médiée par Vif et Vpr et serait indépendante de l'activation d'IRF3 [533].

### 3.5-2.4. IRF7

L'infection par le VIH-1 dans les macrophages augmente l'expression d'IRF7 [418]. L'expression de la protéine Tat peut à elle seule augmenter l'expression d'IRF7 chez les CD4<sup>+</sup> [536]. Son rôle dans l'infection du VIH-1 demeure cependant inconnu et fait l'objet de notre étude présentée au chapitre VI et VII. En effet, nous démontrons qu'IRF7 contribue positivement à la réplication virale du VIH-1 dans les macrophages primaires. Récemment, il a été montré que la diminution de l'expression génique d'IRF7 diminuait l'expression de TRAIL (en anglais, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) [418]. TRAIL participe à la pathogénèse du VIH-1 en étant impliqué dans la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des macrophages.

#### 3.5-2.5. IRF8

En plus d'activer l'expression génique et la réplication du VIH, le système des IFNs peut réprimer spécifiquement l'expression du VIH-1. Un autre membre de la famille des IRFs, IRF8, peut réduire drastiquement la réplication du VIH-1 *in vivo* [529]. En fait, il a été montré qu'un excès d'IRF8 se liant à IRF1 peut inhiber l'induction de la transcription du LTR par IRF1 ainsi que la liaison à Tat. Ces données suggèrent qu'une augmentation d'IRF8 pourrait être impliquée dans l'établissement de la latence.



## CHAPITRE IV- HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

### 4.1- Hypothèses de recherche

Des effets différents sur la prolifération et l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> entre la souche X4 et R5 du VIH-1 ont été reportés [336]. Par ailleurs, une étude a montré une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non-stimulés lorsque les cellules sont infectées par le virus R5 comparativement au virus X4. Ces résultats suggèrent que les virus R5 persistent plus longtemps en début d'infection grâce à leur capacité à établir un état d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui favorise la réplication du VIH-1 [336]. En se basant sur ces données nous avons formulé l'hypothèse suivante :

Est-ce que le virus R5 module des voies de signalisation dans lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non-stimulés apportant une rationnelle dans la réplication préférentielle du virus R5 comparativement au virus X4 après la transmission du virus? Si oui, quels sont les facteurs impliqués dans ces voies?

L'infection par le VIH initie une réponse immunitaire antivirale en induisant les IFNs de type I [537, 538]. Le traitement des macrophages primaires humains *in vitro* avec les IFNs de type I avant l'infection par le VIH-1, inhibe la réplication virale, ce qui suggère que des facteurs inhibiteurs sont présents [519, 539]. En effet, les IFNs de type I augmentent la réplication d'ISGs ayant des effets inhibiteurs sur la réplication [492, 494, 496, 540-545]. Ultimement, les réponses du système immunitaire innée *in vivo* échouent à protéger complètement l'hôte même si les gènes de défense de l'hôte sont exprimés. Récemment,

des ISGs positivement associés à la réplication du VIH-1 ont été identifiés dans les ganglions lymphatiques [546]. Ces données ont apporté l'hypothèse suivante :

Est-ce que le VIH-1 peut moduler la réponse IFN à son avantage en augmentant des facteurs cellulaires contribuant à sa réplication et en diminuant des facteurs l'inhibant? Si oui, quels sont ces facteurs et par quels mécanismes ces facteurs augmentent la réplication virale?

## 4.2- Objectifs de recherche

La compréhension et l'identification de facteurs modulés par le VIH-1 dans les cellules cibles (lymphocytes T CD4+ et macrophages) constituent les objectifs principaux de ce projet. Deux objectifs spécifiques ont été établis afin d'atteindre le but fixé :

**Objectif 1 :** Déterminer l'effet sur l'expression génique de l'exposition des lymphocytes T CD4+ non-stimulés aux virions complets X4 et R5 et identifier les facteurs différenciellement modulés par les deux virus.

**Objectif 2 :** Identifier des facteurs appartenant à la réponse IFN qui sont modulés lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 et déterminer par quels mécanismes ils contribuent à la réplication virale.

### 4.3- Aperçu des résultats

Les premiers résultats obtenus nous ont permis d'identifier des voies de signalisation modulées plus fortement par le virus R5 que le virus X4 dans les lymphocytes T CD4+ non-stimulés. En effet, le virus R5 module la signalisation du RCT et l'organisation de l'actine impliquant le complexe WAVE/ABI et ARP2/3. Ces deux voies sont importantes dans l'activation cellulaire et rendent les cellules plus permissives à la stimulation par le RCT. Le chapitre V présente l'article décrivant ses résultats.

En deuxième lieu, nous avons montré la modulation de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la voie IFN lors d'une infection par le VIH-1 des macrophages prétraités avec un IFN de type I, l'IFN $\alpha$ 2. En effet, la réponse IFN augmente l'expression de TRAF6, mais l'infection des macrophages par le VIH-1 diminue son expression. Par ailleurs, la diminution de l'expression de TRAF6 dans des macrophages infectés par le VIH-1 augmente la réplication virale en concomitance avec l'augmentation de l'expression d'IRF7. Nous avons montré l'implication d'IRF7 dans la réplication virale; la surexpression d'IRF7 augmente la réplication virale, tandis que la répression de la transcription d'*IRF7* diminue la réplication virale du VIH-1 dans les macrophages. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article au chapitre VI.

Finalement, nous avons identifié des promoteurs distincts sur lesquels se lie directement ou indirectement IRF7 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1. Parmi ceux-ci, nous avons identifié le promoteur du gène CARM1 (en anglais, *Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1*). Par ailleurs, la transcription de CARM1 est augmentée lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 et cela en association avec l'expression d'IRF7. En dernier lieu, nous avons déterminé de façon préliminaire, l'effet de l'expression de CARM1 sur la réplication virale. Lorsque l'on diminue l'expression de CARM1 nous avons constaté l'augmentation de l'expression virale du VIH-1 dans les macrophages. Le chapitre VII présente les résultats de ce projet.



## **CHAPITRE V- Modulation différentielle de l'expression génique des cellules T CD4+ naïves par les virus X4 et R5.**

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans la revue « *AIDS Research and Human retroviruses* » (2006 Nov; 50(11) : 3889-92) et est composé de la version finale telle que publiée.

### **5.1- Résumé**

Des différences dans le phénotype sont observés lors d'une infection par le VIH-1 entre les souches X4 et R5 selon la pathogénèse et le tropisme. Dans cette étude, nous avons enregistré les changements temporels de l'expression génique du transcriptome humain complet, représentant 47 000 transcrits, suivant l'exposition des cellules T CD4+ naïves aux souches X4 et R5 dans les premiers 24 heures. Nous montrons que les virus R5 modulent, de façon plus importante que les virus X4, le niveau d'ARNm des cellules T CD4+ naïves. En fait, la modulation de la signalisation du RCT et l'organisation de l'actine impliquant le complexe WAVE/ABI et ARP2/3 apparaissent être associées à l'exposition au virus R5. Les données suggèrent que l'habilité du virus R5 à moduler la polymérisation de l'actine et la signalisation via le RCT crée un environnement favorable pour l'activation des cellules T CD4+ à la suite de la stimulation du RCT. Ceci pourrait expliquer pourquoi R5 est la principale souche observée tôt dans le processus d'une infection naturelle.

## 5.2- Article

### **R5 and X4 HIV Viruses Differentially Modulate Host Gene Expression in Resting CD4<sup>+</sup> T Cells.**

**Mélissa Sirois<sup>1</sup>, Lynda Robitaille<sup>1</sup>, Roman Sasik<sup>2</sup>, Jérôme Estaquier<sup>3</sup>, Jessyka Fortin<sup>1</sup>  
and Jacques Corbeil<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Infectious Disease Research Center  
CHUL Research Center and Laval University  
2705, Boul. Laurier, Québec, Canada, G1V 4G2

<sup>2</sup>Biogem Facility  
University of California, San Diego (UCSD)  
La Jolla, CA, 92093

<sup>3</sup>Unité de Physiopathologie des Infections Lentivirales, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux,  
75724 Paris cedex 15, France

All correspondence to:

Mélissa Sirois  
CHUL Research Center  
2705, Boul. Laurier  
Québec, Canada  
G1V 4G2  
Tel: (418) 654-2296  
Fax: (418) 654-2743  
Email: melissa.sirois@crchul.ulaval.ca

**Running Title:** HIV R5 and host gene expression induction in CD4<sup>+</sup> T cells.

**Submitted pages:** text pages, tables, figures and supplemental data.

**ABSTRACT**

During HIV-1 infection, distinct biological phenotypes are observed between R5 and X4 HIV-1 strains with respect to pathogenicity and tropism. In this study, temporal changes of the expression levels of the complete human transcriptome, representing 47,000 well-characterized human transcripts were monitored in the first 24 hours during HIV-1 R5 and X4 exposition in resting primary CD4<sup>+</sup> T cells. We provide evidence that R5 viruses modulate, to a greater extent than X4 viruses, the level of mRNA of the resting CD4<sup>+</sup> T cells. Indeed, modulation of the TCR signaling and the actin organization involving the WAVE/ABI complex and the ARP2/3 complex appeared associated with R5-exposition. The data suggest that the ability for R5 viruses to modulate the TCR-mediated actin polymerization and signaling create a favorable environment for CD4<sup>+</sup> T cell activation after TCR stimulation and may partly explain why R5 is the primary strain observed early in the natural infection process.



## INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains differ in terms of their usage of chemokine receptors for entry into CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>1</sup> The two main viral coreceptors, CXCR4 and CCR5 are used respectively by X4 and R5 HIV-1 strains.<sup>2-3</sup> Numerous reports have shown the presence of the R5 strains at the early stage of infection and the presence of X4 strains prior and during the rapid progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).<sup>4-7</sup>

During HIV-1 infection, a severe depletion of the CD4<sup>+</sup> T cells represents a hallmark of AIDS. Several studies have highlighted that CD4<sup>+</sup> T cell declines are differently modulated depending on the virus phenotype.<sup>8-11</sup> In a study involving 325 patients demonstrated the direct correlation between the CD4<sup>+</sup> T declines and the X4-infection effects (syncytia and cell death). Richman and collaborators showed that X4-infection had a 5 times greater CD4<sup>+</sup> T cell declines annually than patients with predominantly R5-infection.<sup>12</sup>

Differential effects of R5 and X4 strains on CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and activation have been reported by quantifying cell-surface expression phenotypic markers of activation (e.g. CD25, CD71 and HLA-DR) and cellular proliferation assessment using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation and nuclear expression of Ki67.<sup>13</sup> Interestingly, Locher and collaborators found that HIV infection of stimulated CD4<sup>+</sup> T cells by both strains caused decreases in cellular proliferation and activation. However, in R5-infected unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells, an increase in cell activation occurred in comparison to X4-infected unstimulated CD4<sup>+</sup> T

cells suggesting that R5 isolates may persist longer by enabling the infected CD4<sup>+</sup> T cells to maintain a higher threshold of activation and proliferation that promotes HIV-1 replication. In this regard, it has been established that cellular activation triggered by R5-infection induces signalization that increased transcription factor binding to the HIV-1 promoter region.<sup>14-16</sup>

The effects of HIV-1 on cellular transcription have been determined using gene profiling experiments.<sup>17-21</sup> In one of these studies, Cicala and collaborators incubated resting peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with envelope proteins from R5 and X4 viruses to compare the envelope-mediated signaling of both strains.<sup>21</sup> R5 envelopes, to a greater extent than X4 envelopes, up-regulated the expression of genes belonging to mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways and genes regulating the cell cycle.

To determine the effect in the context of complete virions, we have analyzed the differences in gene expression in resting primary CD4<sup>+</sup> T cells exposed to HIV<sub>BAL</sub> and HIV<sub>NL4-3</sub> viruses. To this end, we inoculated freshly isolated unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells with these two HIV-1 strains (X4 and R5) to study the early events occurring in the infection process. Here is the first report analyzing the temporal changes of the expression levels of the complete human transcriptome during the first 24 hours following inoculation. This approach has allowed us to identify cellular pathways that could provide a rationale for the preferred replication of R5 viruses after viral transmission. We demonstrate that R5 viruses modulate transcription, to a greater extent than X4 viruses, in resting CD4<sup>+</sup> T cells.

Indeed, modulation of the TCR signaling and the actin organization involving the WAVE/ABI complex and the ARP2/3 complex, important in early activation, appears to be enhanced by R5 virus contact. The characterization of differences in phenotypes between both viruses will enhance our understanding of the pathogenesis and may assist therapy.



## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture and virus infection*

PBMCs were recovered from whole blood by gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque (Wisent Inc., St-Bruno, Canada). CD4<sup>+</sup> T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection, according to the manufacturer's instructions (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada). The purified cells were >99% CD4<sup>+</sup> T cells. Virus stocks were produced by transfection of 293T cells with pBal and pNL4-3 by the calcium phosphate coprecipitation method.<sup>22</sup> Supernatants from transfected cells were clarified by filtration through 0.45- $\mu$ m syringe filters and were ultracentrifuged. Viruses were purified with the OptiPrep velocity gradient method (Axis-Shield PoC, Oslo, Norway). This methodology precludes having secreted products in the viral preparations. Virus preparations were normalized for virion content using an in-house enzymatic assay specific for the viral p24 protein.<sup>23</sup> Purified primary CD4<sup>+</sup> T cells were inoculated with either X4 (NL4-3) or R5 (Bal) strain of HIV-1 at 10 ng/ml of p24. Mock-infected cells were used for control. Aliquots of cells ( $10^7$  cells) were taken at 4, 8, 16 and 24 hrs after inoculation. Cells were centrifuged and the pellet was resuspended in 1 ml of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at -80°C.

### *RNA isolation, labeling, and array hybridization*

Total RNA was isolated for each condition and time point using the TRIzol method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then digested with deoxyribonuclease to remove any contaminating genomic DNA (Turbo DNA-free, Ambion, Austin, TX). RNA quantity and quality was assessed using an Agilent

Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent, Mountain View, CA). Equal amounts of total RNA were used as template for RT reactions to generate double-stranded cDNA for subsequent oligonucleotide array analysis (U133v2 GeneChips, Affymetrix, Santa Clara, CA) for 2 independent donors.

*Oligonucleotide array gene expression analysis in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to HIV*

Statistical analysis of our microarray experiment proceeds in three steps: 1) low-level analysis of raw data and normalization using our free academic software *Corgon*,<sup>24-25</sup> 2) we calculated the absolute and relative changes (with respect to control) of the expression levels for every gene at every time point, and sorted the genes based on their level of modulation and statistical significance,<sup>26</sup> and 3) statistical analysis of pathways utilization (Biocarta (<http://www.biocarta.com>) and in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>).

*Real-Time RT-PCR Quantification for mRNA of HIV inoculated CD4<sup>+</sup> T cells*

Complementary DNA (cDNA) was generated from 40 ng of total RNA using a random primer hexamer following the protocol for Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Equal amounts of cDNA were run in triplicate and amplified in a 15  $\mu$ l reaction containing 7.5  $\mu$ l of 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 10nM of Z-tailed forward primer, 100nM of reverse primer, 100nM of Amplifluor Uniprimer probe (Chemicon, Temecula, CA), and 2  $\mu$ l of DNA target.<sup>27</sup> Moreover, no-template controls were used as an additional control. The mixture was incubated at 50°C for 2 min, at 95°C for 4 min, and then cycled at 95°C for 15 sec and at 55°C for 40 sec 55 times using the

Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System. Amplification efficiencies were validated and normalized to ribosomal 18S and quantity of target gene was calculated according to a standard curve. Primers were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and their sequence data are in table 1. Amplicons were detected using the Amplifluor UniPrimer system where forward primers used contained a 5' extra sequence: ACTGAACCTGACCGTACA.

*Multiplex analysis for protein phosphorylation in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to HIV.*

Detection of changes in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase 1/2 (ERK/MAP kinase 1/2) (Thr185/Tyr187), and a phosphorylated tyrosine residue on CD3 epsilon chain (CD3E), lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase (LCK), zeta-chain-associated protein kinase (ZAP-70) and linker for activation of T cells (LAT) was performed on total cell lysate (20 µg) of two donors with the beadlyte 7-plex T Cell Receptor Signaling kit according to the manufacturer's protocol (Millipore, Billerica, MA). The median fluorescence intensity (MFI) was measured with the Luminex<sup>100</sup> system.

*Immunoblots for protein expression of HIV inoculated CD4<sup>+</sup> T cells.*

Immunoblot assays were performed on total cell lysates. Proteins were isolated for each condition using the TRIzol method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cell extracts (30 µg per lane) were resolved by SDS-PAGE on 4-12% gels and transferred on PVDF membranes. The indicated antibodies LCK (3A5) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), CD3E (FL-207) (Santa Cruz Biotechnology), Wasp



family, verprolin homology domain containing protein 2 (WAVE2) (D-16) (Santa Cruz Biotechnology), actin-related protein 2/3 complex (ARP2/3) (H-17) (Santa Cruz Biotechnology), and  $\beta$ -actin (A-13) (SIGMA, Saint-Louis, MO) were visualized by alkaline phosphatase-based enhanced chemiluminescence. The densitometry of the bands were compared after normalization with  $\beta$ -actin.

*Flow cytometry for cell-surface protein expression of HIV inoculated CD4<sup>+</sup> T cells.*

To characterize the differential expression of activation marker on HIV-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells, one-colour flow-cytometry was employed by using EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) gating on 10 000 events. Cell-surface antigen was characterized by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mAb specific for CD25 (clone 2A3) (Becton Dickinson, San Jose, CA) 24 hours after TCR stimulation of the HIV-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells. Unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells were exposed 24 hours to R5 and X4 viruses before treatment with 0,01  $\mu$ g/ml of anti-CD3 (clone OKT3).<sup>28</sup> Anti-IgG1-FITC (clone W3/25) (AbD Serotec, Raleigh, NC) was used like isotypic control. Acquisition of events was selected only on viable cells.

## RESULTS

### *Inoculation of R5 viruses modulated a greater number of transcripts than X4 in resting CD4<sup>+</sup> T cells*

To study the early stage of infection, modulation of gene expression in resting CD4<sup>+</sup> T cells was measured at 4, 8, 16 and 24 hours after HIV-1 inoculation for two independent donors using high-density oligonucleotide microarrays (U133v2 GeneChip). Identification of the most modulated genes was ascertained by sorting significantly up- or downregulated genes by maximum fold change in both conditions. This analysis demonstrated a significant up-regulation in R5 virus-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells when compared to those inoculated with X4 viruses. The biggest difference in gene expression between R5- and X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells occurred at 24 hours post-inoculation. 506 genes were up-regulated over the control in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 compared to 379 genes in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to X4. These observations are consistent with gene expression profiles obtained by Cicala and collaborators from resting CD4<sup>+</sup> T cells population of HIV-infected individuals (HIV-1 R5 are usually in majority in early stage infection). This points to a number of genes induced by R5 viruses in PBMCs, but not X4, that are up-regulated in infected CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>21</sup> We observed the same enriched biological categories associated with genes induced by three different R5 and two different X4 gp120s (cell proliferation, cell cycle and transcription factors) reported by Cicala and collaborators, it suggest that our results are representative of other X4- or R5-tropic viruses.

*T Cell Receptor (TCR) signaling and actin organization are pathways modulated by R5*

To better understand the differences on cellular signaling between both viruses, we searched for genes that are significantly modulated in specific pathways. We obtained 65 significant pathways that involved genes differentially modulated by X4 and R5 strains. Table 2 show the most significant pathways ( $P < 0.01$ ) associated with genes modulated differentially by either R5 or X4 HIV-1 strains. Close examination indicated that most of these pathways are related to the TCR signaling and actin organization. In fact, 79 genes were strongly associated with initiation of TCR activation ( $p=0.00056$ ) (Fig.1) including LCK and FYN tyrosine kinase (FYN). In addition, 13 genes were significantly associated with the regulation of actin organization and cell migration ( $p=0.00068$ ). It is known that polymerization of actin after TCR stimulation is necessary for transcription and proliferation of T cell signaling.<sup>29-31</sup> Genes in both pathways were modulated by R5 to a greater extent than X4 prototypical viruses. These data suggest the ability of R5 viruses to promote the polymerization of actin for T cell activation during exposition of CD4<sup>+</sup> T cells a condition that would favor HIV replication.

*Expression levels of differentially modulated genes by real-time quantitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

To validate the gene modulation of X4 and R5 strains on gene expression of the CD4<sup>+</sup> T cells, we evaluated three independent donors under the same conditions. The gene expression of specific genes identified previously was assessed using real-time quantitative RT-PCR (Fig.2). We examined, a number of genes associated with the initiation of TCR activation (FYN, CD45, LCK, PI3 kinase, CD3E and phospholipase C (PLC)) and associated with actin organization (ABL interactor 2 (ABI2), p21/CDC42/RAC-1 activated



kinase1 (PAK1), ARP2/3 and WAVE2). The greatest differences in gene expression between R5- and X4- inoculated cells occurred at the later time point (24 hrs). Figure 2 illustrates that a number of signaling genes tended to be up-regulated to a greater extent in CD4<sup>+</sup> T cells by the R5 strain as compared to the X4 strain to the point that a few were even down-regulated in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to X4 viruses (FYN, CD45, ABI2 and CD3E).

*R5 and X4 viruses differentially modulate proteins of the TCR signaling and actin organization*

TCR engagement initiates signaling cascades in CD4<sup>+</sup> T cells. To examine the activation of those proteins involved in TCR signaling, we analyzed changes in phosphorylated Erk/MAP kinase 1/2 (Thr185/Tyr187), and phosphorylated tyrosine residues on CD3E, LCK, ZAP-70 and LAT of total protein lysates of R5- and X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells, 24 hours post-infection. Figure 3 represents the fold increase of these proteins in inoculated CD4<sup>+</sup> T cells of two donors as compared to the controls (mock-infected CD4<sup>+</sup> T cells of the same donor). These data show small or no differences in protein activation status between R5- and X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells. To demonstrate the modulation of the quantity of proteins involved in actin organization and TCR activation we performed a western blot for four proteins involved in TCR signaling or actin organization. We used total protein lysates of R5- and X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells for two donors. We compared the expression level of LCK (56 kDa), CD3E (23kDa), WAVE2 (84kDa) and ARP2/3 (34kDa) in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 and X4 viruses. Each protein band was normalized using  $\beta$ -actin (45 kDa) and quantified by densitometry. The ratio of

the normalized expression level for proteins in R5-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells over X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells is presented in figure 4 where LCK is upregulated by 1,72 fold, CD3E by 1,40 fold, WAVE2 by 3,04 and ARP2/3 by 2,10 fold. These results shows there is no difference in the activation status of the protein but there is a difference in the production of the protein involved in TCR activation and actin organization between the CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 compared to CD4<sup>+</sup> T cells exposed to X4.

*Cell activation after TCR stimulation is increased in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 viruses*

To determine if the modulation of the protein level in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 viruses has an effect on CD4<sup>+</sup> T cells activation after TCR stimulation, we quantify by FACS the expression level of the activation marker CD25 on the cell surface after TCR stimulation. We treated unstimulated CD4<sup>+</sup> T with an antibody anti-CD3 (clone OKT3), 24 hours post-inoculation of cells with R5 and X4 strain. Figure 5 represents the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CD25 on their surface. These percentages show an increase in the CD25 expression in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 viruses. Furthermore, the mean of intensity for CD25 is significantly superior in CD4<sup>+</sup> T cells inoculated by R5 strain than by X4 strain ( $p \leq 0.05$ ) (data not show). These data suggest an advantage of activation for unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells exposed to R5 before TCR stimulation.

## DISCUSSION

The present study demonstrates that R5 HIV-1 strain up-regulated a larger number of host genes associated with T cell activation than X4 strain, during the first 24 hours. This finding was corroborated by a complete analysis of the human transcriptome in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells. These changes induced by R5-inoculated unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells are significantly associated with 65 pathways. Our results show that R5 and X4 strains induced distinct gene expression profiles in primary resting CD4<sup>+</sup> T cells. Consistent with our results, Cicala and collaborators demonstrated that R5 and X4 gp120s modulated differentially transcription factors and cell cycle genes in PBMCs. Furthermore, of the 326 genes specifically up-regulated in the resting CD4<sup>+</sup> T cell population derived from viremic individuals, 47 were shared with the set of genes modulated exclusively by R5 envelopes in PBMCs.<sup>21</sup>

The interaction between the viral surface and their receptor and co-receptor is essential to triggers membrane fusion. It is known that Nef localizes to the immunological synapse (IS) and modulates TCR signaling events in activated CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>32</sup> The polymerization of actin is critical for TCR clustering and the IS formation in CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>29-31</sup> Actin-dependant clustering of components of the HIV-1 receptor complex at the surface of the target cells has been confirmed in several cell types.<sup>33-35</sup> Furthermore, activation of the actin polymerization nucleator ARP2/3 was recently suggested to be involved in the migration of the viral core components toward cell nucleus.<sup>36</sup> It was showed that the ARP2/3 complex contributes to the efficient infection of HIV-1 in cell lines. In this study, we provide additional evidence that a R5 HIV-1 strain stimulated to a greater extent



the TCR signaling and the actin organization pathways in the first 24 hours following inoculation of unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells compared to a X4 strain. We also demonstrate that it is the ARP2/3 complex that is involved in the actin organization of the unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells. The WAVE2 protein and the ABI protein were recently associated with the TCR-mediated actin polymerization and signaling.<sup>37-38</sup> ABI2 and WAVE2 colocalize with ARP2/3 complex at the immunological synapse and activate this complex. Knockdown and siRNA studies showed that these proteins are required for actin polymerization in CD4<sup>+</sup> T cells. In our study, we found that WAVE2 and ABI2 are up-regulated only by R5 strains at 24 hours post-infection in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells. These results suggest the implication of the ABI/WAVE complex in the activation of the ARP2/3 complex and actin polymerization with R5-infection of CD4<sup>+</sup> T cells.

Previous results obtained by Cicala and collaborators in viremic patients suggest that R5 envelope facilitates replication of HIV.<sup>21</sup> In accordance to these data, we propose that the complete R5 virions induce genes in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells that potentially contribute to the activation of resting cells after TCR stimulation. In addition, Locher and collaborators indicated that X4 viruses were more likely than R5 virus-infected CD4<sup>+</sup> T cells to have substantial downmodulation of markers of cellular activation.<sup>13</sup> In this regard, our results also confirm that a few genes responsible for cellular activation were also down-regulated in CD4<sup>+</sup> T cells exposed to X4 viruses (FYN, CD45, ABI2 and CD3E). Conversely genes involved in TCR activation were up-regulated in CD4<sup>+</sup> T cells by the R5 strain as compared to X4. Specifically, our data suggest that the ability for R5 viruses to modulate the TCR-mediated actin polymerization and signaling may create a favorable

environment for CD4<sup>+</sup> T cell activation after TCR stimulation that will favor viral entry and transport to the nucleus. This ability may explain the preference for the establishment of an infection by R5 as compared to X4 virus in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells environment and the predominance of R5 strains early in the infection process.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr Ezequiel Calvo at the microarray core service of the Quebec Genome Centre.

This work is supported by The Canadian Institute of Health Research and the Canada Research Chair program.



**SEQUENCE DATA**

FYN : NM\_002037.3

CD45 : NM\_002838.2

LCK : NM\_005356.2

ABI2 : NM\_005759.3

PAK1 : NM\_002576.3

ARP2/3 : NM\_001005386.1

PI3K : NM\_006218.2

CD3E : NM\_000733.2

PLC : NM\_015184.3

WAVE2 : NM\_006990.2

**REFERENCES**

1. Littman DR : Chemokine receptors-keys to AIDS pathogenesis. *Cell* 1998;93 :677-680.
2. Berger EA : HIV entry and tropism : the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997;11 (Suppl. A) :S3-S16.
3. Berkowitz RD, Alexander S, Bare C *et al.*: CCR5- and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J Virol* 1998;72 :10108-10117.
4. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F *et al.*: Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome : Studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989;63 :2118-2125.
5. Schuitemaker H, Koot M, Koostra NA *et al.* : Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection : progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992;66 :1354-1360.

6. Roos MT, Lange JM, de Goede RE *et al.* : Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J Infect Dis* 1992;165 :427-432.
7. Zhu T, Mo H, Wang N *et al.* : Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993;261 :1179-1181.
8. Tersmette M, de Goede RE, Al BJ *et al.*: Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 1988;62 :2026-2032.
9. Tersmette M, Lange JM, de Goede RE *et al.* : Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risks for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989;1:983-985.
10. Shellekens PT, Tersmette M, Roos MT *et al.* : Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype. *AIDS* 1992;6 :665-669.
11. Koot M, Keet IP, Vos AH *et al.* : Prognostic value of human immunodeficiency virus type 1 biological phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993;118 :681-688.



12. Richman DD and Bozzette S A : The impact of the syncitium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *JID* 1994;169 :968-974.
13. Locher CP, Witt SA, Kassel R *et al.* : Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation. *J Gen Virol* 2005;86 :1171-1179.
14. Cicala C, Arthos J, Selig SM *et al.* : Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J Immunol* 1999;163 :420-426.
15. Popik W and Pitha PM : Exploitation of cellular signaling by HIV-1 : unwelcome guests with master keys that signal their entry. *Virology* 2000;276 :1-6.
16. Popik W and Pitha PM : Inhibition of CD3/CD28-mediated activation of the MEK-ERK signaling pathway represses replication of X4 but not R5 human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 2000;74 :2558-2566.

17. Geiss GK, Bumgarner RE, An MC *et al.* : Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 2000;266 :8-16.
18. Corbeil J, Sheeter D, Genini D *et al.* : Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells. *Genome Res* 2001;11 :1198-1204.
19. Cicala C, Arthos J, Selig SM *et al.* : HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *PNAS* 2002;99 :9380-9385.
20. van't Wout AB, Lehrman GK, Mikheeva SA *et al.* : Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4+-T-cell lines. *J Virol* 2003;77 :1392-1402.
21. Cicala C, Arthos J, Martinelli E *et al.* : R5 and X4 envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *PNAS* 2006;103 :3746-3751.
22. Fortin JF, Cantin R, and Tremblay MJ : Host derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 1997;71 :3588-3596.

23. Bounou S, Leclerc JE, and Tremblay MJ : Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* 2002;76 :1004-1014.
24. Sasik R, Woelk CH, and Corbeil J: Microarray truths and consequences. *J Mol Endocrinol* 2004;33 :1-9.
25. Sasik R, Calvo E, and Corbeil J: Statistical analysis of high-density oligonucleotide arrays : a multiplicative noise model. *Bioinformatics* 2002;18 :1633-1640.
26. Cole SW, Galic Z, and Zack JA: Controlling false-negative errors in microarray differential expression analysis : a PRIM approach. *Bioinformatics* 2003;19 :1808-1816.
27. Nuovo GJ, Hohman RJ, Nardone GA *et al.*: In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers. *J Histochem Cytochem* 1999;47:273-280.
28. Van Wauwe JP, de Mey JR and Goossens JG: OKT3: A monoclonal anti human T lymphocyte antibody with mitogenic properties. *J Immunol* 1980;124:2708-2713.
29. Sechi AS, and Wehland J : Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol* 2004; 25 : 257-265.

30. Penninger JM, and Crabtree GR : The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 1999; 96 : 9-12.
31. Tskvitaria-Fuller I, Rozelle AL, Yin HL *et al.*: Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 2003; 171 : 2287-2295.
32. Fenard D, Yonemoto W, de Noronha C *et al.* : Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J Immunol* 2005;175 :6050-6057.
33. Pontow SE, Heyden NV, Wei S *et al.* : Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of Rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J Virol* 2004;78 :7138-7147.
34. Steffens CM and Hope TJ : Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J Virol* 2003;77 :4985-4991.
35. Steffens CM and Hope TJ : Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells : implications for HIV fusion and entry events. *J Virol* 2004;78 :9573-9578.



36. Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z *et al.* : Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell* 2004;15 :5197-5207.
  
37. Nolz JC, Gomez TS, Zhu P *et al.* : The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* 2006;16 :24-34.
  
38. Zipfel PA, Bunnell SC, Witherow DS *et al.* : Role of the Abi/Wave protein complex in T cell receptor-mediated proliferation and cytoskeletal remodeling. *Curr Biol* 2006;16 :35-46.

Table 1. Sequence of Oligonucleotide Primers Used  
in Real-Time qRT-PCR Gene Expression Analysis

<i>Primer<sup>a</sup></i>	<i>Nucleotide sequence</i>
FYN-F	CTAACGTGGAAAAAGACCAGTCC
FYN-R	CACCACATGTCTTCTACAACAGAGG
CD45-F	CACATTCGAGCAATATCAATTCCTAT
CD45-R	GGGTAGGTGCTGGCAATGAC
LCK-F	TTCCCCACTGCAAGACAACC
LCK-R	GAGGGCTCATAGCTGTGCAGA
ABI2-F	TACAGTCAGCAGATAAGCAGAGAGC
ABI2-R	TGGTGTAGGCTTTGGTTTCTTCT
PAK1-F	CGAGCGCGAAGTAGCTG
PAK1-R	GTGACAAATGTCAAATAACGGCCTA
ARP2/3-F	TGAAATCAAGAATAACAAAAAGATGGA
ARP2/3-R	CTTGCCTCATCACCAACCATAA
PI3K-F	TCGAGAAATTGGTTTTGCTATCG
PI3K-R	ACCATATCAAATTCACACACTGGC
CD3E-F	GGGCAAGAGTGTGTGAGAACTG
CD3E-R	TGGCCACCGACATCACATC
PLC-F	ACATGCAGAATGCGGTGGT
PLC-R	CAGAGGAGAGGCCACACAGC
WAVE2-F	ACCAGCAGCTGACTACCCAACT
WAVE2-R	TGGTGAAAAACAACCTGGCC

<sup>a</sup>F (forward) primer sequence is in 5'-3' orientation, R (reverse) primer sequence is reverse complemented.

Table 2. Most significant cellular pathways associated with genes differently modulated by R5 and X4 HIV-1 strains

Pathway	P value
Lck and Fyn tyrosine kinases in initiation of TCR Activation	0.00056
Role of PI3K subunit p85 in regulation of Actin Organization and Cell Migration	0.00068
Activation of Csk by cAMP-dependent Protein Kinase Inhibits Signaling through the T Cell Receptor	0.00071
Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human)	0.00084
T Cell Receptor Signaling Pathway	0.0010
Signaling of Hepatocyte Growth Factor Receptor	0.0013
IL-7 Signal Transduction	0.0017
Y branching of actin filaments	0.0022
Mechanism of Gene Regulation by Peroxisome Proliferators via PPAR $\alpha$ (alpha)	0.0028
<i>Erk and PI-3 Kinase Are Necessary for Collagen Binding in Corneal Epithelia</i>	0.0036
Rab GTPases Mark Targets In The Endocytotic Machinery	0.0041
How does salmonella hijack a cell	0.0044
IL 2 signaling pathway	0.0061
Role of Tob in T-cell activation	0.0062
EGF Signaling Pathway	0.0066
PDGF Signaling Pathway	0.0066
Adherens junction - Homo sapiens (human)	0.0070
Role of MEF2D in T-cell Apoptosis	0.0075
IL 6 signaling pathway	0.0088
Long-term potentiation - Homo sapiens (human)	0.0088
TPO Signaling Pathway	0.0089
Repression of Pain Sensation by the Transcriptional Regulator DREAM	0.0091

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Hierarchical clustered expression profiles of the modulated genes associated with the TCR activation. Modulation is based on peak fold change values in R5 virus-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells when compared to those inoculated with X4 viruses for donor 1 and 2. The color scale ranges from saturated red for upregulated genes in R5 virus-inoculated population to blue for upregulated genes in X4-inoculated population. A single row of colored boxes represents each gene as indicated by peak fold change values, accession number, and HUGO description, while each column represents a single time point.

**Figure 2.** Fold increase of expositions by X4 and R5 over control was calculated for genes associated with TCR signaling or actin organization after CD4<sup>+</sup> T cells were exposed to X4 and R5. Fold change was calculated by qRT-PCR for three donors. It represents the fold increase at 24 hours post-infection. This time point exhibited the greatest fold change across donors. The qRT-PCR results were normalized to the level of 18S.

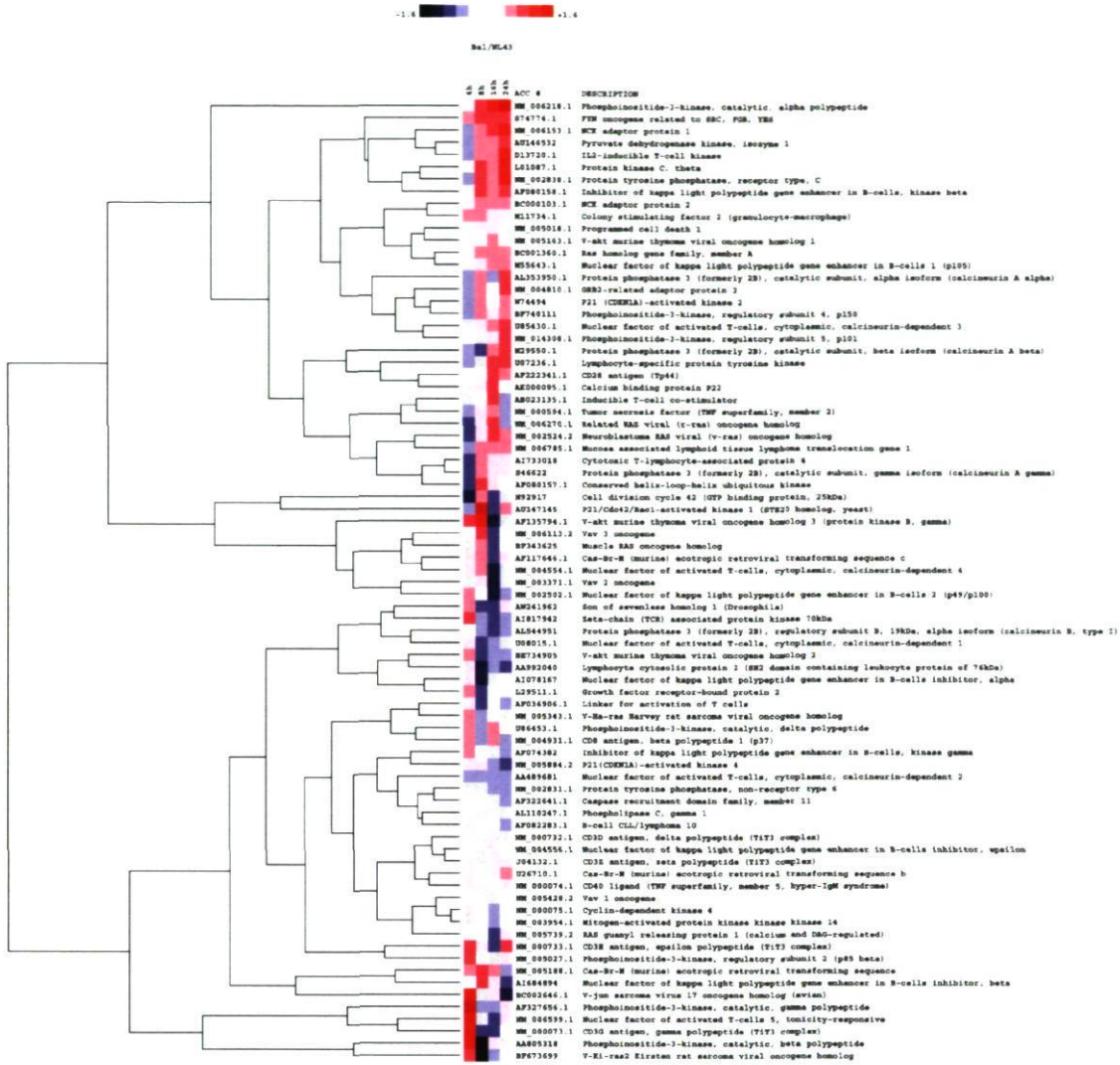
**Figure 3.** Multiplex analysis of R5 and X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells. Fold increase of infections by X4 and R5 over control of phosphorylated ERK/MAPK 1/2 (Thr185/Tyr187), and a phosphorylated tyrosine residue on CD3E, LCK, ZAP-70 and LAT was performed on total cell lysate (20 µg) of two donors with the beadlyte 7-plex T Cell Receptor Signaling kit (Millipore).

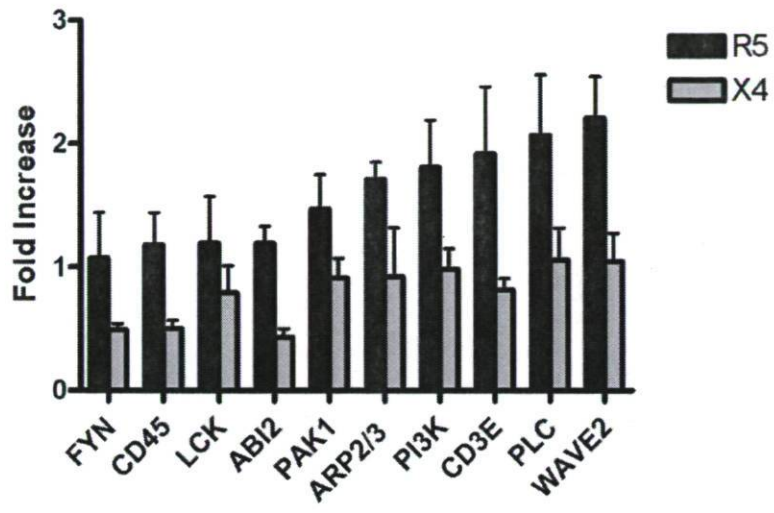
**Figure 4.** Western blot for LCK, CD3E, WAVE2 and ARP2/3. The densitometry of the bands normalized for β-actin (45kDa) shows an increase in proteins levels of LCK, CD3E,

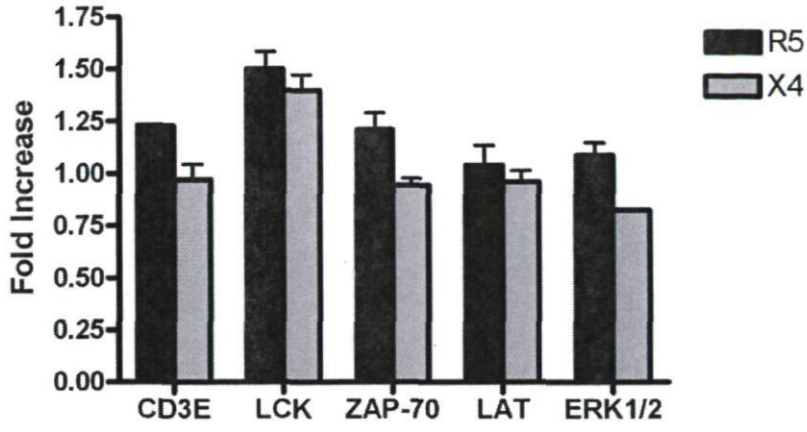


WAVE2 and ARP2/3 by R5 strains over X4 strains in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells at 24 hours post-infection.

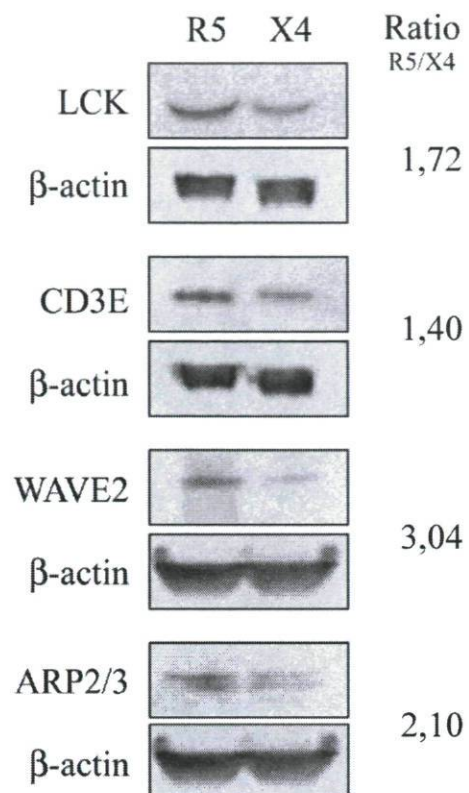
Figure 5. Percentages of positive CD4<sup>+</sup> T cells (PPC) expressing the marker of activation CD25 after TCR stimulation, 24 hours post-inoculation with R5 or X4 strain. All samples were analyzed 24 hours post-treatment with anti-CD3 Ab (OKT3) and the IgG1 isotype Ab was used as control. The results shown are representative of two independent experiments. A) uninoculated CD4<sup>+</sup> T cells, B) X4-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells and C) R5-inoculated CD4<sup>+</sup> T cells.

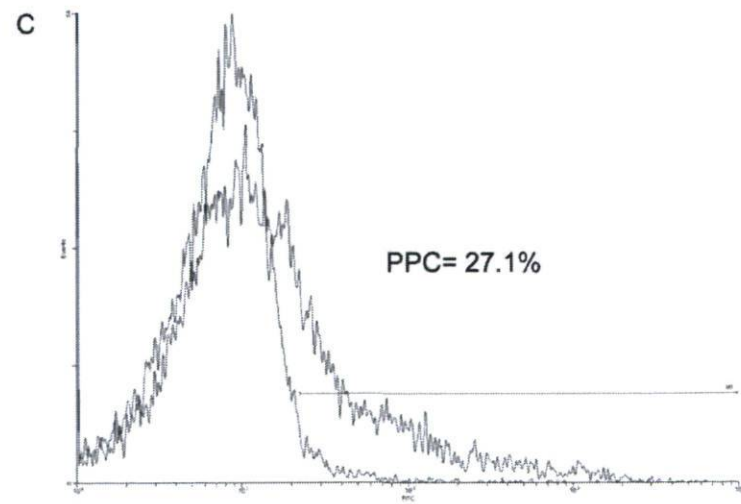
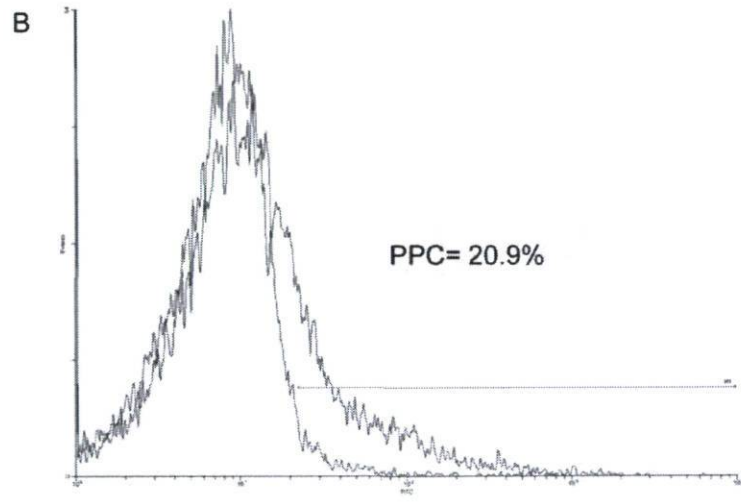
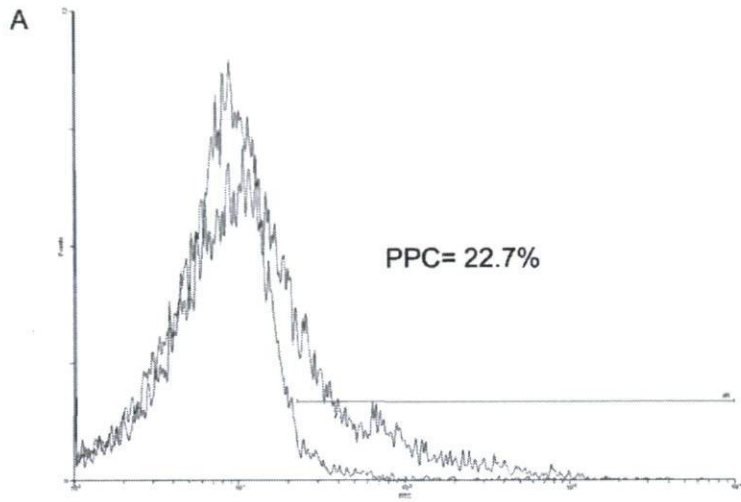












## CHAPITRE VI- TRAF6 et IRF7 modulent la réplication du VIH-1 dans les macrophages

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans la revue «*PLoS ONE*» (6(11):e28125) et est composé de la version finale telle que publiée.

### 6.1- Résumé

Le système immunitaire inné reconnaît une infection virale et enclenche des réponses antivirales comme la production des IFNs de type I. L'induction des IFNs procure un mécanisme de défense antiviral crucial en augmentant les ISGs qui restreignent la réplication virale. Les ISGs inhibent la réplication de plusieurs virus en agissant à différentes étapes du cycle viral. Plus particulièrement, un traitement aux IFNs effectué avant une infection par le VIH-1 *in vivo* arrête ou ralentit significativement la production virale indiquant que des facteurs inhibiteurs sont générés. Nous rapportons que l'infection par le VIH-1 des macrophages primaires humains diminue l'expression de TRAF6 et VISA, lesquels sont des composants de la voie de signalisation IFN qui contrôlent la réplication virale. La diminution de l'expression de *TRAF6* dans les macrophages augmente la réplication virale et l'expression d'IRF7. La diminution de VISA n'a eu aucun impact sur la réplication virale. La surexpression d'IRF7 résulte en une augmentation de la réplication virale tandis que la diminution de l'expression d'IRF7 la diminue significativement dans les macrophages. Ces résultats sont les premières démonstrations que TRAF6 peut réguler la transcription du VIH-1 et qu'en plus, l'expression d'IRF7 promouvoit la réplication du VIH-1.

**TRAF6 and IRF7 control HIV replication in macrophages.**

Mélissa Sirois<sup>1</sup>, Lynda Robitaille<sup>1</sup>, Robin Allary<sup>1</sup>, Mohak Shah<sup>2</sup>, Christopher H. Woelk<sup>3</sup>, Jérôme Estaquier<sup>1,4</sup>, and Jacques Corbeil<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Infectious Disease Research Center, Department of Molecular Medicine, CHUL Research Center and Laval University, Québec, Québec, Canada.

<sup>2</sup> Centre for Intelligent Machines, Department of Electrical and Computer Engineering, McGill University, Montreal, Québec, Canada.

<sup>3</sup> Department of Medicine, University of California, San Diego, San Diego, California, United-States.

<sup>4</sup> CNRS FRE3235, Université René Descartes Paris 5, Paris cedex 06, France.

\*All correspondence to:

Dr. Jacques Corbeil  
CHUL Research Center  
2705 Blvd. Laurier  
Québec, Canada  
G1V 4G2  
Phone: (418) 654-2705  
Fax: (418) 654-2743



Email: [jacques.corbeil@crchul.ulaval.ca](mailto:jacques.corbeil@crchul.ulaval.ca)

**Abstract word count:** 182 words

**Text word count:** 4804 words

**Submitted pages:** text pages, tables and figures

**ABSTRACT**

The innate immune system recognizes virus infection and evokes antiviral responses which include producing type I interferons (IFNs). The induction of IFN provides a crucial mechanism of antiviral defense by upregulating interferon-stimulated genes (ISGs) that restrict viral replication. ISGs inhibit the replication of many viruses by acting at different steps of their viral cycle. Specifically, IFN treatment prior to *in vitro* human immunodeficiency virus (HIV) infection stops or significantly delays HIV-1 production indicating that potent inhibitory factors are generated. We report that HIV-1 infection of primary human macrophages decreases tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) and virus-induced signaling adaptor (VISA) expression, which are both components of the IFN signaling pathway controlling viral replication. Knocking down the expression of *TRAF6* in macrophages increased HIV-1 replication and augmented the expression of IRF7 but not IRF3. Suppressing *VISA* had no impact on viral replication. Overexpression of IRF7 resulted in enhanced viral replication while knocking down *IRF7* expression in macrophages significantly reduced viral output. These findings are the first demonstration that TRAF6 can regulate HIV-1 production and furthermore that expression of IRF7 promotes HIV-1 replication.

**Keywords:** HIV-1, Interferon, TRAF6, IRF7, Interferon-regulatory factors

## Introduction

Infection by RNA viruses, such as HIV-1, initiates antiviral innate immune responses by inducing type I IFNs [1,2]. The treatment of primary human macrophages *in vitro* with type I IFN prior to HIV-1 infection inhibits virus replication, indicating that potent inhibitory factors are present [3,4]. However, pre-treatment is not a viable clinical option and, ultimately, innate immune responses *in vivo* fail to completely protect the human host even though genes integral to host defense are expressed. This may be due to the deregulation by HIV-1 of the signaling events necessary for induction of an appropriate innate immune response mediated by IFN or that HIV-1 replication outpaces these defenses. Type I IFNs display diverse biological effects that restrict virus replication by upregulating the expression of numerous genes (ISGs) [5-13]. For example, *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase (EIF2AK2*, also known as *PKR*), *oligoadenylate synthetase 1 (OAS1)* and *interferon-stimulated gene 15 (ISG15)* are known to be anti-HIV ISGs [14-16]. However, HIV-1 circumvents the protective effects of IFN and may even upregulate certain ISGs to its benefit [17]. Recently, Smith and collaborators identified ISGs expressed in inguinal lymph nodes that were positively associated with HIV-1 viral replication [18]. Moreover, it has been shown that the level of Type I IFN correlates with AIDS pathogenesis [19].

Production of IFN is induced by two major receptor systems for detecting RNA viruses: the toll-like receptors (TLRs) and cytoplasmic retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases (RLHs) [20,21]. The adaptor molecule TRAF6 has been shown to be involved in the TLR signaling pathway and activates IRF7, IRF3 and nuclear factor kappa B (NFkB) [22,23]. Furthermore, the RLH signaling pathway involves RNA helicase RIG-I and

melanoma differentiation associated protein-5 (MDA5) [24,25] that interact with VISA through a caspase recruitment domain (CARD/CARD) interaction [26-29]. VISA induces I-kappaB kinase (IKK $\epsilon$ ) and TANK binding kinase 1 (TBK1) which are responsible for the activation of IFN-regulatory factors (IRF3 and IRF7) through phosphorylation and consequently the production of type 1 IFN [30,31]. IFN production is cell type and stimuli specific and our aim was to ascertain the phenotype in the process of HIV-1 infection of primary human macrophages.

The goal of this study was to identify factors belonging to the interferon pathway that are altered during HIV-1 infection which contribute to the modulation of viral replication. We identified genes involved in the IFN signaling pathway that were impacted by HIV-1 infection of human primary macrophages. Our model is highly relevant to HIV-1 infection since macrophages are among the first cell types infected during transmission of HIV-1. In addition, macrophages infection by SIV is similar to that of CD4+ T cells in the acute phase of SIV infection [32]. We demonstrated that IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages, infected or not with HIV-1, modulated genes that were involved in the transcriptional regulation of the IFN pathway. Among them, HIV-1 downregulated TRAF6 and VISA gene expression. The downregulation of TRAF6 in macrophages infected with HIV-1 resulted in enhanced viral replication. Suppression of TRAF6 resulted in increased expression of IRF7. Overexpression of IRF7 lead to enhanced viral expression and suppression of IRF7 resulted in diminished viral output. The characterization of antiviral innate immunity genes modulated by HIV-1 infection provides a greater understanding of the mechanisms that may be used to combat the virus and improve antiviral treatments.



## Results

**Type I IFN $\alpha$ 2 inhibits HIV-1 replication in primary macrophages.** Kornbluth and collaborators demonstrated that macrophages treated 18 hours with 1000 IU/ml of IFN $\alpha$ 2 prior to HIV-1 NL4-3Ba $Lenv$  strain infection inhibited viral production [3]. To ascertain the stage at which HIV-1 replication was curtailed in the IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages, we monitored viral replication by quantifying *TAT spliced* message expression by qRT-PCR, a marker of productive viral transcription distinct from incoming viral genomic RNA. Treatment of infected cells with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, efavirenz, blocked all steps of infection after entry and prevented the appearance of *TAT spliced message*, demonstrating specificity for new viral production (data not shown). *TAT spliced* message could be detected as early as 2 hours post-infection, remained stable until 8 hours, and increased over time thereafter in macrophages infected with HIV-1. It is possible that initial *TAT spliced* detection could be due to viral nucleic content that's encapsidated within virions. Still, kinetic was greatly delayed in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected with HIV-1, where initial detection was observed at 120 hours and subsequently increased over time (Fig. 1). Similarly, HIV-1 p24 antigen could be detected in cellular supernatant in untreated samples at day 7 after infection. For the purpose of this study, we used the early *TAT spliced* message detection since the HIV-1 p24 can only be detected from day 7 in our model.

To determine the effect of HIV-1 on the IFN response and uncover potential effectors of HIV-1 replication, gene expression analysis in HIV-infected and non-infected IFN $\alpha$ 2-treated macrophages was compared. This strategy enabled the identification of interferon-induced genes that were differentially modulated during HIV-1 infection.

**HIV-1 modulates TRAF6 and VISA gene expression in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages.** To identify specific genes involved in Type I IFN signaling modulated by HIV-1 infection, gene expression in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected or not with HIV-1 was measured at 2, 4, 8, and 24 hours post-infection using high-density oligonucleotide microarrays (U133 Plus 2.0 arrays). Identification of the most highly modulated genes was ascertained by applying the short time series analysis framework of Shah and Corbeil with a linear kernel [33]. The application of linear kernel in conjunction with the framework results in a configuration that effectively scores the genes based on averaged differences between consecutive measurements scaled by their respective means, and this, over all the time points in the two conditions tested. We then compared the results obtained to untreated and uninfected control cultures. The most significantly up or downregulated genes were then identified as the ones obtaining extreme (respectively high and low) scores. This analysis demonstrated significant differences in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected with HIV-1 when compared to the IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages only. Analysis of the top 500 differentially expressed genes (maximum scores of comparison) between IFN $\alpha$ 2 treated macrophages that were either infected or not with HIV-1 through all time points was performed using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [34]. This analysis identified 32 significant functions. Table 1 displays the ten most significant functional categories associated with genes differentially modulated. The same gene can be related to more than one function and the statistical significance takes account of this fact. Examination indicated that most of these functions are related to transcription. Table 2 provides a short list of known genes

associated with IFN response. The expression of most known genes related to the interferon response, such as *OAS1* and 2 (2', 5' oligoadenylate synthetase 1 and 2), *MX1* and 2 (myxovirus (influenza virus) resistance 1 and 2) and *IRF7* in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages compared to untreated control were detected early and throughout the time course. Furthermore, HIV-1 antiviral factors, such as *APOBEC3G*, *APOBEC3A* and *TRIM22*, were upregulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages compared to untreated control. However, most of these IFN-related genes were unaffected by the presence of HIV-1 after the IFN $\alpha$ 2 treatment.

Our intent was to identify genes related to interferon that were inhibited by HIV-1. Table 3 shows candidate interferon-related genes from the top 500 genes that were modulated significantly when HIV-1 was present. These genes represent potential regulators of interferon and innate immunity pathways that are modulated by HIV-1 infection in macrophages. We were specifically interested in *VISA* and *TRAF6* since these two factors represent key control points in the regulation of the IRFs pathway, ISGs production and innate immunity, and expression of these two genes was reduced when HIV-1 was present. Therefore, we examined *TRAF6* and *VISA* gene expression over time to assess the dynamics of their expression. As shown by the oligonucleotide array analysis, the greatest differences in gene expression for these two genes occurred at 8 hours post-infection (Fig. 2A). To validate the modulation of HIV-1 on host gene expression of the IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages, we evaluated independent donors, under the same conditions as the oligonucleotide array experiment. Altogether we used 15 independent donors to perform the experiments described (see material and methods section). We tested the expression of *TRAF6* and *VISA*, using qRT-PCR (Fig. 2B). *TRAF6* and *VISA* gene



expression were upregulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages but downregulated after HIV-1 infection at 8 hours. The downregulation of *TRAF6* and *VISA* after HIV-1 infection of IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages suggested a possible role for these factors in the regulation of HIV-1 expression.

***TRAF6* but not *VISA* controls the level of expression of *IRF7* and HIV-1 replication.**

To analyze the impact of *TRAF6* and *VISA* in the context of HIV-1 infection, we suppressed both genes independently using siRNA. Gene expression inhibition levels of 65% and 61% were obtained for *TRAF6* and *VISA* respectively as compared to a non-targeted siRNA negative control (Fig. 3A). To further decipher the role of *TRAF6* in the IFN antiviral response, we evaluated HIV-1 replication, 24 hours after infection of IFN $\alpha$ 2 pre-treated or not macrophages. HIV-1 replication was significantly upregulated in macrophages with knockdown expression of *TRAF6* as compared to the control pre-treated macrophages independently of IFN treatment (Fig. 3B). This is the first report that *TRAF6* can function to limit HIV-1 replication. No significant differences were detected in macrophages treated with *VISA* siRNA when compared to the negative control siRNA irrespective of the presence of IFN pretreatment (Fig. 3B).

In this transduction pathway, *TRAF6* activates *IRF3* and *IRF7* to promote their transcriptional functions [22,23,30,31]. Therefore, we evaluated the expression of *IRF3* and *IRF7* genes in this context. As shown in figure 3C and D, upregulation of HIV-1 replication in macrophages with knockdown of *TRAF6* expression seen in figure 3B is accompanied by significant overexpression of *IRF7* compared to the HIV-1 infected negative control (Fig 3C). No significant difference in the expression of *IRF7* in HIV-1 infected macrophages



with knockdown of *VISA* expression was observed. Conversely, *IRF3* was downregulated in HIV-1 infected TRAF6 knockdown macrophage, while no significant difference in the expression of *IRF3* in the *VISA* siRNA treated targets was found (Fig. 3D). This suggested that *VISA* was not responsible for the observed increase in viral replication. It is possible that alternative effectors can substitute for its function or that its modulation has no bearing on HIV-1 production.

To validate our finding at the protein expression level, we performed western blotting for both IRF3 and IRF7. Levels of these proteins in lysates of *TRAF6* knockdown or control siRNA treated (200 nM) macrophages from three independent donors were normalized using  $\beta$ -actin. As seen in figure 3E, IRF3 is downregulated (0.83 fold, corresponding to a 17% reduction) and IRF7 is upregulated (3.59 fold) in *TRAF6* knockdown macrophages compared to control siRNA. The protein data confirmed our gene expression results and suggested that the regulation of HIV-1 replication by TRAF6 involved IRF7.

**IRF7 downregulation decreases HIV-1 replication.** To elucidate if IRF7 directly alters HIV-1 replication, we first evaluated the effect of downregulation of IRF7 expression using siRNA. Macrophages were transfected with specific siRNAs targeted against *IRF7* or silencer negative control. As shown in figure 4, transfection of specific *IRF7* siRNA (50nM) significantly reduced IRF7 mRNA (55% reduction) (Fig. 4A) and protein (42% reduction) (Fig. 4B) expression. The inhibition of IRF7 resulted in a comparable downregulation of HIV-1 replication (51% reduction) (Fig. 4C).

**IRF7 overexpression increases HIV-1 replication.** To confirm that IRF7 promoted HIV-1 replication, IRF7 was overexpressed in macrophages followed by infection with HIV-1 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.002. While protein levels expression were only increased modestly (2 fold) by transfection of an IRF7 expressing vector (Fig. 5A) HIV-1 replication was markedly upregulated (14 fold) indicating enhanced viral replication when IRF7 is present in sufficient quantity (Fig. 5B). This occurred despite IFN $\alpha/\beta$  expression in the presence or absence of IRF7 overexpression (data not shown). This is the first demonstration that links IRF7 to an increased HIV-1 replication.

## Discussion

Our investigation demonstrated the capability of HIV-1 infection to alter critical early events involved in appropriate induction of the IFN response. This ability emphasizes the importance of the IFN signaling pathways in controlling HIV-1 replication and suggests that HIV-1 has evolved mechanisms to compromise this innate host immune response to favor its propagation. We present evidence that *TRAF6*, important for transcriptional regulation of the interferon pathway, is affected early in the process of HIV-1 infection of primary human macrophages. Knockdown of the antiviral factor *TRAF6* resulted in a significant augmentation in HIV-1 replication, as assessed by the expression of *TAT* spliced message.

*TRAF6* has been shown to be important for control of replication of other viruses. Konno and collaborators reported that the absence of *TRAF6* in *TRAF6*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts, (MEF cells) resulted in enhanced replication of RNA viruses such as Newcastle disease virus and encephalomyocarditis virus [23]. Similarly, *TRAF6* has been shown to be critical for IFN $\alpha$  and  $\beta$  induction in response to vesicular stomatitis virus infection and intracellular double-stranded RNA, poly (I:C) [35]. All of these studies confirm that *TRAF6* is induced as part of the normal innate immune response against viruses and our findings indicate it plays a similar role in curtailing HIV-1 replication. Interestingly, our results also suggest that HIV-1 has devised strategies to circumvent this inhibition. HIV-1 infection reduced *TRAF6* gene expression with the resulting enhanced viral replication. Despite being upregulated by interferon and repressed by HIV-1 infection, *VISA*, another important mediator of innate immunity, did not have any impact on HIV-1 replication in our study. Instead, HIV-1 replication was similar to that of the control. There may be



compensatory mechanisms circumventing the ablation or reduction of *VISA* expression during HIV-1 infection.

TRAF6 is implicated in the activation of the transcription factors IRF3 and IRF7 [22,36]. TRAF6 polyubiquitinates IRF7, a post-translational modification necessary for the IFN production as demonstrated in fibroblasts [22,36]. Both transcription factors are key regulators of IFN production [37-44] and have essential roles in the activation of antiviral immunity [44-46]. Certain viruses have evolved mechanisms to overcome their effect such as the Thogoto virus ML protein that reportedly inhibits the activation of IRF7 [47]. In addition, vesicular stomatitis virus was more efficient at infecting fibroblasts when IRF7 was ablated [48]. In contrast, IRF7 increased human papillomavirus (HPV) type 8 late promoter activity via direct binding to viral DNA and IRF3 induced strong HPV8 suppression in primary keratinocytes. This is consistent with our study where IRF7 promoted HIV-1 replication [49]. The knockdown of TRAF6 induced the expression of IRF7 but decreased the expression of IRF3 at both the gene and protein levels.

Overexpression of IRF7 resulted in a significant increase in HIV-1 replication in primary human macrophages. Moreover, inhibition of IRF7 brought about a concomitant decrease of viral output. Our results show that when TRAF6 is reduced, IRF7 is overproduced and contributes to enhanced viral replication. Recently, a study by Smith and collaborators identified host genes expressed in inguinal lymph nodes that were associated determinants of HIV-1 viral load [18]. Moreover, in primate models, higher levels of type I interferon characterize the pathogenic state [19]. Consistent with our results with IRF7, these analyses reflect an antiviral host response mediated by the interferon pathway that is associated with higher viral load rather than inhibition of HIV-1 replication, suggesting that



HIV-1 subverts the innate immune response to its own benefits. IRF7 could contribute to enhanced HIV-1 replication by several potential, non-exclusive mechanisms. IRF7 could facilitate Long Terminal Repeat (LTR) driven expression of the virus and/or favor transcriptional activation of cellular genes that could contribute to increased viral output. However, on its own IRF7 is not capable of enhancing the activity of a LTR-luciferase reporter in primary human macrophages (Supplementary Figure S1). Thus, if IRF7 modulates the HIV-1 LTR, it may require interaction with another protein. In opposition, IRF1, a positive control in this setting, could readily enhance LTR-driven replication. Presumably, IRF7 could facilitate the translocation and activity of NFkB resulting in the promotion of HIV-1 replication since NFkB is a potent activator of LTR-driven expression of the virus. Although demonstrated in Jurkat T cells, IRF7 could, in a situation analogous to IRF1, interact with NFkB to promote this LTR-driven transcription [50,51]. Preliminary chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP on chip monitoring 19,000 genes) using HIV-infected primary macrophages indicate enrichment for the promoter regions of three genes that stimulate the NFkB pathway, coactivator-associated arginine methyl transferase 1 (CARM1), B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10) and solute carrier family 20 member 1 (SLC20A1) [52-54]. These interesting candidates warrant additional investigation to determine if they promote HIV-1 replication.

Alternatively, the increase in IRF7 expression together with the reduction in IRF3 expression might favour the formation of IRF7 homodimers instead of IRF3 homodimers or IRF3/IRF7 heterodimers. IRF3 and IRF7 require dimerization among other post-translational modifications to act as transcription factors. This shift in the transcription factor complex composition would induce the activation of a distinct set of genes some of

which could contribute to HIV-1 replication. There is evidence in paramyxovirus infection of lymphocyte B-cells that the relative ratio of IRF3/IRF7 contributed to differential expression of IFN $\alpha$ 2-related genes [55].

In conclusion, we demonstrated that TRAF6 is an important factor involved in the replication of HIV-1 in primary human macrophages. HIV-1 infection downregulated TRAF6 expression. In the absence of TRAF6, IRF7 is overproduced and contributes to enhanced HIV-1 replication. It is important to elucidate how HIV-1 interferes with this innate immunity in order to favour its own replication.

## Methods

**Cells.** Monocytes were recovered from whole blood of healthy human donors by negative selection with RosetteSep™ human monocyte enrichment cocktail (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, BC), according to the manufacturer's instructions. A total of 15 independent donors were utilized for the experiments described in this manuscript. Monocytes to be differentiated into macrophages were plated into T25 flasks in RPMI 1640 supplemented with 10% human serum (Wisent Inc., Québec, QC) for oligonucleotide array experiments and subsequent validation by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). qRT-PCR quantification, knockdown assays and western blot assays used monocytes plated in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Canada, Burlington, ON) and 25 ng/ml of monocyte/macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Genscript Corp, Piscataway, NJ) for differentiation into macrophages. Cell-surface expression of CD14 was characterized by using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mAb (clone MEM-18) (Cedarlane Laboratories Limited, Burlington, ON) after allowing monocytes to differentiate for 5 days. By this criterion, the cells were >97% monocytes differentiated macrophages (MDMs) as assessed by flow-cytometry evaluation by using EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) (data not shown).

**Production of virus stocks.** Virus stocks were produced by the transfection of 293T cells using the calcium phosphate co-precipitation method [56]. The infectious molecular clone used in this study was pNL4-3BaLenv. The pNL4-3BaLenv vector was generated by replacing the *env* gene of the T-tropic HIV-1 strain, NL4-3, with that of the macrophage-tropic HIV-1 BaL strain, thus resulting in an infectious molecular clone with macrophages-



tropic properties [57] (pNL4-3BaLenv was kindly provided by M. J. Tremblay, Laval University, Québec, QC). Supernatants from transfected cells were clarified by filtration through 0.22 micron cellulose acetate syringe filter and ultracentrifuged. Viruses were purified with the OptiPrep velocity gradient method (Axis-Shield PoC, Oslo, Norway). This methodology precludes having secreted products such as cytokines in the viral preparations. The 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) of HIV-1 stock was calculated by using the nonparametric methods of Spearman-Kärber [58]. TZM-BL cell line was used to standardize every viral stock used in this study.

**Treatment and infection of macrophages.** After allowing monocytes to differentiate for 5 days, purified primary macrophages were treated 18 hours with 1000 IU/ml of IFN $\alpha$ 2 (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ), which represents the lowest concentration achieving maximum inhibition of HIV-1 NL4-3BaLenv strain replication in these cells [3]. Pre-treated macrophages (18 hours) were infected with the NL4-3BaLenv strain of HIV-1 at a MOI of 0.002 (physiological dose). Uninfected and untreated cells were used as controls. Aliquots of cells ( $3 \times 10^6$  cells) were taken at 2, 4, 8, and 24 hours after infection, lysed in 1 ml of TRIzol (Invitrogen Canada, Burlington, ON) and stored at -80°C.

**RNA isolation, labeling, and array hybridization.** Total RNA from the same donor was isolated for each condition and time point using the TRIzol method according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Burlington, ON) and then digested with deoxyribonuclease to remove any contaminating genomic DNA (Turbo DNA-free, Ambion, Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON). RNA quality and quantity was



assessed using an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON). RNA integrity numbers (RIN), which estimate the integrity of total RNA samples, ranged from intact (RIN 10) to degraded (RIN 2). RIN were above eight for all samples in our experiments. Total RNA (100 ng) was converted to complementary DNA (cDNA), which was amplified and transcribed to produce biotinylated cRNA using the Two-Cycle cDNA synthesis kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). Fragmented cRNA (15  $\mu$ g) were hybridized to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) for 16 h at 45°C with constant rotation at 60 rpm. The arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR) and biotinylated goat anti-streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) using the Affymetrix Fluidics Station 450 (protocol EukGE-WS2v5\_450), then read using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

**Oligonucleotide array gene expression analysis.** GeneChip Robust Multi-array Average (GCRMA) was the procedure used to normalize the data obtained from the oligonucleotide array analysis [59]. Identification of the most differentially expressed genes between IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected or not with HIV-1 was done using the short time series analysis framework of Shah and Corbeil [33]. This framework generalizes the Hilbert-Schmidt Independence Criterion (HSIC) based framework of Song and collaborators [60] to the short time-series setting by utilizing tensor analysis techniques resulting in a generic analysis tool that allows both identification of most differentially expressed genes and patterns of interest in gene behavior (such as upregulation by IFN $\alpha$ 2 with subsequent suppression by HIV-1). We incorporated a linear kernel in the framework,

and obtain a ranking criterion, which is analogous to the classical mean-difference based criterion for static gene expression data [33,61]. The criterion is based on averaging the differences between consecutive measurements scaled by their respective means, over all the time points. The framework also allows identification of highly non-monotonic variations in gene behavior. The most differentially expressed genes were then extracted using an empirically determined threshold over the ranking scores. These genes were then analyzed with respect to their functionalities and ontological classification using the DAVID analysis software to determine significant functionalities associated with HIV-1 infection after IFN $\alpha$ 2 treatment of the cells [34]. Furthermore, the top 500 differentially expressed genes between IFN $\alpha$ 2 macrophages that were either infected with HIV-1 or non-infected were analyzed to determine which genes had an association with the keyword interferon using Chilobot software [62].

**qRT-PCR examination of gene expression.** cDNA from independent donor cultures was generated from 200 ng of total RNA using a random primer hexamer following the instructions for Superscript II (Invitrogen Canada, Burlington, ON). Primers were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON) and their sequences are presented in Table 4. Amplicons were detected in most cases using the Amplifluor UniPrimer amplification and detection system (Chemicon International, Temecula, CA) except for *TAT spliced* message, a marker of HIV replication, which was detected using the TaqMan system (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON), which allows for greater sensitivity and can detect infection as early as 2 hours post-inoculation. Forward primers used in the Amplifluor UniPrimer system contained an additional 5' Z

sequence (ACTGAACCTGACCGTACA) that is not included in Table 4. Equal amounts of cDNA (20 ng) were run in triplicate and amplified using the Amplifluor Uniprimer in a 15 µl reaction containing 7.5 µl of 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON), 10 nM of Z-tailed forward primer, 100 nM of reverse primer, 100 nM of Amplifluor Uniprimer fluorescein probe (Chemicon International, Temecula, CA) and 5 µl of DNA target [63]. Moreover, no-template controls were used. The mixture was incubated at 50°C for 2 min, at 95°C for 4 min, then cycled at 95°C for 15 sec and at 55°C for 40 sec, 55 times using the Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System. The amplifications using the Taqman system were run in a 15 µl reaction containing 7.5 µl of 2X Universal PCR Master Mix, 200 nM of forward primer, 200 nM of reverse primer, 250 nM of Taqman probe and 5 µl of DNA target. The mixture was incubated at 50°C for 2 min, at 95°C for 10 min, then cycled 40 times at 95°C for 15 sec and at 60°C for 1 min. Amplification efficiencies were validated and normalized to ribosomal 18S and quantity of target gene (arbitrary units) was calculated according to a standard curve. The standard curve consists of different dilution of a RNA sample that generates data points in the linear portion of the PCR amplification.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Macrophages were infected with HIV-1 at a MOI of 0.002 for 2 hours at 37°C. Next, the virus-cell mixture was washed with PBS to remove unbound virus. The p24 content was determined using a sensitive in-house double-antibody sandwich ELISA specific for the viral p24 protein. In this test, the 183-H12-5C and 31-90-25 antibodies are used in combination to quantify p24 levels. Virus production was estimated by measuring p24 levels in cell free culture supernatants.



**Knockdown assays.** Macrophages from healthy donors were transfected with pre-designed siRNA SMARTpool for *TRAF6* (M-004712-00; Dharmacon, Lafayette, CO), *VISA* (L-024237-00; Dharmacon, Lafayette, CO) or *IRF7* (L-011810-00; Dharmacon, Lafayette, CO) with the Oligofectamine Transfection Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Burlington, ON). SMARTpool technology combines four siRNAs that target different mRNA regions. Silencer Negative control siRNAs (AM4635; Ambion, Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON), used as control do not target any human gene product. The best gene expression inhibition levels of 65%, 61% and 55% were obtained for *TRAF6*, *VISA* and *IRF7*, respectively, 48 hours post-transfection (see Supplementary Figure S2 for TRAF6 results). The transfected macrophages were then infected with the NL4-3BaLenv strain of HIV-1 at an MOI of 0.002 for 24 hours. In the case of IFN $\alpha$ 2 pre-treatment, 30 hours post-transfection the macrophages were treated for 18 hours before the infection.

**Protein assays.** Immunoblot assays were performed on total cell lysates of independent donors. Proteins were isolated for each condition using total extract buffer (Tris-base pH 6.8, SDS 20%, mercaptoethanol and glycerol). Cell extracts (30  $\mu$ g per lane) were resolved by SDS-PAGE on 4-20% gels (BIO-RAD Laboratories Canada Ltd, Mississauga, ON) and transferred on PVDF membranes. The indicated antibodies against IRF7 (H-246; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), IRF3 (SL-12.1; BD-Pharmingen, Oakville, ON), TRAF6 (H-274; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and  $\beta$ -actin (A-13; SIGMA, Saint-Louis, MO) were visualized by alkaline phosphatase-based enhanced



chemiluminescence. The densitometry of the bands was compared after normalization with  $\beta$ -actin.

**Overexpression assays.** Macrophages ( $15 \times 10^6$  cells) from healthy donors were transfected with 9  $\mu$ g of pcDNA3-IRF7-myc (Kindly provided by J. Hiscott, McGill University, Montréal, QC) or pcDNA3 (empty vector control) with the Lipofectamine Transfection Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Burlington, ON). We obtained the best gene overexpression after 24 hours of transfection, after which, the transfected macrophages were infected with the NL4-3Ba $Lenv$  strain of HIV-1 at a MOI of 0.002 for 24 hours.

**Microarray data accession number.** Microarray results have been deposited in Gene Expression Omnibus database under accession number GSE30536.

**Statistical analysis.** Analysis was performed by paired  $t$ -test to compare two population means in the case of two samples that are correlated (same donor) or one sample  $t$ -test to compare the sample mean to the population mean (control). P values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

**Ethics statement.** Comité d'éthique de la recherche du CHUQ approved the study and written informed consent was provided by study participants.

**Acknowledgements**

Special thanks to Dr. Nathalie Malo for assistance with the statistical analyses and Dr. David Looney (UCSD) for critical reading of the manuscript.

**References**

1. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 74: 479-485.
2. Takeda K, Akira S (2003) Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5: 143-153.
3. Kornbluth RS, Oh PS, Munis JR, Cleveland PH, Richman DD (1989) Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. *J Exp Med* 169: 1137-1151.
4. Meylan PR, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD, Kornbluth RS (1993) Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* 193: 138-148.
5. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777.
6. Samuel CE (1988) Mechanisms of the antiviral action of interferons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 27-72.
7. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
8. Barr SD, Smiley JR, Bushman FD (2008) The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* 4: e1000007.
9. Bishop KN, Holmes RK, Malim MH (2006) Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* 80: 8450-8458.

10. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, et al. (2009) Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol* 83: 1837-1844.
11. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-430.
12. Peng G, Lei KJ, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM (2006) Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* 203: 41-46.
13. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
14. Kunzi MS, Farzadegan H, Margolick JB, Vlahov D, Pitha PM (1995) Identification of human immunodeficiency virus primary isolates resistant to interferon- $\alpha$  and correlation of prevalence to disease progression. *J Infect Dis* 171: 822-828.
15. Muto NF, Martinand-Mari C, Adelson ME, Suhadolnik RJ (1999) Inhibition of replication of reactivated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in latently infected U1 cells transduced with an HIV-1 long terminal repeat-driven PKR cDNA construct. *J Virol* 73: 9021-9028.
16. Schroder HC, Ugarkovic D, Merz H, Kuchino Y, Okamoto T, et al. (1990) Protection of HeLa-T4<sup>+</sup> cells against human immunodeficiency virus (HIV) infection after stable transfection with HIV LTR-2',5'-oligoadenylate synthetase hybrid gene. *Faseb J* 4: 3124-3130.



17. Izmailova E, Bertley FM, Huang Q, Makori N, Miller CJ, et al. (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med* 9: 191-197.
18. Smith AJ, Li Q, Wietgreffe SW, Schacker TW, Reilly CS, et al. (2010) Host genes associated with HIV-1 replication in lymphatic tissue. *J Immunol* 185: 5417-5424.
19. Campillo-Gimenez L, Cumont MC, Fay M, Kared H, Monceaux V, et al. (2010) AIDS progression is associated with the emergence of IL-17-producing cells early after simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol* 184: 984-992.
20. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300.
21. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.
22. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, et al. (2004) Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5: 1061-1068.
23. Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, et al. (2009) TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One* 4: e5674.
24. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, et al. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105.

25. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175: 2851-2858.
26. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981-988.
27. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, et al. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172.
28. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122: 669-682.
29. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, et al. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19: 727-740.
30. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, et al. (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 491-496.
31. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, et al. (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300: 1148-1151.
32. Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, et al. (2011) HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathog* 7: e1002087.

33. Shah M, Corbeil J (2011) A general framework for analyzing data from two short time-series microarray experiments. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 8: 14-26.
34. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, et al. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3.
35. Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, et al. (2008) TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem* 283: 36211-36220.
36. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, et al. (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171: 4304-4310.
37. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 18: 2986-2996.
38. Marie I, Durbin JE, Levy DE (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J* 17: 6660-6669.
39. Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, et al. (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441: 106-110.



40. Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E, Taniguchi T (1998) Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* 425: 112-116.
41. Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, et al. (1998) Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1: 507-518.
42. Weaver BK, Kumar KP, Reich NC (1998) Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* 18: 1359-1368.
43. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, et al. (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* 17: 1087-1095.
44. Ning S, Pagano JS, Barber GN (2011) IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.*
45. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, et al. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772-777.
46. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, et al. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13: 539-548.
47. Buettner N, Vogt C, Martinez-Sobrido L, Weber F, Waibler Z, et al. (2010) Thogoto virus ML protein is a potent inhibitor of the interferon regulatory factor-7 transcription factor. *J Gen Virol* 91: 220-227.



48. Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, et al. (2008) Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* 452: 323-328.
49. Oldak M, Tolzmann L, Wnorowski A, Podgorska MJ, Silling S, et al. (2011) Differential regulation of human papillomavirus type 8 by interferon regulatory factors 3 and 7. *J Virol* 85: 178-188.
50. Sgarbanti M, Borsetti A, Moscufo N, Bellocchi MC, Ridolfi B, et al. (2002) Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors. *J Exp Med* 195: 1359-1370.
51. Sgarbanti M, Remoli AL, Marsili G, Ridolfi B, Borsetti A, et al. (2008) IRF-1 is required for full NF-kappaB transcriptional activity at the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhancer. *J Virol* 82: 3632-3641.
52. Covic M, Hassa PO, Saccani S, Buerki C, Meier NI, et al. (2005) Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression. *EMBO J* 24: 85-96.
53. Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, et al. (2001) Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104: 33-42.
54. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, et al. (2003) Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22: 3307-3318.

55. Genin P, Lin R, Hiscott J, Civas A (2009) Differential regulation of human interferon A gene expression by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* 29: 3435-3450.
56. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M (1997) Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71: 3588-3596.
57. Lambert AA, Gilbert C, Richard M, Beaulieu AD, Tremblay MJ (2008) The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112: 1299-1307.
58. Richman DD, Johnson VA, Mayers DM, Shirasaka T, O'Brien MC, et al. (2001) In vitro evaluation of experimental agents for anti-HIV activity. *Curr Protoc Immunol* Chapter 12: Unit 12 19.
59. Wu Z, Irizarry RA (2005) Stochastic models inspired by hybridization theory for short oligonucleotide arrays. *J Comput Biol* 12: 882-893.
60. Song L, Bedo J, Borgwardt KM, Gretton A, Smola A (2007) Gene selection via the BAHSIC family of algorithms. *Bioinformatics* 23: i490-498.
61. Shah Mohak CJ (2009) A General Framework for Analyzing Data from Two Short Time-Series Microarray Experiments. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* IEEE computer Society Digital Library. IEEE Computer Society, 8: 14-26.
62. Chen H, Sharp BM (2004) Content-rich biological network constructed by mining PubMed abstracts. *BMC Bioinformatics* 5: 147.

63. Nuovo GJ, Hohman RJ, Nardone GA, Nazarenko IA (1999) In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers. *J Histochem Cytochem* 47: 273-280.

## Figure Legends

**Figure 1. Type I IFN $\alpha$ 2 inhibits HIV-1 replication in primary macrophages.** A) Gene expression of *TAT spliced* at 2, 4, 8, 24, 120 and 168 hours post-infection of macrophages. The macrophages were incubated in the absence or presence of IFN $\alpha$ 2 (1000 UI/ml for 18 hours). The expression level was calculated by qRT-PCR assessments of triplicates and normalized to the level of 18S. Results shown are a representative of 2 independent experiments. A.U. corresponds to arbitrary units. B) Cell-free culture supernatants were collected at 24, 72, 120 and 168 hours post-infection and analyzed for p24 content. Results shown represent 2 combined independent experiments.

**Figure 2. HIV-1 modulates TRAF6 and VISA expression in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages.** A) Intensity of the expression of the genes of interest obtained from the oligonucleotide array analysis (U133 Plus 2.0 array) at 2, 4, 8 and 24 hours post-infection of macrophages. Cells were treated with IFN $\alpha$ 2 (1000 UI/ml for 18 hours) with or without HIV-1. B) Validation of the regulation of gene modulation by HIV-1 in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages (differentiated with human serum) at 8 hours post-infection. Non-IFN $\alpha$ 2 treated and non-HIV infected macrophages were used as negative control. An \* denotes a significant difference ( $P < 0.01$ , paired *t*-test) between IFN $\alpha$ 2 pre-treated or not macrophages. The expression level was calculated by qRT-PCR assessments obtained from four donors and normalized to the level of 18S.



**Figure 3. TRAF6 but not VISA controls the level of expression of IRF7 and HIV replication.** Primary human macrophages were subjected to siRNA knockdown for *TRAF6* and *VISA*. The concentration of siRNA used was 200 nM. A) Percentages of inhibition of *TRAF6* and *VISA* in the presence of specific siRNA targeting both gene individually [n=3] compared to a control non-targeted siRNA [n=3]. Level of expression was measured by qRT-PCR B) Macrophages were all infected with HIV-1 with and without an IFN $\alpha$ 2 pretreatment, and treated with specific siRNA. The level of *TAT spliced* message measured 24 hours post-infection in TRAF6 and VISA conditions were compared to the negative control siRNA. C) Level of IRF7 and D) Level of IRF3 message expression in the absence of IFN $\alpha$ 2 when TRAF6 and VISA are repressed by siRNA compared to the negative control siRNA. The qRT-PCR results were normalized to the level of 18S. An \* denotes a significant difference ( $P < 0.05$ , one sample *t*-test) compared to the negative control siRNA. Each symbol in a group represents one independent donor. E) Western blot for IRF3 and IRF7, 24 hours post-infection in macrophages with TRAF6 suppression compared to siRNA control. The densitometry of the bands was normalized to that of  $\beta$ -actin and shows a decrease in protein level of IRF3 and an increase of IRF7. The ratio is shown next to the respective panels. Results shown are representative of 3 independent experiments.

**Figure 4. IRF7 expression modulates HIV-1 replication in primary macrophages.** A) Level of *IRF7* gene expression in macrophages treated with siRNA targeting *IRF7* (50 nM) [n=3] compared to a control non-targeted siRNA [n=3] resulted in a 55% reduction in *IRF7* gene expression. The qRT-PCR results were normalized to the level of 18S. B) Western blot for IRF7 protein treated as in panel A shows a decrease of 42% for IRF7 protein. The

densitometry of the bands was normalized to that of  $\beta$ -actin. Results shown are representative of 2 independent experiments. C) Level of *TAT spliced* expression following inhibition (51%) by IRF7 as compared to control. The qRT-PCR results were normalized to the level of 18S. An \* denotes a significant difference ( $P < 0.001$ , one sample *t*-test) compared to the negative control siRNA. Each symbol in a group represents one independent donor.

**Figure 5. IRF7 overexpression increases HIV-1 replication in primary macrophages.**

A) Western blot for IRF7 protein, 24 hours post-transfection of macrophages overexpressing IRF7 showed a 2 fold increase compared to empty vector control. The densitometry of the bands was normalized to that of  $\beta$ -actin. The ratio is shown next to the respective panels. Results shown are representative of 2 independent experiments. B) *TAT spliced* expression was augmented 14 fold in primary human macrophages overexpressing IRF7 compared to empty vector control. The qRT-PCR results were normalized to the level of 18S. An \* denotes a significant difference ( $P < 0.05$ , one sample *t*-test) compared to the empty vector control. Each symbol in a group represents one independent donor.

**Supplementary Figure S1.** Transactivation of the HIV-1 LTR by IRF1, IRF3 and IRF7. Expression vector for IRFs and pBlue\_5'\_LTR\_LUC were co-transfected in primary macrophages. Luciferase activity (RLU) was measured at 24h post-transfection. Results are the mean of two separate experiments.

**Supplementary Figure S2.** Western blot for TRAF6 24 hours post-infection of macrophages knockdown with 50, 100, 200 and 500 nM of *TRAF6* siRNAs.  $\beta$ -actin was used as a normalizer for input. 200 nM of siRNA were used since a better percentage of inhibition in *TRAF6* knockdown experiments were obtained at this concentration with respect to the protein level (67%).

Table 1. Ten most significant functional categories associated with genes differentially modulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected or not with HIV-1.

Function	p-value	No. of genes
Phosphoprotein	1,9E-08	126
Alternative splicing	9,1E-05	127
Nucleus	3,3E-04	90
RNA-binding	1,3E-03	19
DNA-binding	2,2E-03	47
Chromosomal rearrangement	3,0E-03	12
Transcription	5,4E-03	46
Transcription regulation	6,6E-03	45
Peroxidase	6,9E-03	4
Cytoskeleton	7,7E-03	14

Functional categories were obtained using the DAVID Bioinformatics tool. Selection of the ten most significant functional categories out of 32 functions involved the top 500 genes differentially modulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected or not with HIV-1.



Table 2. Peak expression and time point of known genes associated in IFN response that were modulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages compared to untreated control.

IFN-related genes	Reference Sequence	Peak expression (Fold induction)	Time (hours)
APOBEC3A	NM_145699	1267	2
APOBEC3G	NM_021822	3	2
EIF2AK2	NM_002759	3	4
G1P2 (ISG15)	NM_005101	47	2
G1P3	NM_002038	10	24
IFI27	NM_005532	1131	4
IFI44L	NM_006820	1182	2
IFIT2	NM_001547	74	2
IFIT3	NM_001549	32	8
IFITM1	NM_003641	707	4
IFITM3	NM_021034	27	8
IRF1	NM_002198	3	8
IRF7	NM_001572	12	2
ISG29	NM_002201	702	2
MX1	NM_002462	197	8
MX2	NM_002463	24	2

---

OAS1	NM_016816	33	2
OAS2	NM_016817	41	2
OASL	NM_003733	446	2
TRIM22	NM_006074	11	2

---

Table 3. Peak expression and time point of candidate genes associated with IFN response that were modulated in IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages compared to untreated control and modulated by HIV-1.

IFN-related genes	Reference Sequence	Peak expression	Time (hours)	Peak expression	Time (hours)
		IFN $\alpha$ 2/CTRL (Fold induction)		IFN $\alpha$ 2/HIV infection (Fold induction)	
BIRC3	NM_001165	7	2	3,5	2
CCL5	NM_002985	8	2	4	8
CD38	NM_001775	39	4	13	16
CEBPD	NM_005195	2	8	1	16
CHI3L1	NM_001276	2	2	1	2
CXCL10	NM_001565	124	2	31	2
CXCL11	NM_005409	118	2	39	8
CXCL9	NM_002416	28	2	9	16
EHF	NM_012153	4	8	1	16
HMGA1	NM_145899	2	8	1	24
LILRB2	NM_005874	16	8	8	2
NCOA3	NM_181659	2	2	4	4

OGT	NM_181632	5	8	4	2
PIGR	NM_002644	3	8	1,5	8
PIP5K2A	NM_005028	3	8	1,5	8
SAMHD1	NM_015474	2	8	1	8
TAP2	NM_000544	16	2	8	2
TCF4	NM_003199	2	2	0,7	16
TRAF6	NM_004620	2	8	1	8
TXNIP	NM_006472	2	8	1	16
VISA	NM_020746	2	8	1	8

Selection of the top 500 most modulated genes when comparing the IFN $\alpha$ 2 pre-treated macrophages infected or not with HIV-1. Of these, 55 were related to interferon as a keyword. From these 55, 21 were upregulated by interferon as compared to untreated control (peak expression and time point) but modulated differentially when HIV-1 was added. Those genes may represent interferon effectors that are modulated by HIV-1 infection during the interferon response.



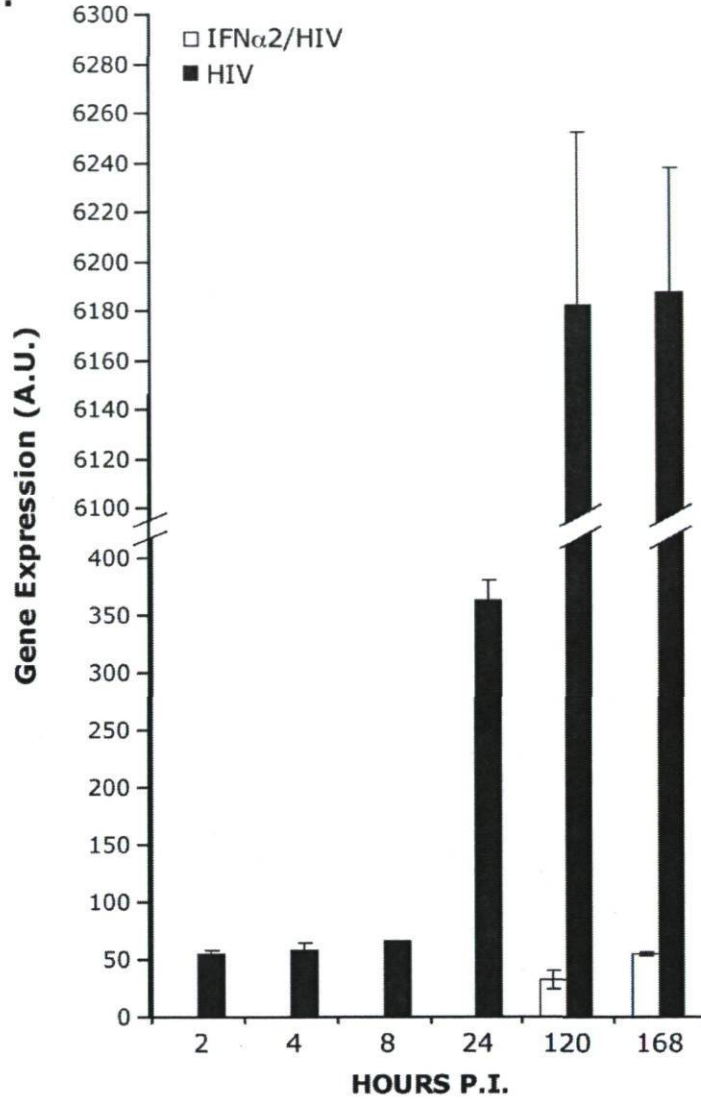
Table 4. Sequence of Oligonucleotide Primers used in Real-Time qRT-PCR Gene Expression Analysis.

Primer <sup>a</sup>	Nucleotide Sequence
TRAF6-F	AAGGGATGCAGGTCACAAATGT
TRAF6-R	TTTTCCAGCAGTATTTTCATTGTCAA
VISA-F	ACTTCATTGCGGCACTGAGG
VISA-R	CTTCGTCGCGGAGATCAACT
IRF7-F	CGACATCGAGTGCTTCCTTATG
IRF7-R	ACTGGGTTCTAGGCGGGC
IRF3-F	TCTGATACCCAGGAAGACATTCTG
IRF3-R	CAACACCATGTTACCCAGTAACTCAT
TAT Spliced-F <sup>b</sup>	CCTAAAACCTGCTTGTACCAATTGC
TAT Spliced-R <sup>b</sup>	GGAGGTGGGTTGCTTTGATAGAGA
TAT Spliced-probe <sup>b</sup>	AAAGCCTTAGGCATCTC

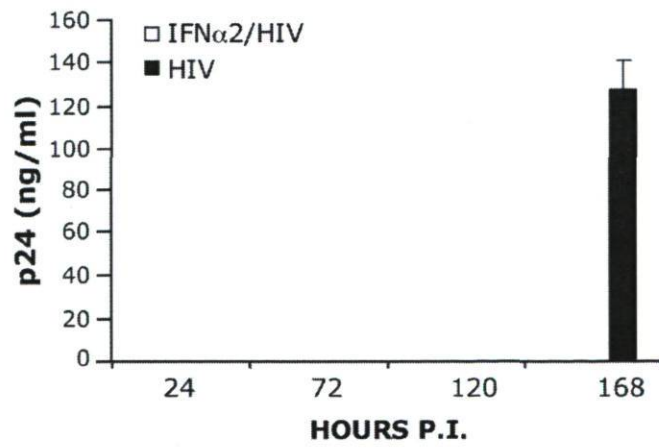
<sup>a</sup>F (forward) primer sequence is in 5'-3' orientation, R (reverse) primer sequence is reverse complemented.

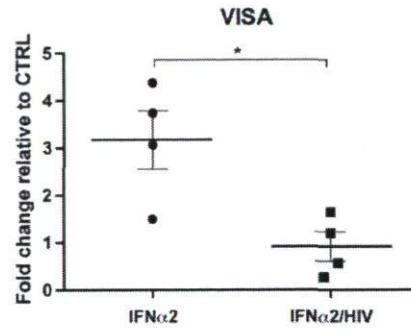
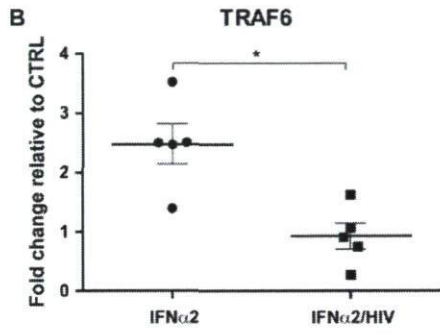
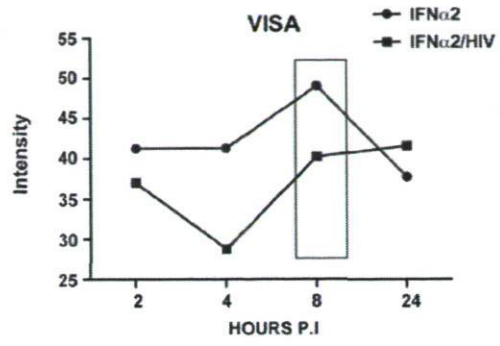
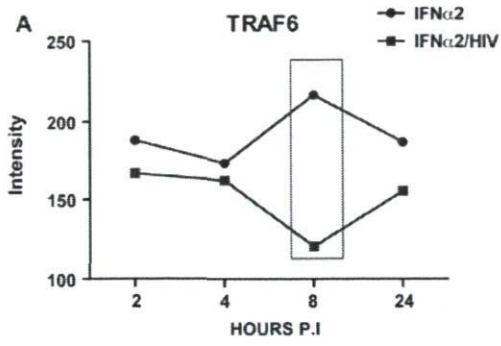
<sup>b</sup>TAT Spliced was detected using Taqman.

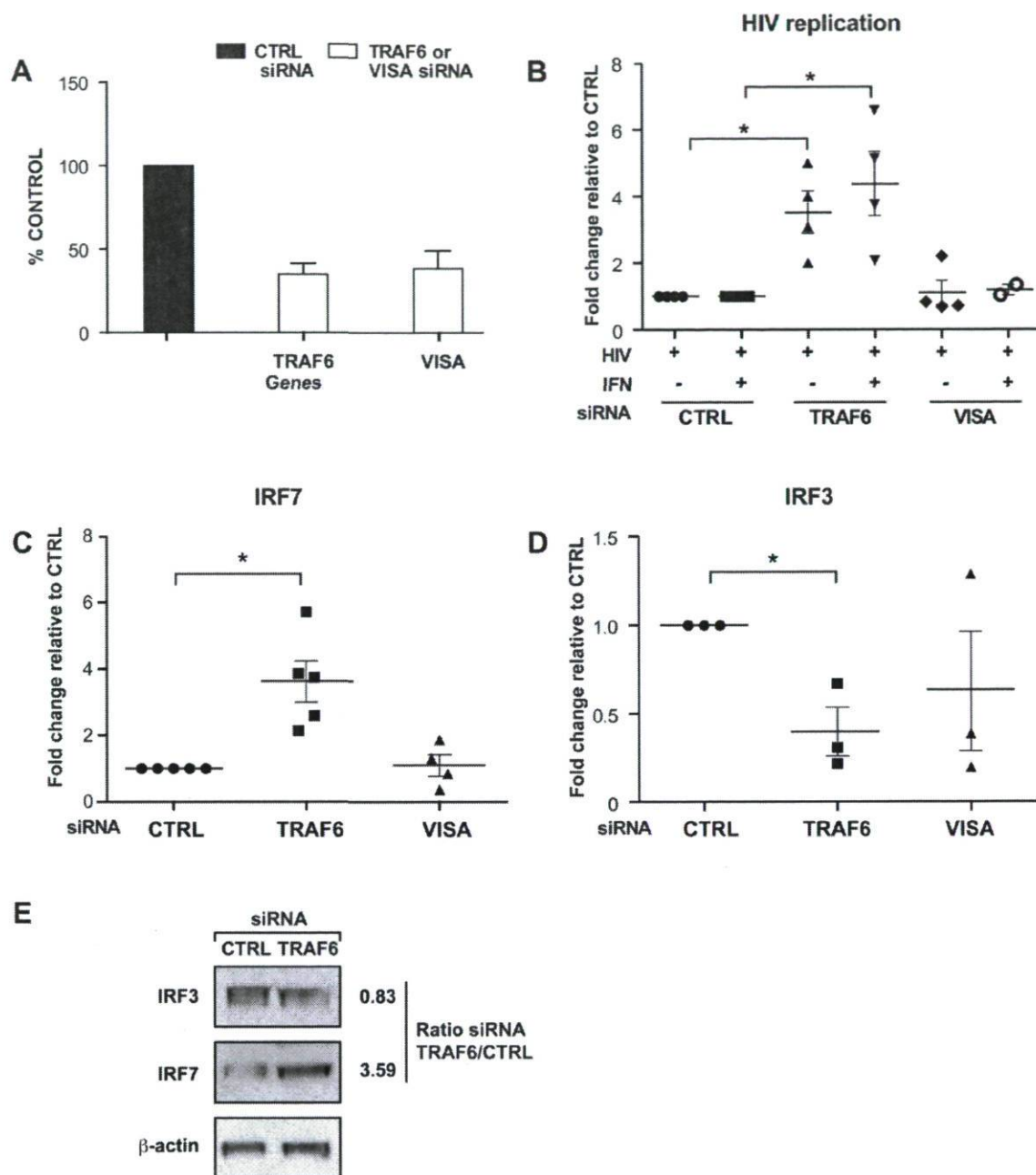
A.



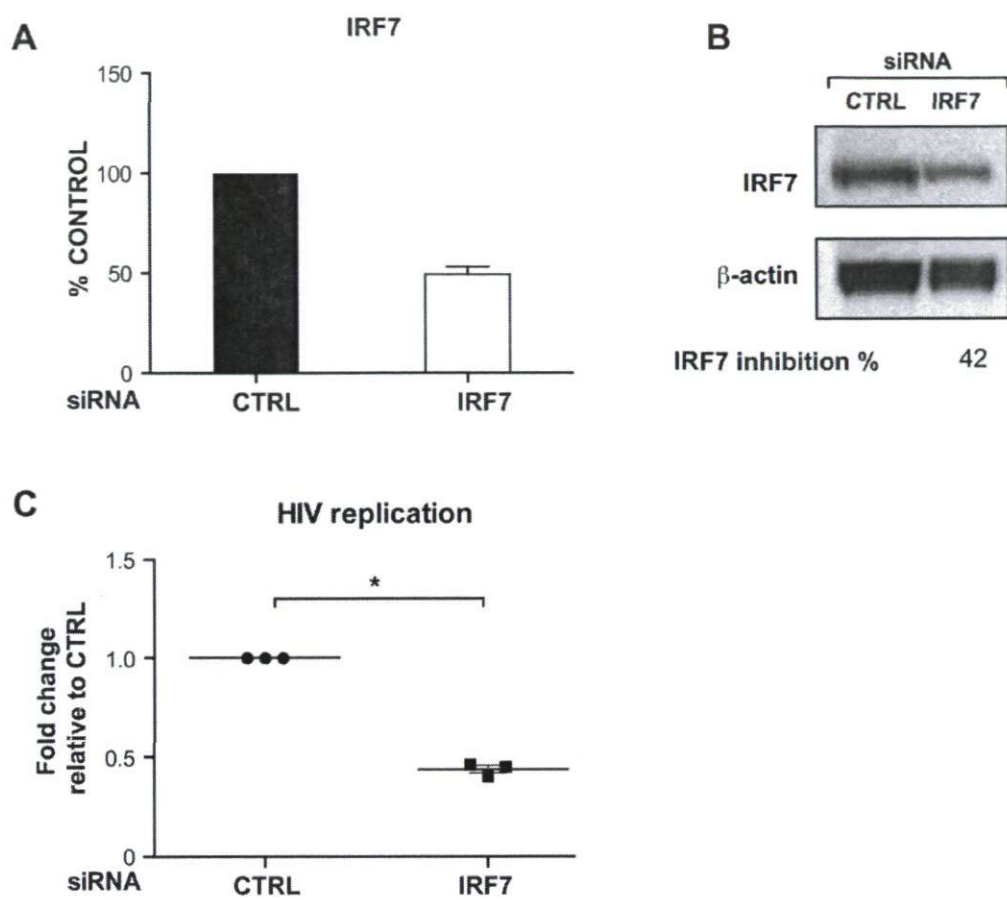
B.

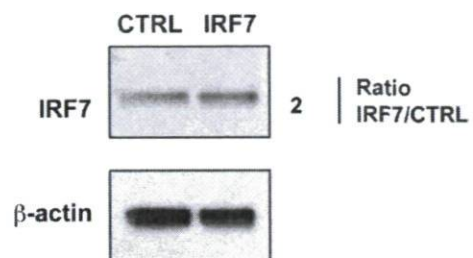
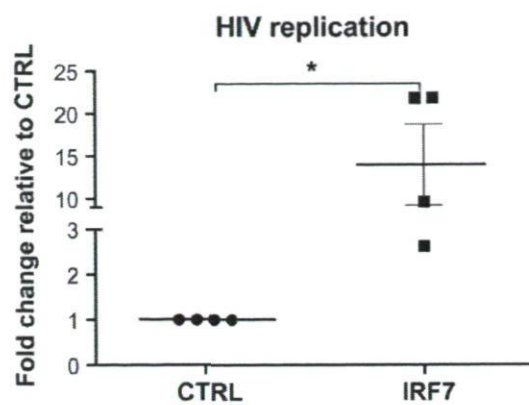


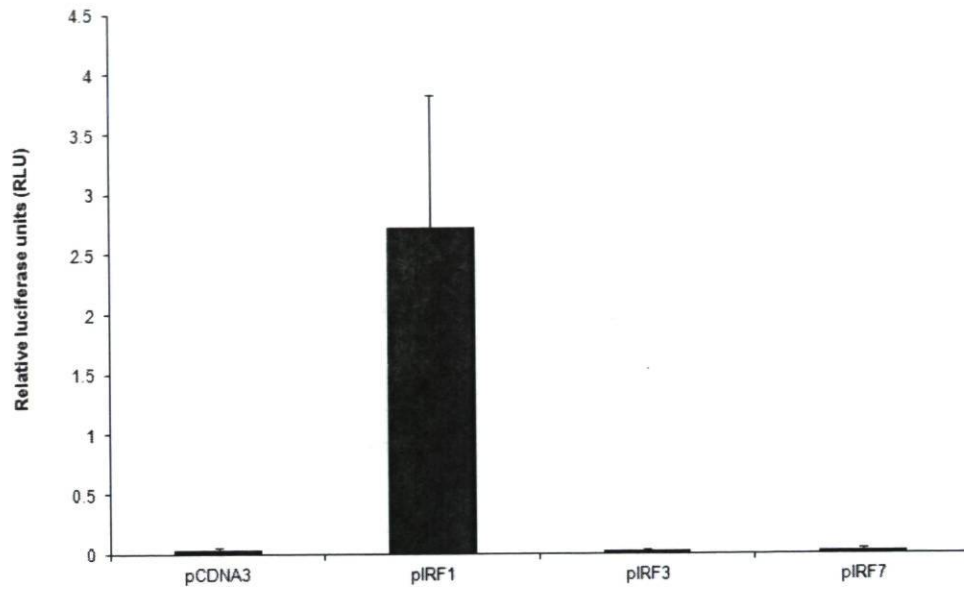


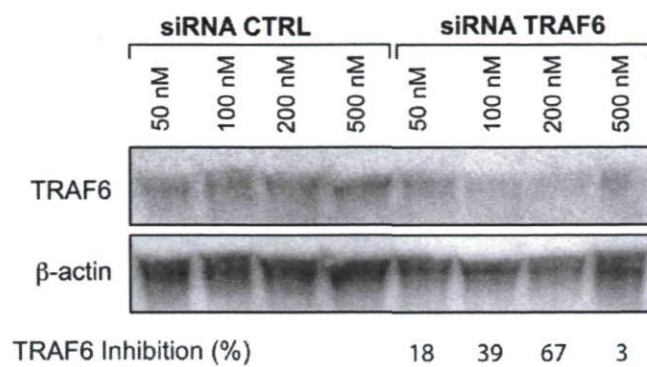






**A****B**







## 6.2- Article

# **CHAPITRE VII- Activation transcriptionnelle de CARM1 par IRF7 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1**

Ce chapitre fait l'objet de résultats obtenus très récemment qui n'ont pas encore été soumis pour publication.

## **7.1- Résumé**

Il est connu qu'IRF7 joue un rôle essentiel dans l'activation de gènes cellulaires induits par les virus. Récemment, nous avons montré la contribution positive d'IRF7 dans le processus de réplication d'une infection des macrophages par le VIH-1. De ce fait nous avons effectué une immunoprécipitation de la chromatine liée à la protéine IRF7 afin d'identifier les promoteurs auxquels IRF7 se lie uniquement lors d'une infection des macrophages primaires humains par le VIH-1 afin d'évaluer l'effet de la transcription des gènes liés à ces promoteurs sur la réplication virale. Ces travaux démontrent qu'IRF7 se lie au promoteur du gène *CARM1*. CARM1 est impliqué dans l'activation de la transcription du LTR du VIH-1 en formant un complexe avec NFκB. Notre étude démontre que la transcription de *CARM1* est augmentée lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1 et diminuée lorsque l'expression génique d'*IRF7* est réduite. Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent que la réplication virale du VIH-1 est diminuée lorsque l'expression génique de *CARM1* est réduite. Ces résultats sont la première démonstration qu'IRF7 régule la transcription de *CARM1*, et que celui-ci semblerait promouvoir la réplication virale du VIH-1.

## 7.2- Rationnelle

Nous avons montré qu'IRF7 augmente la réplication virale du VIH-1 lors d'une infection des macrophages primaires humains. Il est connu que des membres de la famille des IRFs, comme IRF1 et IRF2, se lient au LTR du VIH-1 pour en activer la transcription [529]. La régulation de la réplication virale par IRF7 pourrait se faire via l'interaction au LTR. De ce fait, nous avons donc décidé de vérifier la transcription du LTR en présence d'IRF7 dans notre modèle : les macrophages primaires humains.

Il est connu qu'IRF7 joue un rôle essentiel dans l'activation de gènes cellulaires induit par les virus [385, 415, 547, 548]. Une autre possibilité est qu'IRF7 pourrait réguler la transcription de gènes cellulaires qui ont un effet positif sur la réplication virale. Pour ce faire, l'identification des promoteurs sur lesquels se lie IRF7 lors d'une infection des macrophages primaires humains par le VIH-1 a été effectuée par une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine lié à notre protéine d'intérêt, IRF7. Suivant l'immunoprécipitation de la chromatine, nous avons effectué une expérience de CHIP-on-chip afin d'identifier des promoteurs retrouvés uniquement lors d'une infection des macrophages primaires humains. À la suite de l'identification de promoteurs lors d'une infection des macrophages primaires humains par le VIH-1, l'analyse de l'expression des gènes associés au promoteur identifié afin de valider l'effet d'une infection des macrophages par le VIH-1, ainsi que l'analyse de l'expression de ces gènes lors de la réduction de l'expression d'IRF7 ont été effectuées.

## 7.3- Matériel et Méthodes

**Cellules et virus.** Les monocytes ont été extraits et différenciés en macrophages avec du M-CSF selon le protocole décrit précédemment (Chapitre VI, article 2). La production virale a été produite à partir de la transfection de la lignée cellulaire 293T avec le plasmide pNL4-3Ba*Env* selon le protocole décrit précédemment (Chapitre VI, article 2).

**Expériences de transactivation du LTR du VIH-1.** Cellules THP-1 ont été co-transfectées de façon transitoire avec pBlue\_5'\_LTR\_LUC (0,5 ug) et pcDNA3-IRF1-myc, pcDNA3-IRF7-myc, pcDNA3-IRF3-myc (donné par J. Hiscott, Université McGill, Montréal, QC) ou pcDNA3 (vecteur contrôle) (1,5 ug) avec la lipofectamine selon les instructions du manufacturier (Invitrogen Canada, Burlington, ON). 24 heures suivant la transfection, les cellules ont été lysées dans 100ul de tampon de lyse (125 nM Tris-Base, 10 mM DTT, 5% Triton X-100 et 50 % glycérol). L'activité luciférase a été mesurée avec le luminomètre MLX (Dynex Technology, Chantilly, VA) et exprimé en unité de lumière relative (RLU).

**Infection des macrophages.** Les macrophages ont été infectés avec la souche NL4-3BaLenv du VIH-1 à un MOI de 1 pendant 24 heures. Des cellules non-infectées ont été utilisées comme contrôle.

**Liaison transversale *in vivo* et immunoprécipitation.** La liaison de l'ADN et des protéines a été effectuée en ajoutant de la formaldéhyde 1% directement au milieu de culture comme décrit auparavant [549]. Suivant la sonication de l'ADN, IRF7 a été immunoprécipité à partir de la préparation d'ADN lié avec un anticorps spécifique pour IRF7 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). L'ADN capturé a été purifié en inversant la liaison transversale par traitement des échantillons à 68°C pendant 6-8 heures et les protéines ont été digérées par la protéinase K. L'ADN de cellules non infectées a été utilisé comme contrôle.

**Ligation de l'ADN de liaison, amplification et marquage de l'ADN.** Les fragments d'ADN immunoprécipité ont été ligués à l'ADN de liaison par la ligase d'ADN T4 (Invitrogen Canada, Burlington, ON) suivant les instructions du manufacturier. L'ADN de liaison consistait en : 5'-GATCAGAAGCTTGAATTCGAGCAG-3' et 5'-CTGCTCGAATTCAAGCTTCT-3'. Suivant la ligation, l'ADN a été amplifié. Les conditions d'amplification ont été 50°C pendant 2 min, 95°C pendant 4 min, 55 cycles à 95°C pendant 15 s et 55°C pendant 40 s. L'ADN amplifié a été marqué avec le fluorochrome Cy5-dCTP pour l'échantillon et avec Cy3-dCTP pour l'ADN contrôle.



L'ADN marqué a été hybridé sur une puce de promoteur contenant 19 000 séquences et scanné avec l'appareil G2565BA d'Agilent (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON).

**Analyse du ChIP on chip.** La normalisation et l'analyse statistique ont été effectuées avec l'interface R 2.2.1 en utilisant LIMMA (version 2.7.3).

**Expériences de réduction de l'expression génique.** Macrophages de donneurs sains ont été transfectés pendant 48 heures avec des ARNsi SMARTpool pour *IRF7* (L-011810-00; Dharmacon, Lafayette, CO) ou *CARM1* (L-004130-00 ; Dharmacon, Lafayette, CO) avec l'oligofectamine (Invitrogen Canada, Burlington, ON) selon les instructions du fabricant. Des ARNsi négatifs (AM4635; Ambion, Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON) ont été utilisés comme contrôle. Par la suite, les macrophages transfectés ont été infectés avec la souche NL4-3Ba $Lenv$  du VIH-1 à un MOI de 1 pendant 24 heures.

**Isolation de l'ARN et transcriptase inverse.** Les échantillons de cellules ( $3 \times 10^6$  cellules) ont été lysés dans 1 ml de TRIzol ((Invitrogen Canada, Burlington, ON) et ont été entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'ARN total pour chacun des donneurs a été isolé pour chacune des conditions en utilisant la méthode de TRIzol selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité de l'ARN ont été analysées en utilisant le Bioanalyzer Agilent Technologies 2100 et le kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON). L'ADNc des cultures de donneur indépendants a été généré à partir de 200ng d'ARN total en utilisant les hexamères d'oligos aléatoires suivant les instructions pour la Superscript II (Invitrogen Canada, Burlington, ON).

**Analyse de l'expression génique par qRT-PCR.** Les oligos ont été dessinés en utilisant Primer Express 2.0 (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON). Les amplicons ont été détectés en utilisant le système de détection Amplifluor (IRF7 et CARM1) (Chemicon International, Temecula, CA) ou le système de détection Taqman (TAT spliced) (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON). Des quantités égales d'ADNc (20 ng) ont été amplifiées en suivant les instructions décrites précédemment (Chapitre VI, article 2)



## 7.4- Résultats et Discussion

**Activation de la transcription du LTR.** Dans le but de tester si IRF7 peut se lier directement au LTR du VIH-1 et activer la transcription génique, des macrophages primaires de donneurs sains ont été transfectés avec les vecteurs d'expression pour IRF1 et IRF7 avec un vecteur contenant le LTR du VIH-1 ainsi qu'un gène luciférase reporteur. IRF1 a été utilisé comme contrôle positif, car il est connu qu'il se lie aux séquences IRF du LTR [529]. La présence d'IRF1, active la transcription au LTR, cependant la présence d'IRF7 seul ne stimule pas la transcription (figure 1). Ces résultats suggèrent un rôle indirect d'IRF7 dans la transcription du VIH-1.

**Promoteur identifié lors d'une infection par le VIH-1.** Afin d'identifier les promoteurs sur lesquels se lie directement ou indirectement IRF7 lors d'une infection des macrophages primaires humains par le VIH-1, nous avons effectué une immunoprécipitation de la chromatine liée à IRF7 et interrogé une puce constitué de 19 000 régions promotrices. Des macrophages non-infectés ont été utilisé comme contrôle. Nous avons identifié 275 régions promotrices retrouvées uniquement lors d'une infection par le VIH-1 comparé à l'ADN des macrophages contrôles. Parmi ceux-ci, le promoteur du gène CARM1 a été identifié comme région liée significativement à IRF7 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 (p-value : 0,0032). Par ailleurs, l'activation de la transcription du gène CARM1 lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1 a été montrée (figure 2). Ces résultats suggèrent d'une part que CARM1 a un rôle à jouer lors d'une infection des macrophages et d'autre part que la présence d'IRF7 serait associée à l'activation de la transcription de CARM1 lors d'une infection.

**Effet d'IRF7 sur l'expression de CARM1.** Pour établir le lien entre la présence d'IRF7 et l'activation de la transcription de CARM1 lors d'une infection, nous avons diminué

l'expression d'IRF7 et quantifié l'expression génique de CARM1. L'expression génique d'IRF7 est diminuée significativement de 55% avec l'ARNsi (Chapitre V, article 2, figure 4A). Nos données démontrent que lorsque l'on réduit l'expression d'IRF7 lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1 nous observons une diminution significative de l'expression de CARM1 dans les macrophages primaires infectés par le VIH (98 %) (figure 3). Ces résultats démontrent l'association entre IRF7 et la transcription de CARM1 lors d'une infection des macrophages primaires humains par le VIH-1. Nos résultats suggèrent l'implication d'un complexe de transcription nécessitant la présence d'IRF7 pour activer la transcription de CARM1, puisque la région promotrice du gène *CARM1* ne contient aucun site de liaison pour IRF7.

**Effet de CARM1 sur la réplication virale.** Afin de déterminer le rôle de CARM1 lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1, nous avons diminué l'expression de CARM1 et quantifié la réplication virale (TAT spliced). L'expression de CARM1 est réduite significativement de 59 % (figure 4A). La figure 4B montre qu'il y a une diminution de la réplication virale de 50 % lorsque l'expression de CARM1 est diminuée.

En conclusion, ce sont les premiers résultats qui démontrent l'implication indirecte d'IRF7 dans la transcription du gène CARM1. Par ailleurs, nos premiers résultats vérifiant l'impact de CARM1 sur la réplication virale du VIH-1 suggèrent un effet positif sur celle-ci. Une étude de Hassa et ses collègues a montré l'activation du LTR du VIH-1 lorsqu'il y a présence de CARM1 et de NFkB dans les cellules [550]. En effet, CARM1 agit en synergie avec NFkB pour augmenter l'activation du LTR. Tous ces résultats suggèrent que lors d'une infection des macrophages, le VIH-1 va augmenter l'expression d'IRF7 qui à son tour va activer directement ou indirectement la transcription de gènes distincts dont CARM1 qui va complexer avec NFkB au LTR du VIH-1 pour en augmenter la transcription. L'association de CARM1 et de NFkB et l'augmentation de la transcription du LTR devront être validée dans notre modèle.



## Légende des figures

**1. Effet des IRFs sur la transactivation du LTR du VIH-1.** THP-1 ont été co-transfectées de façon transitoire avec le pBlue\_5'\_LTR\_LUC et les vecteurs exprimant les IRFs indiqués. Après 24h, l'expression de la luciférase a été évaluée comme indiqué dans le matériel et les méthodes. Les résultats représentent une moyenne  $\pm$  écart-type provenant de 2 expériences séparées.

**2. Expression génique de CARM1 lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1.** Macrophages primaires humains ont été infectés par le VIH-1 à un MOI de 1. Après 24 h, l'expression génique de *CARM1* a été quantifiée comme indiqué dans le matériel et les méthodes. Des cellules non-infectées ont été utilisées comme contrôle. Un \* indique une différence significative ( $P \leq 0.05$ , *t*-test à un échantillon) entre les macrophages infectés ou non. Le niveau d'expression a été calculé par des essais de qRT-PCR obtenus à partir de 2 donneurs et normalisés au niveau du 18S.

**3. L'expression d'IRF7 module l'expression de CARM1 dans les macrophages primaires.** Le niveau d'expression de *TAT spliced* (réplication virale) suivant une inhibition (51%) d'*IRF7* comparativement au contrôle. Des macrophages primaires transfectés avec un ARNsi ne ciblant aucun gène humain ont été utilisés comme contrôle. Un \* indique une différence significative ( $P \leq 0.05$ , *t*-test à un échantillon) comparé au contrôle d'ARNsi négatif. Le niveau d'expression a été calculé par des essais de qRT-PCR obtenus à partir de 2 donneurs et normalisés au niveau du 18S.

**4. L'expression de CARM1 module la réplication virale chez les macrophages primaires.** A) Le niveau d'expression génique de *CARM1* chez des macrophages primaires suivant la transfection d'ARNsi ciblant *CARM1* comparé au contrôle négatif d'ARNsi. B) Le niveau d'expression de *TAT spliced* (réplication virale) suivant une inhibition de *CARM1* comparativement au contrôle. Des macrophages primaires transfectés avec un ARNsi ne ciblant aucun gène humain ont été utilisés comme contrôle. Un \* indique une

différence significative ( $P \leq 0.05$ , *t*-test à un échantillon) comparé au contrôle. Le niveau d'expression a été calculé par des essais de qRT-PCR obtenus à partir de 1 donneur et normalisés au niveau du 18S.

**Figure 1**

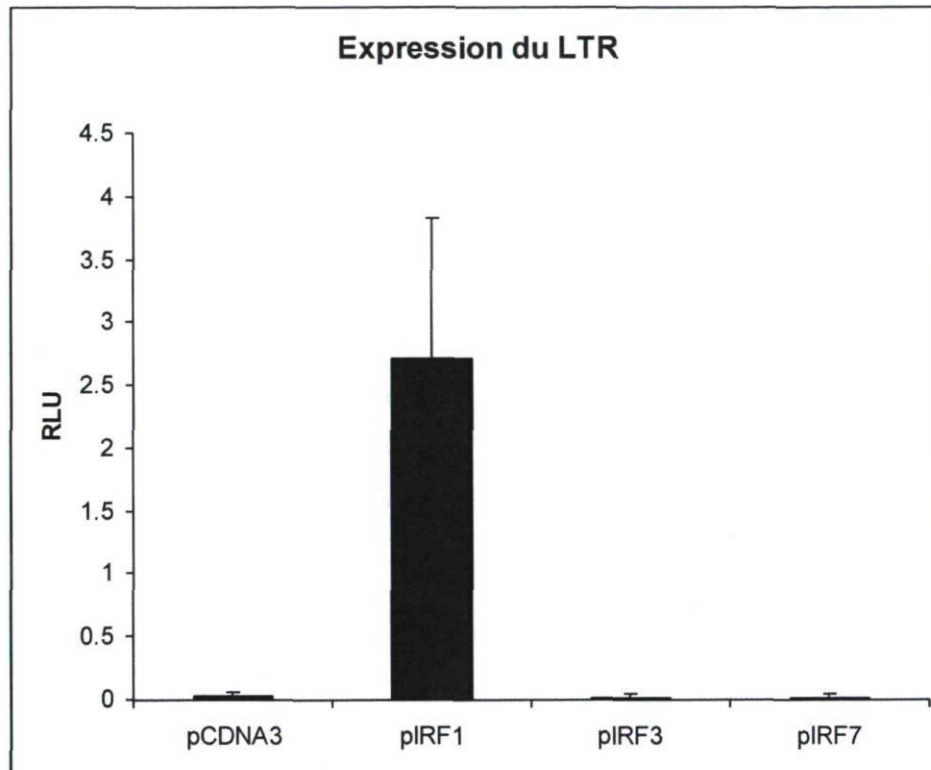




Figure 2

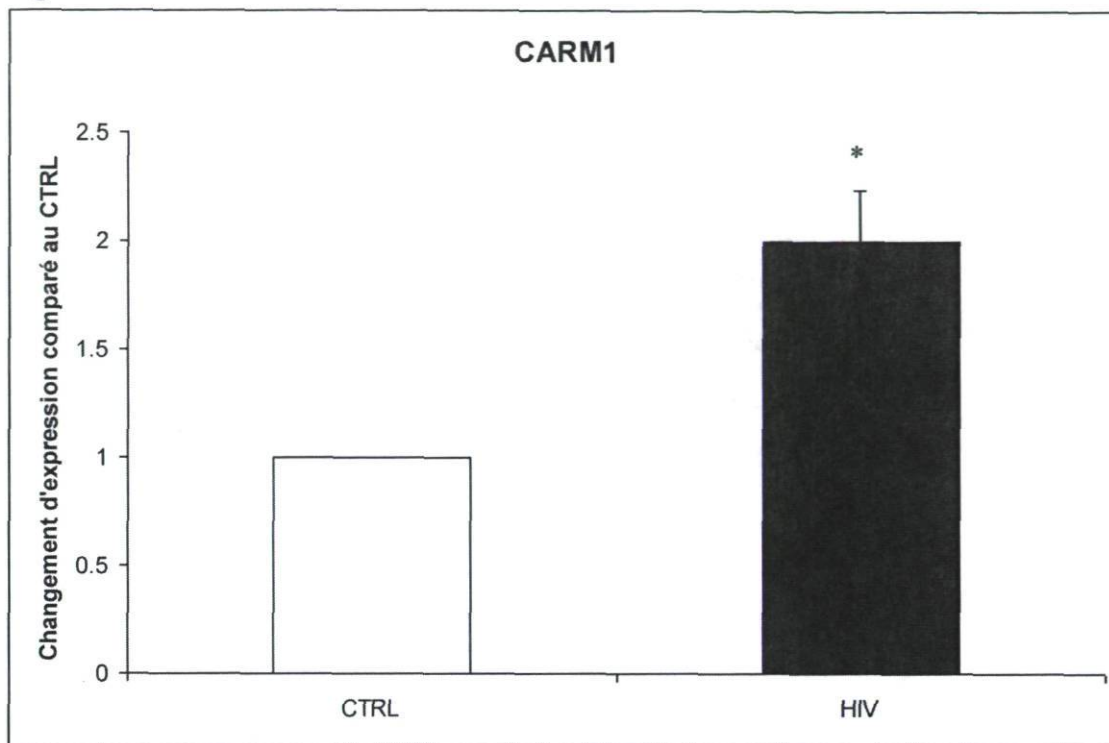


Figure 3

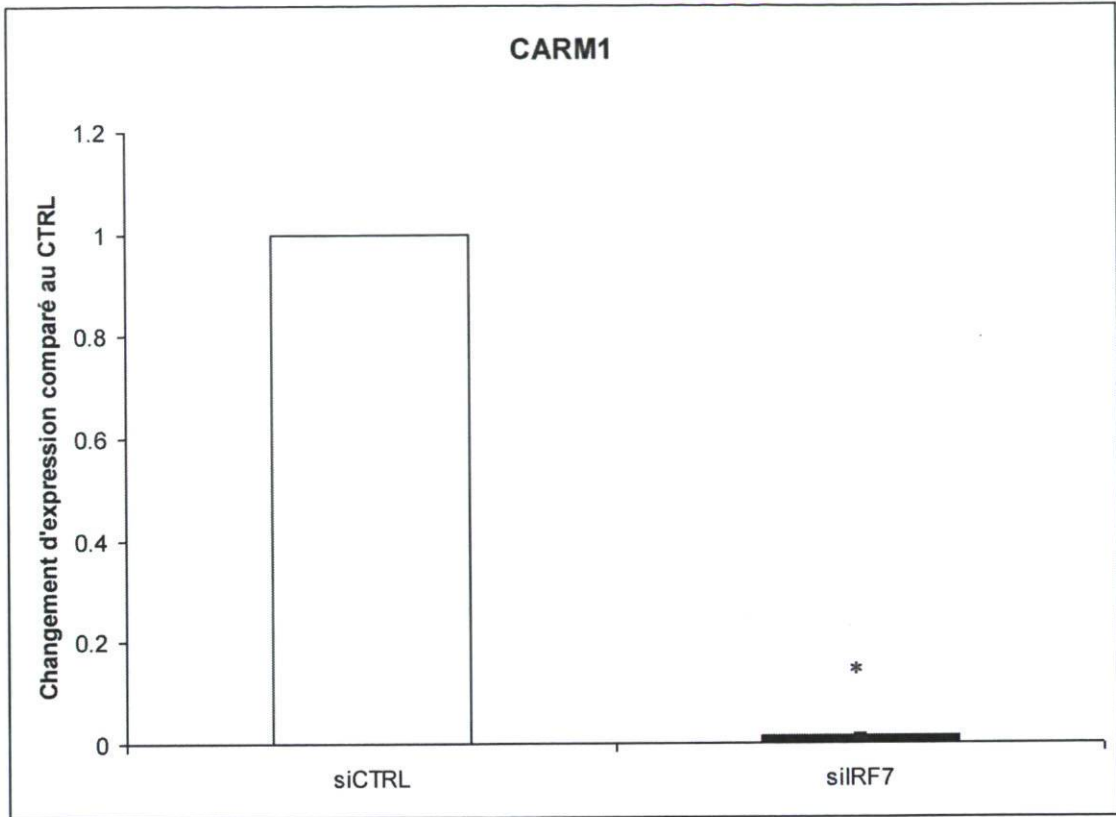
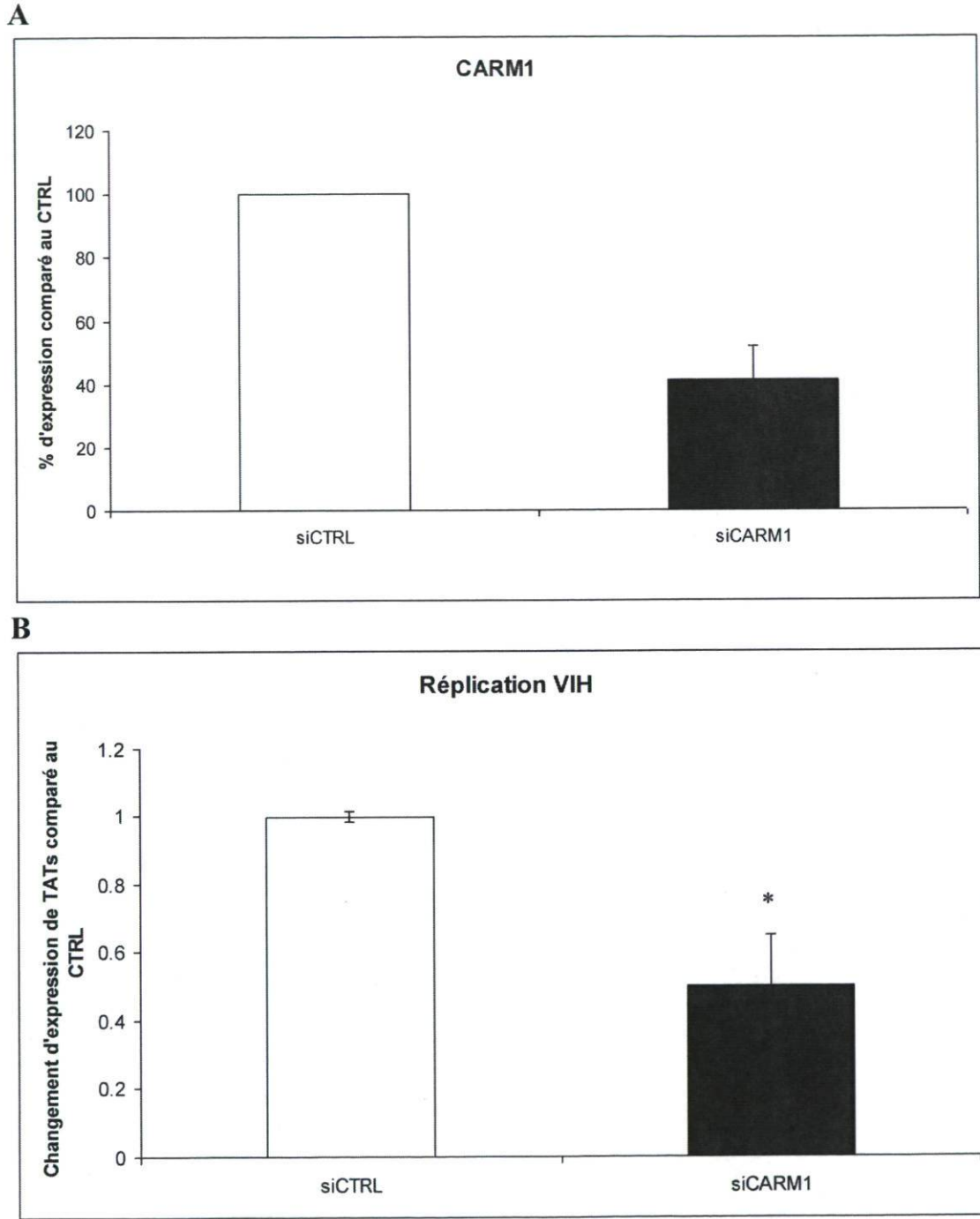


Figure 4



## CHAPITRE VIII- DISCUSSION GÉNÉRALE

L'arrivée de la thérapie antivirale a grandement aidé à la défense contre le VIH. Cependant, aucun traitement ne permet d'éradiquer le virus du corps humain. L'espérance de vie des personnes séropositives ne cesse d'augmenter avec la prise des antirétroviraux. Cependant, l'infection au VIH demeure une maladie grave. En effet, les personnes séropositives sont contagieuses, plus vulnérables à certaines maladies et doivent aussi supporter les effets indésirables de la médication qui est d'autant plus coûteuse. C'est pourquoi en attendant que nous disposions de traitements inhibant complètement la multiplication du virus et/ou que nous ayons accès à un vaccin efficace, la thérapie antivirale doit continuer à se pourvoir de molécules ciblant différentes étapes de la réplication virale. Comme il est décrit tout au long de cette thèse, le VIH déjoue en partie le système immunitaire de l'hôte. De nos jours, le maintien d'une immunité efficace contre le VIH est une des avenues de traitements qui est beaucoup étudiée. La clarification de la modulation des facteurs de l'hôte par le VIH est donc très importante pour la mise en place de traitements efficaces. Les travaux présentés dans cette thèse ont exploré ces phénomènes d'interaction VIH-hôte nécessaires à la réplication du virus. Ils ont mis en lumière la modulation de différents facteurs cellulaires importants à l'infection par le VIH.

L'élucidation de la modulation de l'hôte par le VIH est un objectif très important pour la communauté scientifique. Cependant, de nombreuses théories se basent sur des résultats acquis avec des lignées cellulaires, lesquelles ne correspondent pas aux cellules normales du corps humain ni celles infectées de façon préférentielle par le VIH-1. L'expression des protéines, les voies de signalisation et la réorganisation du cytosquelette d'actine sont bien souvent différentes des cellules primaires. Par conséquent, la meilleure façon d'étudier la modulation des facteurs cellulaires par le VIH demeurent l'utilisation de cellules qui constituent les cibles primaires du virus, soient les lymphocytes T CD4+ et les macrophages provenant de monocytes extraits du sang périphérique. Malgré les difficultés rencontrées par l'utilisation des cellules primaires, la véracité des résultats obtenus est



d'autant plus crédible. Parmi les difficultés rencontrées, il y a la transfection de manière efficace des cellules primaires. En effet, les méthodes de transfection sont souvent toxiques pour ces cellules et l'efficacité de la transfection (inhibition ou surexpression de facteurs) à un fort niveau est difficile. Un travail d'optimisation de protocoles nous a permis d'établir des normes de travail avec lesquels nous avons obtenu les résultats présentés dans cette thèse.

Une autre difficulté rencontrée est la variabilité entre les différents donneurs. En effet, lorsque l'on utilise des lignées cellulaires, la variabilité des différents essais est amoindrit. Chaque individu est doté d'un génome humain qui lui est unique, il est par ailleurs confronté à différents facteurs extérieurs qui le font réagir différemment aux stimuli. Dans nos études d'expression génique, les cellules issues d'individus indépendants réagissaient de façon unique à chaque expérience, ce qui rend difficile les effets significatifs. Pour contrer cette réalité, il nous a fallu augmenter le nombre d'expériences afin d'obtenir des résultats probants.

Mes travaux ont permis de caractériser différents facteurs cellulaires modulés par le VIH-1. Premièrement, l'utilisation de lymphocytes T CD4+, issus du sang périphérique, nous a permis d'étudier les différences entre les virus R5 et les virus X4 en identifiant la modulation de facteurs reliés à l'activation cellulaire et à l'organisation de l'actine par le virus R5 comparativement au virus X4. Deuxièmement, l'utilisation de monocytes/macrophages nous a permis d'identifier un facteur important de la réponse antivirale généré par les IFNs, TRAF6 et un facteur associé positivement à une infection des macrophages par le VIH-1, IRF7. Finalement, nous avons identifié un facteur, CARM1, exprimé lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 et en présence d'IRF7 qui semblerait contribuer à la réplication virale.

## **8.1- La modulation de facteurs cellulaires par les souches X4 et R5 lors d'une infection des lymphocytes T CD4+**

### **8.1-1. Modulation des gènes associés à l'activation des cellules T par la souche R5**

Comme mentionné dans le chapitre I, le virus R5 est préférentiellement répertorié après une primo-infection comparé au virus X4 qui est exprimé de façon majoritaire plus tardivement lors de la pathogénèse. La raison de cette dominance du virus R5 en début d'infection n'est pas encore bien connue. Des travaux antérieurs suggéraient que les virus R5 peuvent plus facilement infecter les cellules non-activées [335, 336]. Dans le même sens, il a été montré que le CPI du virus R5 peut entrer plus facilement dans le noyau des cellules non-activées [337]. Par ailleurs, la variation de la réplication virale dans les lymphocytes T CD4+ naïfs est reliée à leur état d'activation [362]. Plusieurs études ont démontré une différence dans l'établissement d'une infection dans les lymphocytes T CD4+ entre les deux souches virales et celle-ci en lien avec l'activation des cellules par les virus. Récemment, il a été montré que l'enveloppe du virus R5 délivre un signal qui active les cellules T [363]. Dans le même sens, notre étude démontre que la souche R5 du VIH-1 augmente un plus grand nombre de gènes cellulaires associés à l'activation des cellules T que la souche X4 lors des premiers 24 heures suivant une infection. Ce résultat a été corroboré par notre analyse complète du transcriptome humain dans les cellules T CD4+ inoculées avec des virus R5 ou X4. Nos résultats montrent que les virus R5 et X4 induisent un profil d'expression génique distinct dans les cellules T CD4+ non-stimulées. Les changements induits par l'inoculation des cellules T CD4+ avec les virus R5 sont significativement associés à 65 voies de signalisation incluant la régulation de l'organisation de l'actine et la signalisation par le RCT.

Les résultats présentés dans cette étude concordent avec ceux obtenus par Cicala et ses collaborateurs. Alors que nos travaux sont axés sur l'effet des virus complets (infectieux),



leur étude s'est concentrée sur la modulation des gènes cellulaires par l'enveloppe (gp120) des souches R5 et X4 [363]. Ils ont montré que la gp120 des virus R5 et X4 module différemment des facteurs de transcription et des gènes du cycle cellulaire dans les PBMCs. Par ailleurs, des 326 gènes spécifiquement augmentés dans la population de cellules T CD4+ naïves dérivées d'individus virémiques, 47 étaient partagés avec le groupe de gène modulé exclusivement par l'enveloppe R5 dans les PBMCs [363].

### 8.1-2. Réorganisation du cytosquelette d'actine

L'interaction entre la surface virale et le récepteur et co-récepteur cellulaire est essentielle pour permettre la fusion du VIH avec la membrane. Il est connu que Nef se localise à la SV et module les événements de signalisation du RCT dans les cellules T CD4+ activées [551]. La polymérisation de l'actine est critique pour le regroupement du RCT et la formation de la SV chez les cellules T CD4+ [552-554]. Le regroupement des composantes du complexe du récepteur du VIH-1 dépendant de l'actine à la surface des cellules cibles a été démontré pour plusieurs types cellulaires [555-557]. Récemment, il a été suggéré que l'activation du complexe ARP2/3 (en anglais, *Actin-Related Protein 2/3*) est impliqué dans la migration des composantes du noyau viral au travers le noyau cellulaire [558]. Il a été montré que le complexe ARP2/3 contribue à l'infection efficace du VIH-1 dans les lignées cellulaires. Effectivement, l'inhibition du complexe ARP2/3 bloque la réplication du VIH-1 dans les cellules T [558]. Dans notre étude, nous apportons l'évidence additionnelle que la souche R5 module un plus grand nombre de transcrits que la souche X4 et qu'une partie de ces gènes sont impliqués dans les voies de signalisation du RCT et de l'organisation de l'actine dans les 24 premières heures suivant l'inoculation des cellules T CD4+ non-stimulées. Par exemple, la souche R5 augmente le complexe ARP2/3 qui est impliqué dans l'organisation de l'actine des cellules T CD4+ non-stimulées. Récemment, la protéine WAVE2 (en anglais, *Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family Verprolin-homologous protein 2*) et ABI (en anglais, *Abelson-Interactor*) ont été associées à la polymérisation de l'actine et à la signalisation médiée par le RCT [559, 560]. ABI2 et WAVE2 colocalise avec le

complexe ARP2/3 à la SI et active ce complexe. Des études de suppression ont montré que ces protéines sont requises pour la polymérisation de l'actine chez les cellules T CD4+. Nos résultats démontrant l'augmentation d'ABI2 et de WAVE2 par la souche R5 suggèrent l'implication possible du complexe ABI/WAVE dans l'activation du complexe ARP2/3 et de la polymérisation de l'actine lors d'une infection des cellules T CD4+ par la souche R5.

Des résultats antérieurs obtenus par Cicala et ses collaborateurs chez des patients virémiques suggèrent que l'enveloppe R5 facilite la réplication du VIH [561]. En accordance avec ses résultats, nous proposons que le virion complet de la souche R5 induit la transcription de gènes chez les cellules CD4+ non-stimulées qui contribuent potentiellement à l'activation des cellules naïves après la stimulation du RCT. Par ailleurs, nos résultats confirment que certains gènes responsables de l'activation cellulaire ont été diminués chez les cellules T CD4+ exposées aux virus X4 (FYN, CD45, ABI2 et CD3E). Inversement, les gènes impliqués dans l'activation du RCT ont été augmentés par la souche R5 comparé à la souche X4. Nos données suggèrent que l'habilité du virus R5 à moduler la polymérisation de l'actine et la signalisation médié par le RCT pourrait créer un environnement favorable pour l'activation des cellules T CD4+ après la stimulation du RCT. Il serait raisonnable de croire que cet état favoriserait l'entrée virale et le transport au noyau du virus R5. En effet, Komano et ses collaborateurs ont défini un modèle suggérant un rôle du complexe ARP2/3 dans l'entrée du VIH-1 [558]. Le VIH-1 entre dans les cellules via la fusion à la membrane cellulaire [123, 125]. Le noyau viral est libéré sur la couche corticale, dans le cytoplasme, immédiatement après la fusion du virus à la membrane. Ce modèle propose que les composantes du noyau viral recrutent des protéines adaptatrices et activent le complexe ARP2/3 pour générer une force mécanique par laquelle le noyau viral passe au travers la couche corticale et migre au noyau efficacement. Nos résultats suggèrent que le complexe WAVE/ABI est recruté pour possiblement activer le complexe ARP2/3. Cette habilité du virus R5 à moduler les gènes cellulaires pourrait expliquer la préférence de l'établissement d'une infection par la souche R5 comparé à la souche X4 chez les cellules T CD4+ non-stimulées et expliquer la prédominance de la souche R5 tôt dans le processus d'infection.



## **8.2- La modulation de facteur cellulaire par le VIH-1 lors d'une infection des macrophages**

### **8.2-1. Utilisation de l'IFN $\alpha$ 2 et immunité innée**

L'IFN inhibe les premières étapes de la réplication virale. En effet, Kornbluth et ses collaborateurs ont montré que le pré-traitement des macrophages infectés avec 1000 UI/ml d'IFN $\alpha$ 2 retarde la production virale [519]. Cependant, l'immunité innée n'est pas suffisante pour bloquer la réplication virale à long terme suggérant soit que le VIH module la réponse IFN à son avantage et/ou que la réplication du VIH s'établit beaucoup trop rapidement pour être contrée par l'immunité innée de l'hôte. Basée sur le modèle expérimental de Kornbluth et ses collaborateurs, notre investigation a montré la capacité du VIH-1 à moduler des événements de la réponse IFN. Cette habilité met l'accent sur l'importance des voies de signalisation des IFNs dans le contrôle de la réplication du VIH-1 et suggère que le virus a acquis des mécanismes pour compromettre cette réponse immunitaire innée de l'hôte dans le but de favoriser sa propagation.

### **8.2-2. TRAF6 est un facteur important dans la réponse antivirale induite par les IFNs**

TRAF6 est connu comme un facteur important dans le contrôle de la réplication de plusieurs virus. Konno et ses collaborateurs ont rapporté que l'absence de TRAF6 dans les fibroblastes embryonnaires de souris (cellules MEFs) a conduit à une augmentation de la réplication de virus à ARN tel que le virus de la maladie Newcastle et le virus de l'encéphalomyocardie [562]. De façon similaire, il a été montré que TRAF6 est critique pour l'induction de l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  en réponse à une infection par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et au poly (I :C) [563]. Toutes ces études confirment que TRAF6 est un composant normal de la réponse immunitaire innée contre les virus. Nos résultats obtenus

indiquent qu'il joue un rôle similaire lors d'une infection par le VIH-1. En effet, nous présentons dans le cadre de nos études, que TRAF6, facteur important dans la régulation de la transcription de la voie IFN, est affecté tôt dans le processus d'une infection des macrophages par le VIH-1. La diminution de TRAF6 a résulté en l'augmentation significative de la réplication virale. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le VIH-1 a acquis des stratégies pour circonvenir cette inhibition. En effet, lors d'un pré-traitement avec l'IFN $\alpha$ 2 des macrophages, l'infection par le VIH-1 réduit l'expression génique de TRAF6 résultant en l'augmentation de la réplication virale. Malgré le fait qu'il est augmenté par les IFNs et diminué par le VIH-1, VISA, un autre médiateur important de l'immunité innée, n'a eu aucun effet sur la réplication virale dans le modèle d'infection des macrophages primaires. La réplication virale était plutôt similaire à celle observée dans la condition contrôle. Des mécanismes cellulaires compensatoires pourraient possiblement être impliqué et permettre de contourner cette ablation ou réduction de l'expression de VISA lors d'une infection par le VIH-1.

### **8.2-3. IRF7 contribue positivement à la réplication virale**

TRAF6 est impliqué dans l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 [460, 564]. TRAF6 polyubiquitine IRF7, une modification nécessaire pour l'activation de la réponse IFN dans les fibroblastes [460, 564]. Tel que mentionné dans le chapitre III, les deux facteurs de transcription sont des régulateurs clés de la production d'IFN [393, 471, 565-569] et ont un rôle essentiel dans l'activation de l'immunité antivirale [466, 570]. Pour certains virus, IRF7 agit comme un facteur antiviral tandis que pour d'autres virus, il augmente la réplication virale. En effet, certains virus ont développé des mécanismes pour échapper à l'effet antiviral d'IRF7 comme la protéine ML du virus Thogoto qui inhibe l'activation d'IRF7 [571] ou le VSV qui infecte de manière plus efficace les fibroblastes lorsqu'IRF7 est ablaté [572]. Très récemment, il a été montré qu'IRF7 se lie au promoteur du virus du papillome humain 8 et augmente la réplication virale de celui-ci, tandis qu'IRF3 la diminue [573]. Dans notre étude, IRF7 promouvoit la réplication du VIH-1. La



diminution de l'expression de TRAF6 induit l'expression d'IRF7, et la diminution de l'expression d'IRF3 au niveau génique et protéique. Récemment, des études ont attribué à IRF3 un rôle antiviral lors de l'infection de différents types cellulaires par le VIH-1. En particulier, l'infection par le VIH-1 n'active pas IRF3, mais diminue son niveau d'expression [533, 534]. Ces données concordent avec les nôtres ; l'augmentation de l'expression d'IRF3 dans les macrophages primaires humains diminue la réplication virale du VIH-1 (résultats non publiés). IRF3 et IRF7 requièrent leur dimérisation à la suite de des modifications post-translationnelles pour agir comme facteurs de transcription. Alternativement, l'augmentation de l'expression d'IRF7 avec la diminution de l'expression d'IRF3 pourrait favoriser la formation d'homodimères d'IRF7 plutôt que des homodimères d'IRF3 ou des hétérodimères IRF3/IRF7 modulant la réponse innée au virus et possiblement conférant un avantage au VIH-1.

Par ailleurs, l'inhibition d'IRF7 apporte une diminution concomitante de la réplication virale. Nos résultats montrent que lorsque TRAF6 est réduit, IRF7 est surproduit et contribue à l'augmentation de la réplication virale. Inversement, la surexpression d'IRF7 résulte en une augmentation significative de la réplication virale chez les macrophages. Jusqu'à ce jour, notre étude est la première démontrant qu'IRF7 joue un rôle positif lors de l'infection des macrophages primaires humains par le VIH-1. Une étude récente par Smith et ses collaborateurs a identifié des gènes de l'hôte exprimés dans les ganglions lymphatiques qui sont associés à la charge virale du VIH-1 [546]. En lien avec nos résultats avec IRF7, leurs analyses reflètent une réponse antivirale de l'hôte médié par la voie IFN qui est associée avec une haute charge virale plutôt qu'associé à une inhibition de la réplication du VIH-1. Cependant, le mécanisme exact par lequel IRF7 augmente la réplication virale du VIH-1 dans les macrophages primaires humains doit être étudié plus en profondeur et nécessite des recherches additionnelles.

#### **8.2-4. IRF7 ne lie pas directement le LTR du VIH-1**

IRF7 pourrait contribuer à l'augmentation de la réplication virale par plusieurs mécanismes potentiels. IRF7 pourrait faciliter l'expression du VIH-1 par le LTR d'une façon analogue à IRF1. Jusqu'à présent, seulement IRF1 et IRF2 sont reconnues comme se liant au LTR du VIH-1 pour en activer sa transcription. En effet, IRF1 est induit très tôt suivant une infection par le VIH-1 et avant la production de Tat [529]. Lors d'une infection, il y a liaison d'IRF1 à la séquence cible sur le LTR du VIH-1 qui résulte en l'activation de la transcription du LTR du VIH-1 conduisant à l'activation de la transcription de Tat, lequel en retour amplifie l'expression génique dirigée par le LTR. Ces résultats concordent avec nos résultats où l'on démontre l'activation de la transcription du LTR par IRF1. Cependant, la présence d'IRF7 n'est pas suffisante pour activer le LTR, ce qui suggère qu'IRF7 agit de façon indirecte. IRF7 pourrait se lier au LTR en interagissant avec une autre protéine cellulaire ou virale.

### **8.2-5. IRF7 favorise l'activation transcriptionnelle de CARM1 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1**

Comme mentionné dans le chapitre 1, l'expression d'IRF7 est augmentée lors de l'infection des macrophages par le VIH-1[418]. Par ailleurs, une étude menée par Izmailova et ses collaborateurs démontre que la protéine virale Tat augmente l'expression d'IRF7 dans les CD4, ce qui suggère que l'augmentation de l'expression d'IRF7 dans les macrophages est induite après l'activation de la transcription du LTR et qu'IRF7 pourrait favoriser l'activation transcriptionnelle de gènes cellulaires pouvant contribuer à l'augmentation de la production virale [536]. Notre étude démontre qu'IRF7 se lie directement ou indirectement à 275 promoteurs uniquement identifiés lors d'une infection par le VIH-1, comme le promoteur du gène CARM1. CARM1 est un coactivateur transcriptionnel de NFκB. Il forme un complexe avec p300 et NFκB *in vitro* et interagit directement avec la sous-unité p65 de NFκB [574]. Par ailleurs, l'activation transcriptionnelle des promoteurs LTR du VIH-1 par NFκB est augmentée lorsque CARM1 est présent [550]. Nos résultats



démontrent qu'une infection des macrophages primaires par le VIH-1 augmente l'expression de CARM1. Cependant, le promoteur du gène CARM1 ne contient pas de sites IRF ou ISRE sur lesquels IRF7 doit se lier ce qui suggère qu'il se lie indirectement au promoteur de CARM1 par l'intermédiaire d'autres protéines. Notre étude démontre que la diminution de l'expression d'IRF7 diminue l'expression du gène CARM1. Ces résultats suggèrent qu'IRF7 fait parti d'un complexe de transcription qui se lie au promoteur de CARM1 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 et que la présence d'IRF7 est importante pour l'activation de la transcription de CARM1. Nos résultats suggèrent la formation d'un complexe de transcription distinct lors d'une infection des macrophages par le VIH-1. Ce changement dans la composition du complexe de facteur de transcription induirait l'activation d'un groupe de gènes distincts, parmi lesquels certains pourraient contribuer à la réplication virale. Cette hypothèse est plausible puisque lors de l'infection de lymphocytes B par le paramyxovirus le ratio d'IRF3/IRF7 contribue à l'expression différentielle des gènes reliés à l'IFN $\alpha$ 2 [575]. Par ailleurs, des études ont démontré qu'IRF7 peut former un homodimère ou un hétérodimère avec IRF3 et que ses dimères ont des effets spécifiques et distincts sur l'expression des gènes IFN de type I [398, 471]. L'activation transcriptionnelle lors d'une infection des macrophages par le VIH-1 pourrait être due à une affinité différente du complexe de transcription envers les séquences d'ADN cibles comme les ISRE, IRF et des séquences non reliées distinctes.

### **8.2-6. CARM1 favorise la réplication dans les macrophages**

Notre étude préliminaire a montré que lorsque l'expression de CARM1 est diminuée dans les macrophages primaires humains, la réplication virale est réduite elle aussi. Ces résultats doivent être confirmés, mais ils portent à réflexion. Nos résultats vont dans le même sens qu'une étude récente d'Hassa et ses collaborateurs qui a montré l'augmentation de la transcription de LTR du VIH médiée par la sous-unité p65 de NF $\kappa$ B en présence de CARM1 [550]. En effet, CARM1 se lie au complexe de transcription incluant NF $\kappa$ B et leur coexpression occasionne une synergie qui augmente la transcription déjà observée du LTR

[550]. Nos résultats suggèrent que l'effet de CARM1 sur la réplication virale lors d'une infection des macrophages primaires humains est dû à l'interaction de CARM1 et de NFκB.

Une autre étude a montré que CARM1 est positivement impliqué dans la régulation de la transactivation médié par la protéine Tax du virus HTLV-1 [576]. Tax, tout comme Tat, facilite la transcription au niveau du LTR de leur virus respectif. La transactivation de Tax est augmentée dans les cellules surexprimant CARM1 et inversement, une diminution de l'expression de CARM1 inhibe la transactivation de Tax. Par ailleurs, une interaction directe entre Tax et CARM1 a été montrée *in vitro* et *in vivo*. Il serait donc possible que dans notre modèle il y ait une interaction entre Tat et CARM1 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1.

### 8.3- PERSPECTIVES

Les expériences menées durant mon doctorat ont apporté de nouvelles connaissances quant aux facteurs cellulaires participant négativement ou positivement à la réplication virale. De nombreuses questions restent néanmoins sans réponse. D'autres travaux doivent être réalisés afin d'élargir notre compréhension du phénomène décrit et d'y apporter un aspect plus mécanistique. Quatre avenues pourraient être décortiquées d'avantage :

- 1- L'implication de l'interaction entre les récepteurs à la surface cellulaire et les virus dans la modulation des voies de signalisation identifiées et l'effet d'ARP2/3 sur l'établissement d'une infection.
- 2- La caractérisation de la modulation de TRAF6 par le VIH-1.
- 3- L'identification du complexe d'interaction incluant IRF7 impliqué dans l'activation de la transcription lors d'une infection des macrophages primaires par le VIH-1.
- 4- La confirmation du rôle de CARM1 sur la réplication virale et l'identification des mécanismes d'action de CARM1.



### 8.3-1. Rôle des corécepteurs

Les résultats présentés sur la plus grande modulation des gènes cellulaires de lymphocytes T CD4+ naïfs proviennent d'expériences faites à partir de virus complet. Afin de confirmer que la liaison du virus R5 avec son corécepteur engendre une signalisation pouvant mener à l'activation des lymphocytes T CD4+ non-stimulés une série d'expériences pourrait être accompli. Premièrement, nous pourrions exposer les lymphocytes T CD4+ non stimulés à l'enveloppe des virus R5 et X4 et quantifier l'expression génique d'ARP2/3, de WAVE2 et ABI2. Une autre possibilité serait d'utiliser des inhibiteurs de la signalisation des corécepteurs CXCR4 et CCR5. En effet, l'exposition des lymphocytes T CD4+ non-stimulés au virus complet devrait déterminer l'implication de la signalisation médié par les corécepteurs dans l'augmentation de l'expression d'ARP2/3, de WAVE2 et d'ABI2.

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel les lymphocytes T CD4+ sont plus aptes à être stimulés lorsqu'ils sont exposés au virus R5, des études utilisant des ARNsi pourraient être effectuées afin d'évaluer l'impact et la contribution de chacun des gènes identifiés. Il serait important de déterminer dans notre modèle l'implication du complexe ARP2/3 dans l'activation des cellules via le RCT. Cette expérience pourrait être effectuée en augmentant ou diminuant l'expression d'ARP2/3 et en stimulant par la suite le RCT avec un anticorps anti-CD3 et évaluer l'activation cellulaire des lymphocytes T CD4+ par FACS, comme décrit dans le chapitre V. Comme je l'ai mentionné auparavant, WAVE2 et ABI2 sont impliqués dans l'activation du complexe ARP2/3. En émettant l'hypothèse que le complexe ARP2/3 est impliqué dans l'activation des cellules T CD4+ stimulé par le RCT lors d'une exposition au virus R5, il serait intéressant de connaître si l'implication du complexe ARP2/3 est associée à l'activation de celui-ci par WAVE2 et ABI2. Nous pourrions réprimer l'expression de WAVE2 et/ou ABI2, dans un contexte d'exposition des lymphocytes T CD4+ au virus R5, et quantifier l'expression génique et en protéine d'ARP2/3 et évaluer l'activation cellulaire lorsqu'il y a stimulation via le RCT.

### **8.3-2. Protéines impliquées dans la modulation de TRAF6**

Comme mentionné dans le chapitre VI, TRAF6 est augmenté lors d'un traitement des macrophages à l'IFN $\alpha$ 2, mais est diminué lorsque les macrophages sont infectés par le VIH-1. Une autre avenue captivante serait de déterminer si la diminution de TRAF6 est médié par une protéine virale en particulier. Pour ce faire, nous pourrions prétraiter les macrophages avec l'IFN $\alpha$ 2 et transfecter un vecteur exprimant une protéine virale en particulier dans des macrophages afin d'évaluer l'expression de TRAF6. L'expression de chacune des protéines virales du VIH-1 nous permettraient de déterminer si la diminution de TRAF6 est due à un facteur viral en particulier ou plutôt à une cascade de signalisation qui conduit à la modulation de celui-ci.

### **8.3-3. Complexe de transcription impliquant IRF7**

L'induction de la transcription implique un complexe de transcription pouvant être formé de plusieurs facteurs. L'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps IRF7 nous a permis d'identifier qu'IRF7 activait possiblement la transcription de gènes distincts lors d'une infection des macrophages par le VIH-1. Parmi ces gènes on retrouve CARM1. Cependant, CARM1 ne possède aucun site de liaison pour IRF7 ce qui suggère que d'autres protéines font partie avec IRF7 d'un complexe de transcription régulant son expression. Il serait donc intéressant d'identifier ses facteurs impliqués dans l'activation de la transcription des gènes cellulaires lors d'une infection des macrophages par le VIH-1. Pour ce faire, nous pourrions effectuer une immunoprécipitation d'IRF7 et cette fois-ci identifier les protéines cellulaires ou virales interagissant avec IRF7 par spectrométrie de masse. Nous pourrions aussi comparer les cellules infectées aux cellules non-infectées afin d'évaluer les différences dans la formation du complexe de transcription impliquant IRF7.



IRF7 a besoin de former un dimère d'IRF pour être actif. IRF7 contribue positivement à la réplication virale tandis qu'IRF3 la diminue. Il serait donc intéressant de voir si une infection par le VIH-1 va favoriser la formation de dimères d'IRF7 plutôt que de dimères d'IRF3 ou d'hétérodimères d'IRF3 et d'IRF7. Lorsqu'ils sont inactifs, IRF3 et IRF7 se retrouvent dans le cytoplasme, lorsqu'activés ils migrent au noyau. Nous pourrions donc extraire les protéines du noyau afin d'identifier la présence d'IRF7 et/ou d'IRF3 nous donnant une indication supplémentaire sur le type de dimère formé. Dans le cas où notre hypothèse ce confirme, il serait intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de la chromatine en ciblant IRF3 et comparer les promoteurs identifiés avec IRF7 et IRF3. Nous pourrions se concentrer par la suite sur les gènes différents entre les deux conditions et voir si le promoteur de CARM1 ne se retrouve qu'avec IRF7.

Par ailleurs, nous avons montré qu'IRF7 ne se liait pas directement au LTR pour en activer sa transcription. Il serait intéressant de vérifier si IRF7 peut se lier indirectement à celui-ci via le complexe de transcription identifié au préalable. Premièrement, nous pourrions vérifier la présence du LTR par PCR lors de l'immunoprécipitation d'IRF7. Par ailleurs, nous pourrions transfecter un vecteur exprimant IRF7 et/ou les différentes protéines identifiées avec un vecteur contenant le LTR et quantifier l'expression de celui-ci. Par cette expérience, nous pourrions identifier si IRF7 peut indirectement augmenter la transcription du LTR et identifier les protéines nécessaires à l'activation celle-ci.

### **8.3-4. CARM1**

Très récemment et de façon préliminaire, nous avons identifié CARM1 comme étant un facteur pro-VIH induit par IRF7 lors d'une infection des macrophages par le VIH-1. Il reste donc à confirmer ses résultats avec plusieurs donneurs additionnels. Inversement, nous pourrions effectuer la surexpression de CARM1 dans des macrophages primaires et vérifier l'effet sur la réplication virale. Par ailleurs, plusieurs avenues restent à être explorées à partir de ses résultats préliminaires. En effet, il serait important de valider dans notre

modèle, les macrophages primaires, l'implication de CARM1 dans l'activation de la transcription du LTR. En effet, des études effectuées dans la lignée cellulaire 293, CV-1 et dans les cellules MEFs primaires ont montré l'augmentation de l'activation du LTR lorsque CARM1 était en présence de NFkB [550]. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier l'interaction de Tat avec CARM1 en se basant sur l'étude faite avec Tax du HTLV-1. Cette étude démontrait l'augmentation de l'activation du LTR lorsque Tax et CARM1 étaient présent [576]. Dans notre cas, on pourrait évaluer l'activation du LTR en effectuant une cotransfection de Tat et CARM1 dans les macrophages primaires humains et aussi déterminer l'interaction entre les deux par une immunoprécipitation de Tat ou de CARM1 et vérifier la présence de l'une ou l'autre de ces protéines en effectuant un western blot.

CARM1 est connu comme ayant une activité de méthyltransférase [577, 578]. Une autre avenue serait de déterminer si cette activité est nécessaire à l'augmentation de la réplication virale. Une série d'expérience consisterait à co-transfecter CARM1 normal ou muté dans son site de méthyltransférase avec NFkB ou Tat (selon les résultats obtenus dans les expériences précédentes) et le LTR du VIH-1 afin d'évaluer l'activation du LTR.

## CHAPITRE IX- CONCLUSION GÉNÉRALE

Malgré l'apparition de traitements antirétroviraux ciblant le VIH-1, aucun traitement ne prévient ou n'éradique le virus. Par ailleurs, leurs effets sont souvent limités en raison du haut taux de mutation du VIH-1 et des mécanismes permettant au virus de contourner ces effets. Pour ces raisons, il est important de trouver de nouvelles approches thérapeutiques et d'identifier de nouvelles cibles permettant un meilleur contrôle et ultimement l'élimination du VIH-1. Dans ce dessein, la communauté scientifique se tourne vers l'identification de molécules humaines nécessaires au virus plutôt que de cibler directement le VIH-1. Présentement, les défis des équipes de recherche consistent en partie à identifier les facteurs de l'hôte influençant la progression ou le contrôle de l'infection.

Les travaux de recherche rapportés pour cette thèse de doctorat ont permis d'identifier des facteurs cellulaires modulés par le VIH-1 à son avantage lors d'une infection des cellules primaires. En effet, le VIH-1 augmente des facteurs nécessaires à sa réplication et inversement diminue des facteurs qui l'inhibent. Parmi ceux-ci, certains facteurs de l'immunité innée ont été identifiés. En effet, nos résultats démontrent que la réponse immunitaire est dichotomique; elle peut être bénéfique et nuisible au VIH-1. Cependant, cette réponse est nécessaire au contrôle et à la diminution de l'infection par différents pathogènes, l'inhibition de ces facteurs impliqués dans la réplication virale n'est donc pas suggérée. Le plus grand défi serait donc de contrôler l'expression de la réponse immunitaire des personnes séropositives afin de permettre la diminution de la réplication virale sans toutefois rendre propice le système à d'autres infections. Le développement de nouvelles stratégies tenant compte de l'habileté du VIH-1 à moduler les facteurs importants du système immunitaire est selon moi l'une des avenues les plus intéressantes. En effet, cette approche qui consiste à cibler les molécules humaines plutôt que les molécules virales est promise à un bel avenir puisqu'elle est non susceptible aux nombreuses mutations du virus comparativement à la vaccination et aux traitements antirétroviraux.



## BIBLIOGRAPHIE

1. UNAIDS Report on the Global AIDS epidemic. 2010.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.
3. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. 224(4648): p. 500-3.
4. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. 224(4648): p. 497-500.
5. Sarngadharan, M.G., et al., *Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS*. Science, 1984. 224(4648): p. 506-8.
6. Schupbach, J., et al., *Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS*. Science, 1984. 224(4648): p. 503-5.
7. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. 225(4664): p. 840-2.
8. Coffin, J., et al., *Human immunodeficiency viruses*. Science, 1986. 232(4751): p. 697.
9. Korber, B., et al., *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains*. Science, 2000. 288(5472): p. 1789-96.
10. Myers, G., K. Maclnnes, and B. Korber, *The emergence of simian/human immunodeficiency viruses*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1992. 8(3): p. 373-86.
11. Salemi, M., et al., *Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution*. FASEB J, 2001. 15(2): p. 276-8.
12. Sharp, P.M., et al., *The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. 356(1410): p. 867-76.
13. Robbins, K.E., et al., *U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains*. J Virol, 2003. 77(11): p. 6359-66.
14. Travers, S.A., et al., *Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2004. 78(19): p. 10501-6.
15. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. 397(6718): p. 436-41.
16. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. 233(4761): p. 343-6.



17. Peeters, M., C. Toure-Kane, and J.N. Nkengasong, *Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials*. AIDS, 2003. 17(18): p. 2547-60.
18. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. 288(5463): p. 55-6.
19. Reeves, J.D. and R.W. Doms, *Human immunodeficiency virus type 2*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 6): p. 1253-65.
20. Marx, P.A., *Unresolved questions over the origin of HIV and AIDS*. ASM News, 2005. 71: p. 15-20.
21. Kuznetsov, Y.G., et al., *Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes*. J Virol, 2003. 77(22): p. 11896-909.
22. Gomez, C. and T.J. Hope, *The ins and outs of HIV replication*. Cell Microbiol, 2005. 7(5): p. 621-6.
23. Levy, J.A., *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. third edition ed. 2007: ASM Press.
24. Pereira, L.A., et al., *A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(3): p. 663-8.
25. Siekevitz, M., et al., *Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I*. Science, 1987. 238(4833): p. 1575-8.
26. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. 312(5996): p. 763-7.
27. McDougal, J.S., et al., *Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule*. Science, 1986. 231(4736): p. 382-5.
28. Sattentau, Q.J., *CD4 activation of HIV fusion*. Int J Cell Cloning, 1992. 10(6): p. 323-32.
29. Sattentau, Q.J., et al., *The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule*. AIDS, 1988. 2(2): p. 101-5.
30. Sattentau, Q.J. and J.P. Moore, *The role of CD4 in HIV binding and entry*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1993. 342(1299): p. 59-66.
31. Deans, J.P., et al., *Interaction of CD4:lck with the T cell receptor/CD3 complex induces early signaling events in the absence of CD45 tyrosine phosphatase*. European journal of immunology, 1992. 22(3): p. 661-8.
32. Salzwedel, K. and E.A. Berger, *Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(23): p. 12794-9.
33. Simon, J.H., et al., *Role of CD4 epitopes outside the gp120-binding site during entry of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1997. 71(2): p. 1476-84.
34. Ashkenazi, A., et al., *Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(18): p. 7150-4.
35. Arthos, J., et al., *Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV*. Cell, 1989. 57(3): p. 469-81.

36. Alkhatib, G., et al., *CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 Coreceptor activity share common structural determinants. Critical residues in the third extracellular loop support HIV-1 fusion.* J Biol Chem, 1997. 272(32): p. 19771-6.
37. Alkhatib, G., et al., *Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions.* J Biol Chem, 1997. 272(33): p. 20420-6.
38. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.* Cell, 1996. 85(7): p. 1149-58.
39. Rucker, J., et al., *Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry.* Methods Enzymol, 1997. 288: p. 118-33.
40. Rucker, J., et al., *Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses.* J Virol, 1997. 71(12): p. 8999-9007.
41. Alkhatib, G., et al., *HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation.* Virology, 1997. 234(2): p. 340-8.
42. Farzan, M., et al., *Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain.* J Virol, 1998. 72(9): p. 7620-5.
43. Farzan, M., et al., *A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5.* J Virol, 1998. 72(2): p. 1160-4.
44. Platt, E.J., et al., *Adaptive mutations in the V3 loop of gp120 enhance fusogenicity of human immunodeficiency virus type 1 and enable use of a CCR5 coreceptor that lacks the amino-terminal sulfated region.* J Virol, 2001. 75(24): p. 12266-78.
45. Macallan, D.C., et al., *Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans.* J Exp Med, 2004. 200(2): p. 255-60.
46. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation.* J Exp Med, 1990. 171(3): p. 801-17.
47. Marvel, J., et al., *The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL.* Int Immunol, 1991. 3(1): p. 21-8.
48. Koretzky, G.A., *Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system.* FASEB J, 1993. 7(5): p. 420-6.
49. Berard, M. and D.F. Tough, *Qualitative differences between naive and memory T cells.* Immunology, 2002. 106(2): p. 127-38.
50. Campbell, J.J., et al., *6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7.* J Cell Biol, 1998. 141(4): p. 1053-9.



51. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. *Cell*, 1999. 99(1): p. 23-33.
52. Janeway, C.a.P.T., *Immunobiologie*. second edition ed. 1996: Bruxelles: DeBoeck Université.
53. Brenchley, J.M., et al., *T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis*. *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1160-8.
54. Farber, D.L., *Remembrance of antigens past: new insights into memory T cells*. *Scand J Immunol*, 2003. 58(2): p. 145-54.
55. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 745-63.
56. Korn, T., et al., *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties*. *Semin Immunol*, 2007. 19(6): p. 362-71.
57. Aujla, S.J., P.J. Dubin, and J.K. Kolls, *Th17 cells and mucosal host defense*. *Semin Immunol*, 2007. 19(6): p. 377-82.
58. Kunkel, E.J., et al., *Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes*. *Am J Pathol*, 2002. 160(1): p. 347-55.
59. Tardif, M., *Caractérisation du rôle de LFA-1 dans l'infection des lymphocytes T CD4+ par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1*, in *Faculté Médecine*. 2005, Université Laval: Québec.
60. Chun, T.W., et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. *Nature*, 1997. 387(6629): p. 183-8.
61. Spina, C.A., H.E. Prince, and D.D. Richman, *Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro*. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1774-85.
62. Hermankova, M., et al., *Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo*. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7383-92.
63. Loetscher, P., et al., *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. *Nature*, 1998. 391(6665): p. 344-5.
64. Naif, H.M., et al., *CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection*. *J Virol*, 1998. 72(1): p. 830-6.
65. Verani, A., G. Gras, and G. Pancino, *Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons*. *Mol Immunol*, 2005. 42(2): p. 195-212.
66. Verani, A., et al., *CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates*. *J Immunol*, 1998. 161(5): p. 2084-8.
67. Schmidtayerova, H., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level*. *J Virol*, 1998. 72(6): p. 4633-42.

68. Yi, Y., et al., *CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. 72(1): p. 772-7.
69. Nobile, C., et al., *Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes*. J Virol, 2005. 79(9): p. 5386-99.
70. Simmons, G., et al., *CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages*. J Virol, 1998. 72(10): p. 8453-7.
71. Balliet, J.W., et al., *Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate*. Virology, 1994. 200(2): p. 623-31.
72. Rich, E.A., et al., *Increased susceptibility of differentiated mononuclear phagocytes to productive infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)*. J Clin Invest, 1992. 89(1): p. 176-83.
73. Schuitemaker, H., et al., *Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages*. J Clin Invest, 1992. 89(4): p. 1154-60.
74. Triques, K. and M. Stevenson, *Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes*. J Virol, 2004. 78(10): p. 5523-7.
75. Valentin, A., et al., *In vitro maturation of mononuclear phagocytes and susceptibility to HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1991. 4(8): p. 751-9.
76. Lee, S.C., et al., *Productive infection of human fetal microglia by HIV-1*. Am J Pathol, 1993. 143(4): p. 1032-9.
77. Lewis, S.H., et al., *HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses*. Lancet, 1990. 335(8689): p. 565-8.
78. Schmitt, M.P., et al., *Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1990. 6(8): p. 987-91.
79. Martin, J.C. and J.C. Bandres, *Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. 22(5): p. 413-29.
80. Alfano, M. and G. Poli, *Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection*. Mol Immunol, 2005. 42(2): p. 161-82.
81. Steinman, R.M., et al., *The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. 276: p. 1-30.
82. Cavrois, M., J. Neidleman, and W.C. Greene, *The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection*. PLoS Pathog, 2008. 4(6): p. e1000051.
83. Garcia, E., et al., *HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse*. Traffic, 2005. 6(6): p. 488-501.
84. McDonald, D., et al., *Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions*. Science, 2003. 300(5623): p. 1295-7.



85. Turville, S.G., et al., *Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells*. *Blood*, 2004. 103(6): p. 2170-9.
86. Olinger, G.G., M. Saifuddin, and G.T. Spear, *CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells*. *J Virol*, 2000. 74(18): p. 8550-7.
87. Livingstone, W.J., et al., *Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1*. *Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group*. *Lancet*, 1996. 348(9028): p. 649-54.
88. Zerhouni, B., J.A. Nelson, and K. Saha, *CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate*. *J Virol*, 2004. 78(22): p. 12288-96.
89. De Silva, F.S., et al., *CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(17): p. 1585-98.
90. Moir, S., et al., *CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir*. *J Virol*, 1999. 73(10): p. 7972-80.
91. Moir, S., et al., *B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells*. *J Exp Med*, 2000. 192(5): p. 637-46.
92. Valentin, A. and G.N. Pavlakis, *Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1*. *Anticancer Res*, 2003. 23(3A): p. 2071-5.
93. Valentin, A., et al., *Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 7015-20.
94. Chehimi, J., et al., *In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates*. *J Virol*, 1991. 65(4): p. 1812-22.
95. Motsinger, A., et al., *CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection*. *J Exp Med*, 2002. 195(7): p. 869-79.
96. van der Vliet, H.J., et al., *Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection*. *J Immunol*, 2002. 168(3): p. 1490-5.
97. Sandberg, J.K., et al., *Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection*. *J Virol*, 2002. 76(15): p. 7528-34.
98. Kottlilil, S., et al., *Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function*. *J Infect Dis*, 2003. 187(7): p. 1038-45.
99. Casale, T.B., et al., *Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction*. *J Clin Invest*, 1987. 80(5): p. 1507-11.
100. Sundstrom, J.B., et al., *Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells*. *J Immunol*, 2004. 172(7): p. 4391-401.
101. Bannert, N., et al., *Human Mast cell progenitors can be infected by macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro*. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10808-14.



102. Bomsel, M. and V. David, *Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection*. *Nat Med*, 2002. 8(2): p. 114-6.
103. Dwinell, M.B., et al., *Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 1999. 117(2): p. 359-67.
104. Bobardt, M.D., et al., *Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes*. *Immunity*, 2003. 18(1): p. 27-39.
105. Alfsen, A. and M. Bomsel, *HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide*. *J Biol Chem*, 2002. 277(28): p. 25649-59.
106. Mondor, I., S. Ugolini, and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans*. *J Virol*, 1998. 72(5): p. 3623-34.
107. Dezzutti, C.S., et al., *Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1*. *J Infect Dis*, 2001. 183(8): p. 1204-13.
108. Fotopoulos, G., et al., *Trans epithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(14): p. 9410-4.
109. Hazan, U., et al., *Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1?* *FASEB J*, 2002. 16(10): p. 1254-6.
110. Fellin, T. and G. Carmignoto, *Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit*. *J Physiol*, 2004. 559(Pt 1): p. 3-15.
111. Magistretti, P.J. and L. Pellerin, *Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes*. *Cereb Cortex*, 1996. 6(1): p. 50-61.
112. Hirase, H., et al., *Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo*. *PLoS Biol*, 2004. 2(4): p. E96.
113. Brack-Werner, R., *Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis*. *AIDS*, 1999. 13(1): p. 1-22.
114. Liu, Y., et al., *CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor*. *J Virol*, 2004. 78(8): p. 4120-33.
115. He, J., et al., *CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia*. *Nature*, 1997. 385(6617): p. 645-9.
116. Klatzmann, D., et al., *Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes*. *Science*, 1984. 225(4657): p. 59-63.
117. Klatzmann, D., et al., *Immune status of AIDS patients in France: relationship with lymphadenopathy associated virus tropism*. *Ann N Y Acad Sci*, 1984. 437: p. 228-37.
118. Wyatt, R., et al., *Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding*. *J Virol*, 1995. 69(9): p. 5723-33.
119. Henderson, L.A. and M.N. Qureshi, *A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides*. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 15291-7.



120. Qureshi, N.M., et al., *Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides*. AIDS, 1990. 4(6): p. 553-8.
121. Wild, C., et al., *A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(21): p. 10537-41.
122. Olinger, G.G., et al., *Cellular factors influence the binding of HIV type 1 to cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. 18(4): p. 259-67.
123. Maddon, P.J., et al., *HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4*. Cell, 1988. 54(6): p. 865-74.
124. Overbaugh, J., A.D. Miller, and M.V. Eiden, *Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2001. 65(3): p. 371-89, table of contents.
125. Stein, B.S., et al., *pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane*. Cell, 1987. 49(5): p. 659-68.
126. Doms, R.W., *Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection*. Virology, 2000. 276(2): p. 229-37.
127. Melikyan, G.B., et al., *Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion*. J Cell Biol, 2000. 151(2): p. 413-23.
128. Resh, M.D., *Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins*. Subcell Biochem, 2004. 37: p. 217-32.
129. Stein, B.S. and E.G. Engleman, *Mechanism of HIV-1 entry into CD4+ T cells*. Adv Exp Med Biol, 1991. 300: p. 71-86; discussion 87-96.
130. Pelchen-Matthews, A., P. Clapham, and M. Marsh, *Role of CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus infection*. J Virol, 1995. 69(12): p. 8164-8.
131. Sorkin, A. and M. Von Zastrow, *Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2002. 3(8): p. 600-14.
132. Mellman, I., *Endocytosis and molecular sorting*. Annual review of cell and developmental biology, 1996. 12: p. 575-625.
133. Pauza, C.D. and T.M. Price, *Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis*. The Journal of cell biology, 1988. 107(3): p. 959-68.
134. Marechal, V., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis*. Journal of virology, 2001. 75(22): p. 11166-77.
135. Schaeffer, E., V.B. Soros, and W.C. Greene, *Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes*. Journal of virology, 2004. 78(3): p. 1375-83.
136. Cartier, C., et al., *Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection*. J Biol Chem, 1999. 274(27): p. 19434-40.



137. Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. *Nature*, 1994. 372(6504): p. 359-62.
138. Lu, X., et al., *Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4*. *Immunity*, 1998. 8(5): p. 647-56.
139. Isel, C., et al., *Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription*. *EMBO J*, 1999. 18(4): p. 1038-48.
140. Huthoff, H., et al., *On the importance of the primer activation signal for initiation of tRNA(lys3)-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome*. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(17): p. 5186-94.
141. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. *Science*, 1995. 267(5197): p. 483-9.
142. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. *J Virol*, 1997. 71(7): p. 5382-90.
143. McDonald, D., et al., *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells*. *J Cell Biol*, 2002. 159(3): p. 441-52.
144. Adam, S.A. and L. Gerace, *Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import*. *Cell*, 1991. 66(5): p. 837-47.
145. Gallay, P., et al., *Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import*. *J Virol*, 1996. 70(2): p. 1027-32.
146. Gorlich, D., et al., *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope*. *Curr Biol*, 1995. 5(4): p. 383-92.
147. Enenkel, C., G. Blobel, and M. Rexach, *Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes*. *J Biol Chem*, 1995. 270(28): p. 16499-502.
148. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. *EMBO J*, 1998. 17(4): p. 909-17.
149. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. *Cell*, 2002. 110(4): p. 521-9.
150. Carteau, S., C. Hoffmann, and F. Bushman, *Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target*. *Journal of virology*, 1998. 72(5): p. 4005-14.
151. Jordan, A., D. Bisgrove, and E. Verdin, *HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro*. *EMBO J*, 2003. 22(8): p. 1868-77.
152. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress*. *Nat Med*, 2001. 7(12): p. 1313-9.
153. Ono, A. and E.O. Freed, *Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body*. *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1552-63.
154. Garnier, L., J.B. Bowzard, and J.W. Wills, *Recent advances and remaining problems in HIV assembly*. *AIDS*, 1998. 12 Suppl A: p. S5-16.
155. Garoff, H., R. Hewson, and D.J. Opstelten, *Virus maturation by budding*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(4): p. 1171-90.



156. Wilk, T. and S.D. Fuller, *Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer*. *Curr Opin Struct Biol*, 1999. 9(2): p. 231-43.
157. Gross, I., et al., *A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis*. *EMBO J*, 2000. 19(1): p. 103-13.
158. Shehu-Xhilaga, M., et al., *The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein*. *J Virol*, 2002. 76(9): p. 4331-40.
159. Zhou, J., et al., *Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by specific targeting of the final step of virion maturation*. *J Virol*, 2004. 78(2): p. 922-9.
160. Hladik, F. and M.J. McElrath, *Setting the stage: host invasion by HIV*. *Nature reviews. Immunology*, 2008. 8(6): p. 447-57.
161. Norvell, M.K., G.I. Benrubi, and R.J. Thompson, *Investigation of microtrauma after sexual intercourse*. *The Journal of reproductive medicine*, 1984. 29(4): p. 269-71.
162. Guimaraes, M.D., D. Vlahov, and E.A. Castilho, *Postcoital vaginal bleeding as a risk factor for transmission of the human immunodeficiency virus in a heterosexual partner study in Brazil*. *Rio de Janeiro Heterosexual Study Group*. *Archives of internal medicine*, 1997. 157(12): p. 1362-8.
163. Rowland-Jones, S.L., *Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?* *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(4): p. 343-8.
164. Haase, A.T., *Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(10): p. 783-92.
165. Miller, C.J., et al., *Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2005. 79(14): p. 9217-27.
166. Zhang, Z., et al., *Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells*. *Science*, 1999. 286(5443): p. 1353-7.
167. Embretson, J., et al., *Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS*. *Nature*, 1993. 362(6418): p. 359-62.
168. Blumberg, R.S. and R.T. Schooley, *Lymphocyte markers and infectious diseases*. *Semin Hematol*, 1985. 22(2): p. 81-114.
169. Abel, K., et al., *Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection*. *J Virol*, 2005. 79(19): p. 12164-72.
170. Reynolds, M.R., et al., *CD8+ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little*. *J Virol*, 2005. 79(14): p. 9228-35.
171. Delwart, E., et al., *Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection*. *AIDS*, 2002. 16(2): p. 189-95.
172. Karlsson, A.C., et al., *Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection*. *AIDS*, 1998. 12(8): p. 839-47.
173. McDonald, R.A., et al., *Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function*. *J Virol*, 1997. 71(3): p. 1871-9.



174. Levy, J.A., C.E. Mackewicz, and E. Barker, *Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells*. *Immunol Today*, 1996. 17(5): p. 217-24.
175. Rowland-Jones, S., et al., *HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women*. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 59-64.
176. Landay, A.L., C.E. Mackewicz, and J.A. Levy, *An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1993. 69(1): p. 106-16.
177. Mackewicz, C.E., H.W. Ortega, and J.A. Levy, *CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual*. *J Clin Invest*, 1991. 87(4): p. 1462-6.
178. Ogg, G.S., et al., *Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA*. *Science*, 1998. 279(5359): p. 2103-6.
179. Folkvord, J.M., C. Armon, and E. Connick, *Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005. 21(5): p. 363-70.
180. Brander, C. and Y. Riviere, *Early and late cytotoxic T lymphocyte responses in HIV infection*. *AIDS*, 2002. 16 Suppl 4: p. S97-103.
181. Levy, J.A., *HIV pathogenesis and long-term survival*. *AIDS*, 1993. 7(11): p. 1401-10.
182. Rowland-Jones, S., R. Tan, and A. McMichael, *Role of cellular immunity in protection against HIV infection*. *Adv Immunol*, 1997. 65: p. 277-346.
183. van der Ende, M.E., et al., *CD4 T cells remain the major source of HIV-1 during end stage disease*. *AIDS*, 1999. 13(9): p. 1015-9.
184. Levy, J.A., *The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease*. *Trends Immunol*, 2001. 22(6): p. 312-6.
185. Levy, J.A., I. Scott, and C. Mackewicz, *Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity*. *Clin Immunol*, 2003. 108(3): p. 167-74.
186. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. 392(6673): p. 245-52.
187. Turville, S., et al., *The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis*. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(5): p. 710-8.
188. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. *Science*, 1999. 284(5421): p. 1835-7.
189. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 225-74.
190. Ljunggren, K., et al., *IgG subclass response to HIV in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity at different clinical stages*. *Clin Exp Immunol*, 1988. 73(3): p. 343-7.
191. Barker, E., C.E. Mackewicz, and J.A. Levy, *Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(24): p. 11135-9.
192. Beaumont, T., et al., *Reversal of human immunodeficiency virus type 1 IIIB to a neutralization-resistant phenotype in an accidentally infected laboratory worker with a progressive clinical course*. *Journal of virology*, 2001. 75(5): p. 2246-52.



193. Homsy, J., et al., *The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells*. Science, 1989. 244(4910): p. 1357-60.
194. Levy, J.A., *Changing concepts in HIV infection: challenges for the 1990s*. AIDS, 1990. 4(11): p. 1051-8.
195. Robinson, W.E., Jr., D.C. Montefiori, and W.M. Mitchell, *Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection*. Lancet, 1988. 1(8589): p. 790-4.
196. Robinson, W.E., Jr., D.C. Montefiori, and W.M. Mitchell, *Complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptors*. Virology, 1990. 175(2): p. 600-4.
197. Kuiken, C.L., et al., *Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype*. J Virol, 1992. 66(7): p. 4622-7.
198. Yagita, H., et al., *Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Adv Immunol, 1992. 51: p. 215-42.
199. Nara, P.L., et al., *Persistent infection of chimpanzees with human immunodeficiency virus: serological responses and properties of reisolated viruses*. J Virol, 1987. 61(10): p. 3173-80.
200. Spear, G.T., et al., *Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by complement occurs by viral lysis*. J Virol, 1990. 64(12): p. 5869-73.
201. Spear, G.T., et al., *Complement-mediated, antibody-dependent neutralizing titers of sera from asymptomatic and symptomatic HIV-infected individuals*. AIDS, 1992. 6(9): p. 1047.
202. Spear, G.T., et al., *Human antibodies to major histocompatibility complex alloantigens mediate lysis and neutralization of HIV-1 primary isolate virions in the presence of complement*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. 26(2): p. 103-10.
203. Subbramanian, R.A., et al., *Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific infection-enhancing and -inhibiting antibodies in AIDS patients*. J Clin Microbiol, 2002. 40(6): p. 2141-6.
204. Clerici, M. and G.M. Shearer, *A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection*. Immunol Today, 1993. 14(3): p. 107-11.
205. Clerici, M. and G.M. Shearer, *The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights*. Immunol Today, 1994. 15(12): p. 575-81.
206. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. 98(4): p. 279-85.
207. Romagnani, S., *Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?* Immunol Today, 1992. 13(10): p. 379-81.
208. Sher, A., et al., *Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection*. Immunol Rev, 1992. 127: p. 183-204.
209. Appay, V., et al., *Dynamics of T cell responses in HIV infection*. J Immunol, 2002. 168(7): p. 3660-6.
210. Norris, P.J. and E.S. Rosenberg, *CD4(+) T helper cells and the role they play in viral control*. J Mol Med, 2002. 80(7): p. 397-405.



211. Norris, P.J., et al., *Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4(+) T-cell clones*. J Virol, 2001. 75(20): p. 9771-9.
212. Orentas, R.J., et al., *Induction of CD4+ human cytolytic T cells specific for HIV-infected cells by a gp160 subunit vaccine*. Science, 1990. 248(4960): p. 1234-7.
213. Piazza, C., et al., *Cutting edge: CD4+ T cells kill CD8+ T cells via Fas/Fas ligand-mediated apoptosis*. J Immunol, 1997. 158(4): p. 1503-6.
214. Hoffenbach, A., et al., *Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans*. J Immunol, 1989. 142(2): p. 452-62.
215. Kundu, S.K. and T.C. Merigan, *Equivalent recognition of HIV proteins, Env, Gag and Pol, by CD4+ and CD8+ cytotoxic T-lymphocytes*. AIDS, 1992. 6(7): p. 643-9.
216. Plata, F., *HIV-specific cytotoxic T lymphocytes*. Res Immunol, 1989. 140(1): p. 89-91.
217. Riviere, Y., et al., *Gag-specific cytotoxic responses to HIV type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-related complex or AIDS*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. 11(8): p. 903-7.
218. Walker, B.D., et al., *HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals*. Science, 1988. 240(4848): p. 64-6.
219. Ammaranond, P., et al., *A new variant cytotoxic T lymphocyte escape mutation in HLA-B27-positive individuals infected with HIV type 1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. 21(5): p. 395-7.
220. Borrow, P., et al., *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus*. Nat Med, 1997. 3(2): p. 205-11.
221. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nat Med, 1997. 3(2): p. 212-7.
222. Phillips, R.E., et al., *Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition*. Nature, 1991. 354(6353): p. 453-9.
223. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): p. 1890-5.
224. 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.
225. Kerkau, T., et al., *Downregulation of HLA class I antigens in HIV-1-infected cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1989. 5(6): p. 613-20.
226. Scheppler, J.A., et al., *Down-modulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection*. J Immunol, 1989. 143(9): p. 2858-66.
227. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. 2(3): p. 338-42.
228. Klenerman, P., et al., *Cytotoxic T lymphocytes and viral turnover in HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(26): p. 15323-8.
229. Meier, U.C., et al., *Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants*. Science, 1995. 270(5240): p. 1360-2.



230. Barker, E., et al., *CD28 costimulation increases CD8+ cell suppression of HIV replication*. *J Immunol*, 1997. 159(10): p. 5123-31.
231. Musey, L., et al., *HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women*. *J Exp Med*, 1997. 185(2): p. 293-303.
232. Aberg, J.A., et al., *Primary care guidelines for the management of persons infected with human immunodeficiency virus: recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*, 2004. 39(5): p. 609-29.
233. Struble, K., et al., *Antiretroviral therapies for treatment-experienced patients: current status and research challenges*. *AIDS*, 2005. 19(8): p. 747-56.
234. Yeni, P.G., et al., *Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel*. *JAMA*, 2004. 292(2): p. 251-65.
235. Furman, P.A., et al., *Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(21): p. 8333-7.
236. Hart, G.J., et al., *Effects of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) 5'-triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and mammalian DNA polymerases alpha, beta, and gamma*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(8): p. 1688-94.
237. Mitsuya, H., et al., *3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(20): p. 7096-100.
238. Dournon, E., et al., *Effects of zidovudine in 365 consecutive patients with AIDS or AIDS-related complex*. *Lancet*, 1988. 2(8623): p. 1297-302.
239. Fischl, M.A., et al., *The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial*. *N Engl J Med*, 1987. 317(4): p. 185-91.
240. Gu, Z., et al., *Effects of non-nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 in cell-free recombinant reverse transcriptase assays*. *J Biol Chem*, 1995. 270(52): p. 31046-51.
241. Spence, R.A., et al., *Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors*. *Science*, 1995. 267(5200): p. 988-93.
242. Boden, D. and M. Markowitz, *Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(11): p. 2775-83.
243. Steigbigel, R.T., et al., *Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection*. *The New England journal of medicine*, 2008. 359(4): p. 339-54.
244. Bacchetti, P., et al., *Fat distribution in men with HIV infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005. 40(2): p. 121-31.
245. Lichtenstein, K.A., *Redefining lipodystrophy syndrome: risks and impact on clinical decision making*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005. 39(4): p. 395-400.
246. Nolan, D., P. Reiss, and S. Mallal, *Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection: a review of selected topics*. *Expert Opin Drug Saf*, 2005. 4(2): p. 201-18.



247. Safrin, S. and C. Grunfeld, *Fat distribution and metabolic changes in patients with HIV infection*. AIDS, 1999. 13(18): p. 2493-505.
248. Bridges, S.H. and N. Sarver, *Gene therapy and immune restoration for HIV disease*. Lancet, 1995. 345(8947): p. 427-32.
249. Kelleher, A.D., et al., *Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir*. J Infect Dis, 1996. 173(2): p. 321-9.
250. Pantaleo, G., *How immune-based interventions can change HIV therapy*. Nat Med, 1997. 3(5): p. 483-6.
251. Kovacs, J.A., et al., *Interleukin-2 induced immune effects in human immunodeficiency virus-infected patients receiving intermittent interleukin-2 immunotherapy*. Eur J Immunol, 2001. 31(5): p. 1351-60.
252. Ada, G.L. and M.J. McElrath, *HIV type 1 vaccine-induced cytotoxic T cell responses: potential role in vaccine efficacy*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997. 13(3): p. 205-10.
253. Levy, J.A., *Prospects for an AIDS vaccine: encourage innate immunity*. AIDS, 2004. 18(15): p. 2085-6.
254. Takahashi, H., et al., *Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant*. Science, 1992. 255(5042): p. 333-6.
255. Lubeck, M.D., et al., *Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization*. Nat Med, 1997. 3(6): p. 651-8.
256. Pashine, A., N.M. Valiante, and J.B. Ulmer, *Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants*. Nat Med, 2005. 11(4 Suppl): p. S63-8.
257. Sheets, R.L., et al., *Biodistribution and toxicological safety of adenovirus type 5 and type 35 vectored vaccines against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), Ebola, or Marburg are similar despite differing adenovirus serotype vector, manufacturer's construct, or gene inserts*. J Immunotoxicol, 2008. 5(3): p. 315-35.
258. Harro, C., et al., *Safety and immunogenicity of the Merck adenovirus serotype 5 (MRKAd5) and MRKAd6 human immunodeficiency virus type 1 trigene vaccines alone and in combination in healthy adults*. Clin Vaccine Immunol, 2009. 16(9): p. 1285-92.
259. Harro, C.D., et al., *Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored near-consensus HIV type 1 clade B gag vaccines in healthy adults*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009. 25(1): p. 103-14.
260. Nicholson, O., et al., *Safety and Immunogenicity of the MRKAd5 gag HIV Type 1 Vaccine in a Worldwide Phase 1 Study of Healthy Adults*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2010.
261. Mehendale, S., et al., *A phase 1 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 subtype C adeno-associated virus vaccine*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2008. 24(6): p. 873-80.
262. Mehendale, S., et al., *Safety & immunogenicity of tgAAC09, a recombinant adeno-associated virus type 2 HIV-1 subtype C vaccine in India*. Indian J Med Res, 2010. 132: p. 168-75.



263. Vardas, E., et al., *A phase 2 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 vaccine based on adeno-associated virus*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010. 26(8): p. 933-42.
264. Vasan, S., et al., *Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADVAX, a multigenic, DNA-based clade C/B' HIV-1 candidate vaccine*. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8617.
265. Dolter, K.E., et al., *Immunogenicity, safety, biodistribution and persistence of ADVAX, a prophylactic DNA vaccine for HIV-1, delivered by in vivo electroporation*. *Vaccine*, 2011. 29(4): p. 795-803.
266. Cristillo, A.D., et al., *Induction of mucosal and systemic antibody and T-cell responses following prime-boost immunization with novel adjuvanted human immunodeficiency virus-1-vaccine formulations*. *J Gen Virol*, 2011. 92(Pt 1): p. 128-40.
267. Ramanathan, V.D., et al., *A Phase 1 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 subtype C-modified vaccinia Ankara virus vaccine candidate in Indian volunteers*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2009. 25(11): p. 1107-16.
268. Goepfert, P.A., et al., *Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles*. *J Infect Dis*, 2011. 203(5): p. 610-9.
269. Grant, R.M., et al., *Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men*. *The New England journal of medicine*, 2010. 363(27): p. 2587-99.
270. Sharron, M., et al., *Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes*. *Blood*, 2000. 96(1): p. 41-9.
271. Zhang, Y.J., et al., *Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare in vitro*. *J Virol*, 1998. 72(11): p. 9337-44.
272. Zhang, Y.J., et al., *HIV type 1 molecular clones able to use the Bonzo/STRL-33 coreceptor for virus entry*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(3): p. 217-27.
273. Connor, R.I., et al., *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals*. *J Exp Med*, 1997. 185(4): p. 621-8.
274. de Roda Husman, A.M., et al., *Adaptation to promiscuous usage of chemokine receptors is not a prerequisite for human immunodeficiency virus type 1 disease progression*. *J Infect Dis*, 1999. 180(4): p. 1106-15.
275. Edinger, A.L., et al., *Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins*. *Virology*, 1998. 249(2): p. 367-78.
276. Kreisberg, J.F., et al., *Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates depends on coreceptor usage and not patient disease status*. *J Virol*, 2001. 75(18): p. 8842-7.
277. Pohlmann, S., et al., *Simian immunodeficiency virus utilizes human and sooty mangabey but not rhesus macaque STRL33 for efficient entry*. *J Virol*, 2000. 74(11): p. 5075-82.



278. Simmons, G., et al., *Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry.* J Virol, 1996. 70(12): p. 8355-60.
279. Zhang, Y.J. and J.P. Moore, *Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry?* J Virol, 1999. 73(4): p. 3443-8.
280. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.* Cell, 1996. 86(3): p. 367-77.
281. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study.* Science, 1996. 273(5283): p. 1856-62.
282. Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.* Nature, 1996. 382(6593): p. 722-5.
283. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.* Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 657-700.
284. Doms, R.W., *Chemokine receptors and HIV entry.* AIDS, 2001. 15 Suppl 1: p. S34-5.
285. Clapham, P.R. and A. McKnight, *Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses.* J Gen Virol, 2002. 83(Pt 8): p. 1809-29.
286. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.* Science, 1996. 272(5263): p. 872-7.
287. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.* Nature, 1996. 382(6594): p. 829-33.
288. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.* Nature, 1996. 382(6594): p. 833-5.
289. Potempa, S., et al., *CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry.* J Virol, 1997. 71(6): p. 4419-24.
290. Picard, L., et al., *Role of the amino-terminal extracellular domain of CXCR-4 in human immunodeficiency virus type 1 entry.* Virology, 1997. 231(1): p. 105-11.
291. Lu, Z., et al., *Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6426-31.
292. Cocchi, F., et al., *The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection.* Nat Med, 1996. 2(11): p. 1244-7.
293. Rucker, J., et al., *Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity.* Cell, 1996. 87(3): p. 437-46.
294. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5.* Nature, 1996. 384(6605): p. 179-83.



295. Connor, R.I., et al., *Macrophages and CD4+ T lymphocytes from two multiply exposed, uninfected individuals resist infection with primary non-syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1996. 70(12): p. 8758-64.
296. Rana, S., et al., *Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation*. J Virol, 1997. 71(4): p. 3219-27.
297. Martinson, J.J., et al., *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion*. Nat Genet, 1997. 16(1): p. 100-3.
298. Shahabi, N.A., K. McAllen, and B.M. Sharp, *Stromal cell-derived factor 1-alpha (SDF)-induced human T cell chemotaxis becomes phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-independent: role of PKC-theta*. J Leukoc Biol, 2008. 83(3): p. 663-71.
299. Petit, I., et al., *Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells*. J Clin Invest, 2005. 115(1): p. 168-76.
300. Davis, C.B., et al., *Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5*. J Exp Med, 1997. 186(10): p. 1793-8.
301. Ganju, R.K., et al., *The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways*. J Biol Chem, 1998. 273(36): p. 23169-75.
302. Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Groopman, *Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C*. Blood, 2000. 95(8): p. 2505-13.
303. Cicala, C., et al., *Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope*. J Immunol, 1999. 163(1): p. 420-6.
304. Nabel, G. and D. Baltimore, *An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells*. Nature, 1987. 326(6114): p. 711-3.
305. Nishita, M., H. Aizawa, and K. Mizuno, *Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis*. Mol Cell Biol, 2002. 22(3): p. 774-83.
306. Okabe, S., S. Fukuda, and H.E. Broxmeyer, *Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell-derived factor-1alpha is associated with cell migration in a T-lymphocyte line*. Exp Hematol, 2002. 30(7): p. 761-6.
307. Vila-Coro, A.J., et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. FASEB J, 1999. 13(13): p. 1699-710.
308. Ahr, B., et al., *Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. 280(8): p. 6692-700.
309. Moriguchi, M., et al., *CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3*. J Biol Chem, 2005. 280(17): p. 17408-14.



310. Mowafi, F., et al., *Chemokine CXCL12 enhances proliferation in pre-B-ALL via STAT5 activation*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. 50(4): p. 812-7.
311. Okabe, S., et al., *Stromal-cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45*. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. 36(2): p. 308-14.
312. Wu, Y. and A. Yoder, *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis*. *PLoS Pathog*, 2009. 5(12): p. e1000520.
313. Sotsios, Y., et al., *The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes*. *J Immunol*, 1999. 163(11): p. 5954-63.
314. Vicente-Manzanares, M., et al., *Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis*. *J Immunol*, 1999. 163(7): p. 4001-12.
315. Vicente-Manzanares, M., et al., *A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis*. *J Immunol*, 2002. 168(1): p. 400-10.
316. Barbero, S., et al., *Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt*. *Cancer Res*, 2003. 63(8): p. 1969-74.
317. Porcile, C., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation*. *Exp Cell Res*, 2005. 308(2): p. 241-53.
318. Francois, F. and M.E. Klotman, *Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages*. *J Virol*, 2003. 77(4): p. 2539-49.
319. Balabanian, K., et al., *CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2004. 173(12): p. 7150-60.
320. Cicala, C., et al., *HIV-1 gp120 induces NFAT nuclear translocation in resting CD4+ T-cells*. *Virology*, 2006. 345(1): p. 105-14.
321. Yoder, A., et al., *HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells*. *Cell*, 2008. 134(5): p. 782-92.
322. Kawamura, T., et al., *R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8401-6.
323. Granelli-Piperno, A., et al., *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*, 1998. 72(4): p. 2733-7.
324. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(9): p. 5215-20.
325. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. *Nat Med*, 1997. 3(12): p. 1369-75.



326. Meng, G., et al., *Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa.* J Infect Dis, 2000. 182(3): p. 785-91.
327. Agace, W.W., et al., *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation.* Curr Biol, 2000. 10(6): p. 325-8.
328. Cornelissen, M., et al., *Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population.* J Virol, 1995. 69(3): p. 1810-8.
329. Fiore, J.R., et al., *The biological phenotype of HIV-1 is usually retained during and after sexual transmission.* Virology, 1994. 204(1): p. 297-303.
330. Goudsmit, J., *The role of viral diversity in HIV pathogenesis.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. 10 Suppl 1: p. S15-9.
331. Pratt, R.D., et al., *Virologic characterization of primary human immunodeficiency virus type 1 infection in a health care worker following needlestick injury.* J Infect Dis, 1995. 172(3): p. 851-4.
332. Kawamura, T., et al., *Low levels of productive HIV infection in Langerhans cell-like dendritic cells differentiated in the presence of TGF-beta1 and increased viral replication with CD40 ligand-induced maturation.* Eur J Immunol, 2001. 31(2): p. 360-8.
333. Bentwich, Z., et al., *Concurrent infections and HIV pathogenesis.* AIDS, 2000. 14(14): p. 2071-81.
334. Clerici, M., et al., *Immune activation in africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. Italian-Ugandan AIDS Project.* AIDS, 2000. 14(14): p. 2083-92.
335. Greco, G., et al., *Differential effects of human immunodeficiency virus isolates on beta-chemokine and gamma interferon production and on cell proliferation.* J Virol, 1999. 73(2): p. 1528-34.
336. Locher, C.P., et al., *Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation.* J Gen Virol, 2005. 86(Pt 4): p. 1171-9.
337. Popik, W. and P.M. Pitha, *Exploitation of cellular signaling by HIV-1: unwelcome guests with master keys that signal their entry.* Virology, 2000. 276(1): p. 1-6.
338. Richman, D.D. and S.A. Bozzette, *The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression.* J Infect Dis, 1994. 169(5): p. 968-74.
339. Cheng-Mayer, C., et al., *Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host.* Science, 1988. 240(4848): p. 80-2.
340. van Noesel, C.J., et al., *Functional and phenotypic evidence for a selective loss of memory T cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men.* J Clin Invest, 1990. 86(1): p. 293-9.
341. de Jong, J.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity.* J Virol, 1992. 66(2): p. 757-65.



342. Fouchier, R.A., et al., *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule*. J Virol, 1992. 66(5): p. 3183-7.
343. Shioda, T., J.A. Levy, and C. Cheng-Mayer, *Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(20): p. 9434-8.
344. Amara, A., et al., *HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication*. J Exp Med, 1997. 186(1): p. 139-46.
345. Aramori, I., et al., *Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor*. EMBO J, 1997. 16(15): p. 4606-16.
346. Farzan, M., et al., *HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5*. J Biol Chem, 1997. 272(11): p. 6854-7.
347. Gosling, J., et al., *Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(10): p. 5061-6.
348. Amara, A., et al., *G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates*. J Virol, 2003. 77(4): p. 2550-8.
349. Arthos, J., et al., *CCR5 signal transduction in macrophages by human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus envelopes*. J Virol, 2000. 74(14): p. 6418-24.
350. Chackerian, B., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 coreceptors participate in postentry stages in the virus replication cycle and function in simian immunodeficiency virus infection*. J Virol, 1997. 71(5): p. 3932-9.
351. Kelly, M.D., et al., *Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages*. J Immunol, 1998. 160(7): p. 3091-5.
352. Kinter, A., et al., *CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11880-5.
353. Kinter, A.L., et al., *HIV envelope induces virus expression from resting CD4+ T cells isolated from HIV-infected individuals in the absence of markers of cellular activation or apoptosis*. J Immunol, 2003. 170(5): p. 2449-55.
354. Lin, Y.L., et al., *Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(24): p. 15590-5.
355. Mori, K., D.J. Ringler, and R.C. Desrosiers, *Restricted replication of simian immunodeficiency virus strain 239 in macrophages is determined by env but is not due to restricted entry*. J Virol, 1993. 67(5): p. 2807-14.
356. Grainger, D.J. and A.M. Lever, *Blockade of chemokine-induced signalling inhibits CCR5-dependent HIV infection in vitro without blocking gp120/CCR5 interaction*. Retrovirology, 2005. 2: p. 23.



357. Lin, Y.L., et al., *G-protein signaling triggered by R5 human immunodeficiency virus type 1 increases virus replication efficiency in primary T lymphocytes*. J Virol, 2005. 79(12): p. 7938-41.
358. Brown, J.N., et al., *HIV-1 activates macrophages independent of Toll-like receptors*. PLoS One, 2008. 3(12): p. e3664.
359. Cassol, E., et al., *M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms*. J Immunol, 2009. 182(10): p. 6237-46.
360. Chan, G., et al., *Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage*. J Immunol, 2008. 181(1): p. 698-711.
361. Chan, G., et al., *NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase activity mediates the HCMV-induced atypical M1/M2 polarization of monocytes*. Virus Res, 2009. 144(1-2): p. 329-33.
362. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. 9(7): p. 853-60.
363. Cicala, C., et al., *R5 and X4 HIV envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(10): p. 3746-51.
364. Vicenzi, E., et al., *Envelope-dependent restriction of human immunodeficiency virus type 1 spreading in CD4(+) T lymphocytes: R5 but not X4 viruses replicate in the absence of T-cell receptor restimulation*. J Virol, 1999. 73(9): p. 7515-23.
365. Brinkman, K., et al., *In-vivo anti-CD3-induced HIV-1 viraemia*. Lancet, 1998. 352(9138): p. 1446.
366. Carroll, R.G., et al., *Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells*. Science, 1997. 276(5310): p. 273-6.
367. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(15): p. 8869-73.
368. Kinter, A.L., et al., *HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines*. J Immunol, 1995. 154(5): p. 2448-59.
369. Schuitemaker, H., et al., *Early replication steps but not cell type-specific signalling of the viral long terminal repeat determine HIV-1 monocytophism*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. 9(7): p. 669-75.
370. Popik, W. and P.M. Pitha, *Inhibition of CD3/CD28-mediated activation of the MEK/ERK signaling pathway represses replication of X4 but not R5 human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood CD4(+) T lymphocytes*. J Virol, 2000. 74(6): p. 2558-66.
371. Yamamoto, T., et al., *Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state*. PLoS Pathog, 2009. 5(1): p. e1000279.
372. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. 202: p. 8-32.
373. Martal, J.L., et al., *IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy*



- hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities. Biochimie, 1998. 80(8-9): p. 755-77.*
374. LaFleur, D.W., et al., *Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes.* J Biol Chem, 2001. 276(43): p. 39765-71.
  375. Chen, J., E. Baig, and E.N. Fish, *Diversity and relatedness among the type I interferons.* J Interferon Cytokine Res, 2004. 24(12): p. 687-98.
  376. Wheelock, E.F. and W.A. Sibley, *Circulating Virus, Interferon and Antibody after Vaccination with the 17-D Strain of Yellow-Fever Virus.* N Engl J Med, 1965. 273: p. 194-8.
  377. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma.* Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 749-95.
  378. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma.* Science, 1991. 252(5006): p. 698-702.
  379. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.* Nat Immunol, 2003. 4(1): p. 69-77.
  380. Dumoutier, L., et al., *Cloning of a new type II cytokine receptor activating signal transducer and activator of transcription (STAT)1, STAT2 and STAT3.* Biochem J, 2003. 370(Pt 2): p. 391-6.
  381. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.* Nat Immunol, 2003. 4(1): p. 63-8.
  382. Mamane, Y., et al., *Interferon regulatory factors: the next generation.* Gene, 1999. 237(1): p. 1-14.
  383. Taniguchi, T., et al., *IRF family of transcription factors as regulators of host defense.* Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 623-55.
  384. Nehyba, J., et al., *A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein.* Mol Cell Biol, 2002. 22(11): p. 3942-57.
  385. Nguyen, H., J. Hiscott, and P.M. Pitha, *The growing family of interferon regulatory factors.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. 8(4): p. 293-312.
  386. Marsili, G., et al., *On the role of interferon regulatory factors in HIV-1 replication.* Ann N Y Acad Sci, 2003. 1010: p. 29-42.
  387. Hiscott, J., et al., *Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor.* J Interferon Cytokine Res, 1999. 19(1): p. 1-13.
  388. Merika, M., et al., *Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription.* Mol Cell, 1998. 1(2): p. 277-87.
  389. Wang, I.M., et al., *Interferon regulatory factors and TFIIB cooperatively regulate interferon-responsive promoter activity in vivo and in vitro.* Mol Cell Biol, 1996. 16(11): p. 6313-24.
  390. Bovolenta, C., et al., *Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(11): p. 5046-50.
  391. Zhang, L. and J.S. Pagano, *IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency.* Mol Cell Biol, 1997. 17(10): p. 5748-57.
  392. Zhang, L. and J.S. Pagano, *Structure and function of IRF-7.* J Interferon Cytokine Res, 2002. 22(1): p. 95-101.



393. Wathelet, M.G., et al., *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. *Mol Cell*, 1998. 1(4): p. 507-18.
394. Yang, H., et al., *Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators*. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 15495-504.
395. Qin, B.Y., et al., *Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP*. *Structure*, 2005. 13(9): p. 1269-77.
396. Qin, B.Y., et al., *Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation*. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(11): p. 913-21.
397. Chen, W., et al., *Insights into interferon regulatory factor activation from the crystal structure of dimeric IRF5*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. 15(11): p. 1213-20.
398. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection*. *J Biol Chem*, 2000. 275(44): p. 34320-7.
399. Au, W.C., et al., *Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes*. *J Biol Chem*, 1998. 273(44): p. 29210-7.
400. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2003. 4(5): p. 491-6.
401. Hemmi, H., et al., *The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection*. *J Exp Med*, 2004. 199(12): p. 1641-50.
402. Hoshino, K., et al., *IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9*. *Nature*, 2006. 440(7086): p. 949-53.
403. Iwamura, T., et al., *Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways*. *Genes Cells*, 2001. 6(4): p. 375-88.
404. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. *Science*, 2003. 300(5622): p. 1148-51.
405. Uematsu, S., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-{alpha} induction*. *J Exp Med*, 2005. 201(6): p. 915-23.
406. Zhang, L. and J.S. Pagano, *Interferon regulatory factor 7 mediates activation of Tap-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1*. *J Virol*, 2001. 75(1): p. 341-50.
407. Prakash, A. and D.E. Levy, *Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(1): p. 50-6.
408. Yu, Y., S.E. Wang, and G.S. Hayward, *The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation*. *Immunity*, 2005. 22(1): p. 59-70.
409. Yu, Y. and G.S. Hayward, *The ubiquitin E3 ligase RAUL negatively regulates type I interferon through ubiquitination of the transcription factors IRF7 and IRF3*. *Immunity*, 2010. 33(6): p. 863-77.
410. Ning, S., et al., *TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor*



- family member latent membrane protein 1*. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(20): p. 6536-46.
411. Kubota, T., et al., *Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression*. *J Biol Chem*, 2008. 283(37): p. 25660-70.
  412. Caillaud, A., et al., *Acetylation of interferon regulatory factor-7 by p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF) impairs its DNA binding*. *J Biol Chem*, 2002. 277(51): p. 49417-21.
  413. Savitsky, D., et al., *Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 59(4): p. 489-510.
  414. Takaoka, A., T. Tamura, and T. Taniguchi, *Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis*. *Cancer Sci*, 2008. 99(3): p. 467-78.
  415. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 535-84.
  416. Tanaka, N. and T. Taniguchi, *The interferon regulatory factors and oncogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 2000. 10(2): p. 73-81.
  417. Pagano, J.S., *Viruses and lymphomas*. *N Engl J Med*, 2002. 347(2): p. 78-9.
  418. Huang, Y., et al., *Type I interferons and interferon regulatory factors regulate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected macrophages*. *PLoS One*, 2009. 4(4): p. e5397.
  419. Fu, Q., et al., *Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2011. 63(3): p. 749-54.
  420. Heinig, M., et al., *A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk*. *Nature*, 2010. 467(7314): p. 460-4.
  421. Gale, M., Jr. and E.M. Foy, *Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. 436(7053): p. 939-45.
  422. Clemens, M.J., *Interferons and apoptosis*. *J Interferon Cytokine Res*, 2003. 23(6): p. 277-92.
  423. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. 124(4): p. 783-801.
  424. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 197-216.
  425. van Boxel-Dezaire, A.H., M.R. Rani, and G.R. Stark, *Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons*. *Immunity*, 2006. 25(3): p. 361-72.
  426. Fritz, J.H., et al., *Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease*. *Nat Immunol*, 2006. 7(12): p. 1250-7.
  427. Diebold, S.S., et al., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. *Nature*, 2003. 424(6946): p. 324-8.
  428. Irving, A. and B.R. Williams, *Latest advances in innate antiviral defence*. *F1000 Biol Rep*, 2009. 1: p. 22.
  429. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(49): p. 17264-9.

430. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. *Immunity*, 2005. 23(1): p. 19-28.
431. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. *Nature*, 2006. 441(7089): p. 101-5.
432. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. 5(7): p. 730-7.
433. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. *J Immunol*, 2005. 175(5): p. 2851-8.
434. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. *Mol Cell*, 2005. 19(6): p. 727-40.
435. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. 122(5): p. 669-82.
436. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. *Nat Immunol*, 2005. 6(10): p. 981-8.
437. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. 437(7062): p. 1167-72.
438. Kumar, H., et al., *Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses*. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1795-803.
439. Sun, Q., et al., *The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses*. *Immunity*, 2006. 24(5): p. 633-42.
440. Oganessian, G., et al., *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. *Nature*, 2006. 439(7073): p. 208-11.
441. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. *EMBO J*, 2006. 25(14): p. 3257-63.
442. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response*. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6758-80.
443. Seth, R.B., L. Sun, and Z.J. Chen, *Antiviral innate immunity pathways*. *Cell Res*, 2006. 16(2): p. 141-7.
444. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. *Cell Death Differ*, 2006. 13(5): p. 816-25.
445. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2001. 1(2): p. 135-45.
446. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. *Int Immunol*, 2005. 17(1): p. 1-14.
447. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(5): p. 353-64.
448. Moynagh, P.N., *TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway*. *Trends Immunol*, 2005. 26(9): p. 469-76.
449. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. *Semin Immunol*, 2004. 16(1): p. 3-9.
450. Colonna, M., *TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own*. *Eur J Immunol*, 2007. 37(2): p. 306-9.



451. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(9): p. 644-58.
452. Meylan, E. and J. Tschopp, *Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses*. *Mol Cell*, 2006. 22(5): p. 561-9.
453. Hacker, H., et al., *Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6*. *J Exp Med*, 2000. 192(4): p. 595-600.
454. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. *Mol Cell*, 1998. 2(2): p. 253-8.
455. O'Neill, L.A., *How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know*. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(1): p. 3-9.
456. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. *Immunity*, 1997. 7(6): p. 837-47.
457. Hochrein, H., et al., *Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(31): p. 11416-21.
458. Honda, K., et al., *Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(43): p. 15416-21.
459. Honda, K., et al., *Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction*. *Nature*, 2005. 434(7036): p. 1035-40.
460. Kawai, T., et al., *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6*. *Nat Immunol*, 2004. 5(10): p. 1061-8.
461. Takaoka, A., et al., *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. *Nature*, 2005. 434(7030): p. 243-9.
462. Negishi, H., et al., *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(41): p. 15136-41.
463. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling*. *J Immunol*, 2002. 169(12): p. 6668-72.
464. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. *Nat Immunol*, 2003. 4(2): p. 161-7.
465. Watters, T.M., E.F. Kenny, and L.A. O'Neill, *Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins*. *Immunol Cell Biol*, 2007. 85(6): p. 411-9.
466. Honda, K., et al., *IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses*. *Nature*, 2005. 434(7034): p. 772-7.
467. Barnes, B.J., et al., *Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(16): p. 5721-40.
468. Lin, R., et al., *Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(2): p. 959-66.



469. Marie, I., et al., *Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(23): p. 8803-14.
470. Au, W.C., W.S. Yeow, and P.M. Pitha, *Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3*. *Virology*, 2001. 280(2): p. 273-82.
471. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. *Embo J*, 1998. 17(22): p. 6660-9.
472. Brierley, M.M. and E.N. Fish, *Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. 22(8): p. 835-45.
473. Domanski, P. and O.R. Colamonici, *The type-I interferon receptor. The long and short of it*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1996. 7(2): p. 143-51.
474. Pestka, S., *The human interferon alpha species and receptors*. *Biopolymers*, 2000. 55(4): p. 254-87.
475. John, J., et al., *Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons*. *Mol Cell Biol*, 1991. 11(8): p. 4189-95.
476. Bluysen, H.A., et al., *Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(12): p. 5645-9.
477. Li, X.-L., Ezelle, H.J., Hsi, T.Y. and Hassel B.A., *A central role for RNA in the induction and biological activities of type 1 interferons*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2011. 2(1): p. 58-78.
478. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. 264(5164): p. 1415-21.
479. Kerr, I.M. and R.E. Brown, *pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(1): p. 256-60.
480. Clemens, M.J. and A. Elia, *The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function*. *J Interferon Cytokine Res*, 1997. 17(9): p. 503-24.
481. Haller, O., M. Frese, and G. Kochs, *Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses*. *Rev Sci Tech*, 1998. 17(1): p. 220-30.
482. Fish, E.N., K. Banerjee, and N. Stebbing, *The role of three domains in the biological activity of human interferon-alpha*. *J Interferon Res*, 1989. 9(1): p. 97-114.
483. Abramovich, C., et al., *Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta*. *EMBO J*, 1994. 13(24): p. 5871-7.
484. Deonarain, R., et al., *Interferon-alpha/beta-receptor interactions: a complex story unfolding*. *Curr Pharm Des*, 2002. 8(24): p. 2131-7.
485. Domanski, P., et al., *Differential use of the betaL subunit of the type I interferon (IFN) receptor determines signaling specificity for IFNalpha2 and IFNbeta*. *J Biol Chem*, 1998. 273(6): p. 3144-7.



486. Lewerenz, M., K.E. Mogensen, and G. Uze, *Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons*. J Mol Biol, 1998. 282(3): p. 585-99.
487. Plataniias, L.C., et al., *Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type I interferon receptor*. J Biol Chem, 1996. 271(39): p. 23630-3.
488. Michaelis, B. and J.A. Levy, *HIV replication can be blocked by recombinant human interferon beta*. AIDS, 1989. 3(1): p. 27-31.
489. Poli, G., et al., *Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines*. Science, 1989. 244(4904): p. 575-7.
490. Yamamoto, J.K., et al., *Human alpha- and beta-interferon but not gamma-suppress the in vitro replication of LAV, HTLV-III, and ARV-2*. J Interferon Res, 1986. 6(2): p. 143-52.
491. Sperber, S.J., et al., *Anti-HIV-1 activity of recombinant and hybrid species of interferon-alpha*. J Interferon Res, 1992. 12(5): p. 363-8.
492. Pestka, S., et al., *Interferons and their actions*. Annu Rev Biochem, 1987. 56: p. 727-77.
493. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. 14(4): p. 778-809, table of contents.
494. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. 451(7177): p. 425-30.
495. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. 418(6898): p. 646-50.
496. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. 427(6977): p. 848-53.
497. Neil, S. and P. Bieniasz, *Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon*. J Interferon Cytokine Res, 2009. 29(9): p. 569-80.
498. Harris, R.S. and M.T. Liddament, *Retroviral restriction by APOBEC proteins*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(11): p. 868-77.
499. Bishop, K.N., et al., *Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins*. Curr Biol, 2004. 14(15): p. 1392-6.
500. OhAinle, M., et al., *Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H*. J Virol, 2006. 80(8): p. 3853-62.
501. Wiegand, H.L., et al., *A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins*. EMBO J, 2004. 23(12): p. 2451-8.
502. Yu, Q., et al., *APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication*. J Biol Chem, 2004. 279(51): p. 53379-86.
503. Schafer, A., H.P. Bogerd, and B.R. Cullen, *Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor*. Virology, 2004. 328(2): p. 163-8.
504. Svarovskaia, E.S., et al., *Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs*. J Biol Chem, 2004. 279(34): p. 35822-8.



505. Wang, T., et al., *7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G*. J Virol, 2007. 81(23): p. 13112-24.
506. Xu, H., et al., *Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions*. Virology, 2007. 360(2): p. 247-56.
507. Zennou, V., et al., *APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles*. J Virol, 2004. 78(21): p. 12058-61.
508. Zennou, V. and P.D. Bieniasz, *Comparative analysis of the antiretroviral activity of APOBEC3G and APOBEC3F from primates*. Virology, 2006. 349(1): p. 31-40.
509. Virgen, C.A. and T. Hatziioannou, *Antiretroviral activity and Vif sensitivity of rhesus macaque APOBEC3 proteins*. J Virol, 2007. 81(24): p. 13932-7.
510. Sebastian, S. and J. Luban, *TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid*. Retrovirology, 2005. 2: p. 40.
511. Stremlau, M., et al., *Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(14): p. 5514-9.
512. Perez-Caballero, D., et al., *Restriction of human immunodeficiency virus type 1 by TRIM-CypA occurs with rapid kinetics and independently of cytoplasmic bodies, ubiquitin, and proteasome activity*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15567-72.
513. Anderson, J.L., et al., *Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins*. J Virol, 2006. 80(19): p. 9754-60.
514. Li, X., et al., *Unique features of TRIM5alpha among closely related human TRIM family members*. Virology, 2007. 360(2): p. 419-33.
515. Kootstra, N.A., et al., *Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p. 1298-303.
516. Chatterji, U., et al., *Naturally occurring capsid substitutions render HIV-1 cyclophilin A independent in human cells and TRIM-cyclophilin-resistant in Owl monkey cells*. J Biol Chem, 2005. 280(48): p. 40293-300.
517. Van Damme, N., et al., *The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein*. Cell Host Microbe, 2008. 3(4): p. 245-52.
518. Neil, S.J., et al., *HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane*. PLoS Pathog, 2006. 2(5): p. e39.
519. Kornbluth, R.S., et al., *Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro*. J Exp Med, 1989. 169(3): p. 1137-51.
520. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(8): p. 3195-9.
521. Biswas, P., et al., *Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells*. J Exp Med, 1992. 176(3): p. 739-50.



522. Smith, M.S., R.J. Thresher, and J.S. Pagano, *Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 morphogenesis in T cells by alpha interferon*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991. 35(1): p. 62-7.
523. Neil, S.J., et al., *An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein*. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(3): p. 193-203.
524. Gupta, R.K., et al., *Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(49): p. 20889-94.
525. Jia, B., et al., *Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2*. *PLoS Pathog*, 2009. 5(5): p. e1000429.
526. McNatt, M.W., et al., *Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants*. *PLoS Pathog*, 2009. 5(2): p. e1000300.
527. Rong, L., et al., *The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu*. *J Virol*, 2009. 83(15): p. 7536-46.
528. el Kharroubi, A. and E. Verdin, *Protein-DNA interactions within DNase I-hypersensitive sites located downstream of the HIV-1 promoter*. *J Biol Chem*, 1994. 269(31): p. 19916-24.
529. Sgarbanti, M., et al., *Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors*. *J Exp Med*, 2002. 195(10): p. 1359-70.
530. Areste, C. and D.J. Blackbourn, *HIV Tat-mediated transcriptional regulation of proteasome protein cleavage specificity*. *Biochem J*, 2006. 396(2): p. e13-5.
531. Nelson, N., et al., *Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation*. *J Immunol*, 1996. 156(10): p. 3711-20.
532. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael, *Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators*. *Immunity*, 2001. 14(6): p. 763-77.
533. Okumura, A., et al., *HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. *Virology*, 2008. 373(1): p. 85-97.
534. Doehle, B.P., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 mediates global disruption of innate antiviral signaling and immune defenses within infected cells*. *J Virol*, 2009. 83(20): p. 10395-405.
535. Suh, H.S., et al., *TLR3 and TLR4 are innate antiviral immune receptors in human microglia: role of IRF3 in modulating antiviral and inflammatory response in the CNS*. *Virology*, 2009. 392(2): p. 246-59.
536. Izmailova, E., et al., *HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages*. *Nat Med*, 2003. 9(2): p. 191-7.
537. Beutler, B., et al., *How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers*. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(4): p. 479-85.
538. Takeda, K. and S. Akira, *Toll receptors and pathogen resistance*. *Cell Microbiol*, 2003. 5(3): p. 143-53.

539. Meylan, P.R., et al., *Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages*. *Virology*, 1993. 193(1): p. 138-48.
540. Samuel, C.E., *Mechanisms of the antiviral action of interferons*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1988. 35: p. 27-72.
541. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 227-64.
542. Barr, S.D., J.R. Smiley, and F.D. Bushman, *The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22*. *PLoS Pathog*, 2008. 4(2): p. e1000007.
543. Bishop, K.N., R.K. Holmes, and M.H. Malim, *Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination*. *J Virol*, 2006. 80(17): p. 8450-8.
544. Jouvenet, N., et al., *Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin*. *J Virol*, 2009. 83(4): p. 1837-44.
545. Peng, G., et al., *Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity*. *J Exp Med*, 2006. 203(1): p. 41-6.
546. Smith, A.J., et al., *Host genes associated with HIV-1 replication in lymphatic tissue*. *J Immunol*, 2010. 185(9): p. 5417-24.
547. Barnes, B., B. Lubyova, and P.M. Pitha, *On the role of IRF in host defense*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. 22(1): p. 59-71.
548. Paun, A. and P.M. Pitha, *The IRF family, revisited*. *Biochimie*, 2007. 89(6-7): p. 744-53.
549. De Belle, I., et al., *In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1*. *J Biol Chem*, 2003. 278(16): p. 14306-12.
550. Hassa, P.O., et al., *Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1*. *J Mol Biol*, 2008. 377(3): p. 668-78.
551. Fenard, D., et al., *Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement*. *J Immunol*, 2005. 175(9): p. 6050-7.
552. Sechi, A.S. and J. Wehland, *Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics*. *Trends Immunol*, 2004. 25(5): p. 257-65.
553. Penninger, J.M. and G.R. Crabtree, *The actin cytoskeleton and lymphocyte activation*. *Cell*, 1999. 96(1): p. 9-12.
554. Tskvitarua-Fuller, I., et al., *Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization*. *J Immunol*, 2003. 171(5): p. 2287-95.
555. Pontow, S.E., et al., *Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion*. *J Virol*, 2004. 78(13): p. 7138-47.
556. Steffens, C.M. and T.J. Hope, *Localization of CD4 and CCR5 in living cells*. *J Virol*, 2003. 77(8): p. 4985-91.



557. Steffens, C.M. and T.J. Hope, *Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells: implications for HIV fusion and entry events.* J Virol, 2004. 78(17): p. 9573-8.
558. Komano, J., et al., *Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses.* Mol Biol Cell, 2004. 15(12): p. 5197-207.
559. Nolz, J.C., et al., *The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation.* Curr Biol, 2006. 16(1): p. 24-34.
560. Zipfel, P.A., et al., *Role for the Abi/wave protein complex in T cell receptor-mediated proliferation and cytoskeletal remodeling.* Curr Biol, 2006. 16(1): p. 35-46.
561. Cicala, C., et al., *HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(14): p. 9380-5.
562. Konno, H., et al., *TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA.* PLoS One, 2009. 4(5): p. e5674.
563. Yoshida, R., et al., *TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway.* J Biol Chem, 2008. 283(52): p. 36211-20.
564. Sato, S., et al., *Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling.* J Immunol, 2003. 171(8): p. 4304-10.
565. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation.* Mol Cell Biol, 1998. 18(5): p. 2986-96.
566. Sato, M., et al., *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7.* FEBS Lett, 1998. 441(1): p. 106-10.
567. Sato, M., et al., *Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene.* FEBS Lett, 1998. 425(1): p. 112-6.
568. Weaver, B.K., K.P. Kumar, and N.C. Reich, *Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI.* Mol Cell Biol, 1998. 18(3): p. 1359-68.
569. Yoneyama, M., et al., *Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300.* Embo J, 1998. 17(4): p. 1087-95.
570. Sato, M., et al., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction.* Immunity, 2000. 13(4): p. 539-48.
571. Buettner, N., et al., *Thogoto virus ML protein is a potent inhibitor of the interferon regulatory factor-7 transcription factor.* J Gen Virol, 2010. 91(Pt 1): p. 220-7.
572. Colina, R., et al., *Translational control of the innate immune response through IRF-7.* Nature, 2008. 452(7185): p. 323-8.

573. Oldak, M., et al., *Differential regulation of human papillomavirus type 8 by interferon regulatory factors 3 and 7*. J Virol, 2011. 85(1): p. 178-88.
574. Covic, M., et al., *Arginine methyltransferase CARMI is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression*. EMBO J, 2005. 24(1): p. 85-96.
575. Genin, P., et al., *Differential regulation of human interferon A gene expression by interferon regulatory factors 3 and 7*. Mol Cell Biol, 2009. 29(12): p. 3435-50.
576. Jeong, S.J., et al., *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax*. J Virol, 2006. 80(20): p. 10036-44.
577. Bauer, U.M., et al., *Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation*. EMBO Rep, 2002. 3(1): p. 39-44.
578. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. Science, 1999. 284(5423): p. 2174-7.