

Université de Montréal

**La protéine accessoire Vpu du VIH-1 inhibe
l'activité antivirale des pDCs à travers un
processus ILT7-dépendant**

par Édouard A. Côté

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie de la
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du
grade de maîtrise en microbiologie et immunologie

Juillet, 2014

© Édouard A. Côté, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**La protéine accessoire Vpu du VIH-1 inhibe
l'activité antivirale des pDCs à travers un
processus ILT7-dépendant**

Présenté par : Édouard A. Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Lemay, Ph.D.
Président-rapporteur

Dr Éric A. Cohen, Ph.D
Directeur de recherche

Dr Petronela Ancuta, Ph.D
Membre du jury

RÉSUMÉ

La protéine accessoire U (Vpu) du VIH-1 cible efficacement BST2/Tetherin, facteur de restriction restreignant la relâche de divers virus enveloppés à même la surface cellulaire. Le récepteur naturel de BST2 récemment découvert est ILT7, une protéine exclusivement exprimée à la surface des cellules produisant l'essentiel de l'interféron de type 1 (IFN-1) lors d'infections virales, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). L'interaction entre BST2 et ILT7 réprime la production d'IFN-1 des pDCs. Considérant le potentiel immunorégulateur de BST2 récemment décrit, nous avons entrepris d'évaluer cet aspect de l'antagonisme de Vpu sur BST2. À l'aide d'un système de co-culture entre une lignée de cellules T CD4+ infectée avec un virus exprimant ou n'exprimant pas Vpu et les cellules mononucléées du sang périphérique ou de pDCs purifiés, nous avons observé que Vpu est responsable d'une atténuation majeure de la sécrétion d'interféron de type 1 (IFN-1) produite en réponse aux cellules infectées. La présence de molécules de BST2 de surface libres est essentielle à ce processus, puisque le bloc de toute interaction en *trans* de BST2 par des anticorps polyclonaux α -BST2 abroge l'effet de Vpu. Similairement, Vpu ne peut exercer cet effet lorsque ILT7 est déplété dans les pDCs à l'aide de petits ARN interférents. Enfin, l'introduction de protéines recombinantes solubles d'ILT7 dans le système de co-culture semble prévenir l'effet inhibiteur de Vpu, suggérant que Vpu exploite l'interaction de BST2 avec ILT7 pour moduler la sécrétion d'IFN-1 des pDCs. En conclusion, nos résultats démontrent que Vpu exerce un contrôle sophistiqué de la production d'IFN-1 par les pDCs en réponse aux lymphocytes T CD4+ infectés par le VIH-1. Il semble ainsi que l'action de Vpu favorise, par un mécanisme encore méconnu, l'activation d'ILT7 à travers BST2. En effet, cette fonction de Vpu semble tout aussi dépendante de BST2 que de l'ILT7. En favorisant la relâche virale et en menant à l'inhibition de la réponse antivirale des pDCs, la régulation ciblée de BST2 par Vpu est non seulement cruciale à la dissémination du virus, mais aussi à sa réplication.

Mots clés : Virus, VIH-1, protéines accessoires, Vpu, facteur de restriction, BST2, ILT7, IFN-1, pDCs et TLR.

ABSTRACT

Viral protein U (Vpu) is an accessory protein of HIV-1 that efficiently targets BST2/Tetherin, a cellular restriction factor that acts as molecular anchor impeding the release of various enveloped viruses from the cell surface. The recently discovered natural receptor of BST2 is ILT7, a molecule exclusively expressed at the surface of the professional type 1 interferon (IFN-1) producing cells, plasmacytoid dendritic cells (pDCs). The interaction between BST2 and ILT7 has been reported to efficiently induce a repression of IFN-1 secretion by pDCs. Here, we investigated the impact of Vpu mediated antagonism of BST2, in regards to this newly described immune function of BST2. Using a system of CD4+ T cell lines infected with wild type or Vpu-deficient HIV-1 cultured with peripheral blood mononuclear cells or purified pDCs, we report that the presence of Vpu efficiently reduces IFN-1 production from sensing pDCs. Furthermore, we observed that this Vpu effect is dependent on the availability of BST2 molecules at the surface of the infected cells, since the Vpu's immunoregulation is abrogated when blocking any potential BST2 *trans* interaction with anti-BST2 antibodies. Similarly, depleting ILT7 from pDCs by means of small interfering RNA treatment equally negates the downregulation of pDC IFN-1 secretion by Vpu. Finally, the use of recombinant soluble ILT7 competes with pDC-bound ILT7 for the free BST2 and similarly results in high IFN-1 production, causing an identical phenotype. Overall, our results demonstrate that Vpu heightens ILT7 activation and subsequent repression of IFN-1 production by pDCs in response to HIV-1 infected CD4+ T cells by promoting its *trans* interaction with infected T cell bound BST2, through a yet uncharacterized mechanism. By allowing efficient particle release and restraining pDCs antiviral functions, Vpu exerts a double role on BST2 that seems crucial for the replication and dissemination of HIV-1.

Keywords : Virus, HIV-1, accessory proteins, Vpu, restriction factors, BST2, ILT7, IFN-1, pDCs and TLRs.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
ABRÉVIATIONS	vi
TABLE DES FIGURES	x
REMERCIEMENTS	xi
Chapitre 1: INTRODUCTION	1
1.1 SIDA et VIH-1.....	1
1.2 Facteurs viraux d'évasion immunitaire.....	9
1.3 Vpu: Biologie et fonctions.....	15
1.4 BST2, effecteur viral et fonctions immunitaires.....	19
1.5 Les pDCs dans l'immunité antivirale et l'infection au VIH-1.....	21
Chapitre 2: OBJECTIF GÉNÉRAL	30
Chapitre 3: RÉSULTATS	31
Chapitre 4: DISCUSSION	43
Chapitre 5: CONCLUSION	50
Contributions principales des travaux.....	52
Chapitre 6: MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	53
Chapitre 7: RENSEIGNEMENTS SUPPLÉMENTAIRES	59
Crédit d'auteur et diffusion.....	60
Chapitre 8: RÉFÉRENCES	61

ABRÉVIATIONS

ADCC	«Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity» Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide déoxyribonucléique
AP-1	Protéine adaptatrice-1
AP-2	Protéine adaptatrice-2
APOBEC3D	«Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3D », Polypeptide 3D d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm
APOBEC3F	«Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3F », Polypeptide 3F d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm
APOBEC3G	«Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G », Polypeptide 3G d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm
APOBEC3H	«Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3H », Polypeptide 3H d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Petit ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
BDCA2	«C-type lectin domain family 2, member C», Lectine de type C de la famille 2, membre C
BDCA-4	«C-type lectin domain family 4, member C», Lectine de type C de la famille 4, membre C
BST2	«Bone marrow stromal antigen-2», Antigène-2 de la moëlle épinière stromale
β-TrCP	«β-transducin repeat-containing protein» Protéine contenant des répétitions de la β-transducin
CA	Capside
CCR2	Récepteur de chimiokines CC de type 2
CCR3	Récepteur de chimiokines CC de type 3
CCR5	Récepteur de chimiokines CC de type 5
CCR8	Récepteur de chimiokines CC de type 8
CCR7	Récepteur de chimiokines CC de type 7
CCR9	Récepteur de chimiokines CC de type 9
CDC	Centres pour le contrôle et la prévention de maladies
CD1d	«Cluster of differentiation 1d», Cluster de différenciation 1d
CD4	«Cluster of differentiation 4» Cluster de différenciation 4
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type 1

CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type 2
CPI	Complexe de pré-intégration
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
CypA	Cyclophiline A
CXCR4	Récepteur de chimiokines CXC de type 4
DC	Cellule dendritique
4E-BP	«eIF4E Binding Proteins», Protéines se liant à eIF4E
ERAD	«ER-associated protein degradation» Dégradation de protéine associée au RE
ESCRT	«Endosomal sorting complex required for transport», Complexe de triage endosomal requis pour le transport
FcR	Récepteur de Fc
FcγR	Récepteur Fcγ
FDA	«Food and Drug Administration» Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
gp120	Glycoprotéine de 120 kDa
gp160	Glycoprotéine virale de 160 kDa
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAART	«Highly active antiretroviral therapy» Thérapie antirétrovirale très active
IFN	Interféron
IFN-1	Interférons de type 1
IFNAR	Récepteur de l'interféron alpha
IFNAR1	IFNAR de type 1
IFNAR2	IFNAR de type 2
Ig	Immunoglobulines
IL-27	Interleukine 27
IL-6	Interleukine 6
ILT7	«Immunoglobulin-like transcript-7» Transcrit 7 similaire aux immunoglobulines
IN	Intégrase
IRAK	«Interleukin-1 receptor-associated kinase», Kinase associées au récepteur de l'interleukine 1
IRF1	«Interferon regulating factor 1», facteur régulant l'interféron 1
IRF7	«Interferon regulating factor 7», facteur régulant l'interféron 7
IRF9	«Interferon regulating factor 9», Facteur régulant l'interféron 9
ISG	«Interferon stimulated gene», Gène stimulé par l'interféron
ISGF3	«Interferon stimulated gene factor 3» facteur génique stimulé par l'interféron-3
ISRE	«Interferon-sensitive response element» Élément de réponse aux interférons α et β
JAK1	« Janus kinase 1 », Kinase Janus 1
ONUSIDA	Programme commun des nations unies sur le VIH/SIDA
PCP	Pneumonies de type <i>Pneumocytis carinii</i>
HBV	Virus de l'hépatite B

HLA	Antigène de leucocyte humain
HRS	«Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase» Protéine tyrosine kinase régulée par le facteur de croissance des hépatocytes
HSH	Hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes
HSV-1	Virus herpès simplex de type 1
HTLV-1	Virus T-lymphotropique humain de type 1
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire de type 1
ITAM	« Immunoreceptor tyrosine-based activation motif », Motif d'activation d'immunorécepteur à base de tyrosine
LILR	«Leucocyte immunoglobulin-like receptors», Récepteurs leucocytaires similaire aux immunoglobulines
LTR	«Long terminal repeats» Longues répétitions terminales
NC	Nucléocapside
Nef	« Negative factor», Facteur négatif
NF-κB	« Nuclear factor kappa B », Facteur nucléaire kappa B
MAPK	«Mitogen-activated protein kinase»
ITIM	« Immunoreceptor ITIM tyrosine-based inhibitory motif », Motif d'inhibition d'immunorécepteur à base de tyrosine
mDC	«Myeloid dendritic cells», Cellules dendritiques myéloïdes
Myd88	«Myeloid differentiation primary response gene 88» Facteur de différenciation myéloïde-88
NK	«Natural killer cells» Cellules tueuses naturelles
NTB-A	Antigène des cellules NK,T et B
PAMP	«Pathogen-associated molecular patterns» Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PR	Protéase
Pr55^{Gag}	Précurseur de Gag de 55 kDa
Pr160^{Gag-Pol}	Précurseur de Gag-pol de 160 kDa
RE	Réticulum endoplasmique
RRE	«Rev Responsive Element» Élément de réponse à Rev
RING	«Really interesting new gene» Nouveau gène très intéressant
RTG	Réseau <i>trans</i> -golgi
SHP-1	« SH2-containing protein-tyrosine phosphatase-1 » Protéine tyrosine phosphatase 1 contenant un domaine SH2
SHP-2	« SH2-containing protein-tyrosine phosphatase-2 » Protéine tyrosine phosphatase 2 contenant un domaine SH2
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
STAT1	«Signal transducers and activators of transcription 1» Transducteurs de signal et activateurs transcriptionnels de type 1

STAT2	«Signal transducers and activators of transcription 2» Transducteurs de signal et activateurs transcriptionnels de type 2
STAT3	«Signal transducers and activators of transcription 3» Transducteurs de signal et activateurs transcriptionnels de type 3
Syk	Kinase tyrosine de la rate
Th1	«T helper type 1 cells», Lymphocytes T auxiliaires de type 1
Th2	«T helper type 2 cells», Lymphocytes T auxiliaires de type 2
TI	Transcriptase inverse
TLR7	«Toll-like receptor 7», Récepteur Toll-like 7
TLR9	«Toll-like receptor 7», Récepteur Toll-like 7
TNFα	«Tumor necrosis factor alpha», Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAF	«Tumor necrosis factor receptor-associated factor», Facteurs associés au facteur de nécrose tumorale
Tregs	«Regulatory T cell», Lymphocyte T régulateur
TRIM	«TRIPartite interaction motif» Motif d'interaction tripartite
TRIM5α	«TRIPartite interaction motif 5 alpha», Motif d'interaction tripartite 5 alpha
TSG101	«Tumour susceptibility gene 101 » Gène de susceptibilité aux tumeurs 101
TYK2	Tyrosine kinase 2
Vif	«Viral infectivity factor», Facteur viral d'infectivité
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VIS_{cpz}	Virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé
VIS_{gor}	Virus de l'immunodéficience simienne du gorille
VIS_{smm}	Virus de l'immunodéficience simienne du macaque mangabey
Vpu	«Viral protein U», Protéine virale U
Vpr	«Viral protein R», Protéine virale R
Vpx	«Viral protein X», Protéine virale X

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Schématisation du génome et de la structure virale du VIH-1	3
Figure 2 : Infection productive et prolifération du VIH-1	7
Figure 3 : Dégradation et altération du trafic cellulaire de BST2 par la protéine accessoire Vpu du VIH-1	18
Figure 4: Présentation du système de co-culture	31
Figure 5: Vpu régule à la baisse la production d'IFN-1 des pDCs lors de la détection de cellules MT4 infectées par le VIH-1	33
Figure 6: Le blocage de surface de BST2 par des anticorps polyclonaux annule l'effet immunorégulateur de Vpu	35
Figure 7: La déplétion d'ILT7 des pDCs annule l'effet immunorégulateur de Vpu	37
Figure 8: Caractérisation de la protéine recombinante sILT7	39
Figure 9: L'ajout des protéines sILT7 aux co-cultures atténue l'effet immunorégulateur de Vpu	41
Figure 10: Modèle d'action double de Vpu	46
Figure S1: Analyse protéomique de la protéine recombinante sILT7	58

REMERCIEMENTS

Après deux stages de recherche et une maîtrise, mon passage au laboratoire en rétrovirologie humaine se conclut. Les forts moments que j'y ai vécus et la richesse des esprits que j'y ai côtoyés auront progressivement transformé ma manière de penser et d'agir. En outre, cette expérience et les acquis qui en découlent constitueront la base de mon développement professionnel. J'aimerais brièvement consacrer les prochaines lignes aux individus qui ont contribué à ma réussite.

Tout d'abord, merci à mon directeur de recherche, le Dr Éric Cohen, pour m'avoir offert cette opportunité unique de travail et d'apprentissage. Sa direction et son soutien indéfectible m'auront guidé tout au long de mon projet. Merci également aux institutions et aux organismes qui ont financé mon projet de recherche, soit le département de microbiologie, infectiologie et immunologie de la Faculté de médecine de l'université de Montréal, les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) ainsi que la Fondation Gabriel-Marquis.

Un grand merci tout particulier à Mariana Bego. Au laboratoire, Mariana m'a guidé dès mes débuts et jusqu'à mes toutes dernières expériences. Nous avons travaillé coude-à-coude pendant plus deux ans, partageant succès et échecs, et je lui serai toujours reconnaissant pour sa patience, son professionnalisme et son amitié. Merci à Jonathan Richard pour sa camaraderie et son soutien moral, travailler à ses côtés s'est toujours révélé rassurant et encourageant! Merci à Bizhan Romani d'avoir été si généreux de son temps et de son expertise technique. Merci également à Robert Lodge pour sa passion de la théorie et son attention du détail, ainsi qu'à Sabelo Lukhele pour sa bonne humeur contagieuse, à Tram Pham pour son exemplaire dévouement scientifique, à Scott Sugden pour les nombreuses discussions politiques et à Cynthia Torresilla, ma Française préférée! Je tiens également à remercier Johanne Mercier et Fadi Hajjar pour leur expertise technique, mais aussi pour leur prodigieuse capacité à organiser et gérer notre environnement de travail. Merci à Cynthia Torresilla et à Mariana Bego pour leurs commentaires et suggestions pertinentes lors de la rédaction de ce mémoire, et à ceux et

celles que j'ai eut la chance de rencontrer au laboratoire au fil des dernières années et qui ont individuellement marqué mon parcours à leur façon, comme Mathieu Dubé et Catherine Paquay.

Merci à mes parents de m'avoir non seulement encouragé dans mes choix, mais de m'avoir poussé à les concrétiser. Un merci tout spécial à mes deux grands amis, Frédéric et Antoine, ainsi qu'à l'ensemble de la famille L-L pour m'avoir accueilli et compté comme l'un des vôtres.

Enfin, merci à Sabrina. Les mémoires du temps passé ensemble et la perspective d'un avenir partagé me combent du meilleur des espoirs.

Chapitre 1: INTRODUCTION

1.1 SIDA et VIH-1

Découverte du SIDA

En 1981, une nouvelle réalité clinique fait apparition sous l'appellation de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Diverses autorités médicales font alors état d'un nombre anormalement accru de cas de pneumonies à *Pneumocystis* (PCP) chez des groupes de populations relativement jeunes et normalement en santé. Dans un rapport publié le 5 juin 1981 dans le journal «*Morbidity and Mortality Weekly Report*» des Centres pour le contrôle et la prévention de maladies, le médecin généraliste Joel Weisman et l'immunologiste Michael S. Gottlieb décrivent les cas de 5 patients de Los Angeles, des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes atteints de PCP et de symptômes apparentés à des troubles immunitaires, incluant des pertes de poids importantes, des noeuds lymphatiques enflés, de la fièvre et des éruptions cutanées¹. La publication de ces observations constitue la première description du SIDA dans la littérature médicale, à partir de laquelle une série d'études émergeront de sorte à identifier progressivement d'autres groupes à risque tels que les utilisateurs de drogues injectables, les récipiendaires de transfusions sanguines, les prisonniers, les femmes ayant des contacts sexuels avec les hommes infectés et les enfants. En addition à ces groupes à risque seront aussi décrites diverses infections opportunistes récurrentes chez les patients, comme les infections mycobactériennes, la toxoplasmose, des infections fongiques ainsi que certains cancers tels que les sarcomes de Kaposi et les lymphomes non hodgkiniens². Ces observations contribueront à dresser un portrait clinique de plus en plus défini du SIDA.

Agent étiologique et incidence

Suite à l'émission de diverses théories quant à l'origine du syndrome, l'identité de l'agent causal fut enfin révélée avec l'isolement d'un nouveau rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), à partir d'un patient infecté³. Aujourd'hui, on sait

que cet agent se présente en deux variantes majeures, le VIH-1 et le VIH-2, provenant de virus simiens différents ayant franchi la barrière d'espèce jusqu'à l'humain. Les groupes prédominants du VIH-1 proviendraient ainsi du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) du chimpanzé (VIS_{cpz}) et le VIH-2 du VIS de Mangabey enfumé (VIS_{smm})⁴. Le VIH pandémique, le VIH-1 du groupe M, cause présentement les plus hauts taux de morbidité et de mortalité, frappant durement les pays en voie de développement avec en tête l'Afrique sub-saharienne⁵. Dans son communiqué officiel de 2013, le programme commun des Nations unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) rapportait plus de 35,3 millions d'individus infectés avec, en 2012, près de 2,3 millions nouvelles infections et un total de 1,6 million de décès ⁶.

Classification et tropisme du VIH-1

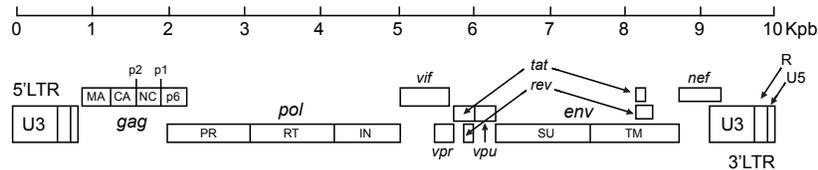
Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des *Retroviridae*, virus dont l'infection comporte typiquement de longs temps d'incubation ou de latence, avant de provoquer des manifestations cliniques chroniques issues d'une réplication virale persistante⁷. Le VIH-1 cible préférentiellement les cellules hématopoïétiques exprimant le récepteur de surface CD4 («Cluster de différenciation 4») ainsi que l'un des deux récepteurs de chimiokines CXC de type 4 (CXCR4) et CC de type 5 (CCR5), qui agissent à titre de corécepteurs. Ainsi, les lymphocytes T CD4+ naïfs, activés ou mémoires, les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les cellules microgliales du cerveau sont tous susceptibles d'être infectés par le virus en raison de leur expression du récepteur CD4 et d'au moins l'un des deux corécepteurs du VIH-1⁸.

Structure du VIH-1

Structurellement, le VIH-1 est un virus enveloppé d'un diamètre de 100-120 nm⁹. Les VIH-1 et VIH-2 se distinguent physiquement des autres rétrovirus de par leur capsid de forme conique. Le VIH-1 expose 72 péplomères, dont la face externe est composée de trimères de la glycoprotéine de 120 kDa (gp120) virale, elle-même liée de façon non covalente à une protéine virale transmembranaire, la protéine de 41 kilodaltons (kDa) (gp41) virale¹⁰. L'enveloppe virale est également parsemée de

protéines de l'hôte, comme des antigènes de leucocytes humains (HLA) de classe I et II ou encore de protéines d'adhésion telle que la «Intercellular Adhesion Molecule 1» (ICAM-1), qui pourraient faciliter l'adhésion aux cellules ciblées par le virus¹¹. La protéine de matrice p17 ou matrice (MA) se trouve quant à elle ancrée à la face intérieure de la membrane lipoprotéique virale. Sous cette dernière se trouve la capside (CA), renfermant deux copies du génome viral, en complexe avec les protéines de la nucléocapside (NC). Non associées à l'acide ribonucléique (ARN) viral se trouvent la transcriptase inverse (TI), l'intégrase (IN), la protéase (PR) ainsi que les protéines accessoires Nef, Vpr et Vif (Fig.1).

A



B

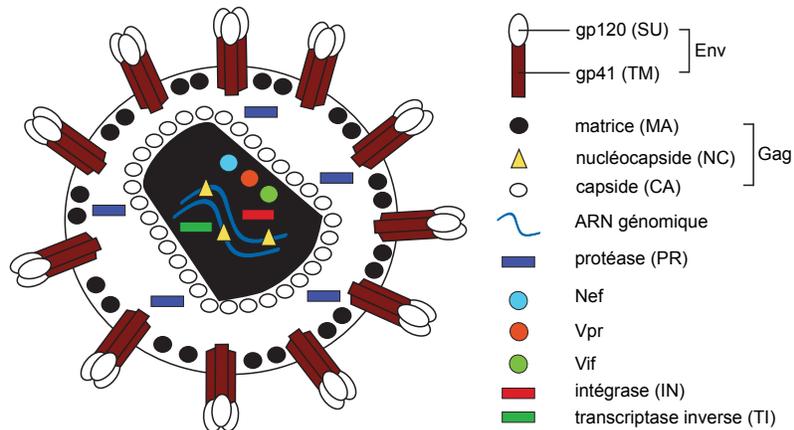


Figure 1: Schématisation du génome et de la structure du VIH-1 (A) Organisation génomique du VIH-1. (B) Organisation structurale du VIH-1.

Génétiquement, le VIH-1 ne partage que 40% d'homologie de séquence nucléotidique avec le VIH-2 et contient le gène *vpu* au lieu de *vpx*¹². Le génome viral s'étend sur près de 10 kilopaires de bases (Kpb) d'ARN monocaténaire de polarité positive. Celui-ci est flanqué à ses extrémités 5' et 3' de régions non codantes nommées

longues répétitions terminales («Long Terminal Repeats, LTR»), homologues après l'étape de transcription inverse. Le génome du VIH comporte 9 cadres de lecture ouverts, dont 3 sont communs à l'ensemble de la famille des rétrovirus. Il s'agit des gènes *gag*, *pol* et *env*, qui donnent naissance aux précurseurs de gag 55 (Pr55^{Gag}) et 160 (Pr160^{Gag-Pol}) ainsi qu'à la glycoprotéine de 160 kDa (gp160). Ceux-ci sont respectivement clivés en 4, 3 et 2 protéines. En effet, le Pr55^{Gag} est clivé par la PR et donne les protéines de matrice (MA), de capsid (CA), de la nucléocapsid (NC) et la protéine tardive p6. Le précurseur Pr160^{Gag-Pol} issu d'un changement de cadre de lecture entre Gag et Pol est également clivé par la PR et fournit les 3 protéines virales à activité enzymatique, soit la TI, l'IN et la PR. Quant à lui, le précurseur gp160 est clivé par la furine cellulaire et fournit les glycoprotéines de l'enveloppe, soit la gp120 ainsi que la gp41¹³. Le VIH-1 emploie les protéines Tat et Rev afin de réguler la transcription et l'exportation nucléaire des transcrits viraux. Essentiels à la réplication virale uniquement *in vivo*, les produits des gènes *vif*, *vpr*, *nef* et *vpu* sont qualifiés de protéines accessoires. Des études associent régulièrement de nouvelles fonctions à ces protéines, dont le rôle général est de modifier l'environnement intracellulaire et extracellulaire de l'hôte pour assurer la persistance, la dissémination et la réplication du virus¹⁴.

Infection productive et prolifération

L'infection d'une cellule cible avoisinante par une cellule T CD4+ productivement infectée peut être décrite en 10 étapes, en partant de la transcription du génome viral intégré¹⁵. À l'étape 1, la présence de séquences promotrices situées dans le LTR en 5' permet la transcription des transcrits viraux, qui n'ont initialement aucune capacité codante en raison de la faible processivité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II¹⁶. L'accumulation nucléaire de Tat cause son interaction croissante avec l'élément TAR (Élément sensible à la transactivation) et le recrutement subséquent du complexe P-TEFb («Positive Transcription Elongation Factor B»). Ce complexe permet la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II dont la processivité accrue permet dès lors la production de transcrits pleine longueur¹⁷. L'expression des gènes précoces et tardifs est ensuite contrôlée par Rev. Cette dernière médie ainsi d'une

part, l'export de transcrits non épissés tels que Gag, Pol et celui de l'ARN génomique, et d'autre part celui de transcrits monoépissés tels que Env, Vif, Vpu et Vpr en interagissant avec une structure secondaire particulière retrouvée uniquement sur ces transcrits, soit l'élément de réponse à Rev («Rev Responsive Element, RRE») (étape 2, Fig.2). Au cours de l'étape 3, les transcrits tardifs sont traduits et convergent aux sites d'assemblage. Alors que les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont transportés à la membrane plasmique, Env transite quant à lui par le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi avant de se rendre à la surface cellulaire. L'assemblage (étape 4, Fig.2) puis la relâche (étape 5, Fig.2) des particules virales ont alors lieu. Au moment où la particule émerge et bourgeonne de la surface cellulaire, un dernier processus de maturation s'enclenche. Il s'agit du clivage PR-dépendant des précurseurs Gag et Gag-Pol. L'agent infectieux libre peut désormais infecter les cellules avoisinantes. À l'étape 6, l'interaction entre la gp120 avec le récepteur cellulaire CD4 provoque un changement de conformation qui expose les sites d'interaction des corécepteurs du VIH-1, soit les récepteurs de chimiokines CXCR4 ou CCR5¹⁸. Il est intéressant de noter qu'une panoplie d'autres corécepteurs comme les récepteurs de chimiokines de type CC-2 (CCR2), -3 (CCR3), -8 (CCR8), -9 (CCR9) ainsi que diverses autres molécules ont démontré une capacité à jouer un tel rôle dans l'entrée de certains isolats du VIH-1 *in vitro*^{19,20}. Dans ce processus, c'est la boucle V3 de gp120 qui détermine l'affinité pour l'un des deux corécepteurs et qui serait ainsi impliquée dans le tropisme des particules virales. Les particules virales sont ainsi soit de souche R5 (tropisme pour CCR5), infectant typiquement les macrophages et les lymphocytes T CD4+ activés ou soit de souche X4 (tropisme pour CXCR4), infectant préférentiellement les lymphocytes T CD4+ exprimant le récepteur CXCR4²¹. Ceci étant dit, certaines souches exhibent un double tropisme et portent ainsi l'appellation R5X4²². Indépendamment du tropisme, l'interaction avec le corécepteur provoque un changement de conformation de la gp41, qui adopte une structure thermostable à six hélices responsable du rapprochement et de la fusion des membranes virales et cellulaires, processus qui génère un pore d'entrée au cytoplasme de la cellule ciblée^{23,24}. Alternativement, le virion peut faire son entrée dans des compartiments intracellulaires par endocytose récepteur-dépendante ou encore par fusion dynamine-dépendante²⁵.

Suite à l'étape 6 d'attache et de fusion, l'étape de décapsidation (étape 7), s'amorce au sein du cytoplasme de la cellule cible. Dans le cytoplasme, la capsid subit alors l'action de diverses protéases cellulaires et libère son contenu composé d'ARN viral associé à la NC, Vpr, l'IN et une portion de la MA²⁶. Le processus de transcription inverse (étape 8, Fig.2) s'amorce et requiert la formation d'un complexe comprenant l'ARN viral, l'ARN de transfert (ARNt) 3 Lys ainsi que la TI²⁷. Tout juste synthétisé, l'ADN viral bicaténaire ainsi qu'un produit incomplet de la transcription inverse dit ADN «flap» s'associent à ces protéines pour former le complexe de préintégration viral (CPI)²⁸. À l'étape 9, le CPI est responsable de l'habileté unique des Lentivirus à pouvoir pénétrer au travers des pores nucléaires de cellules en arrêt de division et permet l'import nucléaire du complexe viral. Une fois au noyau, l'IN catalyse l'intégration du génome viral à un chromosome de l'hôte. Ceci marque l'étape 10, permettant au génome viral intégré de se servir de la machinerie transcriptionnelle cellulaire pour exprimer ses propres gènes et se répliquer¹⁴ (étape 10, Fig.2).

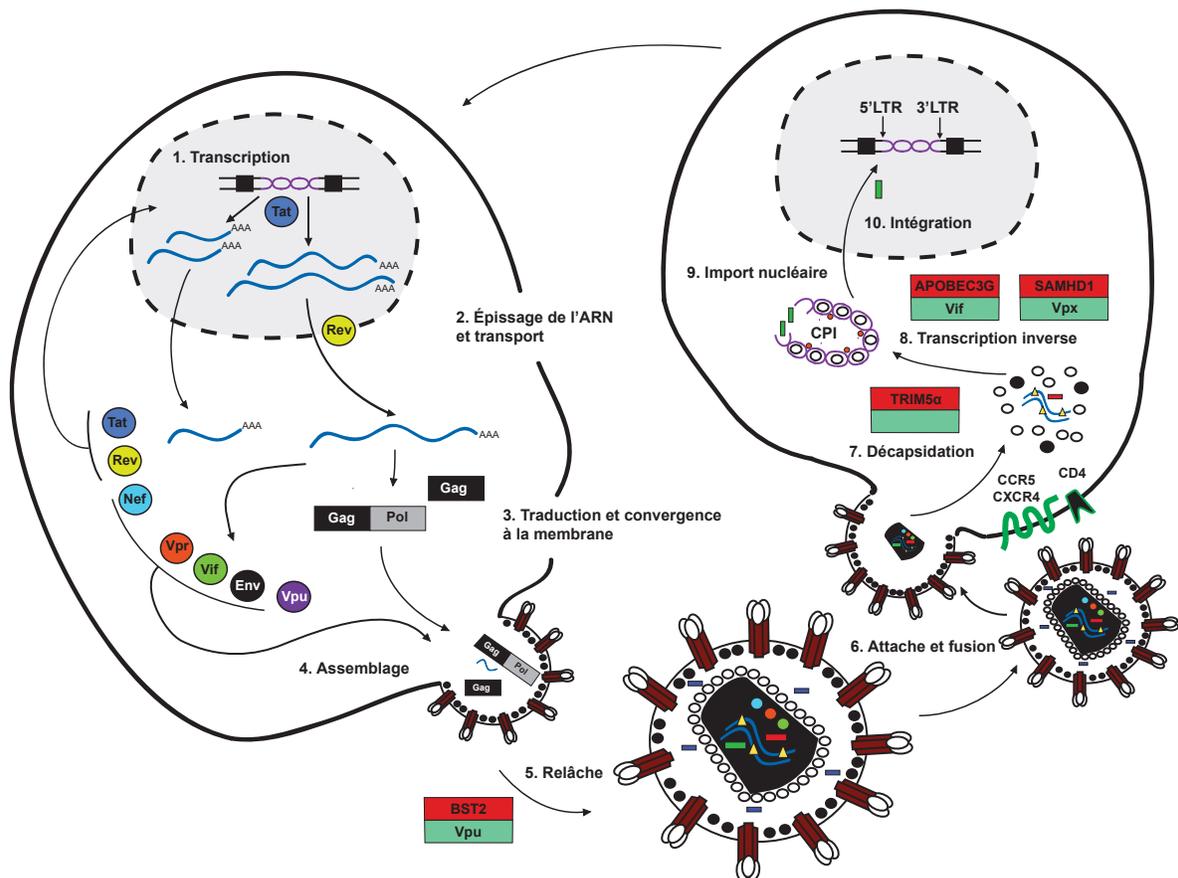


Figure 2: Infection productive et prolifération du VIH-1. Schéma illustrant l'infection d'une cellule cible avoisinante par une cellule productivement infectée, en 10 étapes: 1) La transcription 2) L'épissage de l'ARN et transport 3) Traduction et convergence à la membrane 4) Assemblage 5) Relâche 6) Attache et fusion 7) Décapsulation 8) Transcription inverse 9) Import nucléaire 10) Intégration. Les étapes affectées par un facteur de restriction de l'hôte sont accompagnées d'un encadré où en rouge est indiqué le facteur de restriction impliqué et en vert le facteur viral l'antagonisant, lorsque applicable.

Profil clinique de l'infection

Le cours naturel de l'infection, en l'absence de thérapie antirétrovirale hautement active («Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART»), suit 3 phases majeures: aiguë, chronique et SIDA. La phase aiguë est caractérisée par une forte dissémination virale en raison de l'absence de réponse immunitaire anti-VIH spécifique efficace²⁹. Dans cette phase, la virémie atteint son apogée entre la troisième et la quatrième semaine suivant l'infection primaire³⁰. Ainsi, après avoir franchi la barrière muco-sale, le virus se réplique

faiblement à l'aide de cellules T CD4+ partiellement activées de la lamina propria. La dissémination de ces particules virales permettra au virus d'atteindre divers tissus lymphoïdes, dont le tissu lymphoïde associé à l'intestin. Une forte concentration de cellules T CD4+ activées permettra au virus de s'y répliquer agressivement. La vaste majorité de ces cellules activées mourront en raison des effets cytopathiques induits par le VIH ou de la réponse immunitaire de l'hôte, d'où la déplétion qui y est observée³¹⁻³³. Ceci dit, une fraction des cellules cibles reviennent à un état de repos ou de latence, contribuant à la création d'un réservoir viral. Durant la phase chronique, la réponse T CD8+ VIH-spécifique soutenue est un important contributeur de la stabilité de la charge virale plasmatique³⁴. L'activation immunitaire soutenue en raison de la persistance virale mène toutefois à un lent déclin du nombre de lymphocytes T CD4+ qui s'échelonne sur plusieurs années³⁵. Durant la phase SIDA, l'hôte a atteint un niveau de déplétion qui se traduit par une vulnérabilité croissante à divers pathogènes opportunistes, causant éventuellement son décès³⁶.

Limitations thérapeutiques du HAART

Chacune des étapes du cycle de réplication viral représente des opportunités d'intervention thérapeutiques. Ceci dit, avant 1990, peu d'options de traitement s'offrent encore aux patients, et consistent essentiellement en des traitements prophylactiques visant les pathogènes opportunistes ou gérant les maladies associées au SIDA. Les premiers traitements antirétroviraux approuvés, divers inhibiteurs de la transcriptase inverse, furent d'abord utilisés en monothérapie. Le traitement évolue ensuite vers la thérapie double au début des années 1990 pour évoluer vers le traitement combinatoire triple, à partir de 1996 et suite à l'émergence de nouvelles classes d'agents antirétroviraux comme les inhibiteurs de protéases. Les agents antirétroviraux sont présentement regroupés en 6 classes distinctes basées sur leur nature et mécanisme d'action: les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI), les inhibiteurs de l'IN, les inhibiteurs de fusion, les antagonistes des corécepteurs, les inhibiteurs de la PR³⁷. Aujourd'hui, la thérapie antirétrovirale active diminue dramatiquement la réplication du virus de sorte à réduire

la charge virale plasmatique à des niveaux pratiquement indétectables (<50 copies d'ARN/mL). Le traitement provoque également une reconstitution significative du système immunitaire tel que mesuré par le nombre et la fonction de lymphocytes T CD4+ circulants^{38,39}.

Les approches de criblage à haut débit de candidats thérapeutiques potentiels dans des systèmes de réplication spécifiques au VIH, l'optimisation d'inhibiteurs existants ou encore le *design* rationnel de nouveaux agents antiviraux à partir des analyses de structure à haute résolution de protéines virales continuent de permettre l'élaboration de nouveaux traitements visant à freiner la réplication virale. Ceci dit, bien qu'il soit reconnu que le HAART ait grandement réduit l'émergence de variantes virales résistantes aux traitements, ainsi que la morbidité et la mortalité chez les patients infectés par le VIH⁴⁰, il demeure que les patients doivent adhérer à ce traitement dispendieux à vie, sans espoir de guérison. De plus, la thérapie antirétrovirale combinatoire pourrait contribuer au vieillissement prématuré observé chez les patients traités atteints du VIH-1, ainsi qu'aux comorbidités qui y sont associées^{41,42}. De ce fait, il est admis que le défi actuel de la lutte au VIH consiste au développement conjoint d'agents préventifs et de stratégies ou d'agents curatifs. Il en résulte que depuis quelques années, une fraction importante de l'effort de recherche est désormais consacrée à l'élimination des réservoirs viraux chez les patients sous HAART et à la compréhension des mécanismes de pathogenèse et de persistance virale^{43,44}.

1.2 Facteurs viraux d'évasion immunitaire

Le VIH-1 persiste malgré le HAART pour deux raisons majeures. D'une part, le rétrovirus a la capacité de générer des réservoirs viraux rapidement après l'infection primaire et de manière irréversible, tel que démontré par l'incapacité du HAART à détruire ces-derniers⁴⁵. Le réservoir cellulaire du VIH-1 le mieux décrit consiste en les cellules T CD4+ mémoires au repos contenant des copies de génome viral compétentes pour la réplication et transcriptionnellement inactives^{46,47}. Avec une demi-vie pouvant

atteindre 4 ans⁴⁸, ces cellules sont retrouvées dans le sang périphérique, dans le tractus gastro-intestinal et dans les ganglions lymphatiques des patients infectés. Alternativement, d'autres types cellulaires ont été suggérés à titre de réservoirs viraux potentiels et incluent les macrophages, les cellules dendritiques folliculaires, les cellules gliales, les cellules endothéliales ainsi que les mastocytes⁴⁹⁻⁵². Alternativement, le VIH-1 persisterait en atteignant des sanctuaires de réplication. En effet, dans certaines régions comme le système nerveux central et certaines régions de l'appareil urogénital, les concentrations de drogues antirétrovirales peuvent se retrouver en concentrations suboptimales et donner lieu à de la réplication virale à bas bruit, une source de souches résistantes aux drogues et potentiellement réinjectées dans la circulation systémique⁵³. Bref, le virus se sert ici de deux de ses caractéristiques géniques, soit sa capacité à intégrer le génome de cellules de l'hôte ainsi qu'à générer une diversité clonale à partir de sa transcriptase inverse à basse fidélité pour persister en présence de HAART⁵⁴.

Pour persister, le VIH-1 s'adapte non seulement aux traitements antirétroviraux combinatoires, mais également aux diverses composantes de la réponse immunitaire intrinsèque, innée et adaptative de l'hôte. À cet effet, le VIH-1 dispose de 4 gènes (*vif*, *nef*, *vpu* et *vpr*) qui lui permettent de façonner l'environnement cellulaire rendu autrement trop hostile par les différents acteurs de l'immunité¹⁴.

Vif et APOBEC3G

La protéine accessoire Vif (Facteur viral d'infectivité) est une protéine cytoplasmique de 23 kDa exprimée durant la phase tardive du cycle répliatif viral⁵⁵ et faiblement incorporée dans les particules virales⁵⁶. Vif est dispensable à la réplication du virus dans certaines lignées de cellules T, mais indispensable dans d'autres^{57,58}. La fusion de cellules permissives et non permissives a révélé que cette restriction était due à l'expression d'un facteur cellulaire pourvu d'une activité antivirale. Ce type de protéines cellulaires, appelées facteurs de restriction, constituent des barrières physiques ou fonctionnelles de l'hôte interférant avec diverses étapes du cycle de réplication viral et sont les composantes de l'immunité intrinsèque, une forme d'immunité innée⁵⁹ dont les

composantes sont parfois exprimés constitutivement chez certains types cellulaires, mais plus souvent induits par l'interféron de type 1 (IFN-1)⁶⁰. Les composantes de ce type d'immunité sont souvent neutralisées très spécifiquement par certaines protéines virales. Le facteur contrecarré par Vif fût reconnu comme étant le facteur de restriction APOBEC3G («Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic Polypeptide-Like 3G»)⁶¹. Incorporée dans les virions nouvellement produits grâce à son interaction avec les protéines Gag et de l'ARN viral ou cellulaire⁶², APOBEC3G catalyse la désamination de résidus cytidines en uridines au niveau de l'ADN proviral simple brin généré lors de la transcription inverse, d'où son rôle hypermutagénique⁶³. APOBEC3G a également démontré une activité restrictive au niveau des virus de l'hépatite B (HBV) et du virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1)^{64,65}. Il fut observé que des échantillons cliniques provenant de patients infectés par le VIH-1 présentent d'ailleurs fréquemment ce type d'altérations⁶⁶. Des études récentes ont également démontré une activité anti-VIH-1 similaire pour d'autres membres de la famille APOBEC3 également sensibles à l'action de Vif, notamment APOBEC3D, APOBEC3F et APOBEC3H⁶⁷. Pour provoquer la dégradation des APOBEC3 et prévenir leur incorporation dans les particules virales nouvellement produites, Vif recrute le complexe d'ubiquitine E3 ligase «Cullin 5 RING» afin de polyubiquitiner ce facteur de restriction et le diriger vers le protéasome⁶⁸.

Vpr, protéine aux rôles pléiotropiques

La protéine virale R (Vpr) est une protéine de 14 kDa composée de 96 acides aminés. L'importance de Vpr a été initialement démontrée par la forte réduction de la virémie et l'absence de pathogenèse lors de l'infection de macaques rhésus avec un virus SIV_{mac} n'exprimant pas Vpr⁶⁹. *In vitro*, la présence de Vpr est cruciale à la réplication du VIH-1 dans les macrophages, un type cellulaire pouvant agir comme réservoir viral en raison de sa capacité à abriter le virus pour de longues périodes⁷⁰. Bien qu'exprimée tardivement, Vpr est incorporée dans les virions⁷¹ et est donc présente dans le cytoplasme cellulaire dès l'entrée virale. Malgré sa taille réduite, Vpr est une protéine aux rôles multiples affectant la réplication et l'évasion immunitaire du virus. Ainsi, dès l'entrée, Vpr pourrait, non sans controverse, influencer positivement la fidélité de la

transcription inverse du VIH-1 et l'infectivité du virus à travers son interaction avec l'uracile glycosylase UNG2 («uracil-N-glycosylase 2»), une enzyme de réparation de l'ADN cellulaire retirant les uraciles de l'ADN cellulaire⁷². Vpr serait également impliquée au niveau de l'import nucléaire du CIP⁷³, de la régulation de l'apoptose, de la transactivation du LTR du VIH-1 et de plusieurs gènes cellulaires⁷⁴ ainsi que de l'arrêt de cycle en G2⁷⁵. À ce titre, il a été récemment démontré que Vpr cause l'activation prématurée d'endonucléases associées au complexe SLX4, entraînant la dégradation d'intermédiaires d'ADN viraux et le traitement anormal des fourches de réplication cellulaires⁷⁶. Vpr entraîne ainsi la dégradation d'intermédiaires viraux susceptibles d'induire l'immunité innée tout en causant l'instabilité génomique cellulaire menant ultimement à l'arrêt de cycle en G2⁷⁷. Par ailleurs, de nombreux groupes ont démontré l'implication de Vpr au sein de la régulation de divers processus immunitaires clés. En effet, il semble que Vpr peut affecter la fonction immunitaire des lymphocytes T CD8+ de sorte à réduire considérablement l'efficacité de vaccination *in vivo*⁷⁸. Vpr pourrait également affecter la sécrétion de diverses cytokines tel que démontré par sa régulation négative de la production de IL-12 ou positivement celle de IL-6^{79,80}. De plus, Vpr semble interférer avec le processus de présentation antigénique en modulant la présence de molécules costimulatrices comme CD40, CD80, CD83, CD86, CD28 et CTLA-4 au niveau des cellules T tout en réduisant le niveau d'activation et de maturation des macrophages et des DCs⁸¹⁻⁸³. Enfin, les formes sécrétées et virion-incorporées de Vpr auraient la capacité d'induire l'apoptose de cellules T infectées et non infectées, réduisant de ce fait la réponse immunitaire⁸⁴.

Nef

Le facteur négatif (Nef) est une protéine de 27 kDa exprimée tôt durant le cycle de réplication viral. Deux formes de Nef ont été décrites, soit une forme membranaire myristoylée ainsi qu'une forme cytoplasmique non-myristoylée⁸⁵. Le gène Nef est hautement conservé au niveau de tous les lentivirus de primates comprenant les VIH-1, VIH-2 et VIS. Nef semble être un facteur de virulence crucial au virus, car une progression plus lente au SIDA fût observée chez les humains et singes infectés avec un

virus Δ Nef. Faiblement incorporée au niveau des virions⁸⁶, Nef est également retrouvée sous forme soluble sécrétée retrouvée au niveau du sérum d'individus infectés^{87,88}. Protéine virale aux rôles multiples, Nef a la capacité d'interférer avec plusieurs voies de signalisation cellulaires et de moduler l'expression de surface de plusieurs protéines membranaires pour promouvoir la réplication virale et l'évasion immunitaire du VIH-1⁸⁹.

Ainsi, Nef affecte la réponse des lymphocytes T cytotoxique (CTLs), réponse de l'immunité cellulaire déclenchée par la présentation d'antigènes étrangers en association avec le complexe d'histocompatibilité majeur de classe 1 (CMH-1). Tout comme les cellules cancéreuses, les cellules T productivement infectées par le VIH-1 sont susceptibles à ce type d'immunité et il semblerait que le VIH-1 consacrerait au moins l'une de ses protéines accessoires, soit Nef, à l'évasion de cette réponse. En effet, Nef promeut la survie de la cellule infectée en présence de CTLs en induisant la relocalisation, puis la dégradation du CMH-1^{90,91}. Pour ce faire, Nef stabilise l'interaction entre le CMH-1 et la «Clathrin-associated adaptor protein 1» (AP-1). La stabilisation de cette interaction accélère la dégradation du CMH-1 à travers la voie endolysosomale⁹². Ceci dit, Nef n'expose pas la cellule infectée, dépourvue de CMH-1, à l'action cytotoxique des cellules NK («Natural Killer»). En effet, les cellules NK ont la propriété de lyser les cellules n'exprimant peu ou aucun CMH-1. Pour ce faire, Nef entraîne l'internalisation sélective de certains antigènes HLA, tels que HLA-A et HLA-B, reconnus comme importants pour la fonction des CTLs, et non pas celle des HLA-C et HLA-E qui agissent quant à eux comme des récepteurs inhibiteurs de la fonction antivirale des NK⁹³. Cette spécificité de Nef permet ainsi à la cellule infectée d'échapper simultanément à l'action des CTLs et des cellules NK.

Nef peut également affecter le développement de l'immunité spécifique de par son action sur les cellules T CD4+ activées, les DC ainsi que les macrophages, exprimant tous le complexe d'histocompatibilité majeur de classe 2 (CMH-II). Par exemple, il fût rapporté que les cellules monocytaires infectées chroniquement par le VIH-1 *in vitro* présentaient des défauts d'expression du CMH-II et de chargement de l'antigène⁹⁴.

Compte tenu de l'importance du processus de présentation antigénique à partir de ce complexe dans l'émergence de l'immunité à médiation humorale, Nef provoque une réduction du CMH-II mature de surface, tout en causant une augmentation de molécules de CMH-II immatures, donc non chargées, en surface⁹⁵.

Cas de CD4: Action combinée de Nef et Vpu

Nef a la propriété d'interagir avec d'autres membres proches d'AP-1, comme la «Clathrin-associated adaptor protein 2» (AP-2) et -3 (AP-3) à travers un motif dileucine situé dans son domaine C-terminal⁹⁶. C'est cette propriété, combinée avec sa capacité à interagir avec les queues cytoplasmiques de plusieurs protéines membranaires qui expliquent comment Nef peut accélérer l'internalisation de diverses protéines de l'hôte, comme CXCR4⁹⁷, CCR5⁹⁸ et CD4⁹⁹. En causant la dégradation des molécules de CD4 qui sont à la surface des cellules infectées, Nef promeut la dissémination virale en empêchant la surinfection des cellules infectées et en potentialisant l'infectivité virale¹⁰⁰.

De manière intéressante, une autre protéine virale promeut une même fonction à travers son antagonisme de CD4, soit la protéine virale U (Vpu). Exprimée tardivement, Vpu interagit quant à elle plutôt avec les molécules de CD4 nouvellement synthétisées présentes dans le réticulum endoplasmique (RE) et recrute un complexe ubiquitine ligase pour médier la polyubiquitination de résidus présents dans la queue cytoplasmique de ce dernier. Vpu induit ainsi la dégradation protéasomale de CD4 à l'aide de la machinerie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD)^{101,102}. Il a d'ailleurs été récemment décrit que la coopération fonctionnelle de Nef et Vpu à cette fin aurait des implications au niveau de la réponse de type cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) envers les cellules infectées par le VIH-1. Les cellules NK et les monocytes/macrophages¹⁰³ présentent une telle activité lorsque leur récepteur Fcγ (FcγR) se lie à la portion Fc d'un anticorps dont le Fab est lié à un antigène exprimé à la surface d'une cellule cible. Cette interaction entre la cellule effectrice et la cellule cible via des anticorps cause la relâche de granules cytolytiques par la cellule effectrice et mène à la lyse subséquente de la cellule cible. Au niveau de la cellule infectée, l'interaction

cellulaire entre Env et CD4 exposerait des épitopes normalement masqués dans le trimère d'ENV, condition qui favoriserait une réponse de type ADCC. En dégradant CD4, Nef et Vpu réduisent la susceptibilité de la cellule infectée à la réponse immunitaire de type ADCC, bien que ce phénomène reste à être évalué *in vivo*¹⁰⁴.

1.3 Vpu: Biologie et fonctions

Le gène *vpu*

Alors qu'on désignait l'ensemble des cadres de lectures ouverts alphabétiquement, on découvrit celui de Vpu, référé à la lettre «U». Le gène *vpu* est encodé au niveau de certains VIS, comme le précurseur du VIH-1, soit le VIS_{cpz}, ainsi que le VIS de gorille (VIS_{gor})¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Ainsi, à l'instar du VIH-1 et de ces quelques VIS, le VIH-2 n'encode pas ce gène¹⁰⁹. Vpu est traduit à partir d'un ARNm bicistronique donnant simultanément lieu à la traduction de l'enveloppe virale, suggérant une relation fonctionnelle ancestrale entre ces deux gènes¹¹⁰.

La protéine Vpu

La protéine Vpu du VIH-1 est une protéine membranaire de type 1 de 16 kDa, composée de 77-86 acides aminés. La protéine est retrouvée dans plusieurs compartiments membranaires incluant le RE, le réseau *trans*-golgien (RTG) ainsi que divers endosomes impliqués dans l'endocytose de protéines de surface¹¹¹⁻¹¹³. Au niveau du clone moléculaire viral prototypique NL4-3 du VIH-1, qui appartient au clade B du groupe M, Vpu comprend 81 acides aminés dont 4-5 sont exposés luminalement, 23 sont incorporés dans la bicouche lipidique et le reste est localisé au cytoplasme. La multimérisation de la protéine en homooligomères permet au domaine transmembranaire de former un canal ionique¹¹⁴. Ceci dit, l'importance et la signification de cette activité dans l'ensemble des fonctions qu'exerce Vpu demeure controversée¹¹⁵. Le domaine cytoplasmique de la protéine contient une séquence lui permettant de recruter la protéine β -TrCP (« β -transducin repeat-containing protein»), adaptateur liant le substrat dans la formation du complexe d'ubiquitine E3 ligase SCF (Skp1/Cullin/F-box).

La formation de ce complexe par Vpu s'effectue de manière phosphosérine dépendante, comme l'a démontré la perte de ce recrutement chez un mutant de Vpu dépourvu des sérines 52 et 56¹¹⁶. En agissant à titre de pseudosubstrat recruté par le complexe β -TrCP/SCF-E3 ubiquitine ligase, Vpu entraîne également la séquestration des récepteurs cellulaires comme l'antigène des cellules NK,T et B (NTB-A) et la protéine CD1d («Cluster de différenciation 1-d»), toutes deux impliquées au niveau de la fonction des cellules NK^{115,117}. Il a d'ailleurs été remarqué que Vpu pouvait saturer le complexe cellulaire β -TrCP/SCF-E3 ubiquitine ligase, de sorte à inhiber par compétition la dégradation physiologique de substrats cellulaires et entraînant par exemple, un certain degré d'apoptose par la stabilisation de $\text{I}\kappa\beta$ ¹¹⁸.

Potentialiser la relâche virale

Les premières études faisant usage de clones du VIH-1 n'exprimant pas le gène *vpu* ont observé une diminution relative de la relâche virale par rapport au VIH-1 exprimant ce gène de l'ordre de 5-10 fois au niveau de cellules T CD4+ infectées¹¹⁹. Des études en microscopie électronique ont révélé le phénotype particulier de certains types cellulaires infectés en absence de Vpu, où les particules virales matures semblent incapables de se détacher de la surface de la cellule productrice en plus de s'accumuler dans des compartiments intracellulaires¹²⁰. La fusion de cellules permissives et non-permissives¹²¹ confirma la localisation membranaire de surface¹²² et le caractère interféron-inductible¹²³ de ce facteur de restriction antagonisé par Vpu, et mena enfin à l'identification d'une protéine nommée BST2 («Bone marrow stromal antigen 2»), facteur de restriction responsable de l'inhibition de la relâche virale du VIH-1 en absence de Vpu^{124,125}. Pour ce faire, BST2 agit comme une ancre membranaire en retenant les virions nouvellement produits à la surface des cellules infectées. Diverses études ont confirmé que cette activité n'était pas restreinte au VIH-1, en effet BST2 restreint la relâche d'une variété de virus enveloppés comme plusieurs membres de la famille des *Retroviridae* tels que des alpha-, beta-, gamma- et deltarétrovirus, lentivirus et spumavirus¹²⁶ ainsi que des membres d'autres familles tels que les arenavirus, filovirus, paramyxovirus et rhabdovirus¹²⁶⁻¹³⁰. De manière intéressante, l'activité de BST2 s'étend

également à certains virus qui émergent à partir de membranes intracellulaires comme le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1)¹³¹ ou le coronavirus HCoV-229E¹³².

Antagonisme de BST2 par Vpu

Vpu antagonise le facteur de restriction BST2 par deux mécanismes généraux : 1) en induisant sa dégradation lysosomale et 2) en provoquant sa séquestration fonctionnelle à l'intérieur de la cellule. Divers groupes ont démontré que Vpu induit une réduction des niveaux totaux de BST2 cellulaires¹¹⁵ à travers le recrutement de β -TrCP et de manière dépendante à la phosphorylation de Vpu¹³³. Comme dans le cas du récepteur CD4, Vpu provoque la polyubiquitination des résidus sérine, thréonine, lysine et cystéine de la queue cytoplasmique de BST2¹³⁴. L'interaction entre les domaines transmembranaires des deux protéines aurait lieu dans un compartiment post-ER¹³⁵. La polyubiquitination β -TrCP-dépendante de BST2 par Vpu accélère son triage vers la voie endolysosomale par les composantes de la voie du complexe de triage endosomal requis pour le transport (ESCRT). À ce titre, le substrat de la protéine tyrosine kinase régulée par le facteur de croissance des hépatocytes (HRS) lie le cargo ubiquitiné et recrute les composantes ESCRT à l'aide de son interaction avec le gène de susceptibilité tumoral 101 (TSG101)¹³⁶, engendrant la relocalisation vers les lysosomes, puis la dégradation de BST2^{133,137,138}. L'antagonisme de BST2 par Vpu ne se limite toutefois pas à la dégradation de BST2. En effet, en absence de la dégradation et de déplétion des niveaux de BST2 de surface β -TrCP-dépendante, Vpu est tout de même en mesure d'amplifier la relâche virale, suggérant un deuxième mode d'antagonisme viral¹³⁹. Suite à ces observations, il a été démontré que Vpu a la capacité de séquestrer la protéine membranaire hors des sites d'assemblages viraux ou encore vers des compartiments périnucléaires colocalisant avec le marqueur du RTG, TGN46^{140,141}. Ces observations sont le reflet que Vpu peut non seulement dégrader BST2, mais aussi altérer sa localisation physiologique et fonctionnelle^{142,132,133}. Ces deux activités distinctes de Vpu sont illustrées à la figure 3.

Le VIH-1 est le seul parmi les lentivirus de primates comme les VIS_{cpz} et VIS_{gor} à avoir développé une protéine Vpu possédant la fonction d'antagoniste de BST2. En effet,

chez les VIS_{cpz} et VIS_{gor}, Nef occupe plutôt cette fonction. Il pourrait s'agir d'une adaptation évolutive du VIH-1 et plus précisément des Vpu appartenant aux groupes M et N. En effet, la protéine BST2 humaine a subi une délétion de 5 acides aminés de son domaine cytoplasmiques la rendant insensible à l'action de Nef¹⁴³. Chez l'humain, une telle évolution fonctionnelle de Vpu pourrait être responsable de la distribution étendue du VIH-1 des groupes N et M, contrairement à celle beaucoup plus restreinte des groupes O et P. Ce facteur pourrait avoir ainsi contribué à l'émergence pandémique du VIH-1 du groupe M¹⁴⁴.

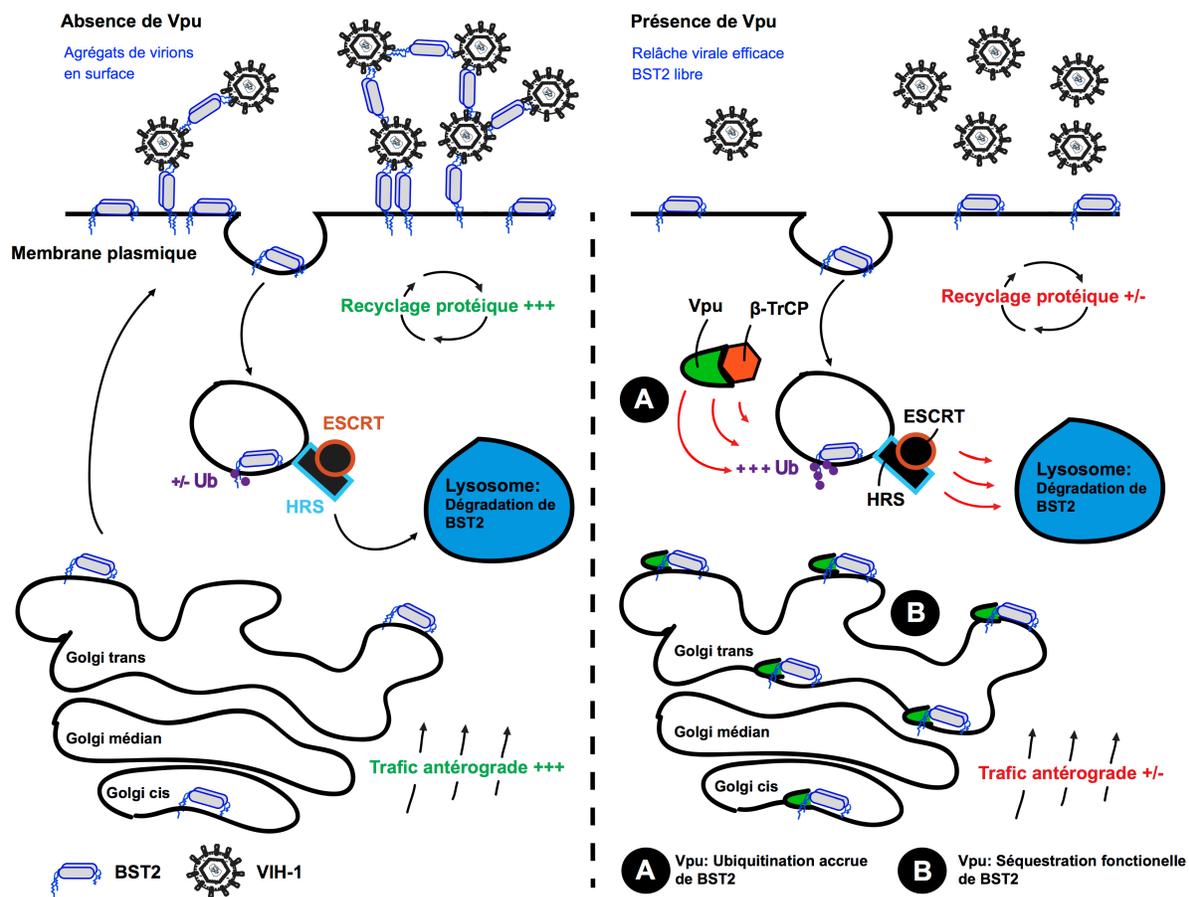


Figure 3: Altération du trafic intracellulaire et dégradation de BST2 par la protéine accessoire Vpu du VIH-1. BST2 est un facteur de restriction affectant la relâche de divers virus enveloppés comme le VIH-1. BST2 agit à titre d'ancre moléculaire retenant les virions émergents au sein de microdomaines riches en cholestérol. Vpu séquestre BST2 au niveau du RTG, induisant une altération fonctionnelle du trafic antérograde et du recyclage de cette dernière. Ceci résulte en une réduction marquée de la localisation fonctionnelle de BST2 au sein de

ces microdomaines. D'autre part, la protéine virale Vpu se sert de la machinerie cellulaire pour forcer la polyubiquitination β -TrCP-dépendante de BST2 et ainsi accroître son transport ESCRT-dépendant vers les lysosomes, lieu de sa dégradation.

1.4 BST2, effecteur viral et fonctions immunitaires

Gène, structure et trafic

Le gène *bst2* possède une séquence promotrice d'environ 2 Kpb contenant les sites d'attaches de divers facteurs de transcription tels que STAT3 («Signal Transducer and Activators of Transcription 3»), le facteur régulant l'interféron 1 (IRF1) et -7 (IRF7) et le facteur génique stimulé par l'interféron-3 (ISGF3) suggérant sa nature interféron-inductible¹⁴⁵. Il a effectivement été démontré que l'interféron- α , - β , - γ , - λ 3, - τ et - ω induisent l'expression de BST2 dans divers types cellulaires¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ bien que son expression constitutive a également été rapportée dans certains types cellulaires¹⁵⁰. Son expression est d'ailleurs induite lors de diverses infections virales au même titre que les gènes induits par l'interféron (ISGs). Dans le cas du VIH-1, l'expression de BST2 corrèle positivement avec la virémie chez les patients infectés au même titre que chez les macaques infectés par le VIS_{mac}¹⁵¹⁻¹⁵³. Autrement, il fût récemment rapporté que l'interleukine 27 (IL-27) pouvait induire l'expression de BST2 chez les monocytes et les cellules T CD4+ de façon IFN-indépendante¹⁵⁴.

BST2 est une protéine transmembranaire de type II de 180 acides aminés et de 28 à 36 kDa de poids moléculaire. Elle est composée d'un domaine cytoplasmique à son extrémité N-terminale, d'un domaine transmembranaire alpha-hélical, d'un domaine extracellulaire «coiled-coil» ainsi que d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) à son extrémité C-terminale¹⁴⁷. Cette topologie unique comportant deux ancrages membranaires est retrouvée avec un certain degré de similarité chez certaines formes de prions¹⁵⁵, la ponticuline du myxomycète *Dictyostelium discoideum*¹⁵⁶, la protéine SM23 du vers parasite *Schistosoma mansoni*¹⁵⁷ ou encore la protéine NcSRS2 du protozoaire *Neospora caninum*¹⁵⁸.

Suite à sa traduction, BST2 atteint le RE puis le RTG où l'ectodomaine de la

protéine est N-glycosylé aux positions 65 et 92. Bien que ces évènements de glycosylation soient importants pour le trafic de BST2 et potentiellement pour son repliement naturel, ils ne semblent pas nécessaires à l'activité antivirale de BST2¹⁵⁹. En revanche, les trois résidus cystéine (C53, C63 et C91) se trouvant dans ce même domaine seraient facultatifs au trafic de la protéine, mais essentiels à la dimérisation de la protéine qui elle, est essentielle au rôle antiviral de BST2¹⁶⁰. Les formes de BST2 matures transitent entre la surface cellulaire, les endosomes et le RTG^{138,140,161}. Il est intéressant de noter que la demi-vie de BST2 de surface serait d'environ 8 heures et que Vpu peut provoquer une réduction de près de 80% de ces niveaux de surface en 6 heures dans certains types cellulaires¹³⁵, alors que dans d'autres types cellulaires Vpu inhibe l'action de BST2 sans en affecter les niveaux de surface¹³⁹.

Mécanisme de restriction viral

La propriété de BST2 de pénétrer la membrane plasmique par deux fois, à l'aide de son domaine transmembranaire et de son ancre GPI, serait à l'origine de sa capacité à amarrer les virions bourgeonnants de la surface cellulaire. En s'accumulant aux sites d'assemblages viraux à raison de 4-7 molécules par site^{162,163}, BST2 agit à titre de pont entre la membrane cellulaire et la membrane virale. L'absence de spécificité de BST2 pour un virus donné suggère que son activité relève de sa configuration structurale plutôt que de sa séquence primaire. Cette hypothèse fut prouvée par la construction d'un homologue structurel de BST2, dit artificiel et synthétisé à partir de domaines structurellement similaires de 3 protéines différentes: Un domaine transmembranaire provenant du récepteur de la transferrine, un domaine «coiled-coil» de la protéine kinase de la dystrophie myotonique de Steinert ainsi qu'une ancre GPI du récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase. Cette chimère est capable d'inhiber la relâche du VIH-1 ainsi que celle de pseudoparticules du virus Ebola¹⁶⁰. Ceci dit, la topologie des dimères de BST2 de surface restreignant les particules virales demeura encore nébuleuse jusqu'à tout récemment. En effet, une étude faisant usage d'une série de mutants de BST2 a démontré que les dimères adoptent une configuration «axiale» avec une préférence d'ancrage (3 à 5 fois plus) dans le virion de leur domaine GPI plutôt

que de leur domaine transmembranaire¹⁶⁴.

Senseur et régulateur de la réponse immunitaire

Une étude d'identification et de caractérisation à grande échelle des activateurs de la voie du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) a révélé que BST2 était capable d'une telle activité¹⁶⁵. Il fut ensuite démontré que le pontage de plusieurs molécules de BST2 de surface avec des anticorps dirigés contre celle-ci cause l'activation de la voie NF- κ B puis la production de cytokines proinflammatoires^{166,167}. Il a été proposé que le pontage de BST2 avec plusieurs particules virales pourrait provoquer une telle activité de sa part et que BST2 pourrait ainsi agir à titre de senseur de l'infection¹⁶⁸. L'impact de cette activité de BST2, tant au niveau immunitaire qu'au niveau de la réplication virale, demeure toutefois à clarifier.

D'autre part, le récepteur naturel de BST2 aurait récemment été découvert par *Cao et al*¹⁶⁹. BST2 interagit ainsi avec ILT7 («Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptor A4»), un récepteur préférentiellement exprimé au niveau des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), cellules spécialisées dans la production d'IFN-1. L'interaction entre BST2 et le récepteur ILT7 provoquerait une régulation négative de la sécrétion d'IFN-1. Cette fonction, combinée à leur capacité de présentation antigénique, permet aux pDCs d'orchestrer les réponses innées et adaptatives¹⁷⁰.

1.5 Les pDCs dans immunité antivirale et l'infection au VIH-1

La réponse antivirale médiée par l'IFN-1

Il y a plus de 50 ans fut identifié le facteur responsable du phénomène d'interférence virale, un phénomène par lequel l'infection de tissus ou de cellules par un premier virus leur confère une résistance à un second virus de différente famille¹⁷¹. Ce facteur, l'interféron (IFN), est aujourd'hui classé en trois types: I, II et III. Chez l'humain et la souris, le premier type est composé de 16 membres, soit 12 sous-types d'IFN α , l'IFN β , l'IFN ϵ , l'IFN κ et l'IFN ω . L'IFN de type II ne représente à ce jour qu'une seule membre,

soit l'IFN γ ¹⁷². Enfin, le troisième type d'IFN est composé de trois membres, soit les IFN λ 1, IFN λ 2 et IFN λ 3 qui diffèrent significativement des IFN de type I et II de par leur ressemblance de structure et séquence protéique avec les membres de la famille de l'interleukine-10¹⁷³.

Les membres de la famille de l'IFN-1 sont des polypeptides à large spectre d'action sécrétés non seulement par les pDCs mais également dans une moindre mesure par une variété de cellules détectant des composantes associées aux pathogènes¹⁷⁴. Trois rôles majeurs sont associés à la fonction de l'IFN-1. Premièrement, l'IFN-1 induit l'immunité cellulaire intrinsèque non seulement dans la cellule infectée, mais également dans les cellules avoisinantes¹⁷⁵. Deuxièmement, ils régulent l'activation de la réponse innée de sorte à promouvoir la présentation antigénique et la fonction des cellules NK tout en restreignant la réponse pro-inflammatoire ainsi que la production de cytokines¹⁷⁶. Troisièmement, ils polarisent les composantes de la réponse adaptative de sorte à favoriser le développement de la réponse à haute affinité des cellules antigène-spécifique T et B ainsi que de la mémoire immunologique^{174,177-179}. Pour exercer l'ensemble de ces fonctions, l'IFN-1 emprunte un chemin décrit depuis plus de 25 ans, où le récepteur de l'IFN-1 (IFNAR) formés des sous-unités 1 (IFNAR1) et 2 (IFNAR2), provoque l'activation de la JAK1 («Janus Kinase 1») et de la TYK2 («tyrosine kinase 2») qui à leur tour phosphoryle les STAT1 et STAT2 («Signal Transducer and Activator of Transcription»)^{180,181}. Suite à leur phosphorylation, STAT1 et STAT2 forment un dimère et s'assemblent avec l'IRF9 (facteur de régulation de l'IFN 9) pour former le complexe facteur génique 3 stimulé par l'interféron («Interferon-stimulated gene factor 3, ISGF3»)¹⁸². Suite à sa translocation nucléaire, le complexe ISGF3 lie un motif particulier, dit élément de réponse aux interférons α et β («Interferon Sensitive Response Element, ISRE») pour activer la transcription de plusieurs centaines d'ISGs, tels que BST2, et qui maintiennent l'environnement cellulaire dans un état réfractaire à la réplication virale¹⁸³.

Les pDCs, producteurs clés de l'IFN-1

Découvertes par Steinman et Cohn en 1973, les DCs sont aujourd'hui considérées comme des sentinelles majeures de l'organisme en raison de leur rôle d'inducteurs de l'immunité innée et adaptative¹⁸⁴. En effet, leurs fonctions comprennent la détection de pathogènes, la présentation antigénique, la tolérance immunitaire en plus d'être essentielles à la polarisation de la réponse immunitaire¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Les DCs comprennent deux grandes lignées qui peuvent être réparties selon un patron d'expression unique de marqueurs de surface, leur répertoire de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes («Pattern Recognition Receptors, PRRs») et leur distribution tissulaire, entre autres. Sur la base de ces caractéristiques nous retrouvons: les DCs d'origine myéloïdes (mDCs), dites conventionnelles, ainsi que les pDCs. Ces dernières possèdent une capacité unique à produire rapidement de larges quantités d'IFN-1 en réponse aux infections virales. Constituant uniquement 0.2%-0.8% des cellules mononucléées du sang périphérique («Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs»), ces dernières peuvent produire jusqu'à 95% de l'IFN-1 en réponse au virus HSV-1¹⁸⁸, et jusqu'à de 1000 fois plus d'IFN-1 que tout autre leucocyte en réponse aux pathogènes viraux¹⁸⁹. Les pDCs peuvent ainsi moduler la migration des cellules T et NK en contexte d'infection par la production de chimiokines^{190,191}, de potentialiser la production d'anticorps en contribuant à la différenciation des cellules B en plasmocytes^{178,192} et à polariser les lymphocytes T en lymphocytes T auxiliaires de type 1, de type 2, de type 17 ou encore en lymphocyte T régulateur (Tregs), dépendamment du contexte et du type de stimulation¹⁹³⁻¹⁹⁶.

Activation des pDCs en réponse au VIH-1

La prodigieuse capacité de production d'IFN-1 des pDCs est mise en évidence par une série de caractéristiques moléculaires qui leur sont uniques. Parmi celles-ci se trouve l'expression de certains récepteurs «Toll-like» («Toll-like Receptors, TLR»), des PRRs reconnaissant avec haute spécificité divers motifs moléculaires associés aux pathogènes («Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs»). Chez les pDCs, l'expression sélective des TLR7 et 9, situés au niveau des compartiments endosomaux, est responsable de la reconnaissance de l'ARN simple brin par TLR7 et de l'ADN double

brin non méthylé arborant des motifs CpG par TLR9. En présence de ces ligands, l'activation des TLR7 et de TLR9 provoque le recrutement du facteur de différenciation myéloïde-88 («Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88»), un adaptateur moléculaire permettant la formation d'un complexe comprenant les kinases associées au récepteur de l'interleukine 1 («Interleukin 1 Receptor Associated Receptor, IRAK») et les facteurs associés au facteur de nécrose tumorale («TNF Receptor Associated Factor, TRAF»), causant la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de régulation de l'interféron 7 («Interferon Regulatory Factor 7, IRF7»), qui se lie alors aux séquences promotrices responsables de la transcription massive d'IFN-1. De manière importante, l'activité de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) serait cruciale pour permettre la translocation d'IRF7 et la production d'IFN-1, sans toutefois être requise au niveau d'autres réponses proinflammatoires des pDCs comme la production du facteur de nécrose tumoral alpha («Tumor Necrosis Factor, TNF α ») ou de l'interleukine-6 (IL-6)¹⁹⁷. Contrairement à tout autre type cellulaire, les pDCs expriment constitutivement IRF7 car d'une part, ils expriment le facteur transcription lignée-spécifique E2-2 qui active sa transcription¹⁹⁸, et d'autre part en raison de l'absence des répresseurs traductionnels de la famille des 4E-BPs («eIF4E Binding Proteins»)¹⁹⁹. Au niveau du VIH-1, les pDCs immatures circulant dans les tissus et les muqueuses sont activées par les particules virales capables de fusion, entraînant la relâche de matériel génomique viral au sein des endosomes. De là, l'ARN simple brin viral est détecté par TLR7, activant la cascade décrite précédemment²⁰⁰. De manière intéressante, la détection des cellules T CD4+ infectées par le VIH-1 par les pDCs primaires ou les lignées de pDCs est beaucoup plus efficace lors d'établissement de contacts cellule à cellule que la détection de particules virales libres²⁰¹. Les cellules T CD4+ infectées par des particules défectives provoquent également la production d'IFN-1 des pDCs et pourraient ainsi représenter une cause sous-estimée d'hyperactivation immunitaire²⁰¹.

Régulation de l'activité antivirale

À ce jour, peu d'études ont fait état de la régulation de l'activité antivirale des pDCs. Ceci étant dit, on sait que le pontage de certaines molécules de surface avec leurs

anticorps respectifs peut causer soit une inhibition directe de l'activité antivirale ou encore induire un certain degré de maturation chez les pDCs, selon la molécule ciblée. Dans les deux cas, une régulation de la production d'IFN-1 peut être observée²⁰². Un phénomène similaire est observé au niveau d'autres types cellulaires, comme chez les cellules NK où le pontage de plusieurs molécules de CMH-I avec des anticorps inhibe leur fonction²⁰³. Chez les pDCs, Dzionek et al. ont d'abord rapporté que le pontage de BDCA2 («C-type lectin domain family 2, member C») cause l'activation de certaines tyrosine kinases et la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire²⁰⁴. Ces événements mènent ultimement à une répression de la production d'IFN-1, par exemple en réponse au virus de l'influenza, aux ligands synthétiques de TLR9 et aux sera de patients souffrant de lupus érythémateux disséminé (LED). De manière intéressante, il a été rapporté que la protéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 peut interagir avec BDCA2 pour inhiber la sécrétion d'IFN-1 des pDCs²⁰⁵. Une activité similaire fut rapportée au niveau d'un membre de la même famille que BDCA2, soit la neuropiline-1 (BDCA-4) lorsque des pDCs furent traitées avec les sera de patients souffrant de LED²⁰⁶. Plus récemment ILT7, récepteur de BST2, fut ajouté à la liste de ce type de récepteurs, capables de provoquer une telle inhibition de la réponse de type IFN-1 et de la production de cytokines proinflammatoires des pDCs^{207,208}.

ILT7: Structure et signalisation

ILT7 fait partie de la famille des LILRs («Leucocyte Ig-like Receptors»), une famille de récepteurs ayant émergé il y a au moins 300 millions d'années, tel que suggéré par leur présence chez les oiseaux²⁰⁹. Les LILRs font partie de la superfamille des Ig (Immunoglobulines) dont les membres agissent à titre de récepteurs d'antigènes, de protéines co-stimulatrices, de molécules d'adhésion et de récepteurs immuno-modulateurs²¹⁰. Tout comme les KIRs (Récepteurs inhibiteurs des cellules NK) et des MIRs (Récepteurs inhibiteurs des monocytes/macrophages), les membres des LILRs sont composés d'au maximum 4 domaines Ig extracellulaires et sont tous encodés au sein du complexe de récepteur leucocytaire situé sur le chromosome 19q13.4. 14 LILRs ont été répertoriés à ce jour et sont classés en deux groupes distincts: les récepteurs

inhibiteurs et les récepteurs activateurs. Les récepteurs inhibiteurs sont tous composés d'un domaine transmembranaire et d'un long domaine cytoplasmique contenant 2-4 motifs ITIM (Motif d'inhibition d'immunorécepteur à base de tyrosine) capables de recruter des protéines tyrosine phosphatases comme les SHP-1 et SHP-2 («SH2-containing protein-tyrosine phosphatase») de sorte à inhiber les fonctions effectrices cellulaires²¹¹⁻²¹³. Par opposition, les récepteurs LILR activateurs n'ont pas nécessairement de domaine transmembranaire, et lorsqu'ils en ont un, possèdent un court domaine cytoplasmique. Leur domaine transmembranaire est positivement chargé par certains résidus qui permettent leur association avec la chaîne commune γ du récepteur de Fc (Fc γ R) nécessaire à leur signalisation cellulaire²¹⁴⁻²¹⁶. ILT7 est un récepteur activateur de 499 acides aminés composé de 4 domaines Ig extracellulaires et d'un domaine transmembranaire contenant une arginine positivement chargée. Celle-ci lui permet une association à un Fc γ R qui est non seulement nécessaire à sa signalisation, mais aussi à sa présence à la surface cellulaire. Suite à l'activation d'ILT7, l'adaptateur Fc γ R enclenche une signalisation à l'aide de son motif ITAM (Motif d'activation d'immunorécepteur à base de tyrosine), résultant en l'activation des tyrosines kinases Syk et Src, la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire et la phosphorylation de protéines tyrosines menant à la répression de la production d'IFN-1²¹⁷.

Contrairement à divers autres LILRs, l'expression d'ILT7 est remarquablement restreinte à un seul type cellulaire, soit les pDCs²⁰⁸. Chez ces dernières, c'est le facteur déterminant de différenciation des pDCs *in vivo*, soit E2-2, qui se lie au promoteur du gène *ilt7* pour induire sa transcription. Les patients souffrant du syndrome de Pitt-Hopkins qui sont haploinsuffisants du gène *E2-2* démontrent d'ailleurs de faibles niveaux d'expression d'ILT7¹⁹⁸. Alors que les conditions d'inductions de l'expression d'autres LILRs activateurs, comme ILT3 et ILT4 ont été découvertes au niveau des monocytes, celles de l'ILT7 chez les pDCs demeurent cependant inconnues²¹⁸.

Répartition et phénotype des pDCs au fil de l'infection

L'infection chronique par le VIH-1 est associée à un fort déclin du nombre de pDCs circulants dans le sang et leur accumulation au sein des ganglions lymphatiques²¹⁹. En effet, la fréquence de pDCs dans les organes lymphatiques secondaires est plus élevée chez les patients infectés que chez les individus non infectés, avec un taux maximal de relocalisation chez les patients avec les plus forts titres viraux²²⁰. De manière intéressante, cette tendance est significativement renversée par le HAART^{221,222}. Suite à leur activation, les pDCs régulent à la hausse les protéines CCR7 (récepteur de chimiokine CC de type 7) et CD62L («L-Selectin»), qui favorisent leur migration vers ces organes. Plus encore, des analyses de migration *ex vivo* ont démontré que les pDCs de patients infectés par le VIH-1 répondent plus fortement aux ligands de CCR7²²³. Au niveau des organes lymphatiques secondaires, les pDCs peuvent sécréter d'importantes quantités d'IFN-1 en absence de stimuli sans toutefois exprimer des hauts niveaux de molécules co-stimulatrices, comme les protéines CD80 («Cluster de différenciation 80») et CD86 («Cluster de différenciation 86»), suggérant un état d'activation en absence de maturation complète²²⁴. Par ailleurs, ces pDCs arborent davantage de marqueurs d'apoptose, tel que suggéré par leur expression de l'annexin V. Il semble donc qu'il y ait une redistribution, dysfonction et mort éventuelle des pDCs au niveau des organes lymphatiques au fil de l'infection. Une telle redistribution et un tel phénotype d'activation/maturation fut également constaté au niveau des macaques infectés chroniquement par le SIV²²⁵. Ceci contraste fortement avec l'infection du SIV chez des hôtes naturels comme les singes Mangabey, où la phase aiguë de l'infection se caractérise initialement par un déclin du niveau de pDCs de la circulation vers les organes lymphoïdes, mais dont les niveaux du sang circulant sont éventuellement reconstitués lors de la phase chronique²²⁶.

Rôle suggéré des pDCs dans la pathogénèse du VIH-1

Le rôle des pDCs au niveau de la pathogénèse du VIH-1 semble complexe. L'une des questions centrales qui les entourent est de savoir dans quelle mesure l'activation des pDCs et leur sécrétion massive d'IFN-1 par le VIH-1 est bénéfique ou néfaste à l'hôte.

D'un côté, la phase chronique de l'infection au VIH-1 est marquée par une activation immunitaire aberrante, constituant aujourd'hui un meilleur indicateur de progression au SIDA que la virémie^{35,227-229}. Bien que le ou les facteurs à l'origine de cette activation chronique ne soient pas encore complètement identifiés, on sait que les produits issus de la translocation microbienne ainsi que la stimulation soutenue de cellules immunitaires innées par le VIH-1 pourraient fort probablement y contribuer. À ce titre, il a été proposé que la production d'IFN-1 soutenue des pDCs pourrait contribuer directement à l'activation immunitaire chronique et ainsi accélérer la déplétion des cellules T²³⁰. En effet, des hauts niveaux d'IFN-1 plasmatiques durant les phases aiguës et chroniques corrèlent avec la progression des patients²³¹ et les femmes, qui progressent plus rapidement à la phase SIDA et qui expriment de plus hauts niveaux de marqueurs d'activation leucocytaires, produisent plus d'IFN-1 que les hommes lorsque leurs cellules sont stimulées par le VIH *ex vivo*²³². Par ailleurs, il a été suggéré qu'en présence de haute répllication virale, l'élément distinguant l'infection d'hôtes naturels et pathogéniques simiens, est le niveau de stimulation chronique des pDCs, qui alimenterait l'immunopathologie chez ces derniers²²⁶. De manière intéressante, l'injection systémique et chronique de ligands de TLR7 et de TLR9, ligands typiques des pDCs, induit chez la souris une perturbation de l'organisation du tissu lymphoïde et une immunodéficience rappelant celle du VIH-1^{233,234}.

D'un autre côté, la sécrétion d'IFN-1 a un rôle antiviral indiscutable, tel qu'illustré par l'inhibition efficace de la répllication du VIH-1 au niveau de cellules T²³⁵⁻²³⁷. De plus, l'IFN-1 des pDCs provoque l'activation des fonctions effectrices des cellules NK, T CD4+ et T CD8+ dirigées contre les cellules infectées par le VIH-1^{230,238}. Enfin la production d'IFN-1 des pDCs contribue au processus de maturation des cellules dendritiques conventionnelles CD11c+, ce qui pourrait favoriser l'émergence de réponse T anti-VIH-1 spécifique²³⁹.

Compte tenu de ces rôles potentiellement divergents, il est plausible que la fonction de la production d'IFN-1 des pDCs évolue d'un rôle protectif à pathogénique au fil de l'infection au VIH-1. Par exemple, lors des étapes de l'infection ou lors de la

transmission initiale, la production d'IFN-1 pourrait contribuer à freiner la réplication et l'établissement de l'infection systémique. Par la suite, alors que le contrôle de la réplication virale échappe éventuellement au système immunitaire, la sécrétion d'IFN-1 pourrait plutôt forcer l'activation et la dysfonction immunitaire et la déplétion des cellules T, contribuant ultimement à l'immunodéficience de l'hôte. Une compréhension approfondie des interactions dominantes VIH-1:pDC gouvernant la production d'IFN-1 devrait contribuer à établir un portrait plus complet de la subversion de cette fonction antivirale centrale par le VIH-1.

Chapitre 2: OBJECTIF GÉNÉRAL

La majorité de la recherche portant sur l'antagonisme de BST2 par Vpu s'est principalement attardée à identifier les déterminants cellulaires et viraux qui caractérisent cette interaction dans un contexte de relâche virale. Ceci dit, des études ont révélé qu'outre sa fonction de facteur de restriction, BST2 peut également agir à titre de senseur antiviral capable d'induire la voie NF- κ B ainsi qu'à titre de ligand immunorégulateur. En effet, à travers son interaction avec le récepteur ILT7, BST2 peut réguler à la baisse la sécrétion d'IFN-1 de pDCs activés.

Conséquemment, nous avons entrepris d'étudier les conséquences du contrôle par Vpu des niveaux de surface de BST2, non pas sur la relâche virale, mais plutôt sur l'activité antivirale des pDCs détectant les cellules infectées par le VIH-1. À ce titre, nous avons émis l'hypothèse qu'en affectant l'accessibilité de BST2 à la surface des cellules infectées, Vpu contrôle indirectement le niveau d'activation du récepteur ILT7 des pDCs et par extension le niveau de sécrétion d'IFN-1 de ces cellules dans le contexte de l'infection au VIH-1. Compte tenu du fait que l'essentiel de la détection du VIH-1 par les pDCs implique une interaction directe entre les pDCs et les cellules infectées, nous avons étudié ce phénomène au moyen d'un système de co-culture entre ces cellules.

L'objectif de mon projet de recherche consista donc à évaluer l'effet immunorégulateur de la protéine accessoire Vpu sur le niveau d'activité antiviral des pDCs, tel que mesuré par leur production d'IFN-1. En second lieu, j'ai étudié l'importance de l'interaction entre le ligand BST2 et le récepteur ILT7 au sein de ce phénomène en employant diverses techniques de blocage, de déplétion par traitement avec des petits ARN interférents ainsi que par compétition à l'aide de protéines recombinantes.

Chapitre 3: RÉSULTATS

Présentation du système d'étude des facteurs viraux et cellulaires déterminant la relâche d'IFN-1 en réponse aux cellules T CD4+ infectées par le VIH-1.

Les pDCs sont à l'origine de la vaste majorité de la production d'IFN-1 en réponse au VIH-1²⁰¹. Les premières études étudiant ce phénomène firent usage de particules libres virales pour stimuler ces cellules, qui s'avèrent de faibles inducteurs de cette réponse, contrairement à d'autres virus comme le virus influenza. Plus récemment, une étude a démontré que ce sont les cellules infectées par le VIH-1, plutôt que les particules virales libres seules, qui stimule efficacement la production de l'IFN-1 des pDCs²⁰¹. Le système pour lequel nous avons opté est donc basé sur la co-culture de cellules de la lignée de cellules T CD4+ MT4 (MT4) infectées avec des PBMCs ou des pDCs primaires purifiés à partir du sang de donneurs adultes en santé. La co-culture de ces cellules provoque une relâche significative d'IFN-1 quantifiable. (Fig.4A).

Plus précisément, des cellules MT4 sont infectées avec le clone du VIH-1 NL4.3 de type sauvage dit «wild-type» (WT) ou n'exprimant pas Vpu dit «delta Vpu» (delU). Ces deux clones viraux expriment tous deux la protéine fluorescente verte («Green Fluorescent Protein, GFP») en raison de la présence d'un site d'entrée interne pour le ribosome («Internal ribosome entry site, IRES») situé en aval du génome viral. Quarante-huit heures suite à l'infection des cellules MT4 à différentes multiplicités d'infections, le pourcentage de cellules infectées dans chaque condition est déterminé en fonction de leur expression de la GFP, tel que déterminé en cytométrie en flux. Un total de 50 000 cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU et à un même taux d'infection, variant entre 20-40% (Fig.4B), sont ainsi mis en culture avec 200 000 PBMCs ou bien 1000 pDCs de donneurs. Lorsque l'utilisation de pDCs purifiés est nécessaire, ces derniers sont isolés à partir de la fraction négative d'une immunoséparation magnétique. L'utilisation de la fraction négative est préférable à l'utilisation de la fraction positive considérant le fait que le pontage de molécules par le biais d'anticorps peut affecter la fonction ou

encore induire la maturation partielle des pDCs²⁰². De plus, les fractions négatives que nous avons obtenues ont démontré de hauts niveaux de pureté (Fig.4C), ce qui justifie davantage l'utilisation de cette méthode. La co-culture perdure pour 18-24 heures, après quoi le surnageant de culture est récolté et sa concentration d'IFN-1 bioactif déterminée à l'aide du système rapporteur d'IFN α/β cellulaire HEK-Blue^{MC}.

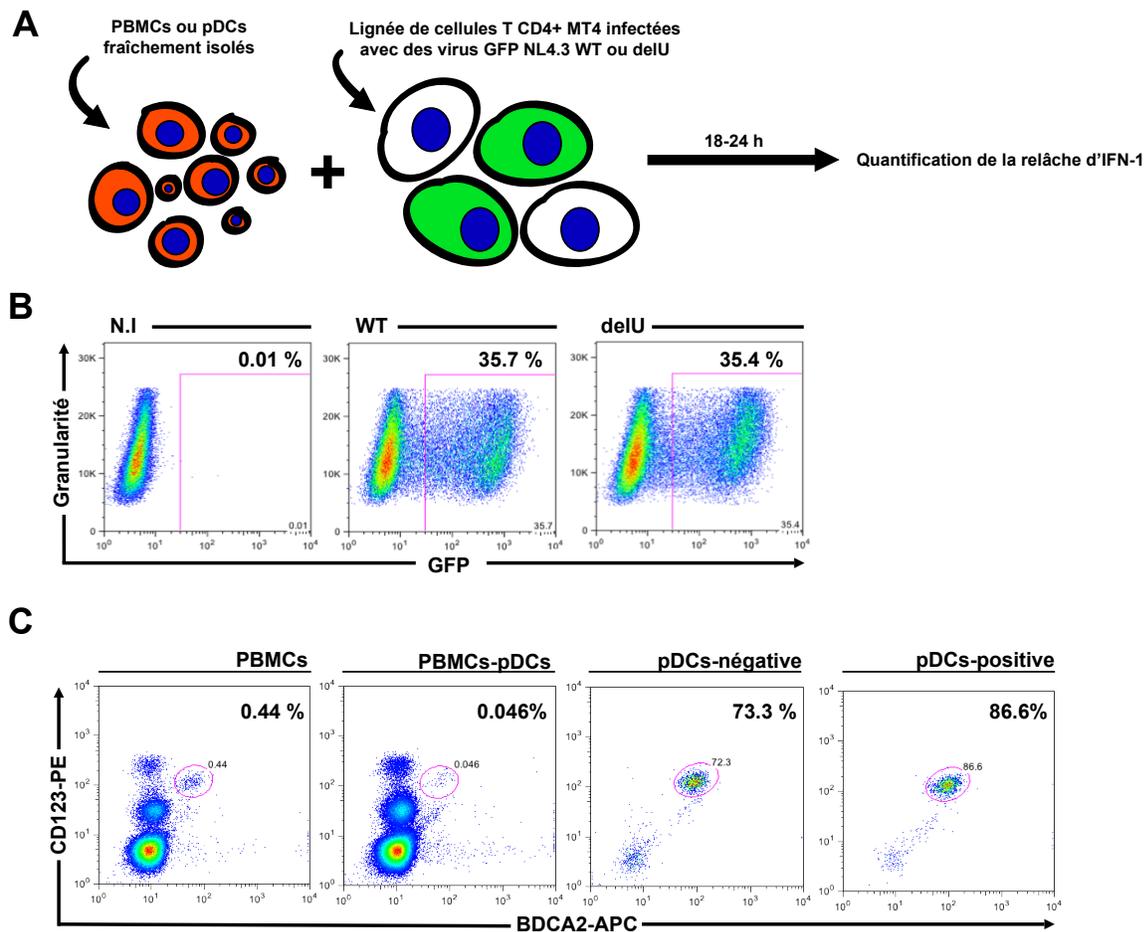


Figure 4: Présentation du système de co-culture (A) Le système d'étude de la réponse antivirale de type IFN-1 des pDCs en réponse aux cellules infectées par le VIH-1 consiste en la co-cultures de PBMCs ou de pDCs avec la lignée de cellules T CD4+ MT4 (MT4) infectées. Après 18-24 heures de co-culture, la concentration d'IFN-1 relâchée dans les surnageants de culture est quantifiée à l'aide du système rapporteur d'IFN α/β cellulaire HEK-Blue. (B) 48 heures suite à leur infection, la concentration de cellules MT4 non infectée (N.I), infectées avec un virus sauvage (WT) ou un virus isogénique n'exprimant pas Vpu (delU) est déterminée en fonction de leur expression de la GFP en cytométrie en flux. Ceci permet de mettre en culture avec les PBMCs ou pDCs un nombre de cellules MT4 à un même taux d'infection entre les conditions WT et delU. (C) La concentration en pDCs de chaque fraction soit PBMCs, PBMCs déplétés de pDCs (PBMCs-

pDCs), la fraction issue de la sélection négative des pDCs (pDCs-négative) et la fraction issue de la sélection positive des pDCs (pDCs-positive) est déterminée en cytométrie en flux à l'aide du marqueur de surface pDC-spécifique BDCA2 et du marqueur de surface hautement exprimé par les pDCs, CD123. N.I, non-infectées; WT, virus de type sauvage; delU, virus n'exprimant pas Vpu.

La protéine virale Vpu régule à la baisse la production d'IFN-1 des pDCs. L'utilisation des virus WT et delU nous a permis d'évaluer la contribution de Vpu dans la sécrétion d'IFN-1 des pDCs détectant les cellules infectées par le VIH-1. Tel que l'ont démontré Lepelley *et al.*²⁰¹, aucun IFN-1 n'a été détecté dans les surnageants de cultures contenant des cellules MT4 non infectées (N.I). De manière intéressante, nous avons constaté que la présence de Vpu (WT) dans les cellules infectées était associée à une réduction significative des niveaux d'IFN-1 relâchés dans les milieux de culture moyennant 50% (Fig.5A). Contrairement à notre hypothèse, l'antagonisme de BST2 par Vpu est ainsi associé à une baisse de sécrétion d'IFN-1 des pDCs. La viabilité et la fonction des pDCs parmi les PBMCs furent évaluées par l'utilisation d'agonistes pDC-spécifiques, soit de TLR7 (Imiquimod, IMIQ) et TLR9 (ADN CpG-A, CpG). Les pDCs parmi les PBMCs n'ont par ailleurs pas démontré de production spontanée d'IFN-1 lorsque cultivés sans agonistes et sans cellules MT4 (X).

Nous avons ensuite examiné si l'effet immunorégulateur de Vpu était entièrement dépendant de la présence des pDCs au sein des PBMCs. Le retrait des pDCs (PBMCs-pDCs) des PBMCs résulte en l'abrogation de toute production d'IFN-1. Plus encore, lorsque nous avons mis en culture les pDCs enrichis par sélection négative (pDCs) avec les cellules MT4 infectées, nous avons constaté non seulement la restitution de la production d'IFN-1 mais aussi l'effet immunorégulateur qu'exerce Vpu sur celle-ci (Fig.5B). Ceci confirme que le VIH module la fonction antivirale des pDCs de manière Vpu-dépendante lorsque ceux-ci sont exposés à des cellules T CD4+ infectées.

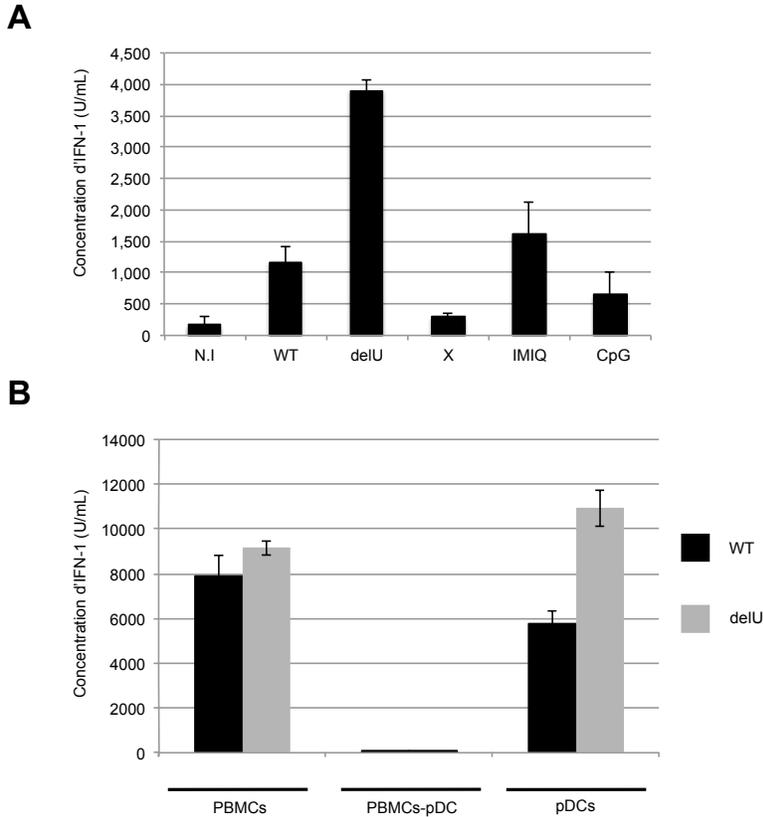


Figure 5: Vpu régule à la baisse la production d'IFN-1 des pDCs lors de la détection de cellules MT4 infectées par le VIH-1. (A) Exemple représentatif des concentrations d'IFN-1 recueillies dans les surnageants de cultures de PBMCs d'un donneur mises en culture avec des cellules MT4 non infectées (N.I), infectées avec un virus NL4.3 complet (WT), infectées avec un virus NL4.3 n'exprimant pas Vpu (delU), seules (X), seules et stimulées avec des agonistes de TLR7 (IMIQ) ou seules et stimulées avec des agonistes de TLR9 (CpG) pour 18-24 heures. (n=3) (B) Exemple représentatif des concentrations d'IFN-1 retrouvées dans les surnageants de culture de PBMCs (PBMCs), de PBMCs déplétés de leurs pDCs (PBMCs-pDC) et de pDCs purifiés par sélection négative (pDCs) d'un donneur représentatif mis en culture avec des cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU pour 18-24 heures. (n=3) N.I, non-infectées; WT, virus de type sauvage; delU, virus n'exprimant pas Vpu; X, PBMCs non stimulés; IMIQ, Imiquimod; CpG, ODN 2216 CpG-A.

L'effet de Vpu est dépendant d'une interaction de BST2 avec un partenaire en trans.

Vpu régulant à la baisse la production d'IFN-1 des PBMCs de façon pDC-dépendante, nous avons ensuite évalué si ce processus était dépendant de la disponibilité d'une cible de Vpu à la surface cellulaire, soit BST2. Plus précisément, considérant le rôle potentiellement immunorégulateur de BST2 sur l'activité des pDCs récemment décrit,

nous avons évalué si l'effet de Vpu persisterait en présence du bloc interactionnel de BST2 avec tout partenaire en *trans*, tel qu'exercé par le biais d'anticorps dirigés contre BST2 à la surface des cellules MT4 infectées (Fig.6A). Pour vérifier l'efficacité de nos conditions de blocage, nous avons traité des cellules MT4 avec des anticorps anti-BST2 de lapin pendant 18 heures, puis ensuite marqué ces cellules avec des anticorps anti-BST2 de souris pour évaluer la quantité de BST2 disponible. Après 18 heures, la vaste majorité du BST2 était toujours lié aux anticorps de lapin, tel que suggéré par l'absence de signal provenant des anticorps anti-BST2 de souris. Cette absence de signal ne provient pas de l'absence de BST2 à la surface de ces cellules après 18 heures, car après 18 heures de traitement des cellules MT4 avec l'anticorps anti-BST2 de souris, l'anticorps polyclonal anti-BST2 de lapin révèle la présence de hauts niveaux de surface de BST2 (résultats non publiés). Comme prévu, le traitement de ces cellules avec un contrôle isotypique ou avec aucun anticorps pendant 18 heures n'affecte peu ou pas la disponibilité de BST2 aux anticorps anti-BST2 de souris, indiquant la disponibilité interactionnelle de BST2 dans ces contextes (Fig.6B). L'efficacité de nos conditions de blocage confirmée, nous avons ensuite mis en culture les cellules MT4 infectées avec un virus WT (WT) ou delU (delU) préalablement traités avec des anticorps anti-BST2 (Anticorps α BST2) ou avec un contrôle isotypique (Contrôle isotypique) avec des PBMCs pendant 18-24 heures, puis mesuré la relâche d'IFN-1 des pDCs. Tel que démontré avec l'exemple représentatif d'un donneur (Fig.6C) ou du combiné de 4 donneurs de sang distincts (Fig.6D), la production d'IFN-1 rejoint les niveaux observés en absence de Vpu lorsque l'accessibilité extracellulaire de BST2 est compromise. À ce titre, ces résultats suggèrent donc que l'effet immunorégulateur de Vpu est dépendant de l'interaction de BST2 avec un partenaire en *trans*.

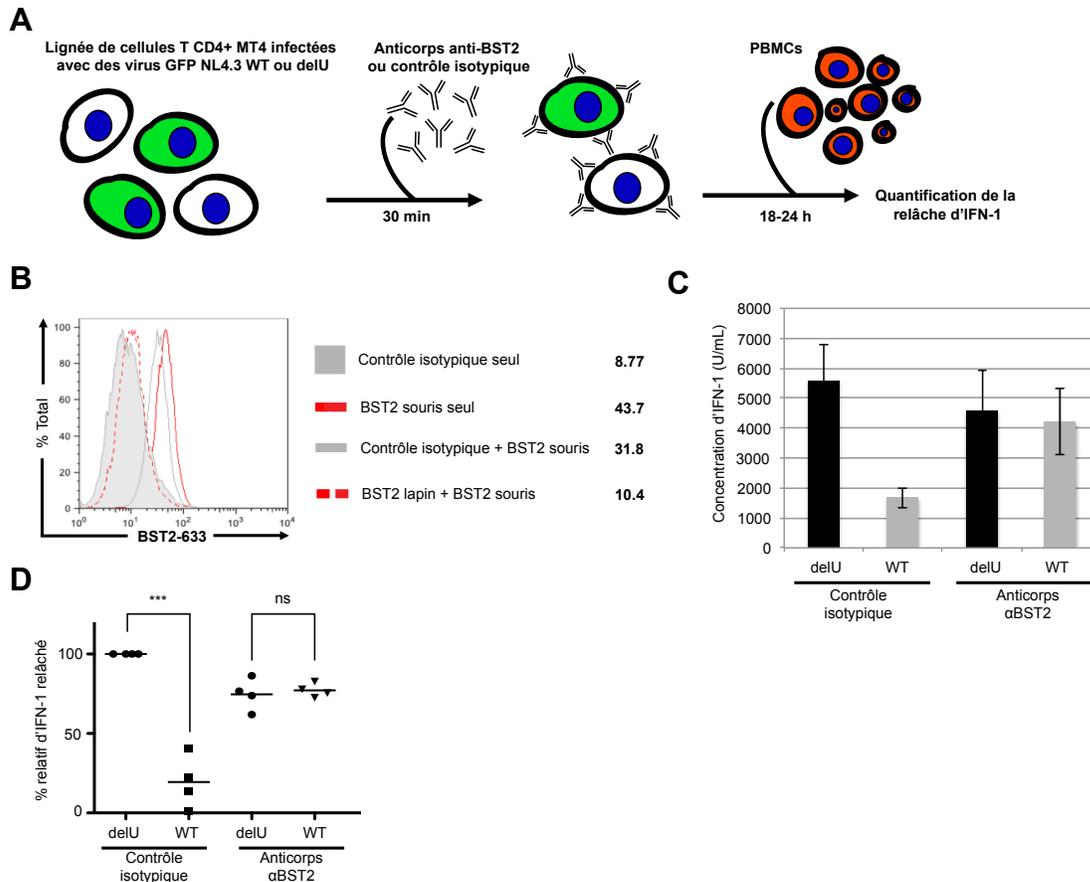


Figure 6: Le blocage de surface de BST2 par des anticorps polyclonaux annule l'effet immunorégulateur de Vpu. Des cellules MT4 infectées avec un virus sauvage (WT) ou un virus n'exprimant pas Vpu (delU) furent incubées avec des anticorps polyclonaux anti-BST2 de sérum de lapin (Anticorps α -BST2) ou avec des contrôles isotypiques de sérum de lapin (Contrôle isotypique). Par la suite, ces cellules furent cultivées avec des PBMCs fraîchement isolés à partir du sang périphérique de donneurs en santé pendant 18-24 heures, puis les niveaux d'IFN-1 des surnageants quantifiés. (A) Schématisation de la procédure expérimentale. (B) Détection des niveaux de surface de BST2 de cellules MT4 par des anticorps anti-BST2 de souris tel que déterminé en cytométrie en flux, suite à 18 heures de traitements bloquants ou non-bloquants. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes d'intensité de fluorescence. (C) Exemple représentatif de la concentration d'IFN-1 recueillie dans les surnageants de culture de PBMCs et cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU et préalablement traités avec des anticorps polyclonaux anti-BST2 de sérum de lapin (Anticorps α BST2) ou avec des contrôles isotypiques de sérum de lapin (Contrôle isotypique). (D) Pourcentage relatif de la relâche d'IFN-1 observée après la culture de PBMCs avec des cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU préalablement traités avec un contrôle isotypique ou avec des anticorps α -BST2 (n=4, à partir de différents donneurs de sang). La relâche d'IFN-1 des PBMCs en contact avec des cellules MT4 infectées avec un virus delU et préalablement traitées avec un contrôle isotypique est ajustée à 100% (**p<0.001, ns = non significatif; en utilisant un test de Student pairé). % Total, Pourcentage du nombre total de cellules; WT, virus de type sauvage; delU, virus n'exprimant pas Vpu.

L'effet de Vpu est dépendant de la présence du récepteur ILT7 à la surface des pDCs.

Considérant le fait que la présence de molécules de BST2 accessibles à la surface des cellules infectées semble cruciale à l'effet immunorégulateur de Vpu, nous avons évalué si l'expression du récepteur naturel de BST2 à la surface des pDCs est tout aussi nécessaire à ce phénomène. Pour ce faire, les pDCs purifiés à partir de PBMCs par sélection négative furent déplétées avec haute efficacité de leurs niveaux endogènes d'ILT7 à l'aide de petits ARN interférents (ARNi) (Fig.7A), puis mis en culture avec des cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU pendant 18-24 heures, après quoi la concentration d'IFN-1 des surnageants de culture fut évaluée. Compte tenu du fait que les pDCs expriment des senseurs extrêmement sensibles à la présence d'ARN simple brin, nous avons d'abord évalué une série d'ARNis ciblant diverses molécules et arborant différentes caractéristiques moléculaires (résultats non publiés). Nous avons ainsi identifié et utilisé pour nos expériences un ARNi contrôle et un ARNi ciblant ILT7 ne causant pas de sécrétion spontanée d'IFN-1 des pDCs. Contrairement aux pDCs traités avec des ARNis contrôles où les niveaux d'ILT7 sont intacts, les pDCs déplétés du récepteur ILT7 produisent de hauts niveaux d'IFN-1, indépendamment de la présence ou de l'absence de Vpu dans les cellules infectées (Fig.7B). Un total de 6 donneurs différents a confirmé cette tendance, tel que démontré à la figure 7C. Ceci démontre que l'effet de Vpu sur les niveaux d'IFN-1 sécrétés par les pDCs en réponse aux cellules infectées est dépendant de l'expression du récepteur ILT7 dans les pDCs. De plus, ces résultats suggèrent qu'ILT7 est le partenaire en *trans* du BST2 libre à la surface des cellules infectées provoquant la réduction d'IFN-1 observée en présence de Vpu.

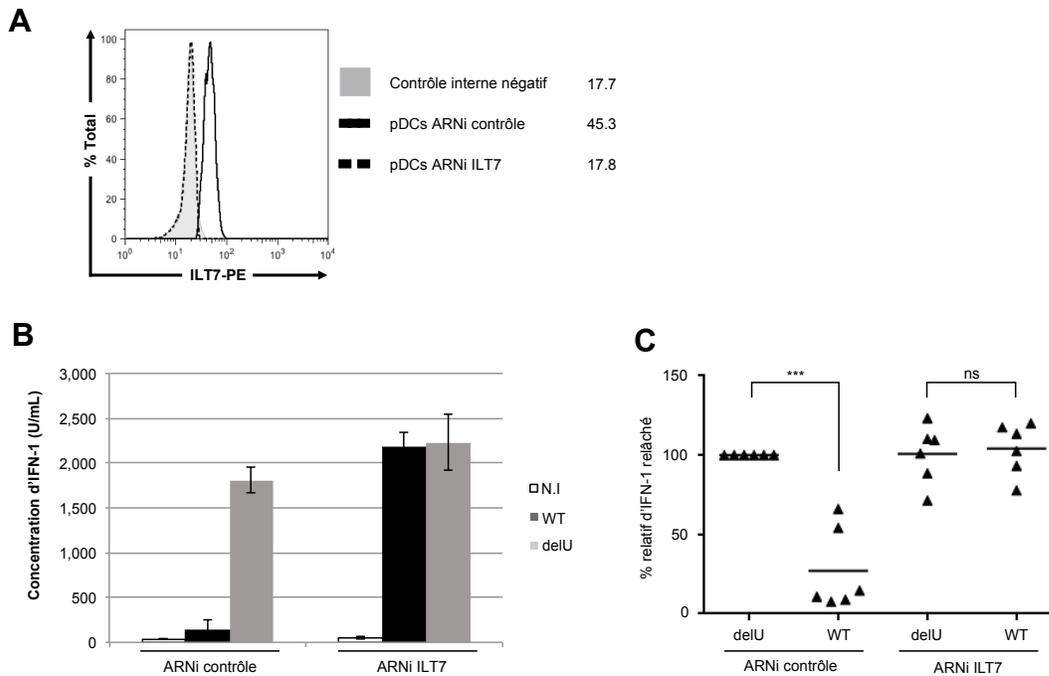


Figure 7: La déplétion d'ILT7 dans les pDCs annule l'effet immunorégulateur de Vpu. (A) Les niveaux d'expression d'ILT7 des pDCs purifiés et traités avec des ARNi contrôles (ARNi contrôle) ou déplétés des niveaux endogènes d'ILT7 (ARNi ILT7) furent évalués par cytométrie en flux. Les niveaux d'expression d'ILT7 sont comparés à la fraction non-pDCs dépourvue des marqueurs typiques de pDCs, comme ILT7 (Contrôle interne négatif). Les valeurs sont exprimées sous forme d'intensités moyennes de fluorescence. (B) Un exemple représentatif des niveaux d'IFN-1 recueillis dans les surnageants de pDCs contrôles (ARNi contrôle) ou déplétés d'ILT7 (ARNi ILT7) mis en culture avec des cellules MT4 non-infectées (N.I), infectées avec un virus sauvage (WT) ou avec un virus n'exprimant pas Vpu (delU). (C) Pourcentages relatifs d'IFN-1 produits après la co-culture de pDCs traités avec des ARNi contrôles ou avec des ARNi ILT7 avec des cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU de 6 donneurs différents. La quantité d'IFN-1 produite dans la condition des pDCs traités avec des ARNi contrôles cultivés avec des cellules MT4 infectées avec un virus delU est établie à 100%. (***) $p < 0.01$, ns= non significatif; en utilisant des mesures ANOVA répétées avec ajustement de Bonferroni.) % Total, Pourcentage du nombre total de cellules; ARNi contrôle, petits ARN interférents contrôle; ARNi ILT7, petits ARN interférents visant ILT7; N.I, non infecté; WT, virus de type sauvage; delU, virus n'exprimant pas Vpu.

Conception et validation de la protéine recombinante soluble d'ILT7. Nous avons ensuite évalué l'importance de l'interaction *in trans* entre le BST2 des cellules infectées et l'ILT7 des pDCs au sein de l'effet immunorégulateur de Vpu. À cette fin, nous avons développé et produit une protéine recombinante soluble d'ILT7 (sILT7) théoriquement capable de faire compétition à l'ILT7 présent à la surface des pDCs et d'empêcher l'activation de ce récepteur inhibiteur de la sécrétion d'IFN-1. Pour élaborer une telle

protéine, nous nous sommes inspirés d'une récente étude qui a révélé la présence d'un codon stop cryptique dans une région intronique sujette à l'épissage hautement conservée au niveau de la grande majorité des membres de la famille LILRs. Cette région cause la production de transcrits contenant ou non un codon stop dans la région "tige" extracellulaire située entre les domaines Ig extracellulaires et le domaine transmembranaire. En conséquence, les membres de la famille des LILRs concernés sont produits en une forme soluble et en une forme membranaire par épissage alternatif²⁴⁰. Après avoir tenté d'obtenir sans succès une sécrétion de divers mutants d'ILT7 tronqués ou modifiés, nous avons donc opté pour cette stratégie en émettant l'hypothèse que si naturellement produit, ce variant soluble issu d'un processus d'épissage alternatif ne devrait démontrer aucun défaut de sécrétion. Nous avons donc recréé ce variant soluble d'ILT7 naturel en insérant un codon stop dans la région appropriée d'un expresser exclusif de la forme membranaire d'ILT7 portant une étiquette N-terminale HA (Fig.8A). La transfection de cet expresser dans les cellules humaines embryonnaires de rein 293T (HEK293T) résulte en la sécrétion de la protéine soluble dans le surnageant des cellules en culture, contrairement à la transfection de l'expresser de la version membranaire d'ILT7 (ILT7) également HA étiqueté à son extrémité N-terminale ou à la transfection d'un vecteur vide (Vide) (Fig.8B). L'identité de notre protéine recombinante fût confirmée par son immunoprécipitation à partir du surnageant de cellules transfectées avec l'expresser de sILT7 à l'aide d'anticorps anti-ILT7 (α ILT7) ou anti-HA (α HA) pré-couplés à des billes agarose enrobées de protéines G et non avec un contrôle isotypique dans les mêmes conditions (Fig.8C). Étrangement, deux bandes apparaissent par coloration au nitrate d'argent lors de l'immunoprécipitation avec des billes anti-HA. Les deux bandes, (Bande A, supérieure, et bande B, inférieure) ont donc été analysées par spectrométrie de masse et ont révélé une même couverture protéique (Fig.S1) et une même identité, soit ILT7, suggérant que la protéine sécrétée est vraisemblablement sujette à des modifications post-traductionnelles (Fig.8D). Sachant que d'autres membres de la famille des LILRs sont N-glycosylés, et que cette modification post-traductionnelle s'est révélée essentielle à l'interaction de certains LILRs avec leurs ligands²⁴¹, nous avons vérifié si le traitement de sILT7 immunoprécipité avec la glycopeptidase F (PNGase F)

affectait son poids moléculaire. Suite au traitement à la PNGase F, les deux bandes majeures disparaissent pour n'en former qu'une, de poids moléculaire grandement réduit, détecté tout juste en dessous de la chaîne lourde des anticorps, dont le poids est légèrement affecté en présence du traitement PNGase F tel que rapporté par d'autres²⁴² (Fig.8E). Ceci confirme que notre protéine recombinante sILT7 est N-glycosylée d'où la détection de bandes multiples ou d'une bande d'apparence diffuse dans nos surnageants de culture. Tel que suggéré dans la littérature, ces modifications pourraient être cruciales à l'interaction de sILT7 avec son ligand naturel, BST2.

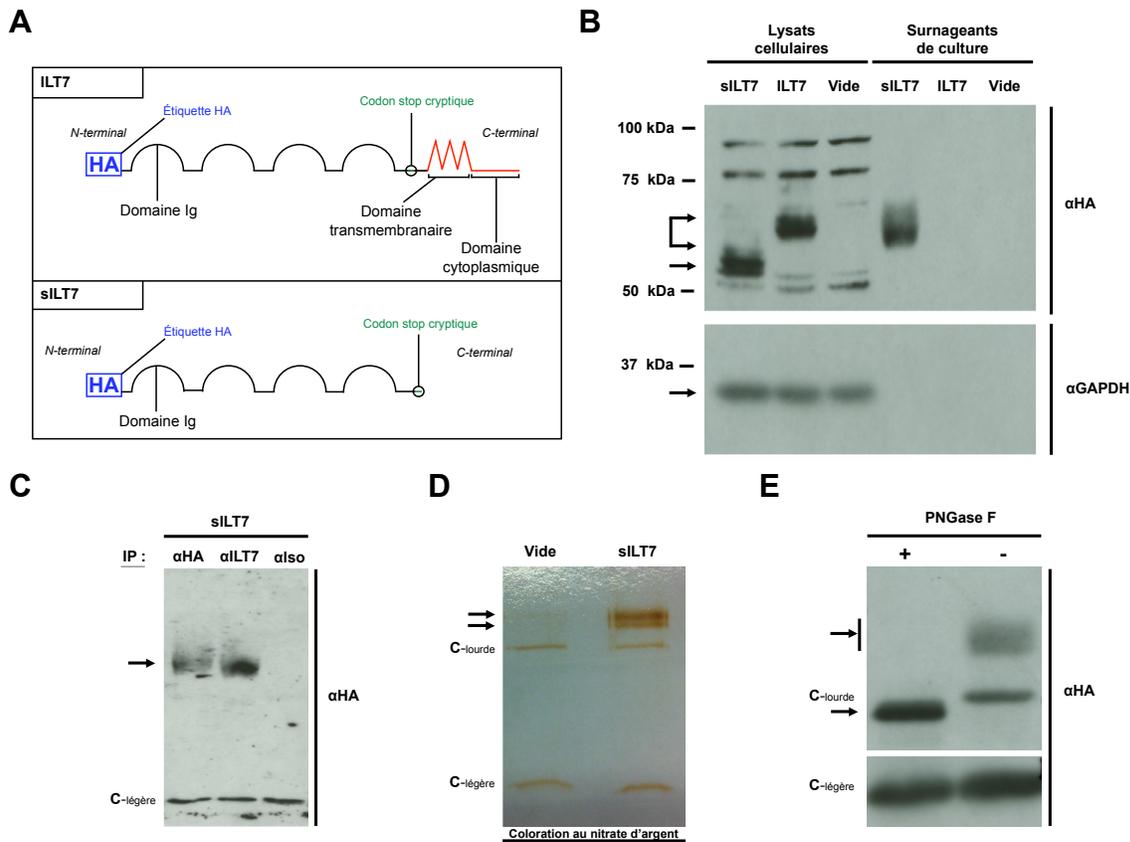


Figure 8: Caractérisation de la protéine recombinante sILT7 (A) Schéma de la topologie d'ILT7 sauvage et de la protéine recombinante sILT7 (sILT7). (B) Des cellules HEK293T furent transfectées avec l'expresseur de sILT7 (sILT7), de ILT7 (ILT7) ou un vecteur vide (Vide) puis l'expression des protéines HA-étiquetées fut évaluée 48 heures post-transfection dans les fractions cellulaires et les surnageants de culture par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps indiqués. (C) Les surnageants de cellules HEK293T transfectées avec sILT7 pour 48 heures furent immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-HA (αHA), d'anticorps anti-ILT7 (αILT7) ou de contrôles isotypiques (αIso), puis le contenu protéique de la fraction des

billes fut analysé par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps anti-HA. (D) Les surnageants de cellules HEK293T transfectées avec un vecteur vide ou sILT7 pour 48 heures furent immunoprécipités à l'aide de billes anti-HA, et l'élution de ces billes mises sur gel SDS-PAGE. La coloration au nitrate d'argent a révélé la présence de deux bandes analysées en spectrométrie de masse. (E) Les surnageants de cellules HEK293T transfectées avec sILT7 pour 48 heures furent immunoprécipités à l'aide de billes anti-HA qui furent traitées ou non à la glycosidase F (PNGase F), et dont l'élution fut analysée par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps anti-HA. Domaine Ig, Domaine immunoglobuline; IP, Immunoprécipitation; α ILT7, anticorps anti-ILT7; kDa, Kilodaltons. α HA, anticorps anti-HA; α iso, anticorps contrôle isotypique; C-légère, chaîne légère des anticorps; C-lourde, chaîne lourde des anticorps; PNGase F, glycosidase F.

La protéine recombinante sILT7 atténue l'effet immunorégulateur de Vpu. Après avoir validé la structure et l'état de N-glycosylation de la protéine recombinante sILT7, nous avons évalué si celle-ci pouvait interagir avec le BST2 des cellules MT4 infectées et ainsi prévenir l'activation du récepteur ILT7 à la surface des pDCs par compétition. Pour ce faire, des cellules MT4 furent infectées avec un virus WT ou delU. Après 48 heures, ces cellules furent mises en contact pour 2 heures avec les surnageants filtrés de cellules HEK293T transfectées avec un expresseur vide (Vide) ou avec l'expresseur de sILT7 (sILT7). Ensuite, des PBMCs de donneurs furent ajoutés aux cellules MT4 pour une durée de 18-24 heures, après quoi la concentration en IFN-1 des surnageants de culture fût évaluée. De manière intéressante, nous avons observé que l'addition de protéines sILT7 est associée à une hausse de la réponse IFN-1, de sorte à atténuer considérablement l'effet immunorégulateur de Vpu sur les pDCs (Fig.9A-B). Ces résultats suggèrent que notre protéine soluble peut faire concurrence à l'ILT7 exprimé à la surface des pDCs pour le BST2 des cellules infectées, provoquant une sécrétion accrue d'IFN-1 résultant du niveau d'activation amoindri de ce récepteur inhibiteur. Ces observations renforcent la pertinence de l'interaction entre ILT7 et BST2 dans la régulation de l'activité antivirale des pDCs en réponse aux cellules infectées par le VIH-1.

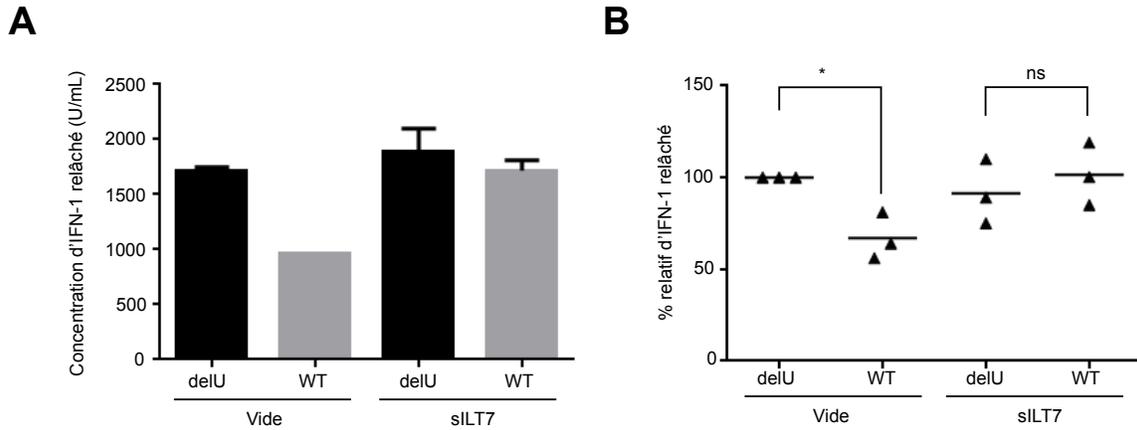


Figure 9: L'ajout des protéines sILT7 aux co-cultures atténue l'effet immunorégulateur de Vpu. (A) Exemple représentatif des concentrations d'IFN-1 recueillies dans les surnageants de cellules MT4 infectées avec un virus exprimant Vpu (WT) ou n'exprimant pas Vpu (delU) et préincubées avec des surnageants contenant (sILT7) ou ne contenant pas (Vide) la protéine sILT7, puis cultivées avec les PBMCs d'un donneur en santé pendant 18-24 heures. (B) Pourcentages relatifs d'IFN-1 produits après la co-culture cellules MT4 infectées avec un virus WT ou delU et préincubées avec des surnageants contenant (sILT7) ou ne contenant pas (Vide) la protéine sILT7, puis co-cultivées avec les PBMCs de donneurs en santé pendant 18-24 heures. La quantité d'IFN-1 produite dans la condition des cellules MT4 infectées avec un virus delU et préincubées avec des surnageants Vide est établie à 100% (* $p < 0.05$, $n = 3$, à partir de différents donneurs). Vide, surnageants de culture de 48 heures transfectées avec un vecteur vide; sILT7, surnageants de culture de 48 heures transfectées avec un sILT7; WT, virus de type sauvage; delU, virus n'exprimant pas Vpu.

Chapitre 4: DISCUSSION

Depuis un certain nombre d'années, diverses études ont permis de démontrer que la protéine accessoire du VIH-1, Vpu, a la capacité de modifier la composition du protéome de surface. Cette habileté lui permet de contrôler la présence de molécules impliquées (directement ou indirectement) au niveau de la réponse immunitaire antivirale. Parmi les cibles de Vpu se trouvent ainsi diverses molécules de surface impliquées dans des fonctions aussi variées que la costimulation²⁴³, la présentation antigénique²⁴⁴, la migration²⁴⁵ et la restriction virale, comme le démontre le cas de BST2¹²⁴. À ce titre, la première fonction décrite de BST2, soit l'inhibition de la relâche de divers virus enveloppés, a attiré beaucoup d'attention depuis les dernières années. Grâce aux nombreuses études menées à ce jour, notre compréhension des mécanismes par lesquels Vpu atténue cette fonction a grandement progressé. Plus récemment, de nouvelles fonctions de BST2 ont été proposées. Il a ainsi été observé que BST2 peut agir à titre de senseur inné de l'assemblage de nouvelles particules virales, menant à l'activation de la voie NF- κ B²⁴⁶. Parallèlement, sa capacité de régulateur immunitaire a été révélée à travers son interaction naturelle avec le récepteur ILT7¹⁶⁹. Si l'impact de l'antagonisme de BST2 par Vpu sur la relâche virale a été abondamment étudié, nous nous sommes à travers cette étude focalisés sur les conséquences de l'antagonisme de Vpu sur la récente fonction de régulateur immunitaire décrite de BST2, dans le contexte de l'infection par le VIH-1.

Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent une nouvelle fonction de l'antagonisme de BST2 par Vpu qui permet aux cellules T CD4+ infectées par le VIH-1 de contrôler la réponse antivirale de type IFN-1 médiée par les pDCs. En effet, nous avons d'abord observé que la protéine Vpu était directement responsable d'une profonde réduction de la production d'IFN-1 par les pDCs mis en culture avec des cellules T CD4+ infectées (Fig.5). Des résultats non publiés produits par notre laboratoire et obtenus à travers l'utilisation de lignées cellulaires T CD4+ déplétées ou non de BST2 ont démontré

que cet effet de Vpu était dépendant de l'expression de BST2. L'utilisation d'anticorps anti-BST2 bloquants a ensuite indiqué que c'est plus précisément l'interaction de BST2 avec un partenaire *en trans* qui est essentiel à l'effet de réduction de la production d'IFN-1 des pDCs par Vpu. Compte tenu de l'interaction suggérée de BST2 avec ILT7, nous avons alors observé que la déplétion d'ILT7 des pDCs phénocopie la déplétion de BST2 au niveau des cellules T CD4+ infectée, suggérant pour la première fois le caractère essentiel de cette interaction dans l'effet immunorégulateur qu'exerce Vpu. Enfin, l'élaboration et la production d'une protéine recombinante soluble d'ILT7 puis plus spécifiquement son utilisation comme inhibiteur compétitif dans notre système de co-culture a davantage suggéré l'importance de l'interaction ILT7-BST2 dans le contrôle de la réponse IFN-1 Vpu-dépendant des cellules infectées par le VIH-1.

Une étude récente a démontré qu'en absence de Vpu, la restriction massive de virions à la surface des cellules T CD4+ pouvait mener BST2 à activer la voie NF- κ B et provoquer la production d'IFN-1 chez ces cellules. Ceci suggère que ces cellules ont pu contribuer à la production totale d'IFN-1 dans notre système de co-culture. Ceci dit, compte tenu du fait que nous n'avons pas détecté d'IFN-1 au niveau de nos cellules infectées seules (résultats non publiés) ou cultivées en absence de pDCs (Fig.5B), nous considérons que cette source d'IFN-1, si présente, est négligeable comme d'autres l'ont observé²⁴⁷.

La pertinence de l'interaction entre BST2 et ILT7 dans le contrôle de la réponse IFN-1 a récemment été mise en doute par un groupe de recherche²⁴⁸. En effet, les auteurs de l'étude ont notamment étudié l'effet d'anticorps anti-BST2 monoclonal 26F8 (26F8) sur la production d'IFN-1 de PBMCs stimulées avec un agoniste de TLR9, donc pDC-spécifique. N'ayant pas observé de différence significative dans ces conditions, même après avoir induit l'expression de BST2 au niveau des cellules avoisinantes des pDCs, les auteurs ont finalement questionné l'importance du potentiel immunorégulateur de BST2. Nous avons exploré cette question en comparant l'efficacité de blocage interactionnel avec notre anticorps polyclonal anti-BST2, pour découvrir que l'anticorps

26F8 ne bloque que partiellement (environ 50%) l'attache de notre anticorps. Ceci suggère que cet anticorps monoclonal ne couvre qu'une partie limitée des sites d'interaction potentiels de BST2. Il se peut ainsi que contrairement à l'activité bloquante complète démontrée par notre anticorps (Fig.6B) cet anticorps ne prévienne tout simplement pas efficacement l'interaction de BST2 avec ILT7. Par ailleurs, l'utilisation d'agonistes synthétiques de TLRs ne force pas nécessairement des contacts cellule à cellule entre les pDCs et leurs cibles, contrairement à ce qui se produit lors de la détection efficace des cellules infectées par les pDCs²⁰¹. Il est possible que l'interaction entre BST2 et ILT7 prenne toute son importance dans un contexte où les cellules cibles et effectrices sont reconnues pour former une synapse virale, lieu de diverses interactions activatrices et inhibitrices.

Notons que nous n'avons pas été en mesure de produire de données démontrant l'interaction directe entre BST2 et ILT7, ou entre BST2 et notre protéine recombinante soluble sILT7. À ce titre, nous menons présentement des études d'interaction avec des collaborateurs détenant une expertise technique dans le domaine de la résonance des plasmons de surface, une méthode de mesure sensible et quantitative de la liaison d'un ligand à son récepteur potentiel adsorbé à la surface d'une couche métallique basée sur la variation de l'indice de l'interface en présence d'interaction²⁴⁹. En plus reproduire les résultats du groupe de recherche ayant initialement décrit l'interaction entre BST2 et ILT7¹⁶⁹, l'obtention de telles données viendra appuyer davantage nos résultats et le modèle proposé dans ce mémoire.

Les résultats présentés ici révèlent le caractère paradoxal de l'antagonisme de BST2 par Vpu. En effet, nous avons initialement été surpris que la réduction des niveaux de surface de la protéine BST2 favorise son interaction de surface avec le récepteur des pDCs ILT7. À ce titre, il est important de noter que cette réduction de surface n'est que partielle, soit de l'ordre de 50% dans les lignées qui ont été utilisées pour générer les résultats présentés. Dans notre cas, nous avons observé que l'un ou l'autre des extrêmes d'expression de surface de BST2, soit la déplétion ou son expression de surface intacte

par l'absence de Vpu, ne sont pas propices à l'immunorégulation de la réponse IFN-1. Pour mieux comprendre ce phénomène, un membre de notre laboratoire, Dr Bego, a fait usage d'un mutant de BST2 dépourvu de son ancre GPI (delGPI) et ainsi incapable de restreindre la relâche virale et donc potentiellement incapable de provoquer un encombrement stérique. Dans ces résultats non publiés, une abrogation dominante de la réponse IFN-1, en absence comme en présence de Vpu chez les cellules infectées, fut observée. De ces résultats combinés à ceux présentés dans ce mémoire découlent l'hypothèse suivante: En absence de Vpu, la restriction massive de BST2 se traduit par une accumulation massive de virions à la surface cellulaire par BST2 pouvant causer un encombrement stérique nuisant à plusieurs interactions en *trans*, dont celle entre BST2 et ILT7 (Fig.10). En plus des résultats issus de l'utilisation de ce mutant de BST2 delGPI, ce modèle est soutenu par des analyses de microscopie électronique démontrant qu'en absence de Vpu, la cellule infectée est littéralement enrobée de particules virales pouvant causer un tel encombrement²⁵⁰.

Pour mieux comprendre le phénomène d'immunorégulation décrit ici, il sera important de caractériser plus amplement la population de BST2 de surface résiduelle persistant en présence de Vpu. Une piste d'explication derrière ce phénomène pourrait provenir de la récente découverte de deux isoformes cellulaires de BST2. En effet, une étude récente a démontré que la traduction de BST2 pourrait être initiée à partir de deux méthionines distinctes donnant lieu à ces deux formes - une longue et une courte, raccourcie au niveau de son domaine cytoplasmique -. Ces deux isoformes ont été retrouvées tant au niveau de lignées cellulaires que de cellules primaires²⁵¹. De manière intéressante, celles-ci ne présentent pas exactement la même activité biologique, bien que toutes deux maintiennent la capacité de restreindre la relâche virale. En effet, chez l'isoforme court de BST2, l'absence de 12 résidus N-terminaux cytoplasmiques serait responsable de l'incapacité de cette forme à activer NF- κ B et de son recyclage et endocytose ralentie en raison de l'absence de motifs YxY d'endocytose. Plus encore, l'isoforme court exhibe une sensibilité réduite à l'action de Vpu en raison de l'absence de résidus sérine, thréonine et tyrosine présents quant à eux chez l'isoforme long²⁵¹. Il est ainsi tentant de spéculer

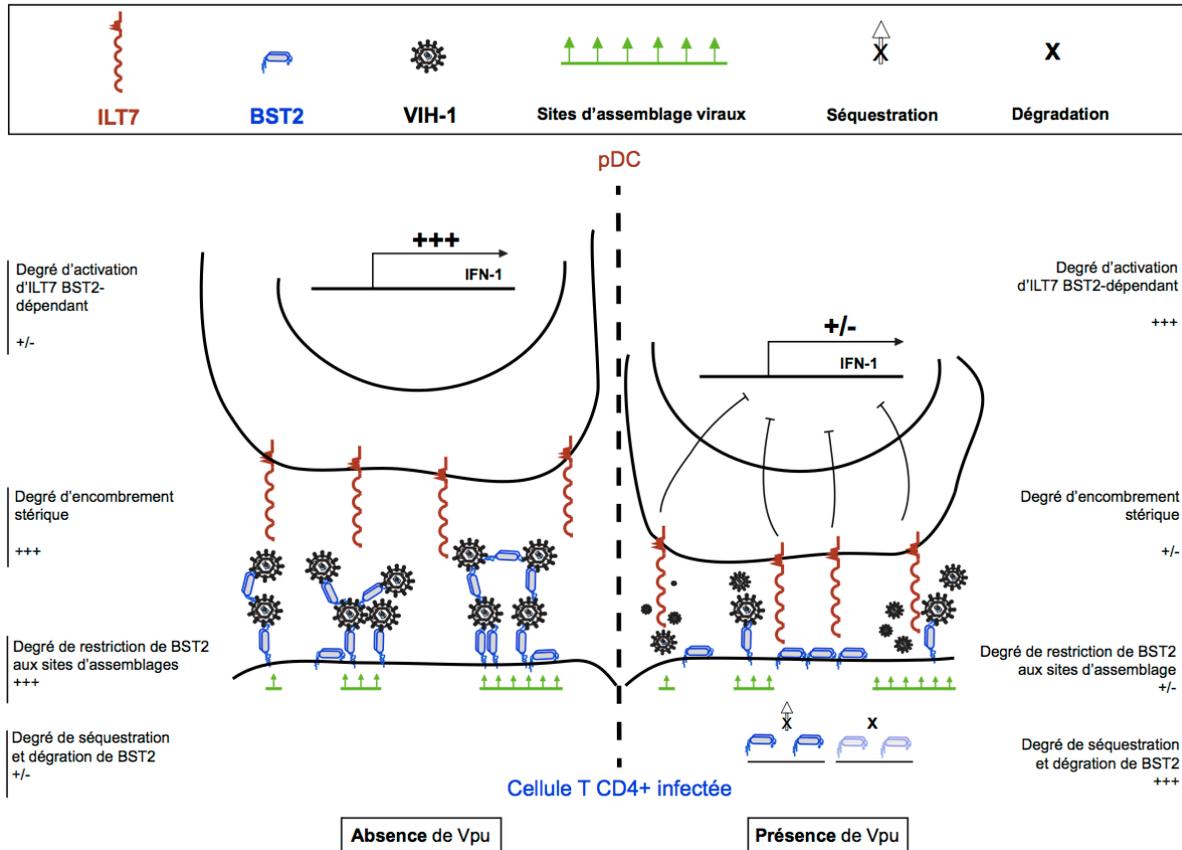


Figure 10: Modèle d'action double de Vpu. La protéine Vpu cause la séquestration intracellulaire, la dégradation et la relocalisation membranaire de BST2, affectant ultimement la présence et la fonction de ce facteur de restriction à la surface cellulaire. En plus de réduire les niveaux de surface de BST2, Vpu cause également le déplacement de cette dernière hors des sites d'assemblages viraux (indiqués en vert) pour favoriser la relâche virale. Dans ce contexte, Vpu favorise la présence de molécules de BST2 libres en surface ce qui pourrait limiter l'accumulation massive de virions en surface et l'encombrement stérique en résultant. Ceci pourrait accroître l'interaction en *trans* de BST2 avec le récepteur inhibiteur de la sécrétion d'IFN-1 des pDCs, ILT7. L'antagonisme de BST2 par Vpu pourrait ainsi jouer un double rôle favorable au virus, tant sur le plan de la relâche virale que de l'évasion de la réponse antivirale de type IFN-1 des pDCs.

qu'en présence de Vpu, la population résiduelle de BST2 pourrait être principalement composée de l'isoforme court de BST2 car moins sensible à son action. Le phénotype immunorégulateur retrouvé en présence de Vpu pourrait donc être la conséquence de la surreprésentation de cette forme et de leurs propriétés uniques, en termes d'activité biologique, de trafic et de localisation membranaire. Pour répondre directement à cette hypothèse, l'infection de cellules T CD4+ modifiées pour exprimer exclusivement l'une ou l'autre de ces isoformes avec des virus WT et delU et leur détection par des pDCs

devrait répondre à cette question. Dans ces conditions, nous pourrions déterminer si l'effet immunorégulateur de Vpu dépend de la surreprésentation active de l'une ou l'autre de ces isoformes de BST2 et de particularités biologiques qui leur sont propres. De plus, il sera également intéressant d'évaluer le degré d'encombrement stérique résultant de la présence exclusive de l'une ou l'autre de ces isoformes.

Dans un tout autre ordre d'idée, l'effet immunorégulateur que nous avons décrit ici a été observé lors de l'utilisation de VIH-1 pandémique du groupe M, reconnu pour exercer le plus fort antagonisme de BST2 lorsque comparé aux groupes non pandémiques²⁵². En effet, le groupe M est le seul à avoir octroyé à Vpu, plutôt que Nef, le rôle d'antagoniste de BST2 chez l'humain²⁵³. L'absence de cette adaptation fonctionnelle de Vpu chez les groupes N, O et P expliquerait leur incapacité à efficacement antagoniser BST2²⁵². À ce titre, il serait intéressant d'évaluer l'amplitude de la sécrétion d'IFN-1 des pDCs en réponse aux cellules infectées par les groupes de VIH-1 non pandémiques, et si le phénomène de modulation de cette réponse antivirale a effectivement lieu entièrement à travers l'antagonisme de BST2 dans ces cellules.

Il a récemment été démontré dans des modèles d'infection de souris humanisées que l'antagonisme de BST2 par Vpu faisait de cette protéine accessoire un contributeur majeur de la propagation virale lors de la phase aiguë de l'infection^{254,255}. Dans ce contexte, la relâche efficace du plus grand nombre de particules libres serait cruciale considérant la dominance de cette voie de transmission à ce stade de l'infection. Chez ces animaux, la profonde différence de virémie observée reflète la nécessité de la protéine accessoire Vpu pour la réplication optimale du virus *in vivo* et permet de constater l'ampleur de la barrière naturelle à l'infection que représente BST2. Ceci dit, il faudra éventuellement évaluer quelle part de cette restriction prennent les fonctions récemment décrites de BST2, soit de senseur et de régulateur immunitaire. Compte tenu du fait que la majorité de la détection des pDCs a lieu au travers de contacts cellule à cellule, il est possible que cet effet particulier de Vpu prenne toute son importance lors de ce type de transmission, ou encore avec dans certains compartiments physiologiques

ou tissus favorisant ce type de contact et/ou contenant une fréquence accrue de pDCs. Quel que soit le contexte, une meilleure compréhension des mécanismes et des voies de signalisation par lesquels Vpu module la fonction antivirale des pDCs constitue une voie de recherche importante dans notre compréhension des déterminants de pathogénèse et de transmission virale. À ce titre, l'implication du récepteur ILT7 décrite ici s'inscrit dans un courant d'études supportant un rôle émergent pour plusieurs membres de la famille des LILR qui, en raison de leur influence sur la fonction de plusieurs cellules présentatrices d'antigènes, pourraient influencer la pathogénèse du VIH-1²⁵⁶. L'étude approfondie de cette voie d'évasion immunitaire du VIH-1 pourrait nous aider à mieux comprendre la dysfonction observée des pDCs au fil de la progression de la maladie et permettre l'élaboration de stratégies visant le rétablissement de ces fonctions antivirales dans un cadre thérapeutique.

Chapitre 5: CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire font état d'une nouvelle fonction de l'antagonisme de BST2 par Vpu au niveau de la régulation de l'activité antivirale des pDCs en réponse aux cellules infectées par le VIH-1. Pour ce faire, nous avons d'abord démontré que l'expression de la protéine accessoire Vpu dans les cellules infectées réduisait leur détection par les pDCs, tel que mesurée par la production d'IFN-1. Plus encore, nos résultats suggèrent que cette fonction de Vpu est directement dépendante de l'interaction de BST2 de surface avec un partenaire en *trans*. Nous avons ensuite réaffirmé la pertinence physiologique de l'interaction proposée entre BST2 et ILT7, en démontrant que l'effet de Vpu était tout aussi dépendant de la disponibilité interactionnelle du BST2 de surface que de l'expression du récepteur ILT7 chez des pDCs. Plus encore, nous avons directement impliqué cette interaction dans l'amplitude de la réponse IFN-1 lorsque nous avons observé l'absence d'inhibition de la réponse IFN-1 après l'ajout de notre protéine recombinante soluble d'ILT7 dans notre système de détection.

De nombreuses études devront être entreprises afin de prouver l'importance du couple interactionnel BST2-ILT7 dans la modulation de la fonction antivirale des pDCs au fil de l'infection par le VIH-1 tel que suggéré dans cette étude. La démonstration récente du fait que les niveaux de ILT7 sont sévèrement réduits chez les individus infectés, et que le traitement au HAART restaure le niveau d'expression et le pourcentage de cellules exprimant ILT7, pourrait refléter l'importance que revêt cette molécule dans l'infection au VIH-1²⁵⁷. Il est possible qu'au début de l'infection, les cellules infectées contrôlent la production d'IFN-1 par les pDCs à travers l'interaction BST2-ILT7, de sorte à assurer un faible niveau d'expression des gènes stimulés par l'IFN-1. Ceci permettrait une forte réplication locale, phénomène nécessaire au succès de la transmission mucosale et ultimement à la dissémination systémique du virus²⁵⁸. Pour cette raison, l'étude approfondie de la régulation de l'activité des pDCs qu'exerce Vpu pourrait révéler une

vulnérabilité précoce du virus potentiellement exploitable dans le cadre de l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant la transmission et la pathogénèse du VIH-1.

CONTRIBUTIONS PRINCIPALES DES TRAVAUX

- ⊙ Vpu abroge la sécrétion d'IFN-1 par les pDCs détectant les cellules infectées par le VIH-1.
- ⊙ Pour exercer cet effet, Vpu requiert la présence de molécules libres de BST2 en surface, afin que ces dernières interagissent avec un partenaire en *trans*.
- ⊙ Le contrôle de la sécrétion d'IFN-1 par Vpu nécessite l'expression du récepteur de BST2, ILT7, au niveau des pDCs.
- ⊙ L'ajout d'une forme soluble du récepteur ILT7 semble faire concurrence à l'ILT7 endogène présent à la surface des pDCs pour l'interaction avec le BST2 exprimé à la surface des cellules T CD4+, interférant ainsi avec la répression de la réponse IFN-1 des pDCs à travers ce ligand.

Chapitre 6: MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Anticorps et réactifs. Les anticorps anti-BST2 polyclonaux proviennent de l'immunisation de lapin avec une protéine produite dans des bactéries et marquée avec la Gluthation S-Transférase (GST) contenant un polypeptide correspondant aux acides aminés 40-180 du BST2 humain. Le sérum préimmun de lapin fut collecté avant l'immunisation des lapins. Les anticorps monoclonaux de souris anti-BST2 26F8 (eBioscience), anti-HA.11 clone 16B12 (Covance), anti-GAPDH clone 14C10 (Cell Signaling Technology) anti-CD4_PerCP/Cy5.5 (Biolegend), anti-CD3_Pacific Blue (Biolegend), anti-CD14_PE/Texas Red (Caltag), anti-CD303(BDCA2)_APC (Miltenyi Biotech), anti-ILT7_PE (Biolegend), les billes anti-HA (Sigma), les billes d'agarose couplées à la protéine G (Invitrogen) et la PNGase F (New England Biolabs) furent tous obtenus de source commerciale tel qu'indiqué. L'interféron ($\text{rIFN}\alpha 2\text{a}$) fut obtenu de PBL. Les contrôles agonistiques de TLR7 (Imiquimod, utilisé à une concentration finale de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou de TLR9 (ODN 2216 CpG-A, utilisé à une concentration finale de 5 μM) furent obtenus de Invivogen.

Isolation et purification des cellules primaires. Les échantillons de sang périphérique furent prélevés à partir de donneurs adultes en santé ayant donné leur consentement, conformément à la Déclaration de Helsinki et avec l'approbation du comité d'éthique de la recherche de l'Institut de recherches cliniques de Montréal. Les PBMCs furent isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll (GE Healthcare) puis cultivées dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum de bovin foetal (SBF). Les pDCs furent isolés à partir de PBMCs par sélection négative en utilisant l'ensemble d'isolation de cellules dendritiques plasmacytoïdes Diamond II (Miltenyi Biotech).

Marquage de surface et analyse de cytométrie en flux. Pour l'analyse des niveaux de surface de BST2, les cellules sont suspendues dans un tampon phosphate

salin à une concentration de 1×10^6 cellules/mL puis marquées avec des anticorps anti-BST2 ou avec un sérum préimmun de lapin pendant 45 minutes à 4 degrés Celsius ($^{\circ}\text{C}$). Après l'incubation, les cellules sont lavées avec du tampon phosphate salin (TPS) et marquées avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome approprié, pendant 30 minutes à 4°C et à la noirceur. Pour l'identification de populations de cellules du sang périphérique de donneurs, les PBMCs ou les pDCs purifiés furent suspendus dans du TPS à une densité de 2×10^8 et 5×10^4 cellules/mL respectivement, bloquées avec des anticorps IgG humains puis marqués avec des anticorps primaires pré-couplés avec les fluorochromes appropriés pendant 30 minutes à 4°C , puis lavées dans du TPS avant d'être analysées en cytométrie en flux. Les populations de pDCs furent identifiées par leur patron d'expression des marqueurs suivants: CD3-/CD14-/BDCA2+/CD123+/ILT7+. Les intensités de fluorescence furent acquises à l'aide d'un cytomètre de flux Cyan ADP flow (Beckman) et les données furent analysées avec le logiciel FlowJo v.9.7 (Treestar).

Plasmides et virus. Les deux clones infectieux du VIH-1 utilisés proviennent d'un expresseur pNL4.3 sauvage de souche X4, chez lequel le gène Nef est suivi d'un site d'entrée interne qui permet l'expression de la protéine fluorescente verte (pNL4.3-GFP WT)⁹³. Identique au pNL4.3-GFP WT à l'exception de l'absence d'expression de Vpu, le clone pNL4.3-GFP delU fut construit en insérant un fragment Sall-KpnI de la construction n'exprimant pas Vpu pNLVDEL1²⁵⁹ dans le clone pNL4.3-GFP WT. Les virus pNL4.3_WT et delU furent produits suite à la transfection par phosphate de calcium de cellules HEK293T. 2 jours après la transfection de ces cellules, les virus contenus dans les surnageants de culture furent concentrés par ultracentrifugation. Les productions virales furent titrées à l'aide du système de cellules TZM-bl tel que décrit auparavant¹⁴⁰. Les cellules de la lignée TZM-bl sont permissives à l'infection par le VIH et expriment le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un LTR du VIH de sorte à permettre la titration des productions virales. L'expression de la luciférase est quantifiée sous forme d'unités relatives de luminescence dont les valeurs sont directement proportionnelles au nombre de particules infectieuses présentes dans l'inoculum.

Culture cellulaire. Les lignées cellulaires HEK293T (ATCC) furent cultivées dans du milieu DMEM auquel fût ajouté 10% de SBF, et les cellules MT4 (Programme de réactifs SIDA du NIH) dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% SBF. Les cellules indicatrices TZM-bl (Programme de réactifs SIDA du NIH) et la lignée de cellules HEK-Blue rapportrices de l'IFN- α/β (InvivoGen) sont cultivées dans du milieu DMEM auquel fût ajouté 10% SBF.

Co-cultures. Deux jours avant la co-culture, les cellules MT4 sont infectées à différentes multiplicités d'infection avec des virus WT ou delU. Le jour de la co-culture, le pourcentage de cellules GFP-positives est déterminée par cytométrie en flux à titre de marqueur d'infection. Les cultures avec un taux d'infection variant entre 15%-35% sont subséquemment choisies pour la co-culture. Les cellules sont co-cultivées un volume final de 250 μ l à un ratio de 3:1 (PBMC:cellule MT4) ou 1:5 (pDC:cellule MT4) dans une plaque en U de 96 puits pour 18-22 heures. Chaque puits reçoit ainsi le même nombre de cellules primaires et de cellules cibles MT4 infectées. Pour ce qui est des contrôles de viabilité et de fonctionnalité des pDCs, un même nombre de cellules primaires est parallèlement traité avec les agonistes de TLR7 et TLR9 pour 18-22 heures selon les recommandations du manufacturier. Dans tous les cas, les co-cultures sont ensuite transférées dans une plaque en V de 96 puits, puis centrifugées pour 5 minutes à 400xg. La concentration d'IFN-1 de ces surnageants est alors quantifiée à l'aide de la lignée reportrice HEK-Blue.

Quantification des concentrations d'IFN-1. La lignée cellulaire HEK-Blue reportrice de l'IFN- α/β (InvivoGen) fut utilisée pour mesurer les niveaux d'IFN-1 bioactifs dans les surnageants de culture. Cette lignée de cellules HEK293 a été modifiée pour exprimer un gène de phosphatase alcaline sous le contrôle d'un promoteur activé par la signalisation de l'IFN-1. Les niveaux de phosphatase alcaline sécrétés sont déterminés, puis convertis en valeurs d'IFN-1 (unités/mL). Les valeurs de concentration d'IFN-1 furent extrapolées à partir de la droite de régression établie à l'aide

d'échantillons aux concentrations d'IFN-1 connues, selon les recommandations du fabricant.

Analyses statistiques. Les analyses statistiques furent obtenues à partir de test ANOVA ou de test t pairé de Student. La valeur p considérée comme significative a été établie à $p < 0.05$.

Détection de protéines par immunobuvardage de type Western. Les cellules furent lysées dans une solution de Triton 1% (25 mM Tris, Triton 1%, 150 mM NaCl) dans lequel des inhibiteurs de protéase avec ou sans EDTA furent rajoutés (Roche). Les lysats cellulaires furent migrés sur gel SDS-PAGE et analysés en immunobuvardage de type Western.

Coimmunoprécipitation. Dans une plaque de 6 puits, des cellules HEK293T furent transfectées pendant 48 heures, puis leurs surnageants furent clarifiés à 1200 tours par minute («Rounds per minute, rpm») pendant 5 minutes. À ces surnageants furent ajoutés 50 ul de billes anti-HA ou 50 ul de billes d'agarose G couplées à des anticorps anti-HA, anti-ILT7 ou à un contrôle isotypique approprié. Le volume final fût ajusté à 5 mL avec du milieu DMEM, puis les tubes furent incubés sur plaque avec rotation durant la nuit à 4 degrés Celsius. Le lendemain, les billes furent lavées avec du tampon de lyse Triton 1%, resuspendues dans un total de 150 ul et bouillies pour 5 minutes. La composition protéique du surnageant de ces billes fut ensuite analysé par immunobuvardage de type Western ou encore par coloration au nitrate d'argent.

Traitement à la PGNase F. Dans une plaque de 6 puits, des cellules HEK293T furent transfectées avec l'expressor de sILT7 pendant 48 heures, puis les surnageants furent clarifiés à 1200 rpm pendant 5 minutes, puis récoltés. À ces surnageants furent ajoutés 50 ul de billes anti-HA et le volume final de chaque échantillon ajusté à 5 mL avec du milieu DMEM. Les échantillons furent ensuite incubés sur plaque rotative pendant 12 heures à 4°C. Les billes furent ensuite isolées par sédimentation, puis lavées et traitées

ou non à la PNGase F pour la nuit selon les recommandations du manufacturier. Le lendemain, les billes furent isolées, puis bouillies dans un volume final de 150 µl. La composition protéique du surnageant de ces billes fut ensuite analysé par immunobuvardage de type Western.

Déplétion des niveaux endogènes d'ILT7 des pDCs. Les pDCs fraîchement isolés par sélection négative furent maintenus dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de SBF puis traités avec les petits ARN interférents ON-TARGETplus SMARTpool visant ILT7 (Thermo Scientific, #Cat: L-012449-00) ou avec un contrôle négatif visant la protéine du complément C8b (Thermo Scientific, #Cat: L-011004-00) à une concentration finale de 250 nM et à l'aide d'Oligofectamine (Lifetechnologies), selon les recommandations du manufacturier. 6 heures suite à la transfection, les milieux de culture furent changés puis les pDCs cultivés avec les cellules MT4 infectées tel que décrit ci-haut.

Spectrométrie de masse. 48 heures après la transfection de cellules HEK293T avec un vecteur vide ou un expresseur de sILT7, les surnageants de culture furent clarifiés par centrifugation et immunoprécipités pendant 18 heures à l'aide de 50 µl de billes anti-HA (Sigma) avec agitation et à 4°C. Les protéines immunoprécipités furent ensuite éluées deux fois, à l'aide de 50 µl de peptides HA (Anaspec) à une concentration de 1mg/mL, à 30°C pendant 15 minutes. Les éluats furent bouillis pendant 5 minutes, puis 30 µl de chaque éluat fut migré sur gel SDS-PAGE. Le gel fut ensuite coloré au nitrate d'argent, les bandes appropriées excisées, et les protéines extraites puis préparées pour leur analyse en spectrométrie de masse par le personnel du plateau de protéomique de l'Institut de recherches cliniques de Montréal. Le logiciel Scaffold (version 4.3.4) a été utilisé pour l'analyse et l'identification des peptides générés par la digestion enzymatique des échantillons.

Production des protéines recombinantes sILT7. Des cellules HEK293T confluentes à 80% furent transfectées avec 4 µg de l'expresseur de sILT7 à l'aide de

Lipofectamine 2000 (Lifetechnologies) par puits de plaque de 6 puits dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF selon les recommandations du manufacturier. Après 48 heures, les surnageants de cultures sont clarifiés par centrifugation à une vitesse de 1500 rpm pendant 5 minutes puis filtrés au travers de pores d'un diamètre de 0,2 μm (SARSTEDT) avant leur utilisation expérimentale. Alternativement, des cellules HEK293T confluentes à 30% dans un Pétri de culture de 15 cm sont transfectées avec 60 μg de l'expressor d'ILT7 par la méthode de transfection au phosphate de calcium. Après 48 heures, les surnageants de cultures sont clarifiés par centrifugation à 1500 rpm pour 5 minutes et filtrés tel que décrit ci-haut avant leur utilisation expérimentale.

Chapitre 7: RENSEIGNEMENTS SUPPLÉMENTAIRES



Figure S1: Analyse protéomique de la protéine recombinante sILT7. (A-B) Pourcentage de couverture peptidique de la protéine ILT7 sauvage contenus dans les échantillons de la bande supérieure (Bande A) et inférieure (Bande B) détectées par coloration au nitrate d'argent. Les peptides détectés pour chaque bande sont indiqués en jaune, et le nombre de ces peptides qui sont uniques et exclusifs à la protéine ILT7 sauvage est indiqué pour chaque bande. En rouge sont encadrés le début et la fin de la séquence d'acides aminés de la protéine recombinante sILT7. La séquence du domaine transmembranaire de la protéine ILT7 sauvage est sous-lignée en vert. Surlignées en vert se trouvent l'ensemble des méthionines présentes dans les peptides détectés. Le logiciel Scaffold a servi à l'analyse des données de spectrométrie de masse. La séquence de référence de ILT7 sauvage du numéro de référence NCBI suivant: NP_036408.3.

CRÉDIT D'AUTEUR ET DIFFUSION

Les résultats présentés ici ont été produits par Édouard A. Côté et font partie d'un manuscrit en préparation. La mise au point du système de co-culture et la conception de l'expérience de blocage par anticorps présentée sont attribuables à Mariana Bego et Éric Cohen. La mise au point de l'expérience de déplétion par petits ARN interférents présentée ainsi que la conception et la production de la protéine recombinante sILT7 est attribuable à Édouard A. Côté. L'utilisation de la protéine recombinante sILT7 dans le système de co-culture a été mise au point par Édouard A. Côté et Éric Cohen. Édouard A. Côté a présenté une partie des résultats présentés ici à la journée des étudiants SIDA/MI du FRSQ en novembre 2013.

Chapitre 9: RÉFÉRENCES

- 1 Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **30**, 250-252 (1981).
- 2 Sepkowitz, K. A. AIDS--the first 20 years. *The New England journal of medicine* **344**, 1764-1772, doi:10.1056/NEJM200106073442306 (2001).
- 3 Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
- 4 Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **1**, a006841, doi:10.1101/cshperspect.a006841 (2011).
- 5 Merson, M. H., O'Malley, J., Serwadda, D. & Apisuk, C. The history and challenge of HIV prevention. *Lancet* **372**, 475-488, doi:10.1016/S0140-6736(08)60884-3 (2008).
- 6 UNAIDS. *Global Report*, <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf> (2013).
- 7 Thormar, H. The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus. *Current HIV research* **11**, 2-9 (2013).
- 8 Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology* **17**, 657-700, doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.657 (1999).
- 9 Campbell, S. & Rein, A. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *Journal of virology* **73**, 2270-2279 (1999).
- 10 McKenna, P. M., Pomerantz, R. J., Dietzschold, B., McGettigan, J. P. & Schnell, M. J. Covalently linked human immunodeficiency virus type 1 gp120/gp41 is stably anchored in rhabdovirus particles and exposes critical neutralizing epitopes. *Journal of virology* **77**, 12782-12794 (2003).
- 11 Orentas, R. J. & Hildreth, J. E. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS research and human retroviruses* **9**, 1157-1165 (1993).
- 12 Reeves, J. D. & Doms, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology* **83**, 1253-1265 (2002).
- 13 Sundquist, W. I. & Krausslich, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006924, doi:10.1101/cshperspect.a006924 (2012).
- 14 Malim, M. H. & Emerman, M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell host & microbe* **3**, 388-398, doi:10.1016/j.chom.2008.04.008 (2008).
- 15 Frankel, A. D. & Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry* **67**, 1-25, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1 (1998).

- 16 Parada, C. A. & Roeder, R. G. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* **384**, 375-378, doi:10.1038/384375a0 (1996).
- 17 Freed, E. O. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* **26**, 13-33 (2001).
- 18 Wu, L. *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183, doi:10.1038/384179a0 (1996).
- 19 Liao, F. *et al.* STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *The Journal of experimental medicine* **185**, 2015-2023 (1997).
- 20 Deng, H. K., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N. & Littman, D. R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300, doi:10.1038/40894 (1997).
- 21 Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K. & Cullen, B. R. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74 (1991).
- 22 Berger, E. A. *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240, doi:10.1038/34571 (1998).
- 23 Weissenhorn, W. *et al.* Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Molecular membrane biology* **16**, 3-9 (1999).
- 24 Jacobs, A., Simon, C. & Caffrey, M. Thermostability of the HIV gp41 wild-type and loop mutations. *Protein and peptide letters* **13**, 477-480 (2006).
- 25 Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. & Melikyan, G. B. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**, 433-444, doi:10.1016/j.cell.2009.02.046 (2009).
- 26 Jayappa, K. D., Ao, Z. & Yao, X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *International journal of biochemistry and molecular biology* **3**, 70-85 (2012).
- 27 Lanchy, J. M. *et al.* Dynamics of the HIV-1 reverse transcription complex during initiation of DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* **275**, 12306-12312 (2000).
- 28 Arhel, N. J. *et al.* HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal* **26**, 3025-3037, doi:10.1038/sj.emboj.7601740 (2007).
- 29 Cohen, M. S., Gay, C. L., Busch, M. P. & Hecht, F. M. The detection of acute HIV infection. *The Journal of infectious diseases* **202 Suppl 2**, S270-277, doi:10.1086/655651 (2010).
- 30 Little, S. J., McLean, A. R., Spina, C. A., Richman, D. D. & Havlir, D. V. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* **190**, 841-850 (1999).
- 31 Guadalupe, M. *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in

- restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* **77**, 11708-11717 (2003).
- 32 Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* **200**, 749-759, doi:10.1084/jem.20040874 (2004).
- 33 Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* **200**, 761-770, doi:10.1084/jem.20041196 (2004).
- 34 Leligdowicz, A. *et al.* Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *The Journal of clinical investigation* **117**, 3067-3074, doi:10.1172/JCI32380 (2007).
- 35 Hazenberg, M. D. *et al.* Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* **17**, 1881-1888, doi:10.1097/01.aids.0000076311.76477.6e (2003).
- 36 Armstrong, D. Opportunistic infections in the acquired immune deficiency syndrome. *Seminars in oncology* **14**, 40-47 (1987).
- 37 Arts, E. J. & Hazuda, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a007161, doi:10.1101/cshperspect.a007161 (2012).
- 38 Autran, B. *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**, 112-116 (1997).
- 39 Komanduri, K. V. *et al.* Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nature medicine* **4**, 953-956 (1998).
- 40 Richman, D. D. HIV chemotherapy. *Nature* **410**, 995-1001, doi:10.1038/35073673 (2001).
- 41 Smith, R. L., de Boer, R., Brul, S., Budovskaya, Y. & van Spek, H. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Frontiers in genetics* **3**, 328, doi:10.3389/fgene.2012.00328 (2012).
- 42 Furuya-Kanamori, L., Kelly, M. D. & McKenzie, S. J. Co-morbidity, ageing and predicted mortality in antiretroviral treated Australian men: a quantitative analysis. *PloS one* **8**, e78403, doi:10.1371/journal.pone.0078403 (2013).
- 43 Smith, M. Z., Wightman, F. & Lewin, S. R. HIV reservoirs and strategies for eradication. *Current HIV/AIDS reports* **9**, 5-15, doi:10.1007/s11904-011-0108-2 (2012).
- 44 Chun, T. W. & Fauci, A. S. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *AIDS* **26**, 1261-1268, doi:10.1097/QAD.0b013e328353f3f1 (2012).
- 45 Chun, T. W. *et al.* Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8869-8873 (1998).
- 46 Chun, T. W. *et al.* Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13193-13197 (1997).

- 47 Finzi, D. *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine* **5**, 512-517, doi:10.1038/8394 (1999).
- 48 Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature medicine* **9**, 727-728, doi:10.1038/nm880 (2003).
- 49 Embretson, J. *et al.* Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**, 359-362, doi:10.1038/362359a0 (1993).
- 50 Gavegnano, C. & Schinazi, R. F. Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **20**, 63-78, doi:10.3851/IMP1374 (2009).
- 51 Joling, P. *et al.* Binding of human immunodeficiency virus type-1 to follicular dendritic cells in vitro is complement dependent. *J Immunol* **150**, 1065-1073 (1993).
- 52 Sundstrom, J. B. *et al.* Human tissue mast cells are an inducible reservoir of persistent HIV infection. *Blood* **109**, 5293-5300, doi:10.1182/blood-2006-11-058438 (2007).
- 53 Else, L. J., Taylor, S., Back, D. J. & Khoo, S. H. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract. *Antiviral therapy* **16**, 1149-1167, doi:10.3851/IMP1919 (2011).
- 54 Siliciano, R. F. & Greene, W. C. HIV latency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **1**, a007096, doi:10.1101/cshperspect.a007096 (2011).
- 55 Goila-Gaur, R. & Strebel, K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51, doi:10.1186/1742-4690-5-51 (2008).
- 56 Khan, M. A. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *Journal of virology* **75**, 7252-7265, doi:10.1128/JVI.75.16.7252-7265.2001 (2001).
- 57 Strebel, K. *et al.* The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**, 728-730, doi:10.1038/328728a0 (1987).
- 58 Gabuzda, D. H. *et al.* Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *Journal of virology* **66**, 6489-6495 (1992).
- 59 Yan, N. & Chen, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. *Nature immunology* **13**, 214-222, doi:10.1038/ni.2229 (2012).
- 60 Pan, X., Baldauf, H. M., Keppler, O. T. & Fackler, O. T. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell research* **23**, 876-885, doi:10.1038/cr.2013.74 (2013).
- 61 Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650, doi:10.1038/nature00939 (2002).
- 62 Strebel, K. & Khan, M. A. APOBEC3G encapsidation into HIV-1 virions: which RNA is it? *Retrovirology* **5**, 55, doi:10.1186/1742-4690-5-55 (2008).

- 63 Harris, R. S., Petersen-Mahrt, S. K. & Neuberger, M. S. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Molecular cell* **10**, 1247-1253 (2002).
- 64 Lei, Y. C. *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G in vitro and in vivo. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 4492-4497 (2006).
- 65 Sasada, A. *et al.* APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2**, 32, doi:10.1186/1742-4690-2-32 (2005).
- 66 Janini, M., Rogers, M., Birx, D. R. & McCutchan, F. E. Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. *Journal of virology* **75**, 7973-7986 (2001).
- 67 Hultquist, J. F., Binka, M., LaRue, R. S., Simon, V. & Harris, R. S. Vif proteins of human and simian immunodeficiency viruses require cellular CBFbeta to degrade APOBEC3 restriction factors. *Journal of virology* **86**, 2874-2877, doi:10.1128/JVI.06950-11 (2012).
- 68 Mehle, A. *et al.* Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7792-7798, doi:10.1074/jbc.M313093200 (2004).
- 69 Lang, S. M. *et al.* Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* **67**, 902-912 (1993).
- 70 Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S. & Landau, N. R. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**, 935-944, doi:10.1006/viro.1995.1016 (1995).
- 71 Guenzel, C. A., Herate, C. & Benichou, S. HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Frontiers in microbiology* **5**, 127, doi:10.3389/fmicb.2014.00127 (2014).
- 72 Ahn, J. *et al.* HIV-1 Vpr loads uracil DNA glycosylase-2 onto DCAF1, a substrate recognition subunit of a cullin 4A-ring E3 ubiquitin ligase for proteasome-dependent degradation. *The Journal of biological chemistry* **285**, 37333-37341, doi:10.1074/jbc.M110.133181 (2010).
- 73 Popov, S. *et al.* Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *The EMBO journal* **17**, 909-917, doi:10.1093/emboj/17.4.909 (1998).
- 74 Vanitharani, R. *et al.* HIV-1 Vpr transactivates LTR-directed expression through sequences present within -278 to -176 and increases virus replication in vitro. *Virology* **289**, 334-342, doi:10.1006/viro.2001.1153 (2001).
- 75 He, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of virology* **69**, 6705-6711 (1995).
- 76 Laguette, N. *et al.* Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* **156**, 134-145, doi:10.1016/j.cell.2013.12.011 (2014).
- 77 Cohen, E. A. From arrest to escape: HIV-1 Vpr cuts a deal. *Cell host & microbe* **15**, 125-127, doi:10.1016/j.chom.2014.01.012 (2014).

- 78 Ayyavoo, V. *et al.* HIV-1 viral protein R compromises cellular immune function in vivo. *International immunology* **14**, 13-22 (2002).
- 79 Mirani, M. *et al.* HIV-1 protein Vpr suppresses IL-12 production from human monocytes by enhancing glucocorticoid action: potential implications of Vpr coactivator activity for the innate and cellular immunity deficits observed in HIV-1 infection. *J Immunol* **169**, 6361-6368 (2002).
- 80 Roux, P., Alfieri, C., Hrimech, M., Cohen, E. A. & Tanner, J. E. Activation of transcription factors NF-kappaB and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *Journal of virology* **74**, 4658-4665 (2000).
- 81 Venkatachari, N. J., Majumder, B. & Ayyavoo, V. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Vpr induces differential regulation of T cell costimulatory molecules: direct effect of Vpr on T cell activation and immune function. *Virology* **358**, 347-356, doi:10.1016/j.virol.2006.08.030 (2007).
- 82 Muthumani, K. *et al.* HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *International immunology* **17**, 103-116, doi:10.1093/intimm/dxh190 (2005).
- 83 Majumder, B. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *Journal of virology* **79**, 7990-8003, doi:10.1128/JVI.79.13.7990-8003.2005 (2005).
- 84 Moon, H. S. & Yang, J. S. Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Molecules and cells* **21**, 7-20 (2006).
- 85 Quaranta, M. G., Mattioli, B., Giordani, L. & Viora, M. Immunoregulatory effects of HIV-1 Nef protein. *Biofactors* **35**, 169-174, doi:10.1002/biof.28 (2009).
- 86 Qi, M. & Aiken, C. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology* **373**, 287-297, doi:10.1016/j.virol.2007.12.001 (2008).
- 87 Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology* **17**, 879-887, doi:10.1093/intimm/dxh267 (2005).
- 88 Lenassi, M. *et al.* HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* **11**, 110-122, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.01006.x (2010).
- 89 Greenway, A. L. *et al.* HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *Journal of biosciences* **28**, 323-335 (2003).
- 90 Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D. & Baltimore, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**, 397-401, doi:10.1038/34929 (1998).
- 91 Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. & Heard, J. M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine* **2**, 338-342 (1996).
- 92 Roeth, J. F., Williams, M., Kasper, M. R., Filzen, T. M. & Collins, K. L. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *The Journal of cell biology* **167**, 903-913, doi:10.1083/jcb.200407031 (2004).

- 93 Cohen, G. B. *et al.* The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**, 661-671 (1999).
- 94 Polyak, S. *et al.* Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection. *J Immunol* **159**, 2177-2188 (1997).
- 95 Stumptner-Cuvelette, P. *et al.* HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12144-12149, doi:10.1073/pnas.221256498 (2001).
- 96 Wonderlich, E. R., Leonard, J. A. & Collins, K. L. HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Advances in virus research* **80**, 103-127, doi:10.1016/B978-0-12-385987-7.00005-1 (2011).
- 97 Hrecka, K., Swigut, T., Schindler, M., Kirchhoff, F. & Skowronski, J. Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *Journal of virology* **79**, 10650-10659, doi:10.1128/JVI.79.16.10650-10659.2005 (2005).
- 98 Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O. T. & Keppler, O. T. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Current biology : CB* **15**, 714-723, doi:10.1016/j.cub.2005.02.058 (2005).
- 99 Leonard, J. A., Filzen, T., Carter, C. C., Schaefer, M. & Collins, K. L. HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that share common elements. *Journal of virology* **85**, 6867-6881, doi:10.1128/JVI.00229-11 (2011).
- 100 Ross, T. M., Oran, A. E. & Cullen, B. R. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Current biology : CB* **9**, 613-621 (1999).
- 101 Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. & Strebel, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of virology* **66**, 7193-7200 (1992).
- 102 Bour, S., Schubert, U. & Strebel, K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *Journal of virology* **69**, 1510-1520 (1995).
- 103 Smalls-Mantey, A., Connors, M. & Sattentau, Q. J. Comparative efficiency of HIV-1-infected T cell killing by NK cells, monocytes and neutrophils. *PloS one* **8**, e74858, doi:10.1371/journal.pone.0074858 (2013).
- 104 Pham, T. N., Lukhele, S., Hajjar, F., Routy, J. P. & Cohen, E. A. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* **11**, 15, doi:10.1186/1742-4690-11-15 (2014).
- 105 Barlow, K. L., Ajao, A. O. & Clewley, J. P. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *Journal of virology* **77**, 6879-6888 (2003).
- 106 Courgnaud, V. *et al.* Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*)

- provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *Journal of virology* **76**, 8298-8309 (2002).
- 107 Courgnaud, V. *et al.* Identification of a new simian immunodeficiency virus lineage with a vpu gene present among different cercopithecus monkeys (*C. mona*, *C. cephus*, and *C. nictitans*) from Cameroon. *Journal of virology* **77**, 12523-12534 (2003).
- 108 Dazza, M. C. *et al.* Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *Journal of virology* **79**, 8560-8571, doi:10.1128/JVI.79.13.8560-8571.2005 (2005).
- 109 Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**, 532-534, doi:10.1038/334532a0 (1988).
- 110 Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. & Pavlakis, G. N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology* **64**, 5448-5456 (1990).
- 111 Pacyniak, E. *et al.* Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS research and human retroviruses* **21**, 379-394, doi:10.1089/aid.2005.21.379 (2005).
- 112 Varthakavi, V. *et al.* The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release. *Traffic* **7**, 298-307, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00380.x (2006).
- 113 Van Damme, N. & Guatelli, J. HIV-1 Vpu inhibits accumulation of the envelope glycoprotein within clathrin-coated, Gag-containing endosomes. *Cellular microbiology* **10**, 1040-1057, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01101.x (2008).
- 114 Schubert, U. *et al.* Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS letters* **398**, 12-18 (1996).
- 115 Dube, M., Bego, M. G., Paquay, C. & Cohen, E. A. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* **7**, 114, doi:10.1186/1742-4690-7-114 (2010).
- 116 Margottin, F. *et al.* Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation. *Virology* **223**, 381-386, doi:10.1006/viro.1996.0491 (1996).
- 117 Besnard-Guerin, C. *et al.* HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates. *The Journal of biological chemistry* **279**, 788-795, doi:10.1074/jbc.M308068200 (2004).
- 118 Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A. & Strebel, K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1299-1311 (2001).

- 119 Strebel, K., Klimkait, T. & Martin, M. A. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**, 1221-1223 (1988).
- 120 Geraghty, R. J., Talbot, K. J., Callahan, M., Harper, W. & Panganiban, A. T. Cell type-dependence for Vpu function. *Journal of medical primatology* **23**, 146-150 (1994).
- 121 Varthakavi, V., Smith, R. M., Bour, S. P., Strebel, K. & Spearman, P. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15154-15159, doi:10.1073/pnas.2433165100 (2003).
- 122 Neil, S. J., Eastman, S. W., Jouvenet, N. & Bieniasz, P. D. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS pathogens* **2**, e39, doi:10.1371/journal.ppat.0020039 (2006).
- 123 Neil, S. J., Sandrin, V., Sundquist, W. I. & Bieniasz, P. D. 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* **2**, 193-203, doi:10.1016/j.chom.2007.08.001 (2007).
- 124 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* **3**, 245-252, doi:10.1016/j.chom.2008.03.001 (2008).
- 125 Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430, doi:10.1038/nature06553 (2008).
- 126 Jouvenet, N. *et al.* Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *Journal of virology* **83**, 1837-1844, doi:10.1128/JVI.02211-08 (2009).
- 127 Radoshitzky, S. R. *et al.* Infectious Lassa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin. *Journal of virology* **84**, 10569-10580, doi:10.1128/JVI.00103-10 (2010).
- 128 Weidner, J. M. *et al.* Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms. *Journal of virology* **84**, 12646-12657, doi:10.1128/JVI.01328-10 (2010).
- 129 Sarojini, S., Theofanis, T. & Reiss, C. S. Interferon-induced tetherin restricts vesicular stomatitis virus release in neurons. *DNA and cell biology* **30**, 965-974, doi:10.1089/dna.2011.1384 (2011).
- 130 Kong, W. S. *et al.* Inhibition of virus-like particle release of Sendai virus and Nipah virus, but not that of mumps virus, by tetherin/CD317/BST-2. *Hiroshima journal of medical sciences* **61**, 59-67 (2012).
- 131 Zenner, H. L., Mauricio, R., Banting, G. & Crump, C. M. Herpes simplex virus 1 counteracts tetherin restriction via its virion host shutoff activity. *Journal of virology* **87**, 13115-13123, doi:10.1128/JVI.02167-13 (2013).
- 132 Wang, S. M., Huang, K. J. & Wang, C. T. BST2/CD317 counteracts human coronavirus 229E productive infection by tethering virions at the cell surface. *Virology* **449**, 287-296, doi:10.1016/j.virol.2013.11.030 (2014).
- 133 Douglas, J. L. *et al.* Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *Journal of virology* **83**, 7931-7947, doi:10.1128/JVI.00242-09 (2009).

- 134 Tokarev, A. A., Munguia, J. & Guatelli, J. C. Serine-threonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2/tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu. *Journal of virology* **85**, 51-63, doi:10.1128/JVI.01795-10 (2011).
- 135 Skasko, M. *et al.* BST-2 is rapidly down-regulated from the cell surface by the HIV-1 protein Vpu: evidence for a post-ER mechanism of Vpu-action. *Virology* **411**, 65-77, doi:10.1016/j.virol.2010.12.038 (2011).
- 136 Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452, doi:10.1038/nature07961 (2009).
- 137 Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T. & Tokunaga, K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Communicative & integrative biology* **3**, 366-369 (2010).
- 138 Mitchell, R. S. *et al.* Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS pathogens* **5**, e1000450, doi:10.1371/journal.ppat.1000450 (2009).
- 139 Miyagi, E., Andrew, A. J., Kao, S. & Strebel, K. Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2868-2873, doi:10.1073/pnas.0813223106 (2009).
- 140 Dube, M. *et al.* Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS pathogens* **6**, e1000856, doi:10.1371/journal.ppat.1000856 (2010).
- 141 Hauser, H. *et al.* HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology* **7**, 51, doi:10.1186/1742-4690-7-51 (2010).
- 142 McNatt, M. W., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS pathogens* **9**, e1003299, doi:10.1371/journal.ppat.1003299 (2013).
- 143 Sauter, D., Vogl, M. & Kirchhoff, F. Ancient origin of a deletion in human BST2/Tetherin that confers protection against viral zoonoses. *Human mutation* **32**, 1243-1245, doi:10.1002/humu.21571 (2011).
- 144 Sauter, D., Specht, A. & Kirchhoff, F. Tetherin: holding on and letting go. *Cell* **141**, 392-398, doi:10.1016/j.cell.2010.04.022 (2010).
- 145 Bego, M. G., Mercier, J. & Cohen, E. A. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *Journal of virology* **86**, 3513-3527, doi:10.1128/JVI.06971-11 (2012).
- 146 Blasius, A. L. *et al.* Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* **177**, 3260-3265 (2006).
- 147 Ishikawa, J. *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics* **26**, 527-534 (1995).
- 148 Tsukamoto, N. *et al.* Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on

- human cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5733-5743, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0171 (2009).
- 149 Mansouri, M. *et al.* Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of virology* **83**, 9672-9681, doi:10.1128/JVI.00597-09 (2009).
- 150 Sauter, D. Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Frontiers in microbiology* **5**, 163, doi:10.3389/fmicb.2014.00163 (2014).
- 151 Homann, S., Smith, D., Little, S., Richman, D. & Guatelli, J. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. *Journal of virology* **85**, 10659-10668, doi:10.1128/JVI.05524-11 (2011).
- 152 Mous, K. *et al.* Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. *PLoS one* **7**, e33934, doi:10.1371/journal.pone.0033934 (2012).
- 153 Rahmberg, A. R. *et al.* Tetherin upregulation in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Journal of virology* **87**, 13917-13921, doi:10.1128/JVI.01757-13 (2013).
- 154 Guzzo, C., Jung, M., Graveline, A., Banfield, B. W. & Gee, K. IL-27 increases BST-2 expression in human monocytes and T cells independently of type I IFN. *Scientific reports* **2**, 974, doi:10.1038/srep00974 (2012).
- 155 Hegde, R. S. *et al.* A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827-834 (1998).
- 156 Hitt, A. L., Hartwig, J. H. & Luna, E. J. Ponticulin is the major high affinity link between the plasma membrane and the cortical actin network in Dictyostelium. *The Journal of cell biology* **126**, 1433-1444 (1994).
- 157 Koster, B. & Strand, M. Schistosoma mansoni: Sm23 is a transmembrane protein that also contains a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Archives of biochemistry and biophysics* **310**, 108-117, doi:10.1006/abbi.1994.1146 (1994).
- 158 Nishikawa, Y., Tragoolpua, K., Makala, L., Xuan, X. & Nagasawa, H. Neospora caninum NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells. *Veterinary parasitology* **109**, 191-201 (2002).
- 159 Arias, J. F., Iwabu, Y. & Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV research* **10**, 283-291 (2012).
- 160 Perez-Caballero, D. *et al.* Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* **139**, 499-511, doi:10.1016/j.cell.2009.08.039 (2009).
- 161 Lau, D., Kwan, W. & Guatelli, J. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. *Journal of virology* **85**, 9834-9846, doi:10.1128/JVI.02633-10 (2011).
- 162 Habermann, A. *et al.* CD317/tetherin is enriched in the HIV-1 envelope and downregulated from the plasma membrane upon virus infection. *Journal of virology* **84**, 4646-4658, doi:10.1128/JVI.02421-09 (2010).
- 163 Lehmann, M. *et al.* Quantitative multicolor super-resolution microscopy reveals tetherin HIV-1 interaction. *PLoS pathogens* **7**, e1002456, doi:10.1371/journal.ppat.1002456 (2011).

- 164 Venkatesh, S. & Bieniasz, P. D. Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS pathogens* **9**, e1003483, doi:10.1371/journal.ppat.1003483 (2013).
- 165 Matsuda, A. *et al.* Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**, 3307-3318, doi:10.1038/sj.onc.1206406 (2003).
- 166 Galao, R. P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T. & Neil, S. J. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses. *Cell host & microbe* **12**, 633-644, doi:10.1016/j.chom.2012.10.007 (2012).
- 167 Tokarev, A. *et al.* Stimulation of NF-kappaB activity by the HIV restriction factor BST2. *Journal of virology* **87**, 2046-2057, doi:10.1128/JVI.02272-12 (2013).
- 168 Gustin, J. K. & Douglas, J. L. BST-2/tetherin: viral tether, viral sensor or both? *Future virology* **8**, doi:10.2217/fvl.13.96 (2013).
- 169 Cao, W. *et al.* Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1603-1614, doi:10.1084/jem.20090547 (2009).
- 170 Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* **29**, 163-183, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101345 (2011).
- 171 Dianzani, F. Viral interference and interferon. *La Ricerca in clinica e in laboratorio* **5**, 196-213 (1975).
- 172 Gonzalez-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews. Immunology* **12**, 125-135, doi:10.1038/nri3133 (2012).
- 173 Gad, H. H. *et al.* Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *The Journal of biological chemistry* **284**, 20869-20875, doi:10.1074/jbc.M109.002923 (2009).
- 174 Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* **14**, 36-49, doi:10.1038/nri3581 (2014).
- 175 Loo, Y. M. & Gale, M., Jr. Viral regulation and evasion of the host response. *Current topics in microbiology and immunology* **316**, 295-313 (2007).
- 176 Gill, N., Chenoweth, M. J., Verdu, E. F. & Ashkar, A. A. NK cells require type I IFN receptor for antiviral responses during genital HSV-2 infection. *Cellular immunology* **269**, 29-37, doi:10.1016/j.cellimm.2011.03.007 (2011).
- 177 Gujer, C. *et al.* IFN-alpha produced by human plasmacytoid dendritic cells enhances T cell-dependent naive B cell differentiation. *Journal of leukocyte biology* **89**, 811-821, doi:10.1189/jlb.0810460 (2011).
- 178 Jego, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234 (2003).
- 179 Welsh, R. M., Bahl, K., Marshall, H. D. & Urban, S. L. Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS pathogens* **8**, e1002352, doi:10.1371/journal.ppat.1002352 (2012).
- 180 Stark, G. R. & Darnell, J. E., Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* **36**, 503-514, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.013 (2012).

- 181 Boo, K. H. & Yang, J. S. Intrinsic cellular defenses against virus infection by
antiviral type I interferon. *Yonsei medical journal* **51**, 9-17,
doi:10.3349/ymj.2010.51.1.9 (2010).
- 182 Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional
activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*
264, 1415-1421 (1994).
- 183 Schmid, S., Mordstein, M., Kochs, G., Garcia-Sastre, A. & Tenover, B. R.
Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state. *The*
Journal of biological chemistry **285**, 42013-42022, doi:10.1074/jbc.M110.165936
(2010).
- 184 Lewis, K. L. & Reizis, B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological
tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a007401,
doi:10.1101/cshperspect.a007401 (2012).
- 185 Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity.
Nature **392**, 245-252, doi:10.1038/32588 (1998).
- 186 Steinman, R. M. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile
controllers of the immune system. *Nature medicine* **13**, 1155-1159,
doi:10.1038/nm1643 (2007).
- 187 Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**,
419-426, doi:10.1038/nature06175 (2007).
- 188 Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in
human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
- 189 McKenna, K., Beignon, A. S. & Bhardwaj, N. Plasmacytoid dendritic cells: linking
innate and adaptive immunity. *Journal of virology* **79**, 17-27,
doi:10.1128/JVI.79.1.17-27.2005 (2005).
- 190 Megjugorac, N. J., Young, H. A., Amrute, S. B., Olshalsky, S. L. & Fitzgerald-Bocarsly,
P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce
migration of T and NK cells. *Journal of leukocyte biology* **75**, 504-514,
doi:10.1189/jlb.0603291 (2004).
- 191 Penna, G. *et al.* Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and
plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **169**, 6673-6676 (2002).
- 192 Poeck, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B
cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the
absence of T-cell help. *Blood* **103**, 3058-3064, doi:10.1182/blood-2003-08-2972
(2004).
- 193 Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells
with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine*
185, 1101-1111 (1997).
- 194 Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y. & Liu, Y. J. Natural interferon alpha/beta-
producing cells link innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental*
medicine **192**, 219-226 (2000).
- 195 Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells
activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nature*
immunology **1**, 305-310, doi:10.1038/79747 (2000).

- 196 Yu, C. F. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol* **184**, 1159-1167, doi:10.4049/jimmunol.0901706 (2010).
- 197 Guiducci, C. *et al.* PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *The Journal of experimental medicine* **205**, 315-322, doi:10.1084/jem.20070763 (2008).
- 198 Cisse, B. *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* **135**, 37-48, doi:10.1016/j.cell.2008.09.016 (2008).
- 199 Colina, R. *et al.* Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* **452**, 323-328, doi:10.1038/nature06730 (2008).
- 200 Beignon, A. S. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3265-3275, doi:10.1172/JCI26032 (2005).
- 201 Lepelley, A. *et al.* Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS pathogens* **7**, e1001284, doi:10.1371/journal.ppat.1001284 (2011).
- 202 Fanning, S. L. *et al.* Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *J Immunol* **177**, 5829-5839 (2006).
- 203 Rubio, G. *et al.* Cross-linking of MHC class I molecules on human NK cells inhibits NK cell function, segregates MHC I from the NK cell synapse, and induces intracellular phosphotyrosines. *Journal of leukocyte biology* **76**, 116-124, doi:10.1189/jlb.1103597 (2004).
- 204 Cao, W. *et al.* BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS biology* **5**, e248, doi:10.1371/journal.pbio.0050248 (2007).
- 205 Martinelli, E. *et al.* HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3396-3401, doi:10.1073/pnas.0611353104 (2007).
- 206 Blomberg, S., Eloranta, M. L., Magnusson, M., Alm, G. V. & Ronnblom, L. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **48**, 2524-2532, doi:10.1002/art.11225 (2003).
- 207 Cao, W. *et al.* Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilon RI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1399-1405, doi:10.1084/jem.20052454 (2006).
- 208 Cho, M. *et al.* SAGE library screening reveals ILT7 as a specific plasmacytoid dendritic cell marker that regulates type I IFN production. *International immunology* **20**, 155-164, doi:10.1093/intimm/dxm127 (2008).
- 209 Volz, A., Wende, H., Laun, K. & Ziegler, A. Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. *Immunological reviews* **181**, 39-51 (2001).

- 210 Brown, D., Trowsdale, J. & Allen, R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue antigens* **64**, 215-225, doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x (2004).
- 211 Leibson, P. J. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* **6**, 655-661 (1997).
- 212 Vivier, E. & Daeron, M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology today* **18**, 286-291 (1997).
- 213 Yokoyama, W. M. What goes up must come down: the emerging spectrum of inhibitory receptors. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1803-1808 (1997).
- 214 Borges, L. & Cosman, D. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine & growth factor reviews* **11**, 209-217 (2000).
- 215 Daeron, M. Fc receptor biology. *Annual review of immunology* **15**, 203-234, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.203 (1997).
- 216 Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L. & Colonna, M. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* **162**, 5-8 (1999).
- 217 Cao, W. & Bover, L. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunological reviews* **234**, 163-176, doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00867.x (2010).
- 218 Manavalan, J. S. *et al.* High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant immunology* **11**, 245-258, doi:10.1016/S0966-3274(03)00058-3 (2003).
- 219 Dave, B., Kaplan, J., Gautam, S. & Bhargava, P. Plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes of patients with human immunodeficiency virus. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **20**, 566-572, doi:10.1097/PAI.0b013e318251d8a4 (2012).
- 220 Lehmann, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *PloS one* **5**, e11110, doi:10.1371/journal.pone.0011110 (2010).
- 221 Barron, M. A., Blyveis, N., Palmer, B. E., MaWhinney, S. & Wilson, C. C. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *The Journal of infectious diseases* **187**, 26-37, doi:10.1086/345957 (2003).
- 222 Siegal, F. P., Fitzgerald-Bocarsly, P., Holland, B. K. & Shodell, M. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *AIDS* **15**, 1603-1612 (2001).
- 223 Seth, S. *et al.* CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J Immunol* **186**, 3364-3372, doi:10.4049/jimmunol.1002598 (2011).
- 224 Dillon, S. M. *et al.* Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic

- chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **48**, 1-12, doi:10.1097/QAI.0b013e3181664b60 (2008).
- 225 Reeves, R. K. *et al.* SIV infection induces accumulation of plasmacytoid dendritic cells in the gut mucosa. *The Journal of infectious diseases* **206**, 1462-1468, doi:10.1093/infdis/jis408 (2012).
- 226 Mandl, J. N. *et al.* Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nature medicine* **14**, 1077-1087, doi:10.1038/nm.1871 (2008).
- 227 Deeks, S. G. *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* **104**, 942-947, doi:10.1182/blood-2003-09-3333 (2004).
- 228 Benito, J. M. *et al.* CD4+ T cell recovery beyond the first year of complete suppression of viral replication during highly active antiretroviral therapy is not influenced by CD8+ T cell activation. *The Journal of infectious diseases* **192**, 2142-2146, doi:10.1086/498168 (2005).
- 229 Papagno, L. *et al.* Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS biology* **2**, E20, doi:10.1371/journal.pbio.0020020 (2004).
- 230 Fitzgerald-Bocarsly, P. & Jacobs, E. S. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *Journal of leukocyte biology* **87**, 609-620, doi:10.1189/jlb.0909635 (2010).
- 231 von Sydow, M., Sonnerborg, A., Gaines, H. & Strannegard, O. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS research and human retroviruses* **7**, 375-380 (1991).
- 232 Meier, A. *et al.* Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nature medicine* **15**, 955-959, doi:10.1038/nm.2004 (2009).
- 233 Heikenwalder, M. *et al.* Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nature medicine* **10**, 187-192, doi:10.1038/nm987 (2004).
- 234 Baenziger, S. *et al.* Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* **113**, 377-388, doi:10.1182/blood-2008-04-151712 (2009).
- 235 Shirazi, Y. & Pitha, P. M. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *Journal of virology* **66**, 1321-1328 (1992).
- 236 Goujon, C. & Malim, M. H. Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. *Journal of virology* **84**, 9254-9266, doi:10.1128/JVI.00854-10 (2010).
- 237 Cordeil, S. *et al.* Evidence for a different susceptibility of primate lentiviruses to type I interferons. *Journal of virology* **87**, 2587-2596, doi:10.1128/JVI.02553-12 (2013).
- 238 Tomescu, C., Chehimi, J., Maino, V. C. & Montaner, L. J. NK cell lysis of HIV-1-infected autologous CD4 primary T cells: requirement for IFN-mediated NK activation by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **179**, 2097-2104 (2007).

- 239 Fonteneau, J. F. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *Journal of virology* **78**, 5223-5232 (2004).
- 240 Jones, D. C. *et al.* Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes. *European journal of immunology* **39**, 3195-3206, doi:10.1002/eji.200839080 (2009).
- 241 Lee, T. H. *et al.* Glycosylation in a mammalian expression system is critical for the production of functionally active leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 protein. *The Journal of biological chemistry* **288**, 32873-32885, doi:10.1074/jbc.M113.478578 (2013).
- 242 Zheng, K., Bantog, C. & Bayer, R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs* **3**, 568-576, doi:10.4161/mabs.3.6.17922 (2011).
- 243 Shah, A. H. *et al.* Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell host & microbe* **8**, 397-409, doi:10.1016/j.chom.2010.10.008 (2010).
- 244 Kerkau, T. *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1295-1305 (1997).
- 245 Ramirez, P. W. *et al.* Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu Results in Impaired Migration and Chemotactic Signaling within CD4 T Cells. *Cell reports*, doi:10.1016/j.celrep.2014.05.015 (2014).
- 246 Hotter, D., Sauter, D. & Kirchhoff, F. Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. *Journal of molecular biology* **425**, 4956-4964, doi:10.1016/j.jmb.2013.09.029 (2013).
- 247 Meyers, J. H. *et al.* Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PloS one* **2**, e458, doi:10.1371/journal.pone.0000458 (2007).
- 248 Tavano, B. *et al.* Ig-like transcript 7, but not bone marrow stromal cell antigen 2 (also known as HM1.24, tetherin, or CD317), modulates plasmacytoid dendritic cell function in primary human blood leukocytes. *J Immunol* **190**, 2622-2630, doi:10.4049/jimmunol.1202391 (2013).
- 249 Kuroki, K. & Maenaka, K. Analysis of receptor-ligand interactions by surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol* **748**, 83-106, doi:10.1007/978-1-61779-139-0_6 (2011).
- 250 Jolly, C. Cell-to-cell transmission of retroviruses: Innate immunity and interferon-induced restriction factors. *Virology* **411**, 251-259, doi:10.1016/j.virol.2010.12.031 (2011).
- 251 Cocka, L. J. & Bates, P. Identification of alternatively translated Tetherin isoforms with differing antiviral and signaling activities. *PLoS pathogens* **8**, e1002931, doi:10.1371/journal.ppat.1002931 (2012).
- 252 Sauter, D. *et al.* Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell host & microbe* **6**, 409-421, doi:10.1016/j.chom.2009.10.004 (2009).

- 253 Sauter, D. *et al.* A rare missense variant abrogates the signaling activity of tetherin/BST-2 without affecting its effect on virus release. *Retrovirology* **10**, 85, doi:10.1186/1742-4690-10-85 (2013).
- 254 Dave, V. P., Hajjar, F., Dieng, M. M., Haddad, E. & Cohen, E. A. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* **10**, 128, doi:10.1186/1742-4690-10-128 (2013).
- 255 Sato, K. *et al.* Vpu Augments the Initial Burst Phase of HIV-1 Propagation and Downregulates BST2 and CD4 in Humanized Mice. *Journal of virology* **86**, 5000-5013, doi:10.1128/JVI.07062-11 (2012).
- 256 Lichterfeld, M. & Yu, X. G. The emerging role of leukocyte immunoglobulin-like receptors (LILRs) in HIV-1 infection. *Journal of leukocyte biology* **91**, 27-33, doi:10.1189/jlb.0811442 (2012).
- 257 Benlahrech, A. *et al.* Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. *Clinical and experimental immunology* **170**, 212-221, doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04647.x (2012).
- 258 Haase, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**, 217-223, doi:10.1038/nature08757 (2010).
- 259 Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A. & Orenstein, J. M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *Journal of virology* **64**, 621-629 (1990).

