

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Rôle d'USP18 dans la perte des cellules CD4 mémoires causée par la signalisation IFN-I lors de l'infection par le VIH-1.

Par

Xavier Dagenais-Lussier

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences de virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Ian Gaël Rodrigue-Gervais
INRS-Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineurs externes

Cécile Tremblay
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Hugo Soudeyns
Unité d'immunopathologie virale
Centre de recherche du CHU Ste-
Justine

Directeur de recherche

Julien van Grevenynghe
INRS-Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Julien van Grevenynghe, sans qui ce travail n'aurait évidemment pas été possible. Merci de m'avoir accueilli dans ton tout nouveau laboratoire pour que j'y débute ma maîtrise et de m'avoir accompagné à travers les années.

Je remercie aussi mes collègues de laboratoire Hamza Loucif et Cherifa Beji qui m'ont non-seulement aidé au cours de ce projet, mais qui m'ont aussi souvent accompagné lors de longues soirées d'expériences. Pour des raisons similaires, je remercie mes collègues de NC2, Clément M., Anaïs A., Wesley F., Claudia G., Paulin V., Aicha S. Merci aussi à tous les autres étudiants et amis du centre qui ont su agréementer mon séjour à l'INRS.

Je dis un grand merci à mes parents France et Denis ainsi qu'à mon frère Nicolas qui m'ont toujours soutenu dans mes projets. Vous m'avez appris à sortir de ma zone de confort et à apprécier les opportunités qui me sont offertes. Merci aussi à ma belle-famille, Sylvianne, André, Catherine et Xavier, votre support a été grandement apprécié. Les journées au lac et en camping m'ont souvent permis de me recharger.

Finalement, je veux dire un merci bien spécial à ma femme, Andréanne, qui a partagé mes hauts et mes bas depuis non seulement ces dernières années de thèse, mais bien avant aussi. Merci de m'avoir poussé pour ce dernier coup à donner, soutenu pour ce sprint final.

RÉSUMÉ

Les premiers mois de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) sont caractérisés par la perte des lymphocytes T CD4 mémoires (Mem). Considérant l'importance des Mem dans la protection immunitaire et que leur perte exacerbe la progression de l'infection par le VIH-1, beaucoup d'efforts ont été consacrés à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de leur perte. Bien que plusieurs mécanismes, souvent en lien avec la présence d'inflammation chronique et la persistance virale, aient été identifiés, la normalisation complète de ces conditions à la suite des traitements demeure non atteinte mettant en évidence la nécessité d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes responsables. Un tel mécanisme est la signalisation des interférons de type I (IFN-I) qui mène à une expression de gènes stimulés par les interférons (ISG) qui sont composés de différents facteurs de restriction, cytokines, chimiokines et molécules de costimulation. Malgré le fait que cette signalisation soit bien contrôlée lors d'infections aiguës, la production d'IFN-I est maintenue lors d'infections persistantes ce qui engendre une détérioration des réponses immunitaires. Bien que la signalisation IFN-I soit connue pour avoir des effets délétères sur la survie des Mem lors de l'infection par le VIH-1, les mécanismes responsables restent à être identifiés. La peptidase USP18 est un de ces ISG que nous avons identifiée comme étant exprimée de façon plus importante chez les Mem de personnes vivants avec le VIH-1 (PVVIH). Lors de cette étude, nous démontrons que d'interférer avec la signalisation IFN-I des Mem de PVVIH, notamment en ciblant USP18, mène à une expression réduite de PTEN, une phosphatase impliquée dans l'inhibition d'AKT, comparable au niveau des contrôles non-infectés. Nos données montrent aussi que d'inhiber USP18 ou PTEN permet d'améliorer l'activation d'AKT, qui est impliquée dans la survie cellulaire, en réponse à des traitement cytokiniques et à de l'activation du récepteur des cellules T. Finalement, nous montrons que l'expression élevée d'USP18 chez les Mem de PVVIH empêche la survie optimale et le maintien à long terme des Mem de manière dépendante à AKT. Dans cette étude, nous établissons ainsi le rôle direct de la signalisation IFN-I/USP18 sur la maintenance de la population Mem totale et virus-spécifique lors de l'infection par le VIH-1.

Ainsi, notre étude complète nos connaissances face aux effets nuisibles de la signalisation IFN-I lors d'infections persistantes indiquant d'autant plus le potentiel thérapeutique de cibler cette voie de signalisation pour rétablir la survie des Mem lors de l'infection par le VIH-1.

Mots-clés : CD4 mémoires ; VIH-1 ; IFN-I ; USP18 ; PTEN

ABSTRACT

The first months of the infection by the human immunodeficiency virus (HIV-1) are characterized by the loss of memory CD4 T cells (Mem). Considering the importance of Mem in immune defenses and that their loss exacerbates HIV-1 progression, a lot of effort has been dedicated to understanding the molecular mechanisms involved in their loss. Even if many mechanisms, often linked to chronic inflammation and viral persistence, have been identified, the complete normalization of those phenotypes following treatments remains unachieved highlighting the necessity to deepen our knowledge of said mechanisms. One such mechanism is type I interferon signaling (IFN-I) which leads to the expression of interferon stimulated genes (ISG) comprised of different restriction factors, cytokine, chemokines, and costimulatory factors. Even though this signaling is well managed during acute infections, IFN-I production is maintained during persistent infections leading to the impairment of immune responses. Even if IFN-I signaling is known to have deleterious effects on Mem survival during HIV-1 infection, the mechanisms responsible remains to be identified.

USP18 peptidase is an ISG that we identified as being more expressed in Mem from people living with HIV-1 (PLWH). In this study, we show that IFN-I signaling interference in Mem from PLWH, especially by targeting USP18, leads to normalized expression of PTEN, a phosphatase involved in AKT inhibition. Our data also show that USP18 or PTEN inhibition can improve AKT activation, which is involved in cell survival upon cytokine or T cell receptor activation. Finally, we show that increased USP18 expression in Mem from PLWH inhibits their optimal survival and long-term maintenance in an AKT dependant manner. In this study, we establish the direct role of IFN-I/USP signaling in total and virus-specific Mem maintenance during HIV-1 infection.

Thereby, this project complements current understanding of the negative effects of IFN-I signaling during persistent infections as well as highlighting the therapeutic potential of targeting this signaling pathway to improve Mem survival during HIV-1 infection.

Keywords : Memory CD4; HIV-1; IFN-I; USP18; PTEN

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
1 LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	1
1.1 PROBLEMATIQUE SOCIO-ECONOMIQUE	1
1.2 PATHOGÉNÈSE	2
1.2.1 <i>Infection précoce</i>	2
1.2.2 <i>Phase aiguë</i>	2
1.2.3 <i>Réservoirs</i>	3
1.2.4 <i>Phase chronique et Inflammation</i>	4
1.3 RÉPONSE IMMUNITAIRE	5
1.3.1 <i>Réponse innée</i>	5
1.3.2 <i>Réponse adaptative</i>	6
1.3.3 <i>Rôle de l'activation immunitaire dans la pathogenèse</i>	7
1.4 TRAITEMENTS	9
1.4.1 <i>Traitements actuels</i>	9
1.4.2 <i>Conséquences des traitements à long terme</i>	10
1.4.3 <i>Traitements futurs</i>	11
2 LES LYMPHOCYTES T CD4	15
2.1 TYPES DE LYMPHOCYTES T CD4.....	15
2.1.1 <i>Th1</i>	15
2.1.2 <i>Th2</i>	15
2.1.3 <i>Th17</i>	16
2.1.4 <i>Th22</i>	16
2.1.5 <i>Treg</i>	16
2.1.6 <i>Tfh</i>	16
2.1.7 <i>Lymphocytes mémoires et sous-populations</i>	17
2.2 RÔLES LORS D'INFECTIONS VIRALES	18
2.2.1 <i>Virus de l'influenza A (VIA)</i>	18

2.2.2	<i>Virus respiratoire syncytial (VRS)</i>	19
2.2.3	<i>SRAS-CoV-2</i>	19
2.2.4	<i>Virus de l'hépatite B (VHB)</i>	19
2.2.5	<i>Virus de l'hépatite C (VHC)</i>	20
2.2.6	<i>VIH-1</i>	20
2.3	CD4 ET VIH	20
2.3.1	<i>Épuisement</i>	21
2.3.2	<i>Perte cellulaire</i>	23
3	LA RÉPONSE INTERFERON DE TYPE I	25
3.1	TYPES D'IFN-I ET SIGNALISATION	25
3.2	EXPRESSION	26
3.3	FONCTIONS	26
3.3.1	<i>Entrée virale et trafic intracellulaire</i>	27
3.3.2	<i>Expression génique et réplication génomique</i>	27
3.3.3	<i>Sortie du virion</i>	29
3.4	SYSTÈMES DE RÉGULATION	30
3.4.1	<i>USP18 et le système d'ISGylation</i>	31
3.5	IFN-I ET INFECTIONS PERSISTANTES	32
3.5.1	<i>Effets de la réponse IFN-I maintenue sur la réponse innée</i>	32
3.5.2	<i>Effets de la réponse IFN-I maintenue sur la réponse humorale</i>	34
3.5.3	<i>Maintien et fonctions des lymphocytes T</i>	35
4	HYPOTHESES ET OBJECTIFS	37
5	BIBLIOGRAPHIE	39
6	ARTICLE	61
6.1	RESUME EN FRANÇAIS	62
6.2	ABSTRACT	63
6.3	AUTHOR SUMMARY	63
6.4	INTRODUCTION	63
6.5	RESULTS	65
6.5.1	<i>Mem from HIV-1-infected subjects display higher USP18 expression, which can be normalized by IFNAR blockade.</i>	65
6.5.2	<i>Higher USP18 expression in Mem from HIV-1-infected subjects prevents optimal AKT activation in response to cytokine stimulation in a PTEN-dependent manner.</i>	69
6.5.3	<i>Higher USP18 expression in infected subjects impairs Mem protection against Fas-induced apoptosis.</i>	72

6.5.4	<i>Interfering with USP18 expression in HIV-1-infected subjects improves long-lasting Mem maintenance in an AKT-dependent manner.</i>	75
6.5.5	<i>Defective long-lasting Mem maintenance in HIV-1-infected subjects is explained by increased cell death.</i>	80
6.5.6	<i>Interfering with USP18 expression in primary-infected subjects also rescues HIV-1-specific cells from apoptosis and involves increased AKT pS473 levels.</i>	82
6.6	DISCUSSION	85
6.7	MATERIALS AND METHODS	89
6.7.1	<i>Ethics statement.</i>	89
6.7.2	<i>Study population.</i>	89
6.7.3	<i>Products.</i>	89
6.7.4	<i>ELISA assays.</i>	90
6.7.5	<i>Purification of Mem.</i>	90
6.7.6	<i>Real-time reverse-transcription (RT)-PCR analysis.</i>	90
6.7.7	<i>Western blots.</i>	90
6.7.8	<i>Transfection and siRNA assays.</i>	91
6.7.9	<i>PhosFlow assays.</i>	91
6.7.10	<i>Intracellular staining assays.</i>	91
6.7.11	<i>Fas-induced apoptosis and cytokine-mediated Mem protection.</i>	92
6.7.12	<i>Production of lentiviral vectors and Mem transduction.</i>	92
6.7.13	<i>Long-lasting Mem maintenance assays.</i>	93
6.7.14	<i>HIV-1-specific stimulation.</i>	93
6.7.15	<i>Spleen processing and cell isolation.</i>	93
6.7.16	<i>Statistical analysis.</i>	94
6.8	ACKNOWLEDGMENTS	94
6.9	SUPPORTING INFORMATION	94
7	BIBLIOGRAPHIE ARTICLE	115
8	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	123
8.1	IMPORTANCE DE LA SIGNALISATION IFN-I LORS DE L'INFECTION PAR LE VIH-1	123
8.2	ROLE D'USP18 LORS D'AUTRES INFECTIONS VIRALES	125
8.3	ROLE DU TRAITEMENT	126
8.4	AVENUES DE TRAITEMENTS	127
8.4.1	<i>IFN-I</i>	127
8.4.2	<i>USP18</i>	128
8.4.3	<i>PTEN</i>	128
8.5	PERSPECTIVES	130
8.6	CONCLUSION	134

9 BIBLIOGRAPHIE CONCLUSION.....	135
10 ANNEXE I.....	139

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

FIGURE 1.1.	RESUME DE LA PATHOGENESE DU VIH-1.....	4
FIGURE 1.2.	REPRÉSENTATION DES CAUSES POTENTIELLES DE L'ACTIVATION IMMUNITAIRE CHRONIQUE CHEZ LES PVVIH.....	9
FIGURE 2.1.	SOUS-TYPES DES LYMPHOCYTES T CD4.....	17
FIGURE 2.2.	ÉPUISEMENT CELLULAIRE.....	23
FIGURE 3.1.	LA CASCADE DE SIGNALISATION IFN-I.....	25
FIGURE 3.2.	LES FACTEURS DE RESTRICTION INHIBENT LA RÉPLICATION DES VIRUS À PLUSIEURS ÉTAPES DE LEUR CYCLE DE VIE.....	29
FIGURE 3.3.	VOIES DE RÉGULATION DES IFN.....	31
FIGURE 3.4.	DÉFAUTS DE L'IMMUNITÉ INNÉE CAUSÉS PAR L'EXPRESSION SOUTENUE DES IFN-I LORS D'INFECTIONS PERSISTANTES.....	33
FIGURE 3.5.	EFFETS NÉGATIFS DE L'EXPRESSION SOUTENUE D'IFN-I SUR L'IMMUNITÉ HUMORALE ET CELLULAIRE.....	35
FIGURE 6.1.	ACTIVITÉS D'USP18.....	38

ARTICLE

FIG 1.	MEM FROM PHI AND CHI DISPLAY HIGHER EXPRESSION LEVELS OF USP18.....	68
FIG 2.	HIGH USP18 EXPRESSION IN MEM FROM PHI AND CHI IMPAIRS AKT ACTIVATION.....	71
FIG 3.	INTERFERING WITH USP18 IN MEM FROM PHI AND CHI IMPROVES CYTOKINE RESPONSES AND CELL RESISTANCE TO APOPTOSIS.....	74
FIG 4.	REDUCED PAKT S473 AFTER TCR TRIGGERING IN PHI AND CHI AFFECTS LONG-LASTING MEM MAINTENANCE.....	77
FIG 5.	TARGETING USP18 IN PHI AND CHI RESULTS IN IMPROVED MEM MAINTENANCE IN AN AKT-DEPENDENT MANNER.....	79
FIG 6.	IMPROVEMENTS OF MEM MAINTENANCE IN PHI AND CHI WITH USP18 GENE EDITING ARE ASSOCIATED WITH LOWER CELL DEATH.....	81
FIG 7.	INTERFERING WITH USP18 REDUCES APOPTOSIS OF HIV-1-SPECIFIC CD4 T-CELLS IN AN AKT-DEPENDENT MANNER.....	84
S1 FIG.	INCREASED PLASMA IFN-A IN HIV-1-INFECTED SUBJECTS CORRELATES WITH VIRAL LOAD.....	98

S2 FIG.	INCREASED LEVELS OF IFN-I SIGNALING IN CD45RA+ CD4 T-CELLS DURING HIV-1 INFECTION ARE NOT ASSOCIATED WITH CELL LOSS.....	99
S3 FIG.	MEM FROM ALL STUDY GROUPS OF SUBJECTS DISPLAYED SIMILAR EXPRESSION LEVELS FOR TOTAL STAT1 AND IRF-7 EXPRESSION.....	100
S4 FIG.	WESTERN BLOT ANALYSES CONFIRMED INCREASED CONSTITUTIVE EXPRESSION OF USP18 IN MEM FROM PHI AND CHI SUBJECTS WHEN COMPARED TO HIVFREE CONTROLS.....	101
S5 FIG.	ART WHEN ADMINISTRATED EARLY AND AFTER YEARS OF TREATMENT NORMALIZES IFN- α PRODUCTION AND IFN-I SIGNALING INTRINSIC TO MEM.....	102
S6 FIG.	EX VIVO MEM FROM PHI, CHI AND HIVFREE SUBJECTS DISPLAY SIMILAR IFNAR EXPRESSION AND SUBSET DISTRIBUTION	103
S7 FIG.	SPECIFIC USP18 GENE SILENCING LED TO SIGNIFICANT INHIBITION OF ITS PROTEIN EXPRESSION IN MEM FROM HIV-1-INFECTED SUBJECTS.....	104
S8 FIG.	INTERFERING WITH IFN-I SIGNALING IN MEM DOES NOT IMPROVE IL-2-MEDIATED STAT5 ACTIVATION	105
S9 FIG.	INTERFERING WITH USP18 IN MEM FROM PHI AND CHI IMPROVES CELL RESISTANCE TO APOPTOSIS AS DETERMINED BY THE PERCENTAGES OF APOPTOSIS	106
S10 FIG.	USP18 siRNA TRANSFECTION IN MEM DOES NOT IMPACT THEIR CD95 EXPRESSION LEVELS	107
S11 FIG.	CRISPR/CAS9 MEDIATED USP18 GENE EDITING IN MEM RESULTS IN SIGNIFICANT AND SUSTAINED INHIBITION OF USP18 EXPRESSION	108
S12 FIG.	SPECIFICALLY INTERFERING WITH USP18 EXPRESSION IN MEM DOES NOT IMPACT IFN- α SECRETION OR VIRUS PRODUCTION DURING LONG-LASTING IN VITRO ASSAY	109
S13 FIG.	SIGNIFICANT INHIBITION OF USP18 EXPRESSION LEVELS IN HIV-1-SPECIFIC CD4 T-CELLS WITH CRISPR/CAS9 MEDIATED USP18 GENE EDITING	110
S14 FIG.	INTERPLAY BETWEEN SUSTAINED IFN-I SIGNALING, USP18 EXPRESSION AND REDUCED AKT ACTIVATION IN MEMORY CD4 T-CELLS DURING HIV-1 INFECTION.....	111
S15 FIG.	USP18 EXPRESSION IS INCREASED IN OTHER CELL POPULATIONS DURING HIV-1 INFECTION .	112
S16 FIG.	FUNCTIONAL DEFECTS OBSERVED IN VIREMIC HIV-1-INFECTED SUBJECTS ARE NOT RESCUED BY IFNAR BLOCKADE	113
S17 FIG.	TARGETING USP18 EXPRESSION IN SPLEEN CD4 T-CELLS FROM AN HIV-1-INFECTED SUBJECT RESULTS IN REDUCED APOPTOSIS	114

DISCUSSION ET CONCLUSION

FIGURE 8.1.	HYPOTHÈSE DES INTERACTIONS ENTRE IRS-4, USP18 ET STAT2 DANS LA RÉGULATION DE LA SIGNALISATION IFN-I.....	129
-------------	--	-----

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE

S1 TABLE. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL DATA OF ALL SELECTED HIV-1-INFECTED SUBJECTS INCLUDING VIRAL LOADS AND ABSOLUTE NUMBERS OF CD4 COUNTS FOR 10 PHI, 10 CHI AND 10 ART+ SUBJECTS..... 95

S2 TABLE. PRIMERS USED FOR THE REAL TIME RT-PCR 96

S3 TABLE. LIST OF ALL ANTIBODIES USED (INCLUDING INFORMATION ABOUT THE VENDOR, CLONE IDS AND FLUOROPHORE) 97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	Cellule présentatrice d'antigène
APOBEC	Enzyme d'édition d'ARNm de l'apolipoprotéine B
ARN	Acide ribonucléique
ART	Traitements antirétroviraux
Bcl-2	Lymphome de cellules B 2
BICD2	Adapteur bicaudale de cargo 2
bNAB	Anticorps neutralisants à large spectre
CCR	C-C chimiokine
CD	Cluster de différenciation
CD4	Lymphocyte T CD4 ⁺
CD8	Lymphocyte T CD8 ⁺
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
cGAS	GMP-AMP Synthase Cyclique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019
CTLA-4	Marqueurs antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique 4
DC	Cellule dendritique
DDR	Domages à l'ADN
DDX3X	DEAD-Box Hélicase 3 X-Lié
ddhCTP	Didehydro-cytidine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
eiF	Facteur d'initiation de la traduction eucaryotique
ERK	Kinase de régulation de signaux extracellulaires
fDC	Cellule dendritique folliculaire
GALT	Tissu lymphoïde associé au tube digestif
GBP5	Protéine d'attache au guanylate
GL	Ganglion lymphatique
HAND	Désordre neurocognitif associé au VIH-1
HGG	Hypergammaglobulinémie
HLTF	Facteur de transcription hélicase-like
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase-1

IFI16	Protéine inductible par l'interféron 16
IFIT	Protéine inductible par l'interféron à répétition tetracopeptide
IFITM	Protéine transmembranaire inductible par l'interféron
IFN-I	Interféron de type I
IFNAR	Récepteur de l'interféron de type I
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IP	Inhibiteurs de protéases
IRF	Facteur de régulation de l'interféron
IRS	Substrat du récepteur à l'insuline
ISG	Gène stimulé par l'interféron
ISGF3	Facteur de gène stimulé par l'interféron 3
JNK	Kinase de la portion N-terminale de c-Jun
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
MCV	Maladies cardiovasculaires
MDA5	Protéine associée à la différenciation de mélanomes 5
Nef	Facteur de régulation négatif
NF-κB	Facteur nucléaire-kappa B
NK	Cellules natural killer
NNRTI	Inhibiteurs de la transcriptase inverse non-nucléotidiques
NRTI	Inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléotidiques
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PD-1	Mort cellulaire programmé 1
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDL	Ligand de mort programmé
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase R
Pol-γ	Polymérase mitochondrial
PrEP	Prophylaxie pré-exposition
PRR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PTEN	Homologue de phosphatase et tensine
PVVIH	Personne vivant avec le VIH
RIG-I	Gène inductible par l'acide rétinoïque I

SAMHD1	Protéine contenant un domaine SAM et HD 1
SRAS-CoV-2	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
sCD14	CD14 soluble
SCF	Protéine skp1–Cul1–F-box
SERINC	Incorporateur de serine
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SOCS	Suppresseur de signalisation cytokinique
STAT	Signal transducteur et d'activation de la transcription
Tat	Transactivateur de transcription
TCR	Récepteurs de cellules T
TET2	Methylcytosine dioxygénase Tet 2
Tfh	Lymphocytes T folliculaires
TG	Triglycérides
TGF	Facteur de croissance transformant
Th	Lymphocytes T helper
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Treg	Lymphocytes régulateurs T
TRIM5	Protéine contenant un motif tripartite 5
UBE2L6	Enzyme conjuguant ubiquitine/ISG15 E2 L6
USP18	Peptidase spécifique à l'ubiquitine 18
VIA	Virus de l'influenza A
Vif	Facteur d'infectivité viral
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
Vpr	Protéine virale R
Vpu	Protéine virale U
VRS	Virus respiratoire syncytial
ZAP	Protéine associée à la chaîne Zeta

1 LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

1.1 PROBLEMATIQUE SOCIO-ECONOMIQUE

En 2019, 1,7 millions de nouveaux cas de virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) ont été estimés à travers le monde. Bien que ceci représente une diminution globale de 23 % depuis 2010, cette tendance n'est pas observée à travers le monde avec certaines régions voyant même des augmentations de 72 % du nombre de nouvelles infections (ONUSIDA 2020). De plus, près de 700 000 personnes sont décédées dû à des complications reliées au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En plus des impacts sur la santé, les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) peuvent subir de la discrimination face à leur situation, notamment dans les pays où il est difficile d'éduquer les gens à la réalité de cette maladie (ONUSIDA 2020). Heureusement, depuis la découverte de ce virus en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983), des progrès majeurs en termes de traitements ont été effectués. Les traitements se sont non seulement améliorés pour les PVVIH, mais aussi pour leur(s) partenaire(s) avec des médicaments du style Prophylaxie Pré-Exposition (PrEP), prescrits aux personnes à risque de contracter le VIH-1, conférant une protection prophylactique procurant un niveau additionnel de confiance et une normalité dans la relation (Spinner et al., 2016). Bien que les traitements soient de plus en plus efficaces et répandus, cette infection demeure un fardeau économique important. En effet, il est estimé que les coûts des traitements antirétroviraux (ART) entre 2016 et 2030 coûteront 880 milliards de dollars américains (Forsythe et al., 2019). Ainsi, malgré les progrès en termes de traitements et d'éducation générale du publique, cette épidémie demeure un lourd problème socio-économique pour lequel des traitements plus efficaces sont requis. Dans ce contexte, une compréhension plus approfondie de la pathogénèse du VIH-1 ainsi que des interactions avec le système immunitaire demeure critique.

1.2 PATHOGÉNÈSE

Les voies d'infections possibles pour contracter le VIH-1 sont via des injections de drogues avec seringues contaminées, transfusions sanguines, contact avec le virus chez le fœtus ou le nourrisson par une mère infectée et via des relations sexuelles. Le processus d'initiation de l'infection décrit plus bas concerne cette dernière qui, de manière globale, est la plus fréquente (HIV Surveillance Report, CDC, 2019). À la suite de la transmission, le VIH-1 se répand rapidement menant au syndrome aigu du VIH-1 qui peut se caractériser par des symptômes similaires à la grippe chez certains individus (Schacker et al., 1996; Tindall et al., 1988) (Figure 1.1.).

1.2.1 Infection précoce

Lors des premières étapes de l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ (CD4) servent de cibles initiales pour l'établissement du virus. Ensuite, le virus se répand dans la population CD4 soit par contact virus-cellules ou par synapses cellulaires, puis le virus se répand dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif (Gut-associated lymphoid tissue; GALT) via les ganglions lymphatiques (GL). Ceci mène à une perte importante des CD4 de l'intestin. L'initiation ainsi que l'établissement de l'infection sont médiés par la présence de cellules CD4⁺CCR5⁺ ainsi que par l'intégrité des tissus muqueux. L'impact de l'infection sur les CD4 du GALT sera examiné de manière plus approfondie dans la section 2.

1.2.2 Phase aiguë

Environ deux semaines après l'infection initiale, certains individus infectés démontrent des symptômes s'apparentant à la grippe, appelés syndrome aigu du VIH-1 (Gurunathan et al. 2009). En plus de ces symptômes, le syndrome aigu du VIH-1 peut se manifester par de la diarrhée, des myalgies, des exanthèmes et des maux de tête (Gurunathan et al., 2009). C'est pendant cette phase que le VIH-1 se réplique de manière importante pouvant atteindre une virémie de 10 millions de copies par millilitre de plasma (Little et al., 1999; Piatak et al., 1993). Sans traitement, la virémie atteint son pic aux environs de trois à quatre semaines, pour finalement diminuer au cours des mois suivants et se stabiliser (Fiebig et al., 2003; Little et al., 1999). Ceci est appelé le « viral set point » et est un aspect déterminant dans la progression de la maladie (McPhee et al., 2019; Mellors et al., 1996). Chez la majorité des PVVIH cette phase aiguë résulte en une perte importante des CD4 périphériques. Cette perte des CD4 périphériques est associée à la perte

massive des CD4 CCR5⁺ du GALT dû à la mort directe des cellules lors de l'expansion virale en plus de la mort par apoptose des cellules non-infectées (Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005).

1.2.3 Réservoirs

Une des caractéristiques importantes de l'infection par le VIH-1 est sa capacité à établir des réservoirs viraux persistants. Ces réservoirs forment l'obstacle principal quant à notre capacité à éliminer complètement le virus. On entend par réservoirs deux choses :

- Les réservoirs cellulaires majoritairement formés de CD4 mémoires portant le virus latent.
- Les tissus lymphoïdes, soit le GALT et les GL.

Bien que le GALT soit principalement associé à l'initiation de l'infection à cause de la perte de CD4 CCR5⁺ avant même l'atteinte du pic de virémie (Lay et al., 2009), le VIH-1 y reste détectable après plusieurs années même sous traitements, faisant de cet organe un réservoir persistant du virus (Chun et al., 2008; Gosselin et al., 2017; Mehandru et al., 2006). En plus du GALT, les GL font aussi partie des réservoirs viraux. La présence du virus dans ces tissus est associée aux cellules dendritiques folliculaires (fDC) capables d'intégrer le virus (Dave et al., 2018). De plus, bien qu'il n'y ai pas de réplication virale *de novo* dans ces tissus lors de traitements, la réplication de cellules infectées avant l'initiation des traitements maintient un réservoir de VIH-1 (McManus et al., 2019).

Les réservoirs viraux dits cellulaires ont été identifiés en 1995 dans des CD4 quiescents (resting) (Chun et al., 1995). Bien que le nombre de ces cellules soit relativement faible (environ 10 millions de cellules chez l'hôte), leur état peu-activé rend l'élimination des virus latents difficile (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997). Dans ce contexte, et malgré des années de médication supprimant de manière efficace la virémie plasmatique, un rebond du virus est attendu suivant l'arrêt des traitements (Davey et al., 1999). En plus de l'aspect de latence virale concernant ces réservoirs, une réplication virale résiduelle demeure présente chez les individus sous traitements (Crowe et al., 2003; Sharkey et al., 2000). Trois aspects sont principalement reconnus pour générer cette réplication :

- La présence de réciprocité (cross talk) entre CD4 activés et quiescents (Chun et al., 2005).
- Le trafic cellulaire entre les tissus périphériques et lymphoïdes (comme le GALT) (Cicala et al., 2019).

- La reconstitution de la population de CD4 à la suite des traitements ART (Chomont et al., 2009).

1.2.4 Phase chronique et Inflammation

Sans traitement, la phase chronique de l'infection par le VIH-1 est caractérisée par une hyperactivation du système immunitaire et une perte constante de CD4 menant éventuellement au SIDA (Catalfamo et al., 2012). Avec l'avancé des traitements et la prolongation de la durée de vie des patients qui en résulte, un nouvel aspect de la pathogénèse du virus est apparu, soit la présence d'inflammation persistante et les comorbidités qui en découlent. Ces comorbidités incluent le désordre neurocognitif associé au VIH-1 (HAND) causé par la présence de produits viraux au niveau du cerveau menant à des changements histologiques (Eggers et al., 2017) ainsi qu'une augmentation de dysfonctionnements endothéliaux, d'athérosclérose, d'hypertension causée par l'inflammation persistante et l'hyperactivation immunitaire, augmentant les risques de maladies cardiovasculaires (MCV) (Dubé et al., 2008). Les comorbidités causées par les traitements seront explorées un peu plus loin.

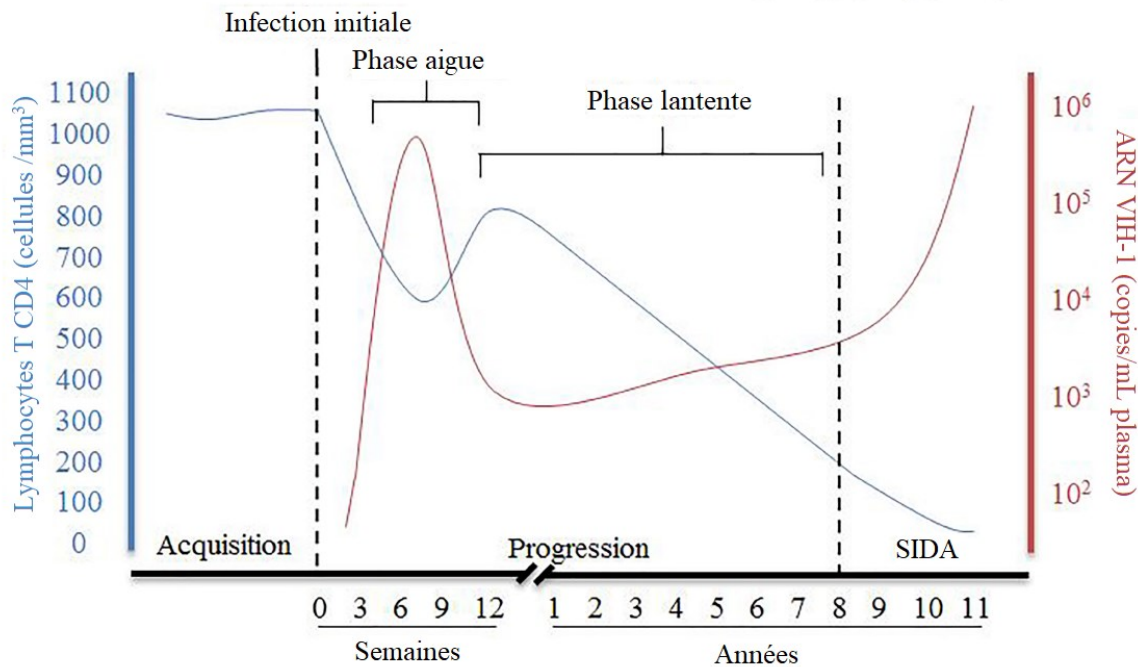


Figure 1.1. Résumé de la pathogénèse du VIH-1.

La progression du VIH-1 est représentée par le nombre relatif de CD4 (cellules/mm³) et le nombre de copie d'ARN viral dans le plasma (copies/mL) montrant leur relation de l'acquisition du virus jusqu'au développement du SIDA. Traduite de (Tough et al., 2019)

1.3 RÉPONSE IMMUNITAIRE

1.3.1 Réponse innée

La réponse immunitaire innée, qui constitue la première ligne de défense contre les pathogènes, est initiée à la suite de la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs). Lors de la réplication virale, plusieurs formes d'acides nucléés, agissant comme PAMPs, peuvent être identifiées par ces récepteurs (Mogensen, 2009). Lorsqu'un PAMP est reconnu par un PRR, une cascade de signalisation est entamée menant à l'induction d'une réponse antivirale notamment via la sécrétion d'interférons de type I (IFN-I) qui mène à l'expression de gènes stimulés par l'interféron (ISG) (Hoffmann et al., 2015). Cette réponse est non-seulement importante pour gérer les premières étapes de l'infection, mais est aussi critique pour l'initiation de la réponse adaptative (Černý & Stříž, 2019; Sonnenberg & Hepworth, 2019). Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, les facteurs de restriction APOBEC3, SAMHD1, TRIM5, Tetherin et SERINC5 sont des ISG induits pour contrôler l'infection (Colomer-Lluch et al., 2018). Les PRRs impliqués dans cette réponse sont multiples et reconnaissent le VIH-1 à différentes étapes de son cycle de réplication. Les PRRs reconnaissant L'ARN viral inclus RIG-I, MDA5, TLR7 et TLR8 ainsi que DDX3X (Beignon et al., 2005; Gringhuis et al., 2017; Lepelley et al., 2011; Solis et al., 2011). De plus, les intermédiaires de transcription inverse produits peuvent aussi être reconnus par des senseurs cytoplasmiques d'ADN tel cGAS et IFI16 (Bode et al., 2016; Jakobsen et al., 2013). Il est intéressant de noter que la capsid du VIH-1 semble éviter la réponse innée en détournant différents facteurs de l'hôte (Rasaiyaah et al., 2013).

Étant donné la nature des relations hôte-pathogène, le VIH-1 a développé différentes stratégies pour éviter ces systèmes de reconnaissance incluant la modulation de facteurs de transcription, la désactivation de certains régulateurs immunitaires, la protection de PAMPs ainsi qu'en empêchant les fonctions antivirales de certains ISG. Les protéines accessoires sont les principales médiatrices de ces stratégies d'évasions. Par exemple, Vpu recrute le complexe ubiquitine ligase SCF menant à une diminution de CD4 ainsi que de certains ISG tels Tetherin, CD99 et UBE2L6 (Damme et al., 2008; Jain et al., 2018; Neil et al., 2008; Willey et al., 1992). De plus, Vpu est connue pour contrer les effets de NF- κ B en réprimant l'expression de facteurs de restriction à la production d'IFNs (Langer et al., 2019). Vif quant à elle recrute le complexe ubiquitine ligase Cbl5/Elongin ciblant APOBEC3 pour dégradation (Marin et al., 2003). De façon similaire, Vpr utilise le complexe cullin4A-DDB1-DCAF1 menant à la dégradation de TET2 et

HLTF favorisant ainsi l'infection virale (Lv et al., 2018; Yan et al., 2019). Nef empêche l'incorporation de SERINC3 et SERINC5 dans la membrane du virion prévenant la diminution de l'infectivité virale qui en résulterait (Usami et al., 2015). Le VIH-1 est aussi connu pour utiliser les dynéines cytoplasmiques via une interaction entre la capsid virale et BICD2 pour effectuer des déplacements vers le noyau (Dharan et al., 2017). Ceci permet au VIH-1 de rejoindre le noyau rapidement pour éviter une reconnaissance dans le cytosol. Finalement, le VIH-1 peut recruter la 2'O-Mtase cellulaire procurant ainsi une 2'O-methylation à différents sites de l'ARN viral permettant d'imiter un ARN du soi (Ringear et al., 2019).

1.3.2 Réponse adaptative

Les études qui éclaircissent le plus la réponse immunitaire adaptative face au VIH-1 se font souvent dans le contexte d'études comparatives entre patients progressseurs et patients dit « contrôleurs élites », ces derniers étant capable de maintenir des faibles niveaux de virémie pendant plusieurs années sans traitements. Ainsi, en comparant les réponses, il est possible d'identifier quels aspects sont avantageux pour une réponse immunitaire adéquate. De façon générale, 24 heures après la re-rencontre des antigènes, les lymphocytes T CD8 (CD8) mémoires s'activent, changent leur phénotype de surface et sécrètent des cytokines et chimiokines. Lors des jours qui suivent, ces cellules vont subir une transformation blastique, une expansion ainsi qu'une augmentation de la production de perforines. Ces CD8 cytolytiques vont cibler les cellules infectées pour y induire leur apoptose (Migueles & Connors, 2015). Les éléments clé pour une réponse efficace, démontrés par les études sur les patients dit « progressseurs lents », un groupe qui inclus les « contrôleurs élites », mentionnés précédemment, ainsi que des individus que ne progressent pas vers le SIDA malgré une virémie élevée, sont, d'une part, leur manifestation d'un plus grand nombre de fonctions, défini comme leur capacité à sécréter plusieurs cytokines en même temps (Betts et al., 2006) et, d'autre part, une plus grande capacité proliférative des CD8 spécifiques aux VIH-1 comparativement aux CD8 des PVVIH contrôles (Horton et al., 2006). Ces deux éléments sont souvent associés aux types de HLA, notamment les HLA-B*5701, HLA-B*5703 et HLA-B*2705, qui corrèle avec le groupe de « progressseurs lents » (Almeida et al., 2007; Costello et al., 1999; Migueles et al., 2000).

En ce qui a trait à la réponse humorale, certains individus produisent des anticorps capables d'agir contre plusieurs variantes du VIH-1 en ciblant des régions relativement plus conservées de l'enveloppe virale (Burton & Hangartner, 2016). Ceux-ci sont appelés anticorps neutralisants à large spectre (broadly neutralizing antibodies ; bNAB). Un des facteurs associés avec cette

production de bNAB est la présence de fonctions effectrices Fc polyfonctionnelles tôt lors de l'infection (Richardson et al., 2018b).

De plus, dans le contexte de réponse antigénique, la souche infectante du VIH-1 joue un rôle important dans la production de bNAB (Kouyos et al., 2018). Un des aspects identifiés menant à une production de bNAB est un haut niveau de glycosylation de la particule virale (Wagh et al., 2018).

1.3.3 Rôle de l'activation immunitaire dans la pathogénèse

Comme mentionné plus haut, la phase chronique de l'infection par le VIH-1 est caractérisée par une activation généralisée de système immunitaire qui persiste malgré les traitements ART. Cette activation chronique cause une augmentation du renouvellement et de l'activation cellulaire menant éventuellement à l'épuisement cellulaire. Les premières indications que l'activation immunitaire pouvait jouer un rôle important dans la pathogénèse du VIH-1 ont été identifiées dans le contexte de l'infection au virus de l'immunodéficience simienne (VIS). En effet, malgré une virémie élevée lors de l'infection au VIS chez le singe vert mangabey, ce qui en fait un modèle d'infection comparable aux progressions lents virémiques, le système immunitaire demeure peu activé, ce qui contraste avec l'activation immunitaire importante présente lors de l'infection pathogénique au VIS (Silvestri et al., 2003). Les différentes branches du système immunitaire jouant un rôle dans la pathogénèse du VIH-1 peuvent être regroupé dans quatre aspects différents soit (Figure 1.2.) :

- L'activation cellulaire, qui comprend l'activation des cellules T et des monocytes/macrophages. Le niveau d'activation des cellules T est un prédicteur important de la rapidité de la progression de la maladie chez les patients non-traités (Deeks et al., 2004; Giorgi et al., 1999). Même dans le contexte de traitements, les marqueurs d'activation et d'épuisement demeurent un corrélat de la maladie (Tenorio et al., 2014). Les monocytes et macrophages sont reconnus comme potentiels médiateurs de morbidité et mortalité non associés au SIDA chez les patients traités. En effet, à la suite de l'infection par le VIH-1, les monocytes changent d'un profil dit « classique (CD16-) » vers un profil « non-classique (CD16+) »; un phénotype associé à l'inflammation, une virémie accrue et à une perte des CD4 (Angelovich et al., 2015). Ces monocytes expriment les récepteurs à chimiokines CCR2, CCR5 et CX3CR1 leurs conférant une capacité migratoire plus élevée que les monocytes « classiques » contribuant potentiellement à l'établissement du réservoir (Devèvre et al., 2015; Vérollet et al., 2015; Williams et al., 2014). En plus, des

niveaux élevés de sCD14, interleukine (IL)-6 et IP-10, trois biomarqueurs de l'activation monocytaire, sont prédicteurs de la morbidité et mortalité chez les patients sous ART (Hattab et al., 2015; Liang et al., 2015).

- L'activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 (IDO) qui est associée à un taux plus élevé de mortalité même chez les patients sous ART (Byakwaga et al., 2015) en plus de potentiellement contribuer à la dépression en diminuant le niveau de tryptophane, qui est nécessaire à la synthèse de sérotonine, au cerveau (Martinez et al., 2014).
- La signalisation anormalement maintenue d'IFN-I est aussi cruciale à la pathogénèse du VIH-1. Les premiers exemples de son importance viennent d'expériences avec le VIS. D'une part, les infections non-pathogéniques du VIS sont caractérisées par des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ayant une faible production d'IFN-I (Mandl et al., 2008). D'autre part, l'utilisation de bloqueur de récepteur à l'interféron (IFNR) tôt lors de l'infection au VIS accélère la progression vers le SIDA chez les singes Rhésus (Sandler et al., 2014). Ces résultats soulignent l'importance du moment lors duquel les IFN-I sont présents lors de l'infection. L'importance de la signalisation IFN-I sur l'infection par le VIH-1 sera explorée de façon plus approfondie dans la section 3.
- L'intégrité du GALT affecte aussi la pathogénèse du VIH-1, notamment en permettant une entrée de bactéries dans l'organisme. Ceci mène à une présence de produits bactériens suivit d'une activation des monocytes/macrophages qui contribuent à l'inflammation généralisée présente chez les PVVIH (Paquin-Proulx et al., 2017).

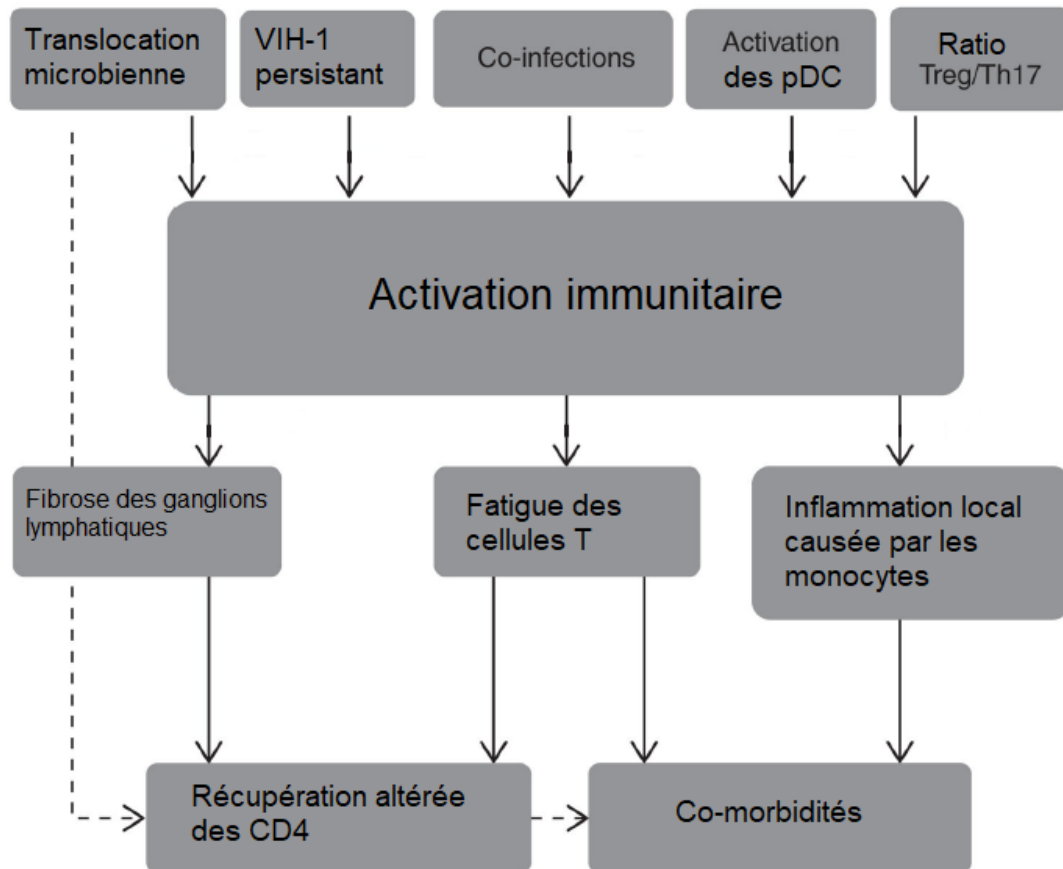


Figure 1.2. Représentation des causes potentielles de l'activation immunitaire chronique chez les PVVIH. Modifiée de (Rajasuriar et al., 2013)

1.4 TRAITEMENTS

1.4.1 Traitements actuels

À la suite de l'établissement du cycle répliatif du VIH-1, un développement rapide de stratégies pour contrer la propagation du virus a été fait. À ce jour six classes de médicaments sont utilisées en combinaison, ciblant différentes étapes du cycle de répliation, pour contrôler l'infection et de procurer une qualité de vie quasi normale pour les PVVIH.

- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléotidiques (NRTI) ont été la première classe de drogues antirétrovirale développée et utilisée. À la suite de leur phosphorylation dans la cellule, les NRTI agissent comme analogues de nucléotides ce qui inhibe l'activité de la transcriptase inverse du VIH-1 en produisant une terminaison précoce du brin d'ADN stoppant la conversion de l'ARN viral en ADN double brin (Moyle, 2005).

- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse non-nucléotidiques (NNRTI), contrairement au NRTI, n'ont pas besoin de phosphorylation intracellulaire pour exercer leur effet. Ils agissent comme inhibiteurs non-compétitifs de la transcriptase inverse en affectant sa conformation.
- Les inhibiteurs de protéases (IP) agissent en se fixant à la protéase du VIH-1 bloquant l'activité protéolytique de l'enzyme et empêchant ainsi la formation de virions matures et fonctionnels (Eron, 2000).
- Les inhibiteurs d'intégrase fonctionnent en bloquant l'intégration rétrovirale, une étape essentielle du cycle viral. L'intégrase est une cible intéressante pour le traitement du VIH-1 dû à l'inexistence de son homologue chez l'humain (Jóźwik et al., 2020).
- L'inhibiteur de fusion (T20, Fuzeon) interfère avec la fusion membranaire en se fixant à la glycoprotéine gp41 de l'enveloppe virale. Ceci empêche les changements conformationnels requis pour la fusion des membranes cellulaires et virales (Eggink et al., 2010).
- L'antagoniste du CCR5, Mariviroc, est quant à lui dépendant du tropisme du virus car il se fixe au récepteur CCR5 de la membrane cellulaire empêchant la liaison entre gp120 et CCR5. Cet antagoniste n'est donc pas efficace dans le contexte où le virus a un tropisme CXCR4 ou un tropisme mixte (Dean, 2012).

1.4.2 Conséquences des traitements à long terme

Deux éléments sont à considérer lorsqu'il est question des conséquences des traitements à long terme, soit la toxicité des traitements eux-mêmes et le fait que les PVVIH vivent de plus en plus longtemps avec le VIH-1. La phase chronique de l'infection mène à une présence soutenue d'IFN-I. Ces niveaux élevés d'IFN-I sont associés à une diminution du dégagement de triglycérides (TG) menant à une hypertriglycéridémie (Grunfeld et al., 1992). Quatre aspects négatifs ressortent pour ce qui est des effets des traitements eux-mêmes :

- La dyslipidémie qui est définie comme une élévation anormale du cholestérol et/ou des TG plasmatiques. L'effet des ART sur le métabolisme lipidique varie entre les classes de drogues et entre les drogues elles-mêmes. Par exemple, dans la classe des NRTI, les changements lipidiques causés par le tenofovir disoproxil fumarate sont moindre que pour la zidovudine, la stavudine, et l'abacavir (Gallant et al., 2004; Moyle et al., 2006; Pozniak et al., 2006). Les NNTRI, efavirenz et nevirapine, quant à eux augmentent les niveaux de HDL (van Leth et al., 2004).

- Les risques de MCV causées par les ART sont en partie expliquées par les effets sur le profil lipidique présentés ci-haut. Cependant, même après un ajustement pour les niveaux lipidiques, une large étude observationnelle a associé l'utilisation de certains NRTI et IP avec des risques plus élevés d'infarctus (Worm et al., 2010). Dans certains cas, les mécanismes responsables sont plus directement liés, comme par exemple l'augmentation des niveaux de fibrinogènes associé à l'utilisation d'IP pouvant favoriser le développement d'athérosclérose (Madden et al., 2008) ainsi que le risque augmenté d'infarctus attribué à la réactivité des plaquettes lors de la prise du NRTI abacavir (Alvarez et al., 2017).
- La toxicité mitochondriale causée par les ART est principalement associée aux NRTI, bien que les NNRTI et IP soient aussi impliqués (Apostolova et al., 2011). En effet, plusieurs études pointent vers les effets hors-cible des NRTI ciblant l'ADN polymérase mitochondriale (Pol- γ) pour expliquer leur toxicité mitochondriale (Feng et al., 2004; Sohl et al., 2015; Vyas et al., 2014; Wutzler & Thust, 2001). L'inhibition de la Pol- γ par les NRTI se fait principalement via la terminaison de la chaîne d'ADN mitochondrial à la suite de son incorporation dans le brin (Brinkman et al., 1998).
- Des effets sur le métabolisme du glucose notamment la résistance à l'insuline sont associés aux dysfonctions mitochondriales (Kim et al., 2008). En plus des effets causés par ces dysfonctions mitochondriales, certains IP sont associés à la résistance à l'insuline de par leur inhibition de la différenciation des cellules adipeuses et l'inhibition du transporteur du glucose Glut4 (Caron et al., 2001; Murata et al., 2000).

Heureusement, le développement de nouveaux composés dans les dernières années vise à améliorer les différents aspects négatifs des traitements en trouvant de nouveaux mécanismes d'action, une meilleure efficacité antivirale, moins de toxicités et d'interactions entre les drogues, ainsi qu'une diminution de la fréquence des dosages.

1.4.3 Traitements futurs

Malgré les progrès dans les traitements contre le VIH-1, une élimination complète du virus demeure inatteignable avec les protocoles actuels. Cette incapacité à générer un remède contre le VIH-1 est causée par les deux aspects des réservoirs mentionnés plus tôt, soit la présence du virus dans des tissus lymphatiques profonds et les cellules porteuses de virus latent. En effet, les concentrations diminuées de ART dans les tissus lymphatiques sont associées avec une augmentation de la transcription et mutation virale (Fletcher et al., 2014; Lee et al., 2020; Lorenzo-Redondo et al., 2016). La latence virale, quant à elle, permet un rebond du virus si la pression

médicamenteuse, qui présentement vise à empêcher la réplication virale elle-même sans toucher aux réservoirs établis, est arrêtée (Colby et al., 2018; Pasternak et al., 2020). De nouvelles stratégies sont présentement développées pour palier à ces lacunes et permettre éventuellement un contrôle de la virémie sans traitement ou même l'élimination complète du VIH-1 chez les PVVIH. Ces stratégies peuvent être catégorisées en trois groupes selon leurs objectifs :

- La réduction/élimination des réservoirs latents.
- Le contrôle immunitaire du VIH-1.
- La suppression des cibles du VIH-1.

La première approche cherche à réduire les réservoirs du VIH-1 à un niveau qui diminuerait grandement, ou voire éliminerait complètement, les chances d'un rebond viral (Cromer et al., 2017). Trois stratégies sont étudiées pour atteindre cet objectif soit (i) l'activation du virus latent suivi de la lyse de la cellule infectée. Cette stratégie est communément appelée « shock and kill » et utilise différents agents pour renverser la latence et permettre une élimination de la cellule par le système immunitaire (Deeks, 2012; Remoli et al., 2012). (ii) L'élimination de sous-populations cellulaires spécifiques. Cette stratégie se base sur le fait que certaines sous-populations, comme les CD4 mémoires effecteurs, ont un taux plus élevé de cellules ayant un provirus intact capable de se réactiver (Hiener et al., 2017). Ainsi, cette stratégie aurait l'avantage d'être moins toxique en ciblant certaines populations « super-réservoirs », ceci aux dépens « d'ignorer » d'autres populations ayant relativement moins de virus latent. (iii) Finalement, la troisième stratégie qui vise à réduire ou à éliminer les réservoirs latents utilise le silençage génique ciblé. En utilisant la technologie CRISPR-Cas9, il serait possible de cliver les provirus et d'ainsi supprimer la latence. Bien que plusieurs études aient bien établi la preuve de concept (Dash et al., 2019; Kaminski et al., 2016; Wang et al., 2018), les vecteurs capables de livrer cette thérapie génique demeurent l'aspect limitant de cette stratégie.

La deuxième approche est de favoriser le contrôle immunitaire du VIH-1. Inspirée de certaines PVVIH capables de contrôler l'infection à la suite de l'arrêt des traitements (Sáez-Cirión et al., 2013; Sneller et al., 2017), cette approche vise à établir une balance entre le système immunitaire et le virus qui est favorable en contrôlant rapidement la propagation virale (Saez-Cirion et al., 2014). Un exemple de ce concept est démontré par l'équipe de Rajashekar *et al.* qui ont utilisé des composé mimétiques de CD4 pour sensibiliser les cellules infectées à la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps chez un model murin (Rajashekar et al., 2021).

Enfin, la dernière approche cherche à empêcher la propagation virale en éliminant les cibles potentielles du VIH-1. Un exemple concret de cette approche est le cas du patient de Berlin, chez qui l'arrêt des traitements de façon prolongée n'a pas mené à un rebond viral grâce à une transplantation de moelle osseuse d'un donneur ayant la mutation CCR5 Δ 32/ Δ 32 (Yukl et al., 2013). Après le patient de Berlin, des efforts ont été consacrés à montrer le potentiel des modifications génétiques ciblées contre CCR5 pour conférer une résistance comparable à l'infection par le VIH-1, tout d'abord avec des nucléases à doigt de zinc (Perez et al., 2008), puis avec la technologie CRISPR-Cas9 (Kang et al., 2016; Schwarze et al., 2021). En considérant que la mutation CCR5 Δ 32 est seulement protectrice pour les souches du VIH-1 avec un tropisme pour ce récepteur, une équipe a modifié de manière simultanée le récepteur CCR5 et CXCR4 procurant ainsi une protection contre les souches des deux tropismes dans un modèle murin (Didigu et al., 2014). Il demeure important de considérer que la mutation CCR5 Δ 32/ Δ 32 est connue pour être un facteur de risque pour certaines conditions immunitaires comme la sclérose en plaque (Ghorban et al., 2013).

2 LES LYMPHOCYTES T CD4

2.1 TYPES DE LYMPHOCYTES T CD4

Les CD4 sont centraux au système immunitaire en coordonnant et régulant les réponses innées et adaptatives. La régulation des réponses immunitaires des CD4, qui est nécessaire pour une réponse immunitaire efficace contre les pathogènes tout en évitant une réponse contre le soi, se fait via la production de cytokines spécifiques menant à la différenciation de différents CD4 possédants des fonctions et caractéristiques distinctes (Kumar et al., 2018; Raphael et al., 2015). Les CD4 naïfs sont tout d'abord activés par des cellules présentatrices d'antigène (APC) via leur complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II) en combinaison avec des signaux de costimulation. Ces CD4 activés se différencient en sous-types distincts ayant pour but de répondre à certaines menaces pathogéniques spécifiques (Jenkins et al., 2001). Ces différents sous-types de CD4 sont définis en plus grands détails ci-bas (Figure 2.1.).

2.1.1 Th1

Les lymphocytes T CD4 helper 1 (Th1) ont comme rôle principal l'élimination de pathogènes intracellulaire (Del Prete, 1992). Les cytokines principales produites par les Th1 pour leurs fonctions effectrices sont l'IFN- γ , l'IL-2, et TNF- α (Foulds et al., 2006). L'expression d'IFN- γ permet l'induction d'une batterie de gènes reliés à la réponse antivirale, favorisant entre autres la phagocytose macrophagique ainsi qu'un débalancement vers un phénotype Th1 pour les CD4, et la transition de l'immunité innée vers une immunité adaptative (Schroder et al., 2004). En plus de favoriser la prolifération des lymphocytes via la phosphorylation de STAT5, l'IL-2 initie l'état cytolytique des lymphocytes T CD8 (CD8) ainsi que leur différenciation en CD8 mémoires (Kim et al., 2006; Williams et al., 2006). STAT1 et STAT4 sont les régulateurs nécessaires pour la différenciation Th1 stimulés respectivement par l'IFN- γ et IL-12 menant à l'activation de T-bet, un facteur de transcription régulant le programme de différenciation Th1 (Zhang et al., 2014).

2.1.2 Th2

Les lymphocytes T CD4 helper 2 (Th2) sont quant à eux caractérisés par leur réponse aux parasites extracellulaires et sont connus pour être centraux aux réponses allergiques (Del Prete, 1992; Sokol et al., 2009). Les cytokines clé pour les fonctions Th2 sont IL-4, IL-5 et IL-13, la première étant impliquée dans la production d'IgE des lymphocytes B menant aux réponses allergiques (Steinke & Borish, 2001). IL-5 active les éosinophiles et inhibe leur apoptose, alors

que l'IL-13 a pour rôle de contrôler les parasites gastrointestinaux (Takatsu & Nakajima, 2008; Wynn, 2003). La différenciation des Th2 est médiée par l'IL-2 et IL-4 qui active respectivement STAT5 et STAT6 (Paul & Zhu, 2010; Zhu et al., 2001).

2.1.3 Th17

Les lymphocytes T CD4 helper 17 (Th17) contrôlent les réponses immunitaires contre les parasites extra-cellulaires comme des bactéries et champignons et sont important dans l'apparition de maladies auto-immunes telle l'arthrite rhumatoïde (Annunziato et al., 2007). Comme le nom l'indique, l'IL-17 est la cytokine effectrice pour les Th17 et cause une réaction de chaînes pro-inflammatoire pouvant être délétère dans certaines infections (Paiva et al., 2021).

2.1.4 Th22

Les lymphocytes T CD4 helper 22 (Th22) sont une population de CD4 identifiée relativement récemment associée avec la protection de la peau et des muqueuses. IL-22, qui est produite principalement par les Th22, induit la production de peptides antimicrobiens et favorise la prolifération cellulaire procurant une protection aux muqueuses contre des pathogènes bactériens (Aujla et al., 2008). Une surproduction d'IL-22 par les Th22 est associée à la génération de maladies auto-immunes, ainsi que d'autres maladies inflammatoires comme des hépatites et des troubles fonctionnels intestinaux (Tian et al., 2013).

2.1.5 Treg

En plus de jouer un rôle critique pour éviter les maladies auto-immunes en affectant la tolérance du soi (Sakaguchi et al., 2010), les lymphocytes régulateurs T (Treg) sont aussi capables d'inhiber la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et des APC (Maeda et al., 2014). Les Treg peuvent soit provenir naturellement du thymus ou se différencier de CD4 naïfs en périphérie (Chen et al., 2003). Les cytokines principales produites par les Treg sont l'IL-10, IL-35 et le TGF- β . Ces trois cytokines ont un fort potentiel d'inhibition des réponses inflammatoires permettant ainsi de diminuer les risques de maladies auto-immunes et les réactions allergiques entre autres (Collison et al., 2007; Couper et al., 2008; Travis & Sheppard, 2014).

2.1.6 Tfh

Leur capacité d'interagir avec les lymphocytes B fait des lymphocytes T folliculaires (Tfh) des joueurs importants dans l'immunité humorale. En effet, ils ont un rôle à jouer dans le

développement des plasmocytes. Les Tfh peuvent sécréter de l'IFN- γ , de l'IL-4 et de l'IL-10 qui favorise la sécrétion d'IgG2a, d'IgG1 et d'IgGA respectivement par les lymphocytes B (Fazilleau et al., 2009).

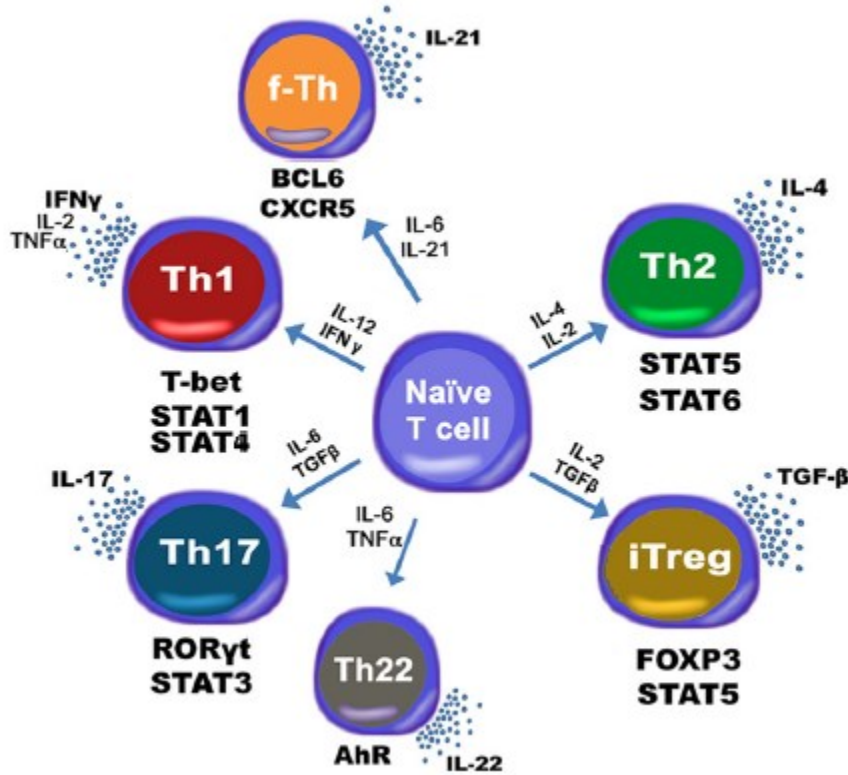


Figure 2.1. Sous-types des lymphocytes T CD4.

Schéma résumant les cytokines requises pour la différenciation, les régulateurs ainsi que les cytokines clé de fonctions associés aux différents sous-types de CD4. Modifiée de (Carbo et al., 2014)

2.1.7 Lymphocytes mémoires et sous-populations

À la suite de l'élimination du pathogène, la majorité des CD4 effecteurs transitionnent vers de l'apoptose, mais la partie restante sert à former la population mémoires (Sprent & Surh, 2002). Les CD4 mémoires possèdent quatre caractéristiques leur permettant de répondre rapidement et efficacement à des pathogènes déjà rencontrés :

- Premièrement, ils sont capables de circuler jusqu'aux tissus périphériques, comme la peau, les poumons et le système digestif, contrairement à la population naïve qui ne circule qu'entre les tissus lymphatiques et le sang permettant une réponse rapide dans ces endroits (Woodland & Kohlmeier, 2009).

- Deuxièmement, la fréquence supérieure de CD4 mémoires pour un antigène particulier par rapport à la population naïve augmente les chances d'une rencontre entre ces CD4 mémoires et leur antigène apparenté lors d'une réinfection. Ceci permet de générer une réponse effectrice plus rapidement (Farber et al., 2014).
- Troisièmement, les CD4 mémoires possèdent un seuil d'activation et de costimulation plus faible que ce qui est nécessaire lors de la réponse primaire (MacLeod et al., 2010; Mishima et al., 2014).
- Finalement, bien que cette caractéristique ne soit pas nécessairement applicable à toutes les cellules ayant un profil « mémoire » (Robertson et al., 2006), les CD4 mémoires sont reconnus pour leur longue durée de vie (McKinstry et al., 2010; Swain, 2000).

Les CD4 mémoires sont généralement subdivisés en trois sous-populations, soit les centrales mémoires (T_{CM}), les effecteurs mémoires (T_{EM}) et les mémoires résidant dans les tissus (T_{RM}). Les T_{CM} expriment des marqueurs associés à la migration vers les ganglions lymphatiques et organes lymphatiques des muqueuses tel CCR7 et CD62L (Cyster, 2005). C'est via cette circulation au travers de ces organes que les T_{CM} subissent leur réponse secondaire (Reinhardt et al., 2001; Sallusto et al., 2004). Les T_{EM} expriment des marqueurs de migrations associés aux sites d'inflammations. Les T_{RM} qu'en à eux restent de façon permanentent dans certains tissus périphériques tels les poumons, la peau ou le foie. Ces positions augmentent les probabilités que les T_{RM} rencontrent un pathogènes lors d'une réinfection (Schenkel & Masopust, 2014).

2.2 RÔLES LORS D'INFECTIONS VIRALES

2.2.1 Virus de l'influenza A (VIA)

Bien que les anticorps neutralisants soient considérés comme la voie immunitaire principale pour gérer l'infection par le VIA, les CD4, surtout les Th1, jouent un rôle important lors de cette infection. En effet, une production trop importante des cytokines effectrices Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) est associée avec une pathologie plus importante du VIA (Betakova et al., 2017). En plus, une réponse Th2 empire les dommages causés par l'infection au VIA sur les tissus des poumons et retarde l'élimination du virus. Une version mortelle de l'infection par le VIA cause une réponse Th1/Th2 débalancée vers le Th2 (Graham et al., 1994; Turianová et al., 2019). De façon similaire, les niveaux l'IL-6 et IL-8, deux cytokines associées à la réponse Th17, ont été associés avec la sévérité de la maladie lors de l'infection par le VIA H1N1 (Bermejo-Martin et al., 2009). Les Treg

quant à eux, diminuent le nombre de Th17 et de neutrophiles, diminuant ainsi l'inflammation pulmonaire et les dommages tissulaires associés (Egarnes & Gosselin, 2018; Moser et al., 2014).

2.2.2 Virus respiratoire syncytial (VRS)

L'élimination du VRS est principalement médiée par la réponse des lymphocytes T, car les anticorps neutralisant produits par les cellules B ne sont pas efficaces ciblant des épitopes « leurre » (Bukreyev et al., 2008; González et al., 2012). Ainsi, les Treg sont particulièrement importants lors de l'infection au VRS, car ils sont responsables du recrutement des CD8 cytotoxiques aux poumons ce qui est nécessaire à l'élimination du virus (Fulton et al., 2010; Ruckwardt et al., 2009). Dans ce contexte, la déplétion des Treg mène à une présence importante de CD8 produisant du TNF- α et de l'IFN- γ augmentant la sévérité de la maladie indiquant leur rôle important anti-inflammatoire (Durant et al., 2013; Fulton et al., 2010). De plus, si la réponse Treg est inadéquate, la réponse Th17, ainsi que la réponse Th2 concomitante, mènera à une infiltration élevée de neutrophiles aux poumons, une production excessive de mucus, et une diminution de l'élimination du virus (Bystrom et al., 2013; Mukherjee et al., 2011).

2.2.3 SRAS-CoV-2

Quoi que le nombre absolu de CD4 chez les patients avec la COVID-19 soit réduit, ils présentent un phénotype d'hyperactivation (Xu et al., 2020). Bien que la réponse Th1 contre SRAS-CoV-2 est existante et probablement protectrice, l'infection se développe due à des mécanismes viraux permettant d'y échapper (Blanco-Melo et al., 2020; Braun et al., 2020). L'importance des Treg dans l'infection par SRAS-CoV-2 est soulignée par plusieurs études démontrant une augmentation de ces cellules dans le sang périphérique de patients atteint d'une forme légère de la COVID-19 (Chen et al., 2020; Wang et al., 2020). De plus, le recrutement des Treg aux poumons semble favoriser une forme légère de la maladie indiquant d'autant plus l'importance de ces cellules pour la réponse antivirale (Taefehshokr et al., 2020). Ceci étant dit, une présence maintenue de Treg lors des stades tardifs de l'infection a aussi été corrélée avec des cas plus sévères de la maladie, probablement dû à une inhibition de la réponse antivirale médiée par les lymphocytes T (Galván-Peña et al., 2021).

2.2.4 Virus de l'hépatite B (VHB)

D'une part, L'IL-17 produit par les Th17 lors de l'infection par le VHB mène à des dommages au tissu du foie, en plus de potentiellement exacerber la fibrose hépatique en favorisant la génération

de myofibroblaste (Ge et al., 2010; Meng et al., 2012; Zhang et al., 2010). D'autre part, empêcher la prolifération des Th17, via une interférence avec le facteur de transcription de cellules B activées, réduit la sécrétion d'IL-17 et IL-22 diminuant ainsi les lésions hépatiques (Chen et al., 2019). Chez les personnes vivant avec le VHB, L'IL-22 exacerbe l'inflammation chronique et la fibrose hépatique via le recrutement de Th17 (Zhao et al., 2014).

2.2.5 Virus de l'hépatite C (VHC)

De façon comparable à l'infection par le VHB, lors de l'infection chronique par le VHC, la présence importante d'IL-17 dû au nombre élevé de Th17 intrahépatiques peut mener à un recrutement de cellules pro-inflammatoires menant à des dommages au niveau du foie (Abou El-Khier et al., 2018; Meng et al., 2012). La fréquence élevée de Treg lors de cette infection joue un double rôle en diminuant les dommages hépatiques, mais en retardant aussi l'élimination du virus menant potentiellement à une inflammation du foie chronique (Wan et al., 2020).

2.2.6 VIH-1

Lors de l'infection par le VIH-1, les Th1, Th17 et Th22 sont critiques pour l'intégrité des muqueuses lors de la réponse immunitaire primaire (Veazey, 2019). Comme mentionné précédemment, l'infection résulte en une dérégulation des CD4 les activant de manière importante, mais sans pour autant être capable de gérer l'infection et même favorisant la réplication virale. La phase chronique de l'infection est caractérisée par une production de Th1 et Th2 alors que le nombre de Th17 est diminué (Gorenec et al., 2016; Shirazi & Pitha, 1992). La diminution du nombre de Th17 est expliquée en partie par leur inhibition via l'activité des Treg (Favre et al., 2010). Concernant les Treg, leur activité est associée à une inhibition des réponses VIH-spécifique contribuant ainsi à la pathogénèse (Kinter et al., 2007). La déplétion des Th22 et la diminution d'IL-22 qui en résulte sont d'importants facteurs dans les dérégulations de l'intégrité du GALT (Kim et al., 2012).

2.3 CD4 ET VIH

De façon générale, l'infection par le VIH-1 pourrait être résumée comme résultant en un échec immunitaire. En effet, la réponse CD8 VIH-spécifique force une diversification génétique des épitopes du VIH reconnus par les CD8 tôt à la suite de l'infection, contribuant ainsi à la persistance virale (Goonetilleke et al., 2009; Salazar-Gonzalez et al., 2009). De façon similaire, malgré la production d'anticorps neutralisants 12 semaines après l'infection, une production de virus

résistant à la neutralisation remplace rapidement ceux qui y sont sensible (Richman et al., 2003; Wei et al., 2003). En plus de ces échecs, la perte des CD4 est le « hallmark » de l'infection par le VIH-1. Cette perte ainsi que les dysfonctionnements des CD4 seront explorés dans la section suivante.

2.3.1 Épuisement

L'épuisement de CD4 est défini par une déficience en production de cytokines et une diminution de leur prolifération et est un phénotype fréquent des infections virales chroniques (Day et al., 2006). Cet épuisement empêche le système immunitaire de fonctionner normalement freinant ainsi la capacité à contrôler la réplication virale et permettant une progression de la maladie. Dans le contexte du VIH-1, l'épuisement des CD4 est principalement associé aux marqueurs antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique 4 (CTLA-4) et programmed cell death 1 (PD-1), le premier étant le régulateur ayant le plus d'impact pour ces lymphocytes. Bien que ces molécules de surfaces servent comme importants régulateurs de la réponse immunitaire, leur expression persistante lors d'infections chroniques mène à un dysfonctionnement et épuisement des CD4 rendant leur réponse ineffective (Morou et al., 2014) (Figure 2.2.).

CTLA-4 est une molécule inhibitrice se retrouvant à la surface de CD4 VIH-spécifiques lors de la phase aiguë et chronique et sa présence corrèle avec la progression de la maladie lors de l'infection par le VIH-1 (Kaufmann et al., 2007). Son expression est régulée par la phosphorylation de sa queue cytoplasmique médiée par les kinases Lck et Fyn qui stabilisent CTLA-4 à la surface de la cellules (Shiratori et al., 1997). CTLA-4 interagit avec CD80 et CD86, les ligands des récepteurs de costimulation CD28 (Greenwald et al., 2002). L'activité de CTLA-4 entrave la signalisation en aval des récepteurs de cellules T (TCR) en interférant avec ERK, JNK et AKT (Calvo et al., 1997; Schneider et al., 2006). De plus, la liaison de CTLA-4 avec la chaîne ξ du TCR prévient sa phosphorylation empêchant la transmission du signal (Lee et al., 1998). CTLA-4 fonctionne aussi en augmentant la mobilité cellulaire réduisant ainsi le temps de contact entre le CD4 et les APC menant à une diminution de la production de cytokines et de la prolifération cellulaire (Schneider et al., 2006). L'importance de CTLA-4 dans l'épuisement des CD4 lors de la phase chronique de l'infection par le VIH-1 est soulignée par la capacité à augmenter la production d'IFN- γ et d'IL-2 suivant son blocage (Kaufmann et al., 2007).

PD-1 interagit avec SHP1 et SHP2, deux molécules de signalisation régulant la croissance cellulaire, via deux sites de phosphorylation de sa queue intracellulaire, soit un motif inhibiteur de

récepteur immunitaire à base tyrosine et un motif « switch » de récepteur immunitaire à base tyrosine (Chemnitz et al., 2004). Les cellules montrent un profil réduit de production de cytokines et de prolifération suivant la ligation de PD-1 avec le programmed death ligand-1 et 2 (PDL-1 et PDL-2) (Freeman et al., 2000). L'activité de PD-1 se fait via l'inhibition en aval du signal TCR en s'associant avec la chaîne ξ du TCR et en empêchant la phosphorylation de ZAP70 (Sheppard et al., 2004). De plus, en empêchant l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) par le CD28, PD-1 inhibe le métabolisme du glucose et l'activité d'AKT induits par le CD3/CD28 (Liu et al., 2020).

En plus des facteurs de signalisations intrinsèques aux CD4 qui contribuent à leur épuisement, certains facteurs environnementaux y ont aussi un rôle lors de l'infection par le VIH-1. Les défauts dans la régulation de la production de cytokines par les monocytes et DC contribuent aussi aux déficiences immunologiques de PVVIH (Kedzierska et al., 2003). L'augmentation d'IL-10 lors de l'infection par le VIH-1 est associée avec une diminution de la réponse CD4 (Clerici et al., 1994; Kumar et al., 1998). Finalement, un facteur important des dysfonctionnements des CD4 provient d'IDO qui régule la prolifération cellulaire via son catabolisme du tryptophane. L'expression d'IDO par les pDC lors de l'infection par le VIH-1 est associée à une déficience des fonctions des CD4 (Boasso et al., 2007).

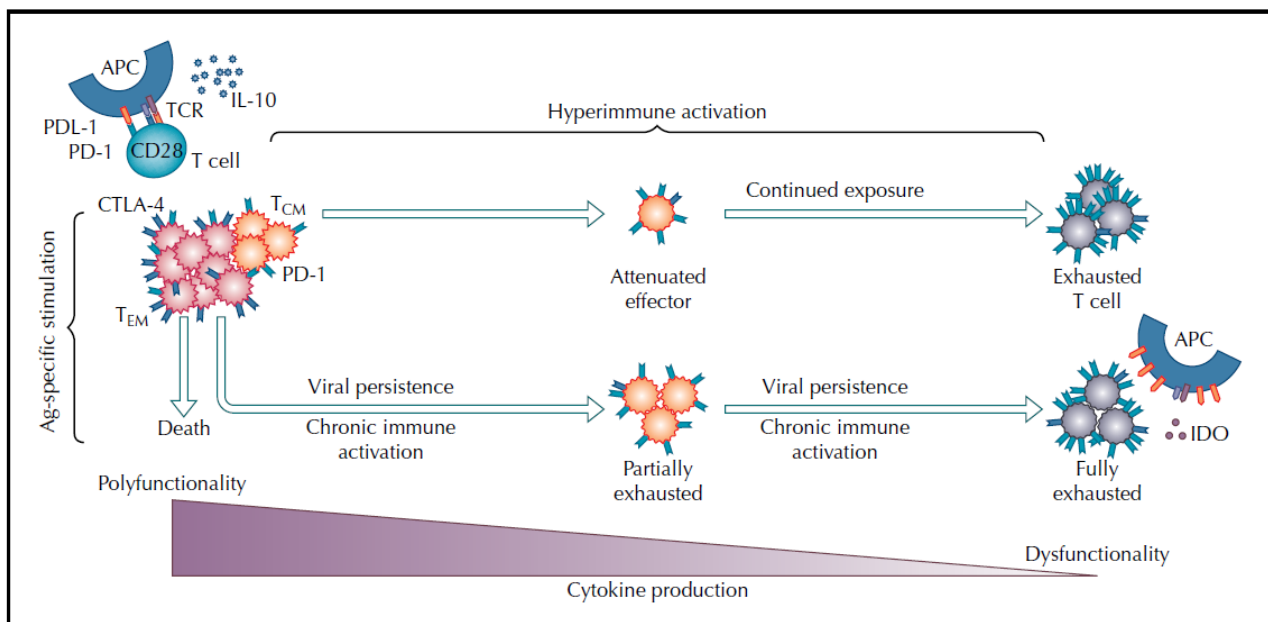


Figure 2.2. Épuisement cellulaire.

Les dérégulations des cellules T sont contrôlées par les cytokines et les récepteurs de régulations négatifs. L'exposition continue à des antigènes mène à une hyper activation immunitaire. L'activation des CTLA-4 et PD-1 mène à une fatigue cellulaire (El-Far et al., 2008).

2.3.2 Perte cellulaire

Une des premières hypothèses mise de l'avant pour expliquer la perte des CD4 lors de l'infection par le VIH-1 est celle de « l'attaque directe ». En effet, l'aspect cytopathique de la réplication virale explique en partie la perte des CD4 infectés. Par exemple, la réplication virale mène à une accumulation d'ADN viral non-intégrés causant de la toxicité et une perte cellulaire (Shaw et al., 1984). Aussi, la viabilité cellulaire des CD4 infectés est compromise dû à l'intégrité membranaire. En effet, le bourgeonnement continu des virions en plus de la protéine virale Vpu augmente la perméabilité de la membrane (Fauci, 1988; González & Carrasco, 2001). De plus, la protéase virale peut cliver Bcl-2 et activer la procaspase 8 rendant les CD4 plus susceptibles à l'apoptose intrinsèque et extrinsèque (Korant et al., 1998; Nie et al., 2002). Cependant, la perte de CD4 et CD8 non-infectés indique que d'autres mécanismes sont responsables de la perte importante de ces cellules dans leur ensemble.

Un autre modèle expliquant la perte des CD4 est celui de l'hyper activation immunitaire. Ce modèle se base sur le fait que plusieurs études ont montré que les niveaux d'activation immunitaire chez les PVVIH étaient de meilleurs prédicteurs de la progression de la maladie que les niveaux de réplication virale (Deeks et al., 2004; Rodríguez et al., 2006). Bien que cette activation augmente le nombre de CD4 à court terme, ces cellules ont une courte durée de vie et sont donc ainsi perdues rapidement à la suite de l'activation (Yates et al., 2007). L'hyper activation du système immunitaire est causé par la production importante de cytokines pro-inflammatoires et aussi par les des protéines virales telles Nef, Tat, Vpr et Vpu (Swingler et al., 1999; Unutmaz et al., 1994). Cette libération de cytokines et chimiokines, incluant l'IL-1 α/β , l'IL-6, l'IL-8, MIP-1 α/β et les IFN-I, présente lors de la phase aiguë et chronique contribue à l'activation et à la perte des CD4 (Appay & Sauce, 2008; Valdez & Lederman, 1997). Cette inflammation constante est délétère pour les fonctions des CD4 VIH-spécifiques entre autres en empêchant l'établissement de CD4 mémoires produisant de l'IL-2 (Younes et al., 2003). Un autre mécanisme relié à l'activation immunitaire potentiellement responsable de la perte des CD4 est celui des réponses aux dommages à l'ADN (DDR) télomérique. En effet, des études récentes *in vitro* montrent que les DDR contribuent à l'apoptose des CD4 via la dérégulation de la voie PI3K/AKT (Khanal et al., 2020; Zhao et al., 2019). Finalement, un autre aspect de l'activation immunitaire impactant la survie des CD4 est l'activité d'IDO. Bien que son activité soit principalement associée avec l'intégrité du GALT, une augmentation de kynurenines plasmatique est associée à une diminution dans la capacité des CD4 mémoires à répondre à l'IL-2 via la production d'espèces réactives de l'oxygène (Dagenais-Lussier et al., 2016).

Le dernier modèle expliquant la perte des CD4 lors de l'infection par le VIH-1 est celui des différents procédés de mort programmé. L'apoptose médiée par la caspase-3 est un facteur contribuant à la perte des CD4 permissibles à l'infection par le VIH-1. Cependant pour les CD4 non-infectés, la pyroptose, médiée par la caspase-1, est responsable de leur mort cellulaire (Sandler & Douek, 2012). La pyroptose est une forme de mort cellulaire programmée inflammatoire lors de laquelle les cellules affectées libèrent des cytokines inflammatoires menant à de la pyroptose chez les cellules avoisinantes produisant ainsi une boucle rétroactive positive de mort cellulaire (Doitsh et al., 2014). En fait, la pyroptose en soit est beaucoup plus impliquée dans la perte des CD4 que l'apoptose causant 95% de la mort de CD4 selon une étude effectuée sur des souris humanisées. (Terahara et al., 2021).

Dans le contexte de perte des CD4, il est intéressant de considérer que toutes les sous-populations ne sont pas toutes affectées de la même manière. En effet, la stimulation des TLR causée par la translocation de produits du microbiome au niveau des muqueuses intestinales mène à une activation importante et une déplétion des Th17 et Th22. Cette perte de ces sous-population contribue à la diminution de l'intégrité du GALT favorisant ainsi l'activation immunitaire (Bunjun et al., 2021; DaFonseca et al., 2015; van Wijk & Cheroutre, 2010). En plus de cette perte de Th17, la différenciation des CD4 en réponse à cette perte favorise la génération de Treg (Favre et al., 2010; Jenabian et al., 2015).

3 LA RÉPONSE INTERFERON DE TYPE I

3.1 TYPES D'IFN-I ET SIGNALISATION

En plus des IFN- α et β , le premier étant encodé par plus d'une douzaine de gènes, il existe aussi les IFN- δ , ϵ , κ , τ et ω (Pestka et al., 2004). IFN- α et β sont les mieux caractérisés alors que les autres, dû à leur expression limitée et fonctions chevauchant celles de IFN- α et β le sont moins (Capobianchi et al., 2015). Tous ces IFN se lient à un récepteur hétérodimérique pour former des chaînes IFNAR1 et IFNAR2. À la suite de cette liaison, le recrutement de JAK1 et TYK2 permet la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui se lient à IRF9 formant ainsi le complexe ISGF3. La translocation d'ISGF3 au noyau permet la transcription des ISG (Pestka et al., 2004; Taniguchi & Takaoka, 2001) (Figure 3.1.).

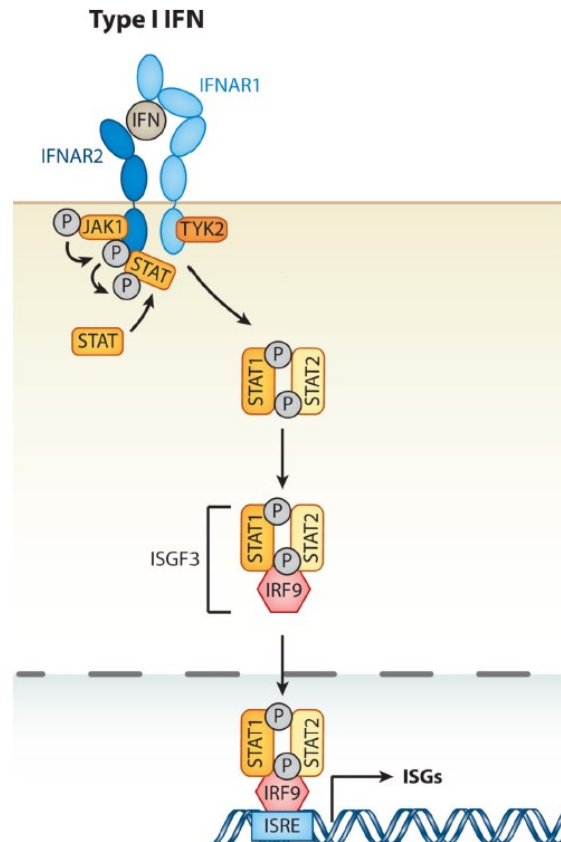


Figure 3.1. La cascade de signalisation IFN-I

Les IFN-I agissent à travers l'hétérodimère de IFNAR1 et IFNAR 2. La liaison entre les IFN-I et le complexe IFNAR1/2 déclenche la phosphorylation de JAK1 menant au recrutement et à la phosphorylation de STAT1 et STAT2. STAT1 et STAT2 s'associent et recrutent IRF9 formant ainsi ISGF3. Modifiée de (Schneider et al., 2014)

3.2 EXPRESSION

Les producteurs principaux d'IFN-I sont les pDC (Kadowaki et al., 2000). Les voies de signalisations permettant la production d'IFN-I sont multiples et incluent la signalisation par les TLR endosomals via MyD88 et IRF7, qui mène aussi à l'activation de NF- κ B et l'induction d'autres cytokines de costimulation (Honda et al., 2005), la signalisation par les TLR non-endosomals comme TLR2 (Dasgupta et al., 2014), la voie cGAS/STING en réponse aux infections par des virus à ADN ainsi que la voie RIG-I pour les virus à ARN (Bruni et al., 2015; Li et al., 2013). Il est intéressant de considérer que la voie de signalisation IFN-I par les TLR endosomals est spécifique aux pDC (Cervantes-Barragan et al., 2012). Ceci est souligné par CpG, un ligand de TLR9, pour lequel l'administration *in vivo* cause une rapide réponse IFN-I médiée exclusivement par les pDC (Blasius et al., 2004). L'importance des pDC pour la production d'IFN-I ne peut cependant pas être complètement expliquée par les voies TLR7/9, car celles-ci sont aussi présentes chez d'autres cellules myéloïdes ainsi que chez les cellules B (Chiang et al., 2012). Un aspect pouvant expliquer le rôle que les pDC jouent dans la signalisation IFN-I est le niveau d'expression d'IRF7 qui est normalement absent pour la plupart des types cellulaires étant seulement induit suivant une signalisation initiale d'IFN-I permettant de débiter une boucle rétroactive positive (Dai et al., 2004). Dans le cas des pDC, IRF7 est exprimé de façon élevée permettant une réponse IFN-I indépendante de cette boucle rétroactive et d'IFNAR lors de certaines infections (Barchet et al., 2002). Ceci peut expliquer pourquoi les pDC de souris déficientes en IFNAR peuvent répondre normalement à une infection MCMV. Les IFNAR demeurent cependant nécessaires pour une réponse IFN-I complète dans le contexte de liaison *in vivo* des TLR (Tomasello et al., 2018). Un autre facteur important dans la production d'IFN-I par les pDC est le regroupement cellulaire. En effet, à la suite de leur activation par des ligands aux TLR, les pDC forment des grappes (Asselin-Paturel et al., 2005) et la densité cellulaire a été associée à une réponse IFN-I forte (Kim et al., 2014; Wimmers et al., 2018). En plus de la proximité entre les pDC, certaines études montrent aussi l'importance des interactions directes cellules-cellules. Ces études montrent la contribution de l'intégrine LFA-1 pour une réponse IFN-I adéquate lors de l'activation des TLR, de l'infection par le VIA et le MCMV (Saitoh et al., 2017; Tomasello et al., 2018).

3.3 FONCTIONS

Des études transcriptomiques sur différents types cellulaires provenant de plusieurs mammifères ont identifié environ 450 gènes induits par les IFN-I (Schoggins et al., 2011). Bien que chez les

humains il semblerait que 10% du génome soit sujet aux régulations par les IFN-I, les comparaisons transcriptomiques inter-animales ont identifié un groupe essentiel de 62 gènes communs critiques pour les réponses IFN (Shaw et al., 2017). Les PRR ainsi que des protéines de transduction du signal comme JAK, STAT1/2 et IRF9 sont présents de manière constitutive, mais sont aussi des ISG exprimés pour renforcer la réponse IFN-I (Schneider et al., 2014). En plus de ces ISG de sensibilisation, certains ISG ciblent différentes étapes du cycle viral, soit l'entrée et le trafic intracellulaire, l'expression génique et réplication génomique ainsi que l'assemblage et la sortie (Figure 3.2.).

3.3.1 Entrée virale et trafic intracellulaire

L'attachement du virion à la cellule cible est une étape nécessaire aux infections virales. HSPE est l'exemple typique d'ISG ciblant cette étape. Plusieurs études ont démontré que l'expression de HPSE, une héparanase, inhibe plusieurs virus tels les flavivirus et norovirus via son clivage des protéoglycanes à sulfate d'héparane (Dang et al., 2018; Schoggins et al., 2014). De plus, le ligand de glycoprotéine PSGL-1, lorsqu'il est incorporé à de nouveaux virions, a récemment été identifié comme inhibiteur d'infektivité pour plusieurs virus en inhibant l'attachement (Fu et al., 2020). L'entrée en tant que telle est ciblée par différents ISG utilisant différents mécanismes pour inhiber cette étape. Par exemple, les protéines IFITM sont capables de rediriger les particules virales vers des lysosomes pour les dégrader (Bailey et al., 2014; Spence et al., 2019), CH25H, un enzyme convertissant le cholestérol en 25-HC, perturbant les membranes et réprimant l'entrée des virions (Blanc et al., 2013; Liu et al., 2013), ainsi que le coactivateur de récepteur nucléaire, NCOA7, qui favorise l'acidification vésiculaire et la dégradation du cargo (Doyle et al., 2018). SERINC5 est un facteur de restriction capable de s'incorporer dans la particule virale lors du bourgeonnement inhibant ensuite la fusion du virion avec la membrane cellulaire de la cellule cible (Usami et al., 2015). Finalement, les protéines MX1 et MX2 sont capables d'inhiber le transport des virus vers le noyau en bloquant le complexe du pore nucléaire (Haller et al., 2015).

3.3.2 Expression génique et réplication génomique

Les réplicases virales à ARN sont une cible de choix pour les ISG dû à leur haut taux de conservation chez différents virus. MX1 est un exemple d'ISG capable de cibler l'élongation transcriptionnelle (Haller et al., 2015). Un autre ISG identifié comme étant capable d'inhiber la transcription virale est RBBP6 en se liant avec la protéine de l'Ebola, VP30, empêchant celle-ci d'interagir avec la protéine virale NP (Batra et al., 2018).

Un autre aspect de l'expression génique qui est souvent utilisé par les ISG pour inhiber le cycle de réplication viral est la traduction protéique. De ces ISG, trois ont été relativement bien caractérisés, soit PKR, la famille IFIT et ZAP. Le premier est une kinase dépendante de l'ARN double brins phosphorylant eIF2A modulant ainsi la traduction (Pindel & Sadler, 2011). La famille des IFIT cible les structures coiffe ne possédant pas de 2'-O-méthylation empêchant l'initiation de leur traduction en se liant à eIF3C et eIF3E (Vladimer et al., 2014). Les ZAP quant à elles possèdent plusieurs activités antivirales dont la capacité d'interagir avec les exosomes et d'ainsi dégrader l'ARN messager (Guo et al., 2007). En plus de ces trois ISG, plusieurs autres facteurs de restriction ciblant la traduction protéique ont été identifiés, comme les PARP capables d'affecter la traduction avec leur activité catalytique et d'autoribolysation (Atasheva et al., 2014). Certains ISG, comme schlafen 11, sont capable de réprimer certains codons d'ARN de transferts rares utilisés par des virus tel le VIH-1 (Li et al., 2012). Un dernier exemple d'ISG ciblant la traduction protéique est Shiftless, qui inhibe le décalage de cadre ribosomal affectant le ratio Gag : Gag-Pol optimal pour le VIH-1 (Wang et al., 2019b).

Finalement, la réplication génomique est une des voies de la réplication virale ciblée par les ISG. L'enzyme Viperin est un exemple d'un tel ISG, qui catalyse la formation de ddhCTP qui s'incorporent dans l'ARN viral nouvellement synthétisé agissant comme terminateur de chaîne pour la polymérase à ARN des flavivirus (Gizzi et al., 2018). Dans le cas des rétrovirus comme le VIH-1, l'utilisation d'une transcriptase inverse pour la génération de l'ADN à partir du génome à base d'ARN peut être cibler par les ISG. APOBEC3G est l'exemple le plus connu de cette stratégie, cette protéine cause des mutations dans le génome simple brin des rétrovirus menant à des défauts dans la réplication virale (Malim & Bieniasz, 2012; Zhang et al., 2003). SAMHD1 est un autre facteur de restriction impliqué dans l'infection par le VIH-1 en épuisant la réserve de dNTP disponible pour la synthèse d'ADNc viral inhibant ainsi la réplication virale (Lahouassa et al., 2012). Une stratégie utilisée par les ISG est de dégrader directement le génome viral. Par exemple, les protéines OAS catalysent la formation de 2',5'-oligoadénylate activant la RNase L cellulaire menant à la dégradation du génome viral (Chakrabarti et al., 2011). Une autre façon d'inhiber la réplication virale est via la déstabilisation d'organelles de réplication comme c'est le cas avec IFI16 empêchant la formation de ces sites au réticulum endoplasmique inhibant la réplication des flavivirus (Richardson et al., 2018a). Pour finir, un autre mécanisme ciblant la réplication génomique est la répression de l'autophagie. En effet, plusieurs virus sont connus pour coopter la machinerie autophagique pour promouvoir leur propre réplication (Paul & Münz, 2016). Ainsi, il est possible de cibler l'autophagie, comme TDRD7 le fait en inhibant la

phosphorylation d'AMPK lors de l'infection par le virus Sendai, pour réprimer la réplication virale (Subramanian et al., 2018).

3.3.3 Sortie du virion

Les dernières étapes pouvant servir de cible pour les ISG afin d'entraver la réplication virale sont l'assemblage et la sortie du virus en tant que telle. Le peu d'ISG identifiés pour cibler ces étapes sont impliqués dans l'infection par le VIH-1 et comprennent CNP qui s'attache à Gag et empêche l'assemblage de la particule virale, GBP5 qui nuit à l'incorporation de Env aux virions et finalement la Tetherin qui ancre les particules du virus à la surface de la cellule lors du bourgeonnement (Krapp et al., 2016; Neil et al., 2008; Wilson et al., 2012).

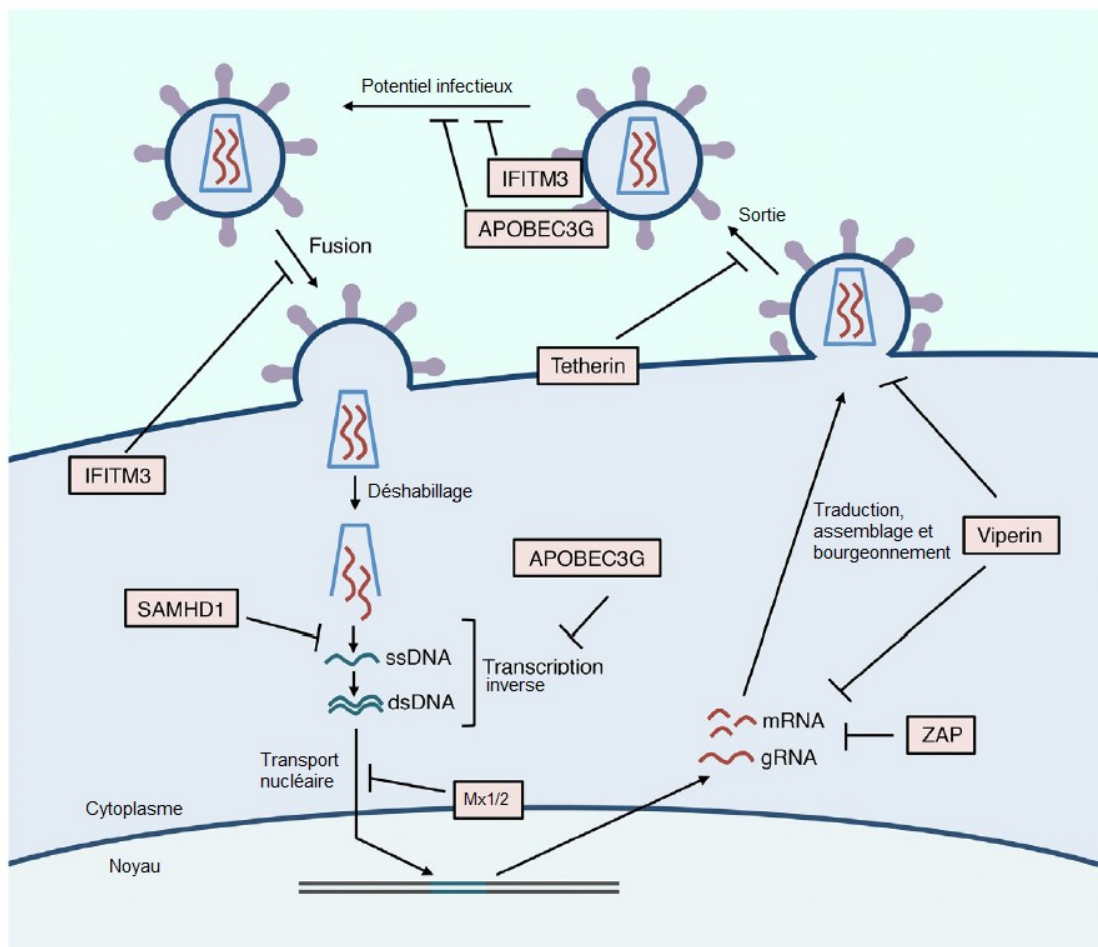


Figure 3.2. Les facteurs de restriction inhibent la réplication des virus à plusieurs étapes de leur cycle de vie.

Le cycle de réplication d'un rétrovirus est représenté ainsi que l'inhibition de différentes étapes du cycle par des facteurs de restrictions. Modifiée de (Chemudupati et al., 2019)

3.4 SYSTÈMES DE RÉGULATION

Les mécanismes permettant de réprimer la signalisation IFN-I peuvent être regroupés en trois groupes selon leur fonctionnement :

- L'expression de régulateurs négatifs.
- L'induction de micro-ARN (miRNA).
- La régulation à la baisse de l'expression d'IFNAR en surface.

Les protéines principalement associées avec la boucle rétroactive négative de signalisation IFN-I sont les SOCS 1 et 3 qui compétitionnent avec les STAT pour la liaison avec IFNAR et inhibent l'activité de JAK (Yoshimura et al., 2007) ainsi qu'USP18 qui sépare JAK1 d'IFNAR2 (Sarasin-Filipowicz et al., 2009). En plus des protéines précédentes, STAT3 a récemment été identifié comme régulateur négatif de la signalisation IFN-I (Tsai et al., 2019; Wang et al., 2019a). STAT3 agit en tant que régulateur négatif en empêchant l'entrée de STAT1 au noyau en compétitionnant pour la liaison avec KPNA1, l'importine principale de STAT1 (Wang et al., 2019a).

Deux miRNA sont connus pour réguler les réponses IFN-I, soit miR-146a et miR-155. Le premier régule l'expression de STAT1 chez les Th1 (David, 2010) alors que le second réprime de façon générale la voie IFNAR-JAK-STAT dans les CD8 à la suite d'une signalisation pro-inflammatoire et PRR (Gracias et al., 2013).

Finalement, la régulation à la baisse d'IFNAR se fait principalement via l'internalisation du récepteur réduisant ainsi la capacité cellulaire à répondre aux IFN-I (de Weerd & Nguyen, 2012). Cette internalisation est médiée par différentes voies pro-inflammatoires tel IL-1, TLR ainsi que par le stress métabolique (Bhattacharya et al., 2013; Huangfu et al., 2012; Huynh et al., 2012). Un mécanisme associé à cette signalisation pro-inflammatoire est celui médié par la kinase p38 facilitant la phosphorylation du domaine cytoplasmique d'IFNAR menant à son internalisation, ubiquitination et dégradation (Platanias, 2003). En plus de l'internalisation et la dégradation d'IFNAR, l'activation TLR permet le recrutement de PKC β et PKC δ aux IFNAR, ceci active SHP2 qui est capable de déphosphoryler les intermédiaires de signalisation (Du et al., 2005) (Figure 3.3.).

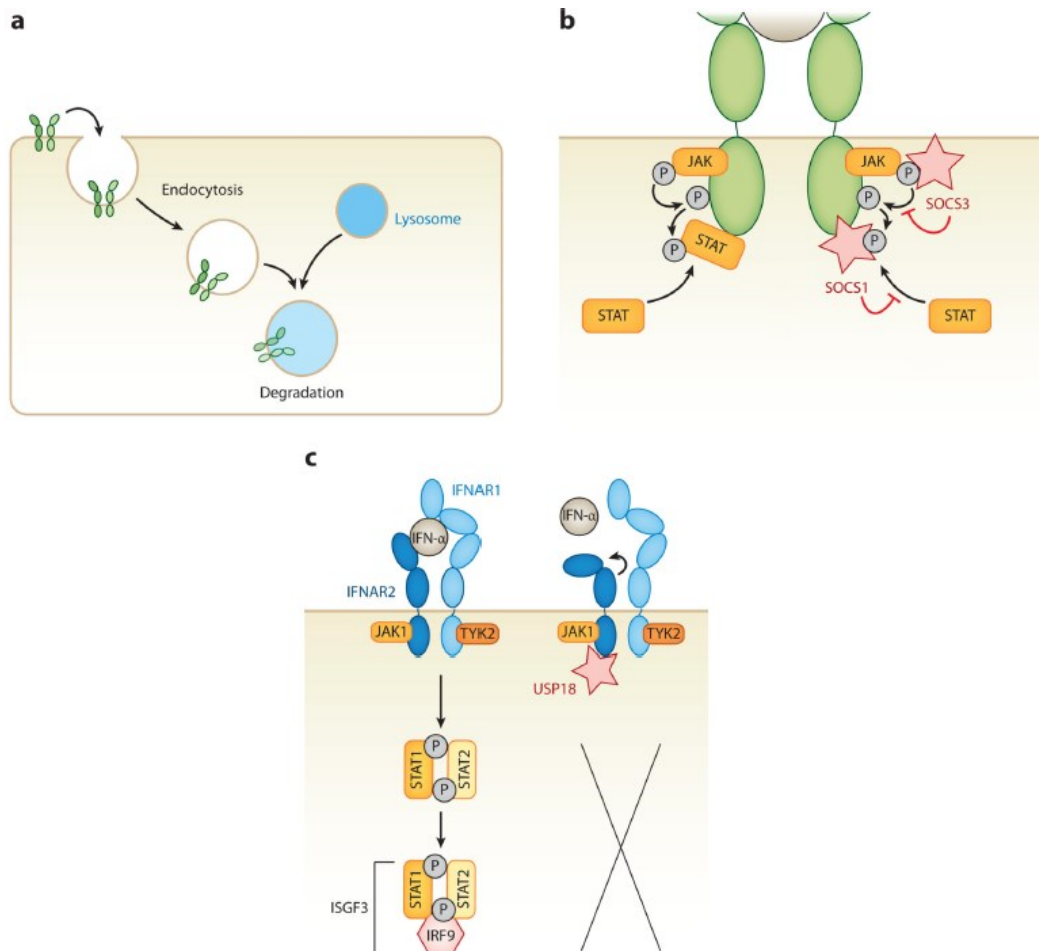


Figure 3.3. Voies de régulation des IFN.

La signalisation IFN est régulée négativement par plusieurs mécanismes. (a) Un des mécanismes de régulation est l'endocytose d'IFNAR réduisant la signalisation JAK/STAT. (b) Les protéines SOCS agissent comme inhibiteurs de kinases dans la cascade de phosphorylation JAK/STAT. (c) USP18 se lie à la sous-unité IFNAR2 du récepteur empêchant l'activité de JAK1. Modifiée de (Schneider et al., 2014)

3.4.1 USP18 et le système d'ISGylation

Comme mentionné plus haut, la protéase ubiquitine-spécifique 18 (USP18), aussi connue sous le nom d'UBP43, est un régulateur de la signalisation IFN-I. L'activité de régulation de l'IFN-I médié par USP18 est dû à sa capacité à se lier à la région cytoplasmique d'IFNAR2 empêchant non seulement la liaison de JAK1 avec IFNAR2, empêchant ainsi son activation, mais changeant aussi la conformation du récepteur forçant sa dissociation avec la cytokine. En plus d'affecter les interactions entre cytokine et récepteur, l'interaction entre USP18 et IFNAR2 diminuerait la capacité de ce dernier à recruter IFNAR1 à la surface cellulaire (Wilmes et al., 2015). Cette chaîne d'événements, engendre un état réfractaire chez les cellules, diminuant leur capacité à répondre

à de futures stimulations (François-Newton et al., 2011). L'importance d'USP18 dans le contrôle de la signalisation IFN-I est souligné par les modèles murins chez lesquels sa déficience cause une hyperactivation de cette signalisation caractérisée par un maintien de la phosphorylation de STAT1 et STAT2 (Kim et al., 2005; Zou et al., 2007).

En plus de ses fonctions de régulateur direct de la signalisation IFN-I, USP18 est connu pour son activité isopeptidase ciblant le gène stimulé par l'interféron 15 (ISG15). L'ISG15 est une des protéines les plus exprimées à la suite de la stimulation par les IFN-I. Cet enzyme modifie d'autres protéine de manière similaire à l'ubiquitination, un processus nommé ISGylation. Dépendamment de la cible, l'ISGylation peut mener à la dégradation de la protéine affectée, sa stabilisation ou même son inhibition (Sandy et al., 2020). Comme pour l'ubiquitination, le système d'ISGylation utilise un ensemble de trois types d'enzymes, E1, E2 et E3, permettant respectivement l'activation, la conjugaison et la liaison d'ISG15 à sa cible. USP18 s'insère dans ce système de par son activité d'isopeptidase spécifique à ISG15 permettant la deISGylation en le séparant de son substrat. Cette activité d'USP18 est médié par sa région IBB-1 qui interagit avec le domaine C-terminal d'ISG15 (Zhang & Zhang, 2011).

Ainsi, USP18 peut moduler la réponse IFN-I par deux voies, soit en inhibant l'activation de JAK1, empêchant la signalisation directement, ou en modifiant l'activité d'ISG15, un important facteur de la réponse IFN-I.

3.5 IFN-I ET INFECTIONS PERSISTANTES

Comme mentionné précédemment, la signalisation IFN-I est sujette à des systèmes de régulation dans le but de revenir à un état d'homéostasie une fois que le virus est éliminé. Cependant, dans le cas d'infections persistante, cet état ne peut être atteint menant ainsi à une production soutenue d'IFN-I résultant en différents effets néfastes chez l'hôte notamment en causant de l'immunosuppression et en promouvant l'inflammation. De plus en plus d'études pointent vers l'expression soutenue d'IFN-I comme étant un facteur commun de pathogénèse chez plusieurs maladies persistante comme le VIH-1.

3.5.1 Effets de la réponse IFN-I maintenue sur la réponse innée

L'expression soutenue d'IFN-I mène à des dérégulations au niveau tissulaire et cellulaire reliées à la réponse immunitaire innée. Par exemple, au niveau tissulaire, l'expression soutenue d'IFN-I est connue pour perturber l'architecture splénique résultant en une altération des interactions

entre les cellules du système immunitaire. Cette expression augmente aussi l'expression d'IL-10 et de PDL-1 chez les DC, monocytes et macrophages y résidant en plus d'être associée à une diminution de ces cellules ainsi que les cellules NK (Boasso et al., 2008; Teijaro, 2016).

Au niveau cellulaire, les IFN-I sont associés à la perte des DC dû à la répression des microARN221 causant une expression de *bim* et *foxo3a*, deux gènes pro-apoptotiques (Sehgal et al., 2015). Similairement, l'exposition soutenue des pDC à de l'IFN-I lors d'infections virales induit l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bim et Bax, activant les caspases et menant à la mort cellulaire (Swiecki et al., 2011). Toujours dans le cadre des DC, la présence d'IFN-I lors de l'infection par le LCMV clone-13 inhibe la génération de cDC, qui possèdent une capacité à stimuler les lymphocytes T, favorisant ainsi un état immunosupprimé (Cunningham et al., 2016). En ce qui a trait aux macrophages, il a été démontré que les IFN-I sont reliés à une diminution de la réplication virale forcée des macrophages CD169+ nécessaire à une production d'antigènes adéquate (Honke et al., 2011). Finalement, l'expression soutenue d'IFN-I favorise l'expansion de monocytes exprimant Ly6C de façon élevée ayant des fonctions immunosuppressives en plus de désensibiliser les monocytes à des facteurs microbiens qui les activeraient normalement (Norris et al., 2013; Taleb et al., 2017) (Figure 3.4.).

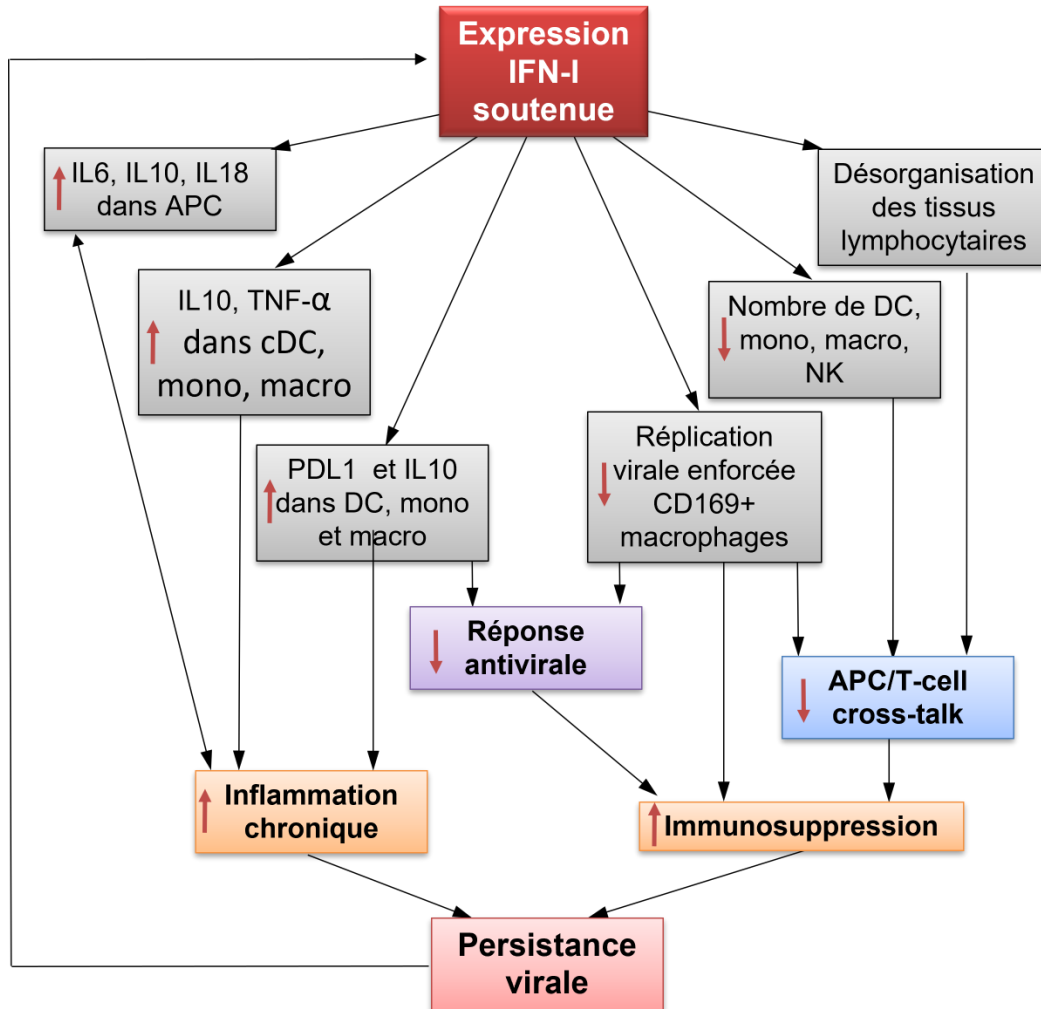


Figure 3.4. Défauts de l'immunité innée causés par l'expression soutenue des IFN-I lors d'infections persistantes. Traduite de (Dagenais-Lussier et al., 2017)

3.5.2 Effets de la réponse IFN-I maintenue sur la réponse humorale

Les infections persistantes virales, comme le VIH-1, sont aussi associées avec une perturbation de la réponse humorale caractérisée par une perte progressive des cellules B mémoires et virus-spécifiques, une distribution anormale dans les sous-populations des cellules B, une plus grande production des anticorps totaux et non-spécifiques, ceci étant connu sous le nom d'hypergammaglobulinémie (HGG), une apparence tardive des anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse vaccinale altérée (Kardava et al., 2014; Moir & Fauci, 2013; Noto & Pantaleo, 2017). En plus de causer de l'HGG, la signalisation IFN-I est aussi connue pour diminuer la production d'anticorps spécifiques ainsi que de causer une perte de l'architecture splénique organisée (Daugan et al., 2016). Finalement, l'expression soutenue d'IFN-I a aussi été associée avec la génération de plasmoblastes de courte durée de vie, une réduction dans la production

d'anticorps neutralisant et une perte de cellules B spécifiques causées par des facteurs extrinsèques comme la présence de lymphocyte cytotoxiques, des cellules myéloïdes produisant de l'IL-10 et de monocytes inflammatoires (Fallet et al., 2016; Moseman et al., 2016; Sammicheli et al., 2016) (Figure 3.5.).

3.5.3 Maintien et fonctions des lymphocytes T

Dans le contexte des lymphocytes T, quatre aspects négativement affectés par la signalisation IFN-I persistante peuvent être abordés :

- La signalisation IFN-I augmente l'apoptose induit par le VIH-1 et l'activité de la caspase-3 chez les CD4 de souris humanisées (Cheng et al., 2017), réduit la capacité des cellules à répondre à l'IL-2 et l'IL-7 et réduit leur homéostasie (Cha et al., 2014; Le Saout et al., 2014).
- Plusieurs marqueurs d'activation et de prolifération, comme CD38, HLA-DR et Ki67, sont élevés lors de l'infection par le VIH-1 en corrélation avec la production d'IFN-I (Hardy et al., 2013).
- La voie de signalisation IFN-I est associée avec l'épuisement des CD4 dans le cas de l'infection par le VIH-1 et une suppression de la différenciation Th1 lors de l'infection par LCMV clone-13 (Crawford et al., 2014; Osokine et al., 2014).
- L'effet de la signalisation IFN-I sur les Treg n'est pas totalement évident. Certaines études se contredisent en rapportant soit aucun effet de la signalisation sur les Treg, ou un effet direct sur la réduction de leur nombre (Che et al., 2015; Srivastava et al., 2014).

Ainsi, malgré le rôle critique que les IFN-I jouent pour défendre l'hôte contre les attaques virales, il est bien établi que leur signalisation est bel et bien une épée à double tranchant (Figure 3.5.).

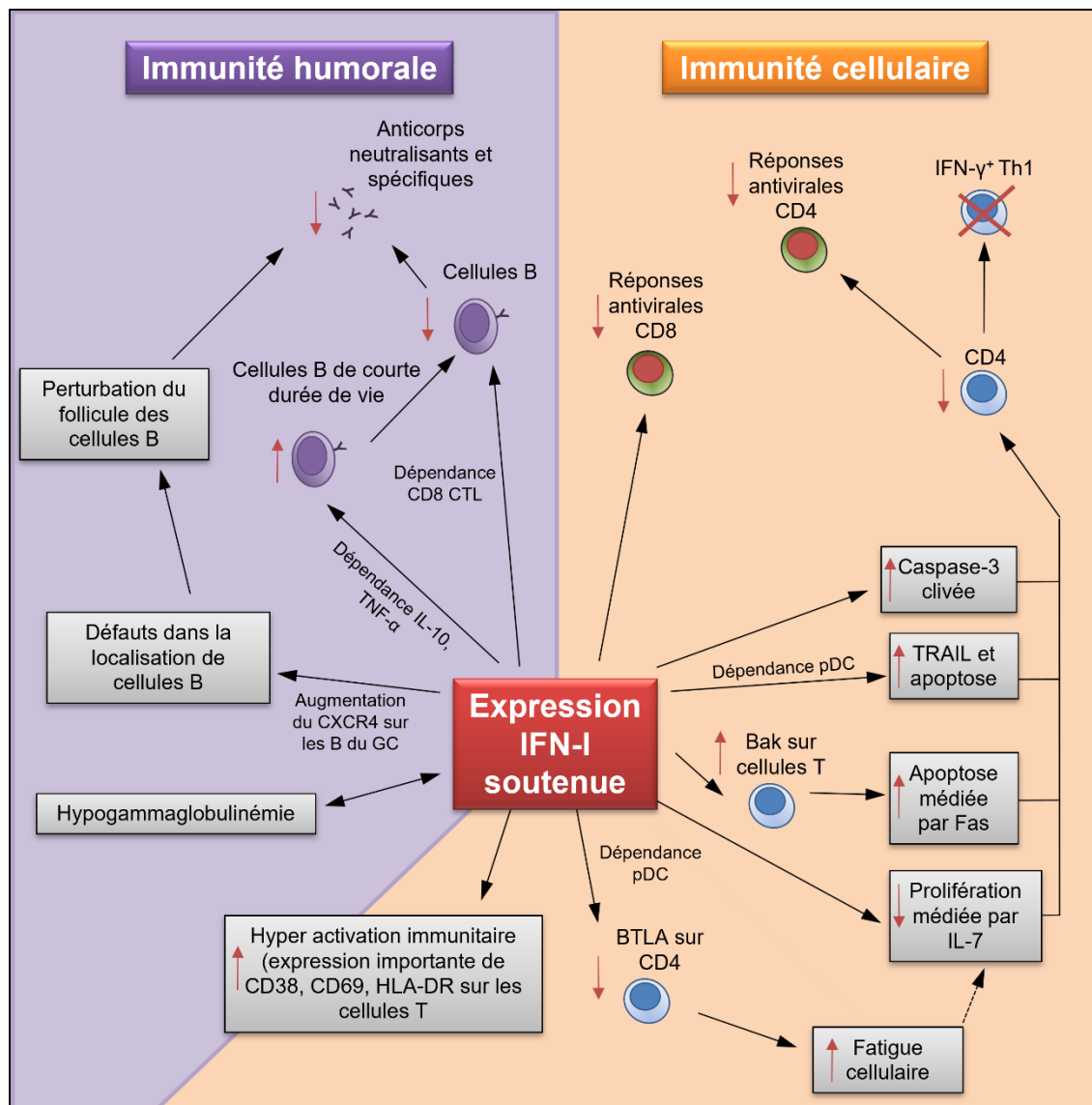


Figure 3.5. Effets négatifs de l'expression soutenue d'IFN-I sur l'immunité humorale et cellulaire. Traduite de (Dagenais-Lussier et al., 2017)

4 HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Bien que la signalisation IFN-I soit connue pour avoir des effets délétères sur la survie des Mem lors de l'infection par le VIH-1, les mécanismes responsables restent à être identifiés. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la peptidase USP18. Trois raisons plus spécifiques nous ont poussés à placer USP18 au cœur de ce projet :

- USP18, en interagissant avec ISG15, est capable de stabiliser PTEN inhibant possiblement AKT et favorisant ainsi potentiellement l'apoptose (Mustachio et al., 2017).
- USP18 est un régulateur négatif de la signalisation IFN-I en interagissant avec IFNAR2 l'empêchant d'interagir avec JAK (Malakhova et al., 2006; Sarasin-Filipowicz et al., 2009).
- Nous avons identifié une expression plus importante d'USP18 dans les CD4 mémoires provenant d'individus primo- et chroniquement infectés.

Malgré le fait qu'USP18 est connu pour jouer un rôle dans différents types de cancers, son effet est contradictoire, avec des études rapportant des effets favorisant la croissance cellulaire, alors que d'autres ont montré des effets inhibiteurs (Cai et al., 2017; Hong et al., 2014). De plus, le fait que très peu d'information sur USP18 existe dans le contexte de l'infection par le VIH-1, encore moins chez les CD4 mémoires, font de cette peptidase un élément intéressant à étudier. Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'USP18 est impliqué dans la perte des lymphocytes T CD4 mémoires causée par la signalisation IFN-I lors de l'infection par le VIH-1. Pour tester cette hypothèse, nous proposons les objectifs suivants :

1. Démontrer le rôle de la signalisation IFN-I dans l'expression d'USP18 et de PTEN chez les CD4 mémoires de PVVIH (incluant des individus primo- et chroniquement infectés et ART) (Figure 4.1.).
2. Investiguer le rôle d'USP18 sur l'activation d'AKT dans les CD4 mémoires de PVVIH et son effet sur leur capacité à répondre à différents signaux de survie.
3. Évaluer le potentiel de rétablir une signalisation normale dans les CD4 mémoires de PVVIH.

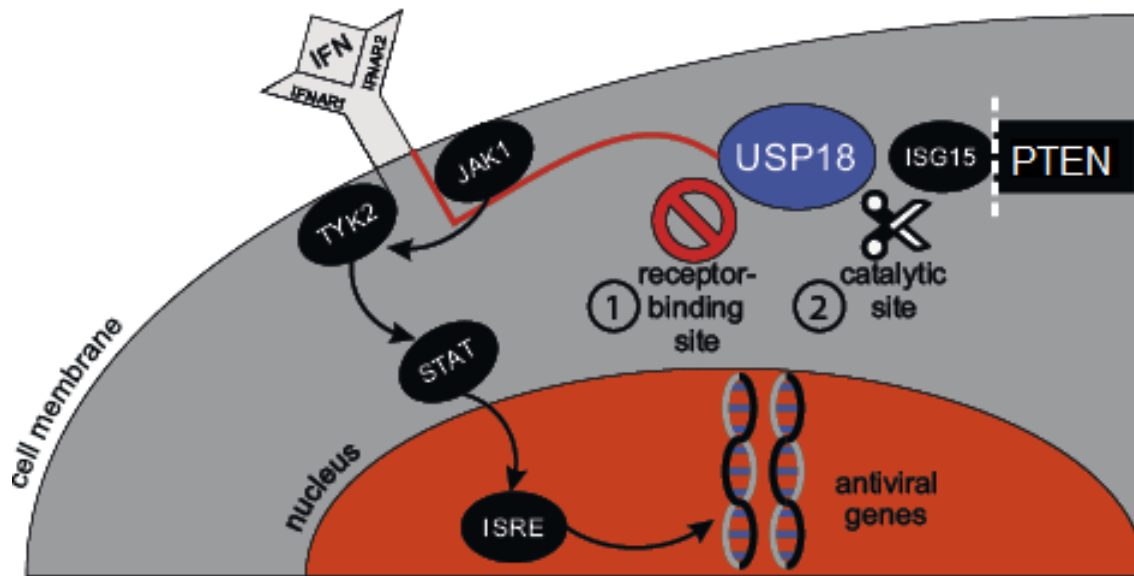


Figure 4.1. Activités d'USP18.

1) L'inhibition de la voie signalisation IFN-I en se liant à la sous-unité IFNAR2 du récepteur bloquant la cascade JAK/STAT. 2) Fonction de deISGylation de PTEN. Modifiée de (Dziamałek-Macioszczyk et al., 2019)

5 BIBLIOGRAPHIE

- Abou El-Khier, N.T., Elhammady, D., Arafa, M.M., Shahin, D., Eladl, E., Abousamra, N.K., Sharaf-Eldeen, O., Shaker, G., and Esmael, M.E. (2018). Th17 and IL-17 as Predictors of Hepatic Inflammation in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection and Treated With Direct Antiviral Therapy. *Egypt. J. Immunol.* *25*, 61–74.
- Alvarez, A., Orden, S., Andújar, I., Collado-Díaz, V., Núñez-Delgado, S., Galindo, M.J., Estrada, V., Apostolova, N., and Esplugues, J.V. (2017). Cardiovascular toxicity of abacavir: a clinical controversy in need of a pharmacological explanation. *AIDS Lond. Engl.* *31*, 1781–1795.
- Angelovich, T.A., Hearps, A.C., Maisa, A., Martin, G.E., Lichtfuss, G.F., Cheng, W.-J., Palmer, C.S., Landay, A.L., Crowe, S.M., and Jaworowski, A. (2015). Viremic and Virologically Suppressed HIV Infection Increases Age-Related Changes to Monocyte Activation Equivalent to 12 and 4 Years of Aging, Respectively. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *69*, 11–17.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fìli, L., Ferri, S., Frosali, F., et al. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1849–1861.
- Apostolova, N., Blas-García, A., and Esplugues, J.V. (2011). Mitochondrial toxicity in HAART: an overview of in vitro evidence. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 2130–2144.
- Appay, V., and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* *214*, 231–241.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O’Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* *201*, 1157–1167.
- Atasheva, S., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2014). Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. *J. Virol.* *88*, 2116–2130.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* *14*, 275–281.
- Bailey, C.C., Zhong, G., Huang, I.-C., and Farzan, M. (2014). IFITM-Family Proteins: The Cell’s First Line of Antiviral Defense. *Annu. Rev. Virol.* *1*, 261–283.
- Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 507–516.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* *220*, 868–871.
- Batra, J., Hultquist, J.F., Liu, D., Shtanko, O., Von Dollen, J., Satkamp, L., Jang, G.M., Luthra, P., Schwarz, T.M., Small, G.I., et al. (2018). Protein Interaction Mapping Identifies RBBP6 as a Negative Regulator of Ebola Virus Replication. *Cell* *175*, 1917-1930.e13.
- Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates

- plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115**, 3265–3275.
- Bermejo-Martin, J.F., Ortiz de Lejarazu, R., Pumarola, T., Rello, J., Almansa, R., Ramírez, P., Martín-Loeches, I., Varillas, D., Gallegos, M.C., Serón, C., et al. (2009). Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit. Care Lond. Engl.* **13**, R201.
- Betakova, T., Kostrabova, A., Lachova, V., and Turianova, L. (2017). Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 2616–2622.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789.
- Bhattacharya, S., HuangFu, W.-C., Dong, G., Qian, J., Baker, D.P., Karar, J., Koumenis, C., Diehl, J.A., and Fuchs, S.Y. (2013). Anti-tumorigenic effects of Type 1 interferon are subdued by integrated stress responses. *Oncogene* **32**, 4214–4221.
- Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K.A., Kropp, K.A., Forster, T., Shui, G., Lacaze, P., Watterson, S., Griffiths, S.J., Spann, N.J., et al. (2013). The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity* **38**, 106–118.
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B.E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., et al. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9.
- Blasius, A., Vermi, W., Krug, A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2004). A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha. *Blood* **103**, 4201–4206.
- Boasso, A., Herbeuval, J.-P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., and Shearer, G.M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **109**, 3351–3359.
- Boasso, A., Hardy, A.W., Landay, A.L., Martinson, J.L., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Clerici, M., and Shearer, G.M. (2008). PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **129**, 132–144.
- Bode, C., Fox, M., Tewary, P., Steinhagen, A., Ellerkmann, R.K., Klinman, D., Baumgarten, G., Hornung, V., and Steinhagen, F. (2016). Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA via the cGAS-STING signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1615–1621.
- Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D., Georg, P., Kurth, F., Hippenstiel, S., Dingeldey, M., Kruse, B., Fauchere, F., et al. (2020). SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* **587**, 270–274.
- Brinkman, K., ter Hofstede, H.J., Burger, D.M., Smeitink, J.A., and Koopmans, P.P. (1998). Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS Lond. Engl.* **12**, 1735–1744.
- Bruni, D., Chazal, M., Sinigaglia, L., Chauveau, L., Schwartz, O., Desprès, P., and Jouvenet, N. (2015). Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci. Signal.* **8**, ra25.

- Bukreyev, A., Yang, L., Fricke, J., Cheng, L., Ward, J.M., Murphy, B.R., and Collins, P.L. (2008). The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on Fc receptor-bearing leukocytes. *J. Virol.* *82*, 12191–12204.
- Burton, D.R., and Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 635–659.
- Byakwaga, H., Hunt, P.W., Laker-Oketta, M., Glidden, D.V., Huang, Y., Bwana, B.M., Mocello, A.R., Bennett, J., Walusansa, V., Dollard, S.C., et al. (2015). The Kynurenine Pathway of Tryptophan Catabolism and AIDS-Associated Kaposi Sarcoma in Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999 70*, 296–303.
- Bystrom, J., Al-Adhoubi, N., Al-Bogami, M., Jawad, A.S., and Mageed, R.A. (2013). Th17 Lymphocytes in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viruses* *5*, 777–791.
- Cai, J., Liu, T., Jiang, X., Guo, C., Liu, A., and Xiao, X. (2017). Downregulation of USP18 inhibits growth and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma cells by suppressing BCL2L1. *Exp. Cell Res.* *358*, 315–322.
- Calvo, C.R., Amsen, D., and Kruisbeek, A.M. (1997). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor zeta and ZAP70. *J. Exp. Med.* *186*, 1645–1653.
- Capobianchi, M.R., Uleri, E., Caglioti, C., and Dolei, A. (2015). Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* *26*, 103–111.
- Carbo, A., Hontecillas, R., Andrew, T., Eden, K., Mei, Y., Hoops, S., and Bassaganya-Riera, J. (2014). Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. *Front. Cell Dev. Biol.* *2*, 31.
- Caron, M., Auclair, M., Vigouroux, C., Glorian, M., Forest, C., and Capeau, J. (2001). The HIV Protease Inhibitor Indinavir Impairs Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Intranuclear Localization, Inhibits Preadipocyte Differentiation, and Induces Insulin Resistance. *Diabetes* *50*, 1378–1388.
- Catalfamo, M., Le Saout, C., and Lane, H.C. (2012). The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* *23*, 207–214.
- Černý, J., and Stríž, I. (2019). Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity? *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979 133*, 1549–1565.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3012–3017.
- Cha, L., de Jong, E., French, M.A., and Fernandez, S. (2014). IFN- α exerts opposing effects on activation-induced and IL-7-induced proliferation of T cells that may impair homeostatic maintenance of CD4+ T cell numbers in treated HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 2178–2186.
- Chakrabarti, A., Jha, B.K., and Silverman, R.H. (2011). New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *31*, 49–57.
- Che, J.W., Kraft, A.R.M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. (2015). Regulatory T cells resist virus infection-induced apoptosis. *J. Virol.* *89*, 2112–2120.

- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 945–954.
- Chemudupati, M., Kenney, A.D., Bonifati, S., Zani, A., McMichael, T.M., Wu, L., and Yount, J.S. (2019). From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* *1866*, 382–394.
- Chen, L.-Y., Fan, X.-P., Fan, Y.-C., Zhao, J., Gao, S., Li, F., Qi, Z.-X., and Wang, K. (2019). BATF Interference Blocks Th17 Cell Differentiation and Inflammatory Response in Hepatitis B Virus Transgenic Mice. *Dig. Dis. Sci.* *64*, 773–780.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Chen, X., Huang, J., Huang, Y., Chen, J., Huang, Y., Jiang, X., and Shi, Y. (2020). Characteristics of immune cells and cytokines in patients with coronavirus disease 2019 in Guangzhou, China. *Hum. Immunol.* *81*, 702–708.
- Cheng, L., Yu, H., Li, G., Li, F., Ma, J., Li, J., Chi, L., Zhang, L., and Su, L. (2017). Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI Insight* *2*, 94366.
- Chiang, C.-Y., Engel, A., Opaluch, A.M., Ramos, I., Maestre, A.M., Secundino, I., De Jesus, P.D., Nguyen, Q.T., Welch, G., Bonamy, G.M.C., et al. (2012). Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* *11*, 306–318.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brechley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* *15*, 893–900.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R.F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.* *1*, 1284–1290.
- Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13193–13197.
- Chun, T.-W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Large, D., Semerjian, A., Curlin, M.E., O’Shea, M.A., Hallahan, C.W., Daucher, M., Ward, D.J., et al. (2005). HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J. Clin. Invest.* *115*, 3250–3255.
- Chun, T.-W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Meyers, J.H., Roby, G., Hallahan, C.W., Kottlilil, S., Moir, S., Mican, J.M., Mullins, J.I., et al. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* *197*, 714–720.
- Cicala, C., Arthos, J., and Fauci, A.S. (2019). Role of T-cell trafficking in the pathogenesis of HIV disease. *Curr. Opin. HIV AIDS* *14*, 115–120.
- Clerici, M., Wynn, T.A., Berzofsky, J.A., Blatt, S.P., Hendrix, C.W., Sher, A., Coffman, R.L., and Shearer, G.M. (1994). Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J. Clin. Invest.* *93*, 768–775.

- Colby, D.J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., Rolland, M., Takata, H., Buranapraditkun, S., Intasan, J., et al. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat. Med.* **24**, 923–926.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569.
- Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A., and Prado, J.G. (2018). Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front. Immunol.* **9**, 2876.
- Couper, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777.
- Crawford, A., Angelosanto, J.M., Kao, C., Doering, T.A., Odorizzi, P.M., Barnett, B.E., and Wherry, E.J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* **40**, 289–302.
- Cromer, D., Pinkevych, M., Rasmussen, T.A., Lewin, S.R., Kent, S.J., and Davenport, M.P. (2017). Modeling of Antiretroviral Treatment in HIV: What Is the Optimal Duration of Antiretroviral Therapy-Free HIV Remission? *J. Virol.* **91**, e01395-17.
- Crowe, S., Zhu, T., and Muller, W.A. (2003). The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 635–641.
- Cunningham, C.R., Champhekar, A., Tullius, M.V., Dillon, B.J., Zhen, A., de la Fuente, J.R., Herskovitz, J., Elsaesser, H., Snell, L.M., Wilson, E.B., et al. (2016). Type I and Type II Interferon Coordinately Regulate Suppressive Dendritic Cell Fate and Function during Viral Persistence. *PLoS Pathog.* **12**, e1005356.
- Cyster, J.G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 127–159.
- Dagenais-Lussier, X., Aounallah, M., Mehraj, V., El-Far, M., Tremblay, C., Sekaly, R.-P., Routy, J.-P., and van Grevenynghe, J. (2016). Kynurenine Reduces Memory CD4 T-Cell Survival by Interfering with Interleukin-2 Signaling Early during HIV-1 Infection. *J. Virol.* **90**, 7967–7979.
- Dagenais-Lussier, X., Loucif, H., Murira, A., Laulhé, X., Stäger, S., Lamarre, A., and van Grevenynghe, J. (2017). Sustained IFN- λ Expression during Established Persistent Viral Infection: A “Bad Seed” for Protective Immunity. *Viruses* **10**.
- Dai, J., Megjugorac, N.J., Amrute, S.B., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004). Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN- α production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 1535–1548.
- Damme, N.V., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host Microbe* **3**, 245–252.
- Dang, W., Xu, L., Yin, Y., Chen, S., Wang, W., Hakim, M.S., Chang, K.-O., Peppelenbosch, M.P., and Pan, Q. (2018). IRF-1, RIG-I and MDA5 display potent antiviral activities against norovirus coordinately induced by different types of interferons. *Antiviral Res.* **155**, 48–59.
- Dasgupta, S., Erturk-Hasdemir, D., Ochoa-Reparaz, J., Reinecker, H.-C., and Kasper, D.L. (2014). Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell Host Microbe* **15**, 413–423.

- Dash, P.K., Kaminski, R., Bella, R., Su, H., Mathews, S., Ahooyi, T.M., Chen, C., Mancuso, P., Sariyer, R., Ferrante, P., et al. (2019). Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice. *Nat. Commun.* *10*, 2753.
- Daugan, M., Murira, A., Mindt, B.C., Germain, A., Tarrab, E., Lapierre, P., Fritz, J.H., and Lamarre, A. (2016). Type I Interferon Impairs Specific Antibody Responses Early during Establishment of LCMV Infection. *Front. Immunol.* *7*, 564.
- Dave, R.S., Jain, P., and Byrareddy, S.N. (2018). Follicular Dendritic Cells of Lymph Nodes as Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Reservoirs and Insights on Cervical Lymph Node. *Front. Immunol.* *9*, 805.
- Davey, R.T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., et al. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15109–15114.
- David, M. (2010). Interferons and microRNAs. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *30*, 825–828.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., et al. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350–354.
- Dean, L. (2012). Maraviroc Therapy and CCR5 Genotype. In *Medical Genetics Summaries*, V.M. Pratt, S.A. Scott, M. Pirmohamed, B. Esquivel, M.S. Kane, B.L. Kattman, and A.J. Malheiro, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)), p.
- Deeks, S.G. (2012). HIV: Shock and kill. *Nature* *487*, 439–440.
- Deeks, S.G., Kitchen, C.M.R., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., et al. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* *104*, 942–947.
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* *47*, 450–455.
- Devèvre, E.F., Renovato-Martins, M., Clément, K., Sautès-Fridman, C., Cremer, I., and Poitou, C. (2015). Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 3917–3923.
- Dharan, A., Opp, S., Abdel-Rahim, O., Keceli, S.K., Imam, S., Diaz-Griffero, F., and Campbell, E.M. (2017). Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E10707–E10716.
- Didigu, C.A., Wilen, C.B., Wang, J., Duong, J., Secreto, A.J., Danet-Desnoyers, G.A., Riley, J.L., Gregory, P.D., June, C.H., Holmes, M.C., et al. (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood* *123*, 61–69.
- Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., et al. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* *505*, 509–514.
- Doyle, T., Moncorgé, O., Bonaventure, B., Pollpeter, D., Lussignol, M., Tauziet, M., Apolonia, L., Catanese, M.-T., Goujon, C., and Malim, M.H. (2018). The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry. *Nat. Microbiol.* *3*, 1369–1376.

- Du, Z., Shen, Y., Yang, W., Mecklenbrauker, I., Neel, B.G., and Ivashkiv, L.B. (2005). Inhibition of IFN- α signaling by a PKC- and protein tyrosine phosphatase SHP-2-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10267–10272.
- Dubé, M.P., Lipshultz, S.E., Fichtenbaum, C.J., Greenberg, R., Schecter, A.D., Fisher, S.D., and Working Group 3 (2008). Effects of HIV infection and antiretroviral therapy on the heart and vasculature. *Circulation* *118*, e36–40.
- Durant, L.R., Makris, S., Voorburg, C.M., Loebbermann, J., Johansson, C., and Openshaw, P.J.M. (2013). Regulatory T Cells Prevent Th2 Immune Responses and Pulmonary Eosinophilia during Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *J. Virol.* *87*, 10946–10954.
- Dziamalek-Macioszczyk, P., Harażna, J., and Stompór, T. (2019). Versatility of USP18 in physiology and pathophysiology. *Acta Biochim. Pol.* *66*, 389–392.
- Egarnes, B., and Gosselin, J. (2018). Contribution of Regulatory T Cells in Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 Response to Influenza Virus Infection. *Front. Immunol.* *0*.
- Eggers, C., Arendt, G., Hahn, K., Husstedt, I.W., Maschke, M., Neuen-Jacob, E., Obermann, M., Rosenkranz, T., Schielke, E., Straube, E., et al. (2017). HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Neurol.* *264*, 1715–1727.
- Eggink, D., Berkhout, B., and Sanders, R. (2010). Inhibition of HIV-1 by Fusion Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 3716–3728.
- El-Far, M., Halwani, R., Said, E., Trautmann, L., Doroudchi, M., Janbazian, L., Fonseca, S., van Grevenynghe, J., Yassine-Diab, B., Sékaly, R.-P., et al. (2008). T-cell exhaustion in HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *5*, 13–19.
- Eron, J.J. (2000). HIV-1 protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *30 Suppl 2*, S160-170.
- Fallet, B., Narr, K., Ertuna, Y.I., Remy, M., Sommerstein, R., Cornille, K., Kreutzfeldt, M., Page, N., Zimmer, G., Geier, F., et al. (2016). Interferon-driven deletion of antiviral B cells at the onset of chronic infection. *Sci. Immunol.* *1*, eaah6817.
- Farber, D.L., Yudanin, N.A., and Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 24–35.
- Fauci, A.S. (1988). The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* *239*, 617–622.
- Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., et al. (2010). Tryptophan Catabolism by Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Alters the Balance of TH17 to Regulatory T Cells in HIV Disease. *Sci. Transl. Med.* *2*, 32ra36-32ra36.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* *30*, 324–335.
- Feng, J.Y., Murakami, E., Zorca, S.M., Johnson, A.A., Johnson, K.A., Schinazi, R.F., Furman, P.A., and Anderson, K.S. (2004). Relationship between antiviral activity and host toxicity: comparison of the incorporation efficiencies of 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine-triphosphate analogs by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human mitochondrial DNA polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 1300–1306.
- Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrandt, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H., et al. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* *17*, 1871–1879.

- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295–1300.
- Fletcher, C.V., Staskus, K., Wietgreffe, S.W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J.G., Beilman, G.J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T.E., et al. (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2307–2312.
- Forsythe, S.S., McGreevey, W., Whiteside, A., Shah, M., Cohen, J., Hecht, R., Bollinger, L.A., and Kinghorn, A. (2019). Twenty Years Of Antiretroviral Therapy For People Living With HIV: Global Costs, Health Achievements, Economic Benefits. *Health Aff. (Millwood)* 38, 1163–1172.
- Foulds, K.E., Wu, C., and Seder, R.A. (2006). Th1 memory: implications for vaccine development. *Immunol. Rev.* 211, 58–66.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
- Fu, Y., He, S., Waheed, A.A., Dabbagh, D., Zhou, Z., Trinité, B., Wang, Z., Yu, J., Wang, D., Li, F., et al. (2020). PSGL-1 restricts HIV-1 infectivity by blocking virus particle attachment to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 9537–9545.
- Fulton, R.B., Meyerholz, D.K., and Varga, S.M. (2010). Foxp3+ CD4 Regulatory T Cells Limit Pulmonary Immunopathology by Modulating the CD8 T Cell Response during Respiratory Syncytial Virus Infection. *J. Immunol.* 185, 2382–2392.
- Gallant, J.E., Staszewski, S., Pozniak, A.L., DeJesus, E., Suleiman, J.M.A.H., Miller, M.D., Coakley, D.F., Lu, B., Toole, J.J., Cheng, A.K., et al. (2004). Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* 292, 191–201.
- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865–867.
- Galván-Peña, S., Leon, J., Chowdhary, K., Michelson, D.A., Vijaykumar, B., Yang, L., Magnuson, A.M., Chen, F., Manickas-Hill, Z., Piechocka-Trocha, A., et al. (2021). Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118.
- Ge, J., Wang, K., Meng, Q.-H., Qi, Z.-X., Meng, F.-L., and Fan, Y.-C. (2010). Implication of Th17 and Th1 Cells in Patients with Chronic Active Hepatitis B. *J. Clin. Immunol.* 30, 60–67.
- Ghorban, K., Dadmanesh, M., Hassanshahi, G., Momeni, M., Zare-Bidaki, M., Arababadi, M.K., and Kennedy, D. (2013). Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immune system-related diseases? *Inflammation* 36, 633–642.
- Giorgi, J.V., Hultin, L.E., McKeating, J.A., Johnson, T.D., Owens, B., Jacobson, L.P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D.J., Phair, J.P., et al. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* 179, 859–870.
- Gizzi, A.S., Grove, T.L., Arnold, J.J., Jose, J., Jangra, R.K., Garforth, S.J., Du, Q., Cahill, S.M., Dulyaninova, N.G., Love, J.D., et al. (2018). A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature* 558, 610–614.

- González, M.E., and Carrasco, L. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 VPU protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrane permeabilization. *Virology* 279, 201–209.
- González, P.A., Bueno, S.M., Carreño, L.J., Riedel, C.A., and Kalergis, A.M. (2012). Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev. Med. Virol.* 22, 230–244.
- Goonetilleke, N., Liu, M.K.P., Salazar-Gonzalez, J.F., Ferrari, G., Giorgi, E., Ganusov, V.V., Keele, B.F., Learn, G.H., Turnbull, E.L., Salazar, M.G., et al. (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 1253–1272.
- Gorenec, L., Zidovec Lepej, S., Grgic, I., Planinic, A., Iscic Bes, J., Vince, A., and Begovac, J. (2016). The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. *Microb. Pathog.* 97, 125–130.
- Gosselin, A., Wiche Salinas, T.R., Planas, D., Wacleche, V.S., Zhang, Y., Fromentin, R., Chomont, N., Cohen, É.A., Shacklett, B., Mehraj, V., et al. (2017). HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* 31, 35–48.
- Gracias, D.T., Stelekati, E., Hope, J.L., Boesteanu, A.C., Doering, T.A., Norton, J., Mueller, Y.M., Fraietta, J.A., Wherry, E.J., Turner, M., et al. (2013). The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nat. Immunol.* 14, 593–602.
- Graham, M.B., Braciale, V.L., and Braciale, T.J. (1994). Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *J. Exp. Med.* 180, 1273–1282.
- Greenwald, R.J., Latchman, Y.E., and Sharpe, A.H. (2002). Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 391–396.
- Gringhuis, S.I., Hertoghs, N., Kaptein, T.M., Zijlstra-Willems, E.M., Sarrami-Forooshani, R., Sprokholt, J.K., van Teijlingen, N.H., Kootstra, N.A., Booiman, T., van Dort, K.A., et al. (2017). HIV-1 blocks the signaling adaptor MAVS to evade antiviral host defense after sensing of abortive HIV-1 RNA by the host helicase DDX3. *Nat. Immunol.* 18, 225–235.
- Grunfeld, C., Pang, M., Doerrler, W., Shigenaga, J.K., Jensen, P., and Feingold, K.R. (1992). Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1045–1052.
- Guo, X., Ma, J., Sun, J., and Gao, G. (2007). The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 151–156.
- Gurunathan, S., Habib, R.E., Baglyos, L., Meric, C., Plotkin, S., Dodet, B., Corey, L., and Tartaglia, J. (2009). Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. *Vaccine* 27, 1997–2015.
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M., and Kochs, G. (2015). Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* 23, 154–163.
- Hardy, G.A.D., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., et al. (2013). Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PloS One* 8, e56527.
- Hattab, S., Guiguet, M., Carcelain, G., Fourati, S., Guihot, A., Autran, B., Caby, F., Marcelin, A.-G., Costagliola, D., and Katlama, C. (2015). Soluble biomarkers of immune activation and

- inflammation in HIV infection: impact of 2 years of effective first-line combination antiretroviral therapy. *HIV Med.* *16*, 553–562.
- Hoffmann, H.-H., Schneider, W.M., and Rice, C.M. (2015). Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.* *36*, 124–138.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772–777.
- Hong, B., Li, H., Lu, Y., Zhang, M., Zheng, Y., Qian, J., and Yi, Q. (2014). USP18 is crucial for IFN- γ -mediated inhibition of B16 melanoma tumorigenesis and antitumor immunity. *Mol. Cancer* *13*, 132.
- Honke, N., Shaabani, N., Cadeddu, G., Sorg, U.R., Zhang, D.-E., Trilling, M., Klingel, K., Sauter, M., Kandolf, R., Gailus, N., et al. (2011). Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nat. Immunol.* *13*, 51–57.
- Horton, H., Frank, I., Baydo, R., Jalbert, E., Penn, J., Wilson, S., McNevin, J.P., McSweyn, M.D., Lee, D., Huang, Y., et al. (2006). Preservation of T Cell Proliferation Restricted by Protective HLA Alleles Is Critical for Immune Control of HIV-1 Infection. *J. Immunol.* *177*, 7406–7415.
- Huangfu, W.-C., Qian, J., Liu, C., Liu, J., Lokshin, A.E., Baker, D.P., Rui, H., and Fuchs, S.Y. (2012). Inflammatory signaling compromises cell responses to interferon alpha. *Oncogene* *31*, 161–172.
- Huynh, L., Wang, L., Shi, C., Park-Min, K.-H., and Ivashkiv, L.B. (2012). ITAM-coupled receptors inhibit IFNAR signaling and alter macrophage responses to TLR4 and *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 3447–3457.
- Jain, P., Boso, G., Langer, S., Soonthornvacharin, S., De Jesus, P.D., Nguyen, Q., Olivieri, K.C., Portillo, A.J., Yoh, S.M., Pache, L., et al. (2018). Large-Scale Arrayed Analysis of Protein Degradation Reveals Cellular Targets for HIV-1 Vpu. *Cell Rep.* *22*, 2493–2503.
- Jakobsen, M.R., Bak, R.O., Andersen, A., Berg, R.K., Jensen, S.B., Tengchuan, J., Jin, T., Laustsen, A., Hansen, K., Ostergaard, L., et al. (2013). IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4571-4580.
- Jenabian, M.-A., El-Far, M., Vyboh, K., Kema, I., Costiniuk, C.T., Thomas, R., Baril, J.-G., LeBlanc, R., Kanagaratham, C., Radzioch, D., et al. (2015). Immunosuppressive Tryptophan Catabolism and Gut Mucosal Dysfunction Following Early HIV Infection. *J. Infect. Dis.* *212*, 355–366.
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., and Pape, K.A. (2001). In Vivo Activation of Antigen-Specific CD4 T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 23–45.
- Jóźwik, I.K., Passos, D.O., and Lyumkis, D. (2020). Structural Biology of HIV Integrase Strand Transfer Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* *41*, 611–626.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y.-N., and Liu, Y.-J. (2000). Natural Interferon α/β -Producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity. *J. Exp. Med.* *192*, 219–226.
- Kaminski, R., Chen, Y., Fischer, T., Tedaldi, E., Napoli, A., Zhang, Y., Karn, J., Hu, W., and Khalili, K. (2016). Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci. Rep.* *6*, 22555.
- Kang, J.A., and Jeon, Y.J. (2020). Emerging Roles of USP18: From Biology to Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 6825.

- Kang, X., He, W., Huang, Y., Yu, Q., Chen, Y., Gao, X., Sun, X., and Fan, Y. (2016). Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J. Assist. Reprod. Genet.* *33*, 581–588.
- Kardava, L., Moir, S., Shah, N., Wang, W., Wilson, R., Buckner, C.M., Santich, B.H., Kim, L.J.Y., Spurlin, E.E., Nelson, A.K., et al. (2014). Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J. Clin. Invest.* *124*, 3252–3262.
- Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., Zaunders, J.J., Mackey, E.W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., et al. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat. Immunol.* *8*, 1246–1254.
- Kedzierska, K., Crowe, S.M., Turville, S., and Cunningham, A.L. (2003). The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev. Med. Virol.* *13*, 39–56.
- Khanal, S., Tang, Q., Cao, D., Zhao, J., Nguyen, L.N., Oyedeji, O.S., Dang, X., Nguyen, L.N.T., Schank, M., Thakuri, B.K.C., et al. (2020). Telomere and ATM Dynamics in CD4 T-Cell Depletion in Active and Virus-Suppressed HIV Infections. *J. Virol.* *94*, e01061-20.
- Kim, C.J., Nazli, A., Rojas, O.L., Chege, D., Alidina, Z., Huibner, S., Mujib, S., Benko, E., Kovacs, C., Shin, L.Y.Y., et al. (2012). A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol.* *5*, 670–680.
- Kim, H.P., Imbert, J., and Leonard, W.J. (2006). Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 349–366.
- Kim, J.-A., Wei, Y., and Sowers, J.R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ. Res.* *102*, 401–414.
- Kim, S., Kaiser, V., Beier, E., Bechheim, M., Guenther-Biller, M., Ablasser, A., Berger, M., Endres, S., Hartmann, G., and Hornung, V. (2014). Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *44*, 807–818.
- Kinter, A., McNally, J., Riggin, L., Jackson, R., Roby, G., and Fauci, A.S. (2007). Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3390–3395.
- Korant, B.D., Strack, P., Frey, M.W., and Rizzo, C.J. (1998). A Cellular Anti-Apoptosis Protein is Cleaved by the HIV-1 Protease. In *Aspartic Proteinases: Retroviral and Cellular Enzymes*, M.N.G. James, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 27–29.
- Kouyos, R.D., Rusert, P., Kadelka, C., Huber, M., Marzel, A., Ebner, H., Schanz, M., Liechti, T., Friedrich, N., Braun, D.L., et al. (2018). Tracing HIV-1 strains that imprint broadly neutralizing antibody responses. *Nature* *561*, 406–410.
- Krapp, C., Hotter, D., Gawanbacht, A., McLaren, P.J., Kluge, S.F., Stürzel, C.M., Mack, K., Reith, E., Engelhart, S., Ciuffi, A., et al. (2016). Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host Microbe* *19*, 504–514.
- Kumar, A., Angel, J.B., Daftarian, M.P., Parato, K., Cameron, W.D., Fillion, L., and Diaz-Mitoma, F. (1998). Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clin. Exp. Immunol.* *114*, 78–86.
- Kumar, B.V., Connors, T.J., and Farber, D.L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* *48*, 202–213.

- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 by reducing the intracellular pool of deoxynucleotide triphosphates. *Nat. Immunol.* *13*, 223–228.
- Langer, S., Hammer, C., Hopfensperger, K., Klein, L., Hotter, D., De Jesus, P.D., Herbert, K.M., Pache, L., Smith, N., van der Merwe, J.A., et al. (2019). HIV-1 Vpu is a potent transcriptional suppressor of NF- κ B-elicited antiviral immune responses. *ELife* *8*, e41930.
- Lay, M.D.H., Petravic, J., Gordon, S.N., Engram, J., Silvestri, G., and Davenport, M.P. (2009). Is the Gut the Major Source of Virus in Early Simian Immunodeficiency Virus Infection? *J. Virol.* *83*, 7517–7523.
- Le Saout, C., Hasley, R.B., Imamichi, H., Tcheung, L., Hu, Z., Luckey, M.A., Park, J.-H., Durum, S.K., Smith, M., Rupert, A.W., et al. (2014). Chronic exposure to type-I IFN under lymphopenic conditions alters CD4 T cell homeostasis. *PLoS Pathog.* *10*, e1003976.
- Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* *282*, 2263–2266.
- Lee, S.A., Telwatte, S., Hatano, H., Kashuba, A.D.M., Cottrell, M.L., Hoh, R., Liegler, T.J., Stephenson, S., Somsouk, M., Hunt, P.W., et al. (2020). Antiretroviral therapy concentrations differ in gut versus lymph node tissues and are associated with HIV viral transcription by a novel RT-ddPCR assay. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *83*, 530–537.
- Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K.W., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* *7*, e1001284.
- van Leth, F., Phanuphak, P., Stroes, E., Gazzard, B., Cahn, P., Raffi, F., Wood, R., Bloch, M., Katlama, C., Kastelein, J.J.P., et al. (2004). Nevirapine and Efavirenz Elicit Different Changes in Lipid Profiles in Antiretroviral- Therapy-Naive Patients Infected with HIV-1. *PLoS Med.* *1*, e19.
- Li, M., Kao, E., Gao, X., Sandig, H., Limmer, K., Pavon-Eternod, M., Jones, T.E., Landry, S., Pan, T., Weitzman, M.D., et al. (2012). Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. *Nature* *491*, 125–128.
- Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.-M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., and Haase, A.T. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* *434*, 1148–1152.
- Li, X.-D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* *341*, 1390–1394.
- Liang, H., Duan, Z., Li, D., Li, D., Wang, Z., Ren, L., Shen, T., and Shao, Y. (2015). Higher levels of circulating monocyte–platelet aggregates are correlated with viremia and increased sCD163 levels in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 435–443.
- Little, S.J., McLean, A.R., Spina, C.A., Richman, D.D., and Havlir, D.V. (1999). Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* *190*, 841–850.
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., et al. (2013). Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity* *38*, 92–105.
- Liu, Y., Liu, S., Wu, C., Huang, W., Xu, B., Lian, S., Wang, L., Yue, S., Chen, N., and Zhu, Z. (2020). PD-1-Mediated PI3K/Akt/mTOR, Caspase 9/Caspase 3 and ERK Pathways Are Involved in

- Regulating the Apoptosis and Proliferation of CD4+ and CD8+ T Cells During BVDV Infection in vitro. *Front. Immunol.* *11*, 467.
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.-Y., Archer, J., Pond, S.L.K., Chung, Y.-S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C.V., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* *530*, 51–56.
- Lv, L., Wang, Q., Xu, Y., Tsao, L.-C., Nakagawa, T., Guo, H., Su, L., and Xiong, Y. (2018). Vpr Targets TET2 for Degradation by CRL4VprBP E3 Ligase to Sustain IL-6 Expression and Enhance HIV-1 Replication. *Mol. Cell* *70*, 961-970.e5.
- MacLeod, M.K.L., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2010). Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology* *130*, 10–15.
- Madden, E., Lee, G., Kotler, D.P., Wanke, C., Lewis, C.E., Tracy, R., Heymsfield, S., Shlipak, M.G., Bacchetti, P., Scherzer, R., et al. (2008). Association of Antiretroviral Therapy with Fibrinogen Levels in HIV Infection. *AIDS Lond. Engl.* *22*, 707–715.
- Maeda, Y., Nishikawa, H., Sugiyama, D., Ha, D., Hamaguchi, M., Saito, T., Nishioka, M., Wing, J.B., Adeegbe, D., Katayama, I., et al. (2014). Detection of self-reactive CD8+ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science* *346*, 1536–1540.
- Malakhova, O.A., Kim, K.I., Luo, J.-K., Zou, W., Kumar, K.G.S., Fuchs, S.Y., Shuai, K., and Zhang, D.-E. (2006). UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J.* *25*, 2358–2367.
- Malim, M.H., and Bieniasz, P.D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006940.
- Mandl, J.N., Barry, A., Vanderford, T., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F., Coffman, R., Staprans, S., and Feinberg, M. (2008). Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat. Med.*
- Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L., and Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* *9*, 1398–1403.
- Martinez, P., Tsai, A.C., Muzoora, C., Kembabazi, A., Weiser, S.D., Huang, Y., Haberer, J.E., Martin, J.N., Bangsberg, D.R., and Hunt, P.W. (2014). Reversal of the Kynurenine pathway of tryptophan catabolism may improve depression in ART-treated HIV-infected Ugandans. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *65*, 456–462.
- Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* *434*, 1093–1097.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., and Swain, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* *130*, 1–9.
- McManus, W.R., Bale, M.J., Spindler, J., Wiegand, A., Musick, A., Patro, S.C., Sobolewski, M.D., Musick, V.K., Anderson, E.M., Cyktor, J.C., et al. (2019). HIV-1 in lymph nodes is maintained by cellular proliferation during antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.* *129*, 4629–4642.
- McPhee, E., Grabowski, M.K., Gray, R.H., Ndyababo, A., Ssekasanvu, J., Kigozi, G., Makumbi, F., Serwadda, D., Quinn, T.C., and Laeyendecker, O. (2019). Short Communication: The Interaction of HIV Set Point Viral Load and Subtype on Disease Progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *35*, 49–51.

- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Jean-Pierre, P., Manuelli, V., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., Boden, D., et al. (2006). Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med.* 3, e484.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272, 1167–1170.
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S.I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwaisako, K., Liu, X., Zhang, M., et al. (2012). Interleukin-17 Signaling in Inflammatory, Kupffer Cells, and Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* 143, 765-776.e3.
- Migueles, S.A., and Connors, M. (2015). Success and failure of the cellular immune response against HIV-1. *Nat. Immunol.* 16, 563–570.
- Mishima, T., Toda, S., Ando, Y., Matsunaga, T., and Inobe, M. (2014). Rapid proliferation of activated lymph node CD4(+) T cells is achieved by greatly curtailing the duration of gap phases in cell cycle progression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19, 638–648.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2013). Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol. Rev.* 254, 207–224.
- Morou, A., Palmer, B.E., and Kaufmann, D.E. (2014). Distinctive features of CD4+ T cell dysfunction in chronic viral infections. *Curr. Opin. HIV AIDS* 9, 446–451.
- Moseman, E.A., Wu, T., de la Torre, J.C., Schwartzberg, P.L., and McGavern, D.B. (2016). Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8+ T cell differentiation. *Sci. Immunol.* 1, eaah3565.
- Moser, E.K., Hufford, M.M., and Braciale, T.J. (2014). Late Engagement of CD86 after Influenza Virus Clearance Promotes Recovery in a FoxP3+ Regulatory T Cell Dependent Manner. *PLOS Pathog.* 10, e1004315.
- Moyle, G. (2005). Mechanisms of HIV and nucleoside reverse transcriptase inhibitor injury to mitochondria. *Antivir. Ther.* 10 Suppl 2, M47-52.
- Moyle, G.J., Sabin, C.A., Cartledge, J., Johnson, M., Wilkins, E., Churchill, D., Hay, P., Fakoya, A., Murphy, M., Scullard, G., et al. (2006). A randomized comparative trial of tenofovir DF or abacavir as replacement for a thymidine analogue in persons with lipoatrophy. *AIDS Lond. Engl.* 20, 2043–2050.
- Mukherjee, S., Lindell, D.M., Berlin, A.A., Morris, S.B., Shanley, T.P., Hershenson, M.B., and Lukacs, N.W. (2011). IL-17–Induced Pulmonary Pathogenesis during Respiratory Viral Infection and Exacerbation of Allergic Disease. *Am. J. Pathol.* 179, 248–258.
- Murata, H., Hruz, P.W., and Mueckler, M. (2000). The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. *J. Biol. Chem.* 275, 20251–20254.
- Mustachio, L.M., Kawakami, M., Lu, Y., Rodriguez-Canales, J., Mino, B., Behrens, C., Wistuba, I., Bota-Rabassedas, N., Yu, J., Lee, J.J., et al. (2017). The ISG15-specific protease USP18 regulates stability of PTEN. *Oncotarget* 8, 3–14.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
- Nie, Z., Phenix, B.N., Lum, J.J., Alam, A., Lynch, D.H., Beckett, B., Krammer, P.H., Sekaly, R.P., and Badley, A.D. (2002). HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release

- of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death Differ.* **9**, 1172–1184.
- Norris, B.A., Uebelhoer, L.S., Nakaya, H.I., Price, A.A., Grakoui, A., and Pulendran, B. (2013). Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity. *Immunity* **38**, 309–321.
- Noto, A., and Pantaleo, G. (2017). B-cell abnormalities and impact on antibody response in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **12**, 203–208.
- Osokine, I., Snell, L.M., Cunningham, C.R., Yamada, D.H., Wilson, E.B., Elsaesser, H.J., de la Torre, J.C., and Brooks, D. (2014). Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7409–7414.
- Paiva, I.A., Badolato-Corrêa, J., Familiar-Macedo, D., and de-Oliveira-Pinto, L.M. (2021). Th17 Cells in Viral Infections—Friend or Foe? *Cells* **10**, 1159.
- Paquin-Proulx, D., Ching, C., Vujkovic-Cvijin, I., Fadrosch, D., Loh, L., Huang, Y., Somsouk, M., Lynch, S.V., Hunt, P.W., Nixon, D.F., et al. (2017). Bacteroides are associated with GALT iNKT cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection. *Mucosal Immunol.* **10**, 69–78.
- Pasternak, A.O., Grijsen, M.L., Wit, F.W., Bakker, M., Jurriaans, S., Prins, J.M., and Berkhout, B. (2020). Cell-associated HIV-1 RNA predicts viral rebound and disease progression after discontinuation of temporary early ART. *JCI Insight* **5**, 134196.
- Paul, P., and Münz, C. (2016). Autophagy and Mammalian Viruses: Roles in Immune Response, Viral Replication, and Beyond. *Adv. Virus Res.* **95**, 149–195.
- Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). How are T H 2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 225–235.
- Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.-L., et al. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26**, 808–816.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32.
- Piatak, M., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., and Lifson, J.D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**, 1749–1754.
- Pindel, A., and Sadler, A. (2011). The role of protein kinase R in the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **31**, 59–70.
- Platanias, L.C. (2003). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol. Ther.* **98**, 129–142.
- Pozniak, A.L., Gallant, J.E., DeJesus, E., Arribas, J.R., Gazzard, B., Campo, R.E., Chen, S.-S., McColl, D., Enejosa, J., Toole, J.J., et al. (2006). Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naive patients: virologic, immunologic, and morphologic changes—a 96-week analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **43**, 535–540.
- Rajashekar, J.K., Richard, J., Beloor, J., Prévost, J., Anand, S.P., Beaudoin-Bussièrès, G., Shan, L., Herndler-Brandstetter, D., Gendron-Lepage, G., Medjahed, H., et al. (2021). Modulating HIV-1 envelope glycoprotein conformation to decrease the HIV-1 reservoir. *Cell Host Microbe* **0**.

- Rajasuriar, R., Khoury, G., Kamarulzaman, A., French, M.A., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. (2013). Persistent immune activation in chronic HIV infection: do any interventions work. *AIDS Lond. Engl.* 27, 1199–1208.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5–17.
- Rasaiyaah, J., Tan, C.P., Fletcher, A.J., Price, A.J., Blondeau, C., Hilditch, L., Jacques, D.A., Selwood, D.L., James, L.C., Noursadeghi, M., et al. (2013). HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature* 503, 402–405.
- Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M.K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101–105.
- Remoli, A.L., Marsili, G., Battistini, A., and Sgarbanti, M. (2012). The development of immune-modulating compounds to disrupt HIV latency. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 159–172.
- Richardson, R.B., Ohlson, M.B., Eitson, J.L., Kumar, A., McDougal, M.B., Boys, I.N., Mar, K.B., De La Cruz-Rivera, P.C., Douglas, C., Konopka, G., et al. (2018a). A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication. *Nat. Microbiol.* 3, 1214–1223.
- Richardson, S.I., Chung, A.W., Natarajan, H., Mabvakure, B., Mkhize, N.N., Garrett, N., Abdool Karim, S., Moore, P.L., Ackerman, M.E., Alter, G., et al. (2018b). HIV-specific Fc effector function early in infection predicts the development of broadly neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 14, e1006987.
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Petropoulos, C.J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4144–4149.
- Ringgaard, M., Marchand, V., Decroly, E., Motorin, Y., and Bennasser, Y. (2019). FTSJ3 is an RNA 2'-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing. *Nature* 565, 500–504.
- Rodríguez, B., Sethi, A.K., Cheruvu, V.K., Mackay, W., Bosch, R.J., Kitahata, M., Boswell, S.L., Mathews, W.C., Bangsberg, D.R., Martin, J., et al. (2006). Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* 296, 1498–1506.
- Ruckwardt, T.J., Bonaparte, K.L., Nason, M.C., and Graham, B.S. (2009). Regulatory T Cells Promote Early Influx of CD8+ T Cells in the Lungs of Respiratory Syncytial Virus-Infected Mice and Diminish Immunodominance Disparities. *J. Virol.* 83, 3019–3028.
- Sáez-Ciri6n, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., et al. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 9, e1003211.
- Saez-Cirion, A., Jacquelin, B., Barré-Sinoussi, F., and Müller-Trutwin, M. (2014). Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130436.
- Saitoh, S.-I., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori Saitoh, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., et al. (2017). TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat. Commun.* 8, 1592.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500.
- Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Keele, B.F., Learn, G.H., Giorgi, E.E., Li, H., Decker, J.M., Wang, S., Baalwa, J., Kraus, M.H., et al. (2009). Genetic identity, biological phenotype, and

- evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 1273–1289.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763.
- Sammicheli, S., Kuka, M., Di Lucia, P., de Oya, N.J., De Giovanni, M., Fioravanti, J., Cristofani, C., Maganuco, C.G., Fallet, B., Ganzer, L., et al. (2016). Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Sci. Immunol.* 1, eaah6789.
- Sandler, N.G., and Douek, D.C. (2012). Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 655–666.
- Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601–605.
- Sarasin-Filipowicz, M., Wang, X., Yan, M., Duong, F.H.T., Poli, V., Hilton, D.J., Zhang, D.-E., and Heim, M.H. (2009). Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4841–4851.
- Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* 41, 886–897.
- Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313, 1972–1975.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.
- Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., et al. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 505, 691–695.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
- Schwarze, L.I., Głow, D., Sonntag, T., Uhde, A., and Fehse, B. (2021). Optimisation of a TALE nuclease targeting the HIV co-receptor CCR5 for clinical application. *Gene Ther.*
- Sehgal, M., Zeremski, M., Talal, A.H., Ginwala, R., Elrod, E., Grakoui, A., Li, Q.-G., Philip, R., Khan, Z.K., and Jain, P. (2015). IFN- α -Induced Downregulation of miR-221 in Dendritic Cells: Implications for HCV Pathogenesis and Treatment. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 35, 698–709.
- Sharkey, M.E., Teo, I., Greenough, T., Sharova, N., Luzuriaga, K., Sullivan, J.L., Bucy, R.P., Kostrikis, L.G., Haase, A., Veryard, C., et al. (2000). Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* 6, 76–81.
- Shaw, A.E., Hughes, J., Gu, Q., Behdenna, A., Singer, J.B., Dennis, T., Orton, R.J., Varela, M., Gifford, R.J., Wilson, S.J., et al. (2017). Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. *PLOS Biol.* 15, e2004086.

- Shaw, G.M., Hahn, B.H., Arya, S.K., Groopman, J.E., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1984). Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 226, 1165–1171.
- Sheppard, K.-A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., et al. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 574, 37–41.
- Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacio, J.S., and Saito, T. (1997). Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 6, 583–589.
- Shirazi, Y., and Pitha, P.M. (1992). Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J. Virol.* 66, 1321–1328.
- Silvestri, G., Sadora, D.L., Koup, R.A., Paiardini, M., O’Neil, S.P., McClure, H.M., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2003). Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18, 441–452.
- Simpson, K.N., Hanson, K.A., Harding, G., Haider, S., Tawadrous, M., Khachatryan, A., Pashos, C.L., and Wu, A.W. (2014). Review of the impact of NNRTI-based HIV treatment regimens on patient-reported disease burden. *AIDS Care* 26, 466–475.
- Sneller, M.C., Justement, J.S., Gittens, K.R., Petrone, M.E., Clarridge, K.E., Proschan, M.A., Kwan, R., Shi, V., Blazkova, J., Refsland, E.W., et al. (2017). A randomized controlled safety/efficacy trial of therapeutic vaccination in HIV-infected individuals who initiated antiretroviral therapy early in infection. *Sci. Transl. Med.* 9, eaan8848.
- Sohl, C.D., Szymanski, M.R., Mislak, A.C., Shumate, C.K., Amiralaie, S., Schinazi, R.F., Anderson, K.S., and Yin, Y.W. (2015). Probing the structural and molecular basis of nucleotide selectivity by human mitochondrial DNA polymerase γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 8596–8601.
- Sokol, C.L., Chu, N.-Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* 10, 713–720.
- Solis, M., Nakhaei, P., Jalalirad, M., Lacoste, J., Douville, R., Arguello, M., Zhao, T., Laughrea, M., Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (2011). RIG-I-mediated antiviral signaling is inhibited in HIV-1 infection by a protease-mediated sequestration of RIG-I. *J. Virol.* 85, 1224–1236.
- Sonnenberg, G.F., and Hepworth, M.R. (2019). Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 599–613.
- Spence, J.S., He, R., Hoffmann, H.-H., Das, T., Thinon, E., Rice, C.M., Peng, T., Chandran, K., and Hang, H.C. (2019). IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nat. Chem. Biol.* 15, 259–268.
- Spinner, C.D., Boesecke, C., Zink, A., Jessen, H., Stellbrink, H.-J., Rockstroh, J.K., and Esser, S. (2016). HIV pre-exposure prophylaxis (PrEP): a review of current knowledge of oral systemic HIV PrEP in humans. *Infection* 44, 151–158.
- Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 551–579.
- Srivastava, S., Koch, M.A., Pepper, M., and Campbell, D.J. (2014). Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. *J. Exp. Med.* 211, 961–974.

- Steinke, J.W., and Borish, L. (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir. Res.* 2, 66–70.
- Subramanian, G., Kuzmanovic, T., Zhang, Y., Peter, C.B., Veleparambil, M., Chakravarti, R., Sen, G.C., and Chattopadhyay, S. (2018). A new mechanism of interferon's antiviral action: Induction of autophagy, essential for paramyxovirus replication, is inhibited by the interferon stimulated gene, TDRD7. *PLoS Pathog.* 14, e1006877.
- Swain, S.L. (2000). CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 407–411.
- Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R.D., and Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J. Exp. Med.* 208, 2367–2374.
- Swingler, S., Mann, A., Jacqu e, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff, E.N., Wang, R., Fisher, D., et al. (1999). HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* 5, 997–103.
- Taefehshokr, N., Taefehshokr, S., and Heit, B. (2020). Mechanisms of Dysregulated Humoral and Cellular Immunity by SARS-CoV-2. *Pathog. Basel Switz.* 9, E1027.
- Takatsu, K., and Nakajima, H. (2008). IL-5 and eosinophilia. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 288–294.
- Taleb, K., Auffray, C., Villefroy, P., Pereira, A., Hosmalin, A., Gaudry, M., and Le Bon, A. (2017). Chronic Type I IFN Is Sufficient To Promote Immunosuppression through Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 1156–1163.
- Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2001). A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 378–386.
- Tejaro, J.R. (2016). Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr. Opin. Virol.* 16, 31–40.
- Tenorio, A.R., Zheng, Y., Bosch, R.J., Krishnan, S., Rodriguez, B., Hunt, P.W., Plants, J., Seth, A., Wilson, C.C., Deeks, S.G., et al. (2014). Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J. Infect. Dis.* 210, 1248–1259.
- Terahara, K., Iwabuchi, R., Iwaki, R., Takahashi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. (2021). Substantial induction of non-apoptotic CD4 T-cell death during the early phase of HIV-1 infection in a humanized mouse model. *Microbes Infect.* 23, 104767.
- Tian, T., Yu, S., and Ma, D. (2013). Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 113–125.
- Tomasello, E., Naciri, K., Chelbi, R., Bessou, G., Fries, A., Gressier, E., Abbas, A., Pollet, E., Pierre, P., Lawrence, T., et al. (2018). Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation in vivo during a viral infection. *EMBO J.* 37, e98836.
- Tough, R.H., and McLaren, P.J. (2019). Interaction of the Host and Viral Genome and Their Influence on HIV Disease. *Front. Genet.* 9, 720.
- Travis, M.A., and Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 51–82.
- Tsai, M.-H., Pai, L.-M., and Lee, C.-K. (2019). Fine-Tuning of Type I Interferon Response by STAT3. *Front. Immunol.* 10, 1448.

- Turianová, L., Lachová, V., Svetlíkova, D., Kostrábová, A., and Betáková, T. (2019). Comparison of cytokine profiles induced by nonlethal and lethal doses of influenza A virus in mice. *Exp. Ther. Med.* *18*, 4397–4405.
- Unutmaz, D., Pileri, P., and Abrignani, S. (1994). Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J. Exp. Med.* *180*, 1159–1164.
- Usami, Y., Wu, Y., and Göttlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* *526*, 218–223.
- Valdez, H., and Lederman, M.M. (1997). Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin. Rev.* *187–228*.
- Veazey, R.S. (2019). Intestinal CD4 Depletion in HIV / SIV Infection. *Curr. Immunol. Rev.* *15*, 76–91.
- Vérollet, C., Souriant, S., Bonnaud, E., Jolicoeur, P., Raynaud-Messina, B., Kinnaer, C., Fourquaux, I., Imle, A., Benichou, S., Fackler, O.T., et al. (2015). HIV-1 reprograms the migration of macrophages. *Blood* *125*, 1611–1622.
- Vladimer, G., Góna, M., and Superti-Furga, G. (2014). IFITs: Emerging Roles as Key Anti-Viral Proteins. *Front. Immunol.* *5*, 94.
- Vyas, R., Zahurancik, W.J., and Suo, Z. (2014). Structural basis for the binding and incorporation of nucleotide analogs with L-stereochemistry by human DNA polymerase λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E3033-3042.
- Wagh, K., Kreider, E.F., Li, Y., Barbian, H.J., Learn, G.H., Giorgi, E., Hraber, P.T., Decker, T.G., Smith, A.G., Gondim, M.V., et al. (2018). Completeness of HIV-1 Envelope Glycan Shield at Transmission Determines Neutralization Breadth. *Cell Rep.* *25*, 893-908.e7.
- Wan, Z., Zhou, Z., Liu, Y., Lai, Y., Luo, Y., Peng, X., and Zou, W. (2020). Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection. *Scand. J. Immunol.* *91*, e12873.
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., and Das, A.T. (2018). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* *244*, 321–332.
- Wang, H., Yuan, M., Wang, S., Zhang, L., Zhang, R., Zou, X., Wang, X., Chen, D., and Wu, Z. (2019a). STAT3 Regulates the Type I IFN-Mediated Antiviral Response by Interfering with the Nuclear Entry of STAT1. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Wang, W., Su, B., Pang, L., Qiao, L., Feng, Y., Ouyang, Y., Guo, X., Shi, H., Wei, F., Su, X., et al. (2020). High-dimensional immune profiling by mass cytometry revealed immunosuppression and dysfunction of immunity in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* *17*, 650–652.
- Wang, X., Xuan, Y., Han, Y., Ding, X., Ye, K., Yang, F., Gao, P., Goff, S.P., and Gao, G. (2019b). Regulation of HIV-1 Gag-Pol Expression by Shiftless, an Inhibitor of Programmed -1 Ribosomal Frameshifting. *Cell* *176*, 625-635.e14.
- de Weerd, N.A., and Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunol. Cell Biol.* *90*, 483–491.
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., et al. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* *422*, 307–312.
- van Wijk, F., and Cheroutre, H. (2010). Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *6*, 559–566.
- Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* *66*, 7193–7200.

- Williams, D.W., Byrd, D., Rubin, L.H., Anastos, K., Morgello, S., and Berman, J.W. (2014). CCR2 on CD14(+)CD16(+) monocytes is a biomarker of HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 1, e36.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8 + memory T cells. *Nature* 441, 890–893.
- Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Zang, T., Kutluay, S.B., Jouvenet, N., Alim, M.A., Bitzegeio, J., Rice, C.M., and Bieniasz, P.D. (2012). Inhibition of HIV-1 particle assembly by 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Cell Host Microbe* 12, 585–597.
- Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivié, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., et al. (2018). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* 9, 3317.
- Woodland, D.L., and Kohlmeier, J.E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 153–161.
- Worm, S.W., Sabin, C., Weber, R., Reiss, P., El-Sadr, W., Dabis, F., De Wit, S., Law, M., Monforte, A.D., Friis-Møller, N., et al. (2010). Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J. Infect. Dis.* 201, 318–330.
- Wutzler, P., and Thust, R. (2001). Genetic risks of antiviral nucleoside analogues—a survey. *Antiviral Res.* 49, 55–74.
- Wynn, T.A. (2003). IL-13 Effector Functions. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 425–456.
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., et al. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 8, 420–422.
- Yan, J., Shun, M.-C., Zhang, Y., Hao, C., and Skowronski, J. (2019). HIV-1 Vpr counteracts HLTF-mediated restriction of HIV-1 infection in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 9568–9577.
- Yates, A., Stark, J., Klein, N., Antia, R., and Callard, R. (2007). Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. *PLoS Med.* 4, e177.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465.
- Younes, S.-A., Yassine-Diab, B., Dumont, A.R., Boulassel, M.-R., Grossman, Z., Routy, J.-P., and Sekaly, R.-P. (2003). HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.* 198, 1909–1922.
- Yukl, S.A., Boritz, E., Busch, M., Bentsen, C., Chun, T.-W., Douek, D., Eisele, E., Haase, A., Ho, Y.-C., Hütter, G., et al. (2013). Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog.* 9, e1003347.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94–98.
- Zhang, J.-Y., Zhang, Z., Lin, F., Zou, Z.-S., Xu, R.-N., Jin, L., Fu, J.-L., Shi, F., Shi, M., Wang, H.-F., et al. (2010). Interleukin-17-producing CD4+ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 51, 81–91.

- Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W., and Sun, B. (2014). TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv. Exp. Med. Biol.* *841*, 15–44.
- Zhao, J., Zhang, Z., Luan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, Y., Jin, L., Zhou, C., Fu, J., Gao, B., et al. (2014). Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* *59*, 1331–1342.
- Zhao, J., Nguyen, L.N.T., Nguyen, L.N., Dang, X., Cao, D., Khanal, S., Schank, M., Thakuri, B.K.C., Ogbu, S.C., Morrison, Z.D., et al. (2019). ATM Deficiency Accelerates DNA Damage, Telomere Erosion, and Premature T Cell Aging in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *Front. Immunol.* *10*, 2531.
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7276–7281.

6 ARTICLE

USP18 is a significant driver of memory CD4 T-cell reduced viability caused by type I IFN signaling during primary HIV-1 infection

USP18 est un facteur important dans la réduction de la viabilité des cellules CD4 mémoires causée par la signalisation IFN-I lors de l'infection primaire par le VIH-1.

Xavier Dagenais-Lussier¹, Hamza Loucif¹, Hugo Cadorel¹, Juliette Blumberger¹, Stéphane Isnard², Mariana Gé Bego³, Éric A. Cohen^{3,4}, Jean-Pierre Routy², and Julien van Grevenynghe^{1,*}, for the Montreal Primary Infection Study Group.,

¹ Institut national de la recherche scientifique (INRS)-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada.

²Chronic Viral Illness Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Glen site, Montréal, Québec, Canada.

³Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, QC H2W 1R7, Canada.

⁴Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

Contribution des auteurs :

Conceptualisation: XDL, JPR, JvG. **Acquisition des données:** XDL, HL, HC, JB, MGB. **Analyse:** XDL, HL, HC, JB, MGB, JvG. **Acquisition des fonds:** JvG. **Méthodologie:** XDL, SI, JvG. **Administration du projet:** JvG. **Ressources** EAC, JPR. **Supervision:** EAC, JPR, JvG.

Écriture –originale: XDL, JvG. **Écriture – révision:** XDL, HL, EAC, JPR, JvG.

6.1 Résumé en français

La perte des cellules-T CD4 mémoires (Mem) est un évènement clé de l'immuno-pathogénèse du VIH-1 et se produit tôt lors des premiers mois de l'infection primaire. Beaucoup d'efforts ont été fournis pour comprendre les mécanismes moléculaires derrière cette perte, mais ils n'ont toujours pas été complètement identifiés. Dans cette étude, nous dévoilons le rôle d'USP18 sur les effets délétères de la signalisation soutenue des IFN de type I chez les Mem, incluant les cellules-T CD4 spécifiques au VIH-1. Nous démontrons que d'interférer avec la voie de signalisation IFN-I chez les patients infectés, notamment en ciblant le gène stimulé par l'interféron USP18, abouti à une expression réduite de PTEN comparable à celle observée chez les contrôles non-infectés. Nous montrons que l'activation d'AKT en réponse aux traitements cytokiniques, à l'activation du récepteur des cellules-T (TcR), ainsi que la stimulation Gag VIH-1 est significativement améliorée chez les patients infectés lorsque PTEN ou USP18 sont inhibés. Finalement, nos données démontrent que les niveaux plus élevés d'USP18 chez les Mem de patients infectés empêchent une survie cellulaire et une maintenance à long terme convenable de manière dépendante à AKT. En tout, nous établissons un rôle direct de la signalisation IFN-I/USP18 dans la maintenance des Mem totales et virus-spécifiques et nous apportons un nouveau mécanisme impliqué dans la diminution de la survie de ces populations lors de l'infection primaire par le VIH-1.

6.2 Abstract

The loss of Memory CD4 T-cells (Mem) is a major hallmark of HIV-1 immuno-pathogenesis and occurs early during the first months of primary infection. A lot of effort has been put into understanding the molecular mechanisms behind this loss, yet they still have not been fully identified. In this study, we unveil the unreported role of USP18 in the deleterious effects of sustained type I IFN signaling on Mem, including HIV-1-specific CD4 T-cells. We find that interfering with IFN-I signaling pathway in infected patients, notably by targeting the interferon-stimulated gene USP18, resulted in reduced PTEN expression similar to those observed in uninfected control donors. We show that AKT activation in response to cytokine treatment, T-cell receptor (TcR) triggering, as well as HIV-1 Gag stimulation was significantly improved in infected patients when PTEN or USP18 were inhibited. Finally, our data demonstrate that higher USP18 in Mem from infected patients prevent proper cell survival and long-lasting maintenance in an AKT-dependent manner. Altogether, we establish a direct role for type I IFN/USP18 signaling in the maintenance of total and virus-specific Mem and provide a new mechanism for the reduced survival of these populations during primary HIV-1 infection.

6.3 Author summary

In this study, we expand our knowledge of how type I interferons (IFN-I) leads to memory CD4 T-cell defective survival by unveiling the molecular mechanism behind such impairments, placing USP18 at its center. Our data further deciphers the specific USP18-related mechanism that is responsible for such impairments by implicating AKT inhibition in a PTEN-dependent manner. Our findings also point to a potential use of neutralizing anti-interferon α/β receptor antibodies to rescue the defective memory CD4 T-cell survival during HIV-1 infection, even in HIV-1 specific CD4 T-cell. To conclude, our findings provide the characterization of the molecular pathway leading to disturbances caused by sustained IFN-I signaling which occurs early during primary HIV-1 infection, complementing current knowledge which placed sustained IFN-I signaling as detrimental to the host during this infection.

6.4 Introduction

The maintenance of memory CD4 T-cells (Mem) represents a key component for long-lasting immune protection during persistent infections with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus (SIV) [1-4]. In this context, the elite controllers, who naturally control HIV-1 infection for decades in the absence of anti-retroviral therapy (ART),

display the ability to maintain a large pool of Mem [4, 5]. For the other infected patients, loss of Mem occurs in the first months of HIV-1 infection, which exacerbates viral progression [6]. This loss depends on multiple molecular mechanisms, including metabolic disturbances, and is driven by prolonged inflammation alongside viral persistence [6-9]. Recently, our group identified a critical metabolic disturbance in the form of increased kynurenine levels in Mem from HIV-1-infected patients leading to higher production of reactive oxygen species and reducing cell responsiveness to IL-2 cytokine [6]. However, our knowledge of the different molecular mechanisms responsible for these immune defects remains incomplete as a full normalization of those defects is still unachieved. Therefore, we need to identify new factors responsible for these impairments and, more importantly, we need to establish an overall network regarding the relations between such impairments. Shedding light on such a network will enable better treatment, since individual factors are not enough to understand the full clinical picture of the disease.

Type I interferons (IFN-I) are necessary in establishing an efficient adaptive and acquired immune response, especially in acute viral infections, and are largely produced by plasmacytoid dendritic cells (pDC) following their stimulation [10, 11]. After binding the interferon $_{\alpha/\beta}$ receptor (IFNAR), IFN-I trigger the activation of interferon-stimulated genes (ISG) through the Janus kinase/STAT signaling pathway. These ISG include various intrinsic restriction factors, cytokines, chemokines, and co-stimulatory molecules [10, 12-14]. During acute viral infections, IFN-I expression is subject to negative regulation, which controls cytokine levels upon viral clearance [10]. However, in the case of persistent viral infections, such as HIV-1, sustained production of IFN- α is observed and is mainly driven by viremia and systemic inflammation [15-20]. Increasing evidence shows that the sustained IFN-I production during persistent viral infections can be detrimental for the host and directly participates in immune impairments [21-27]. Such impairments include the expression of inhibitory factors that reduce antiviral immunity, T-cell hyper activation and cell exhaustion as well as HIV-specific T-cell dysfunctions [17, 21, 22, 27-29]. However, it remains unknown to what extent and by which molecular mechanisms sustained IFN-I signaling affects the survival of Mem and contributes to the loss of this population during primary HIV-1 infection.

As such, we investigated whether sustained IFN-I signaling during the early and later stages of HIV-1 infection impairs Mem survival and by which mechanisms these perturbations might occur. Our data show that Mem from infected patients display increased expression of the ISG ubiquitin specific peptidase 18 (USP18), also known as UBP43. In the past two decades, several functions of USP18 have been discovered: this protein is not only an isopeptidase, but also a major

regulator of IFN-I signaling [30]. Under specific circumstances, USP18 binds to IFNAR2, one the subunit of the IFNAR dimer, and compete with JAK preventing proper activation of the pathway [31]. Therefore, USP18 functions as a maestro of many biological pathways in various cell types. However, no information are available regarding the contribution of USP18 on HIV-1 immunopathogenesis, we investigated its impact on Mem survival and function in infected subjects. Our study identified a critical role of USP18 in the loss of Mem including HIV-1-specific cells during HIV-1 infection. Our findings also demonstrate our ability to rescue Mem from apoptosis in a PTEN- and AKT-dependent manner when USP18 is specifically targeted.

Altogether, this study puts USP18/PTEN/AKT at the center of the molecular pathway by which sustained IFN-I signaling leads to Mem impairments during HIV-1 infection.

6.5 Results

6.5.1 Mem from HIV-1-infected subjects display higher USP18 expression, which can be normalized by IFNAR blockade.

Despite indications of an IFN-I signature in HIV-1 infection [22, 32-34], the status of IFN-I signaling intrinsic to Mem and how it may impair cell survival in infected subjects are unknown. First, we compared the plasma levels of IFN- α from primary-infected (PHI) and chronically-infected (CHI) subjects to age-matched uninfected donor controls (HIV^{free}). S1 Table summarizes the clinical and virological data for all selected PHI and CHI subjects including viral loads (VL) and CD4 counts. Similarly to others, we found higher IFN- α levels in plasma from HIV-1-infected subjects compared to uninfected controls (Fig 1A) [15-20]. We also found that the subjects with high plasma IFN- α levels were the ones with the highest VL (correlation between the two parameters: $P = 0.0187$, $r = 0.5334$; $n = 19$) (S1 Fig).

To assess the IFN-I signaling intrinsic to Mem, we next measured in PHI, CHI and HIV^{free} subjects the constitutive phosphorylation levels of STAT1 and IRF7, two IFN-I-induced transcription factors, in *ex vivo* Mem by PhosFlow. Here, by using a multicolor-parameter flow cytometric analysis as previously described, we investigated IFN-I signaling on all Mem subsets classified by three surface markers, CD45RA, CD27 and CCR7 [35, 36]. Total Mem were defined by a CD3⁺CD4⁺CD45RA^{neg} phenotype (S2A Fig). Our data showed increased constitutive levels for STAT1 pY701, STAT1 pS727 and IRF7 pS477/S479 in Mem from PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} donors (Fig 1B, S2B Fig and S3A Fig). The increased levels of the three phospho-proteins during HIV-1 infection were observed across all memory subsets that are

determined by differential expression of CD27 and CCR7 markers. In this context, memory subsets include the long-lasting CD27⁺CCR7⁺ central memory CD4 T-cells (T_{CM}) as well as CD27^{neg}CCR7^{neg} effector memory CD4 T-cells (T_{EM}) (Fig 1B and S3A Fig). Although CD45RA⁺ CD4 T-cells also displayed higher phospho-protein levels in HIV-1-infected subjects when compared to uninfected controls, their levels did not correlate with the cell frequencies unlike Mem (S2B,C Fig). Increased IFN-I signaling in Mem from infected subjects was further confirmed by assessing the mRNA expression of several ISGs such as restriction factors (MxA, OAS.1 and SAMHD1), transcription regulators (IRF1 and IRF7), ISG₁₅, ISG₅₆ and USP18 (Fig 1C). Of note, we found similar mRNA expression of STAT1 in Mem for all study groups (Fig 1C, last lane).

Considering the lack of literature surrounding USP18 expression during HIV-1 infection, we next compared its protein levels in the three groups of subjects. We found increased constitutive USP18 expression in Mem from PHI and CHI compared to HIV^{free} subjects ($P = 0.0001$ and $P = 0.002$, respectively for PHI and CHI subjects; $n = 10$ [MFI]) (Fig 1D). Percentages of USP18⁺ Mem were also higher in PHI and CHI subjects when compared to uninfected controls (36.2 ± 15.3 [PHI], 29.8 ± 12.3 [CHI] and 7.9 ± 4 [HIV^{free}]; $P < 0.0001$ and $P = 0.0014$, respectively for PHI and CHI) (S4A Fig). We confirmed increased USP18 expression in purified Mem from PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} controls by western blot (S4B,C Fig). Unsurprisingly, antiviral therapy (ART), when administered early during the first months of infection and for approximately 2.5 years, led to viral suppression alongside a full normalization of both plasma IFN- α levels and intrinsic USP18 expressions in Mem (S1 Table and S5A,B Fig). To assess whether increased USP18 expression levels in Mem from viremic subjects were associated with higher expression of IFN _{α/β} receptors (IFNAR), we looked at the surface levels of both IFNAR1 and IFNAR2 in PHI, CHI and HIV^{free} subjects. Not only our data did not show increased expression of IFNAR in infected subjects, but we even found reduced constitutive expression of IFNAR1 in PHI when compared to uninfected controls (S6A,B Fig). Similarly, increased USP18 expression levels during HIV-1 infection could not be explained by different ratios of Mem subsets as no significant differences were found between the study groups (S6C Fig). Finally, to test our ability to interfere with USP18 expression by blocking IFN-I signaling, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or purified Mem for all groups were cultured with neutralizing antibodies against the IFN _{α/β} receptor (α -IFNAR) or respective isotype Ig control for 24 hours before assessing USP18 levels. Our data showed that the α -IFNAR treatment normalized USP18 levels in Mem from PHI and CHI subjects (Fig 1E,F). Of note, the presence of Ig controls did not impact USP18 levels as compared to untreated Mem (Fig 1E,F).

Altogether, our results show increases of USP18 expression in Mem from HIV-1-infected subjects and confirm the efficacy of IFNAR blockade in normalizing their USP18 levels at 24 post-treatment in the range of those from uninfected controls.

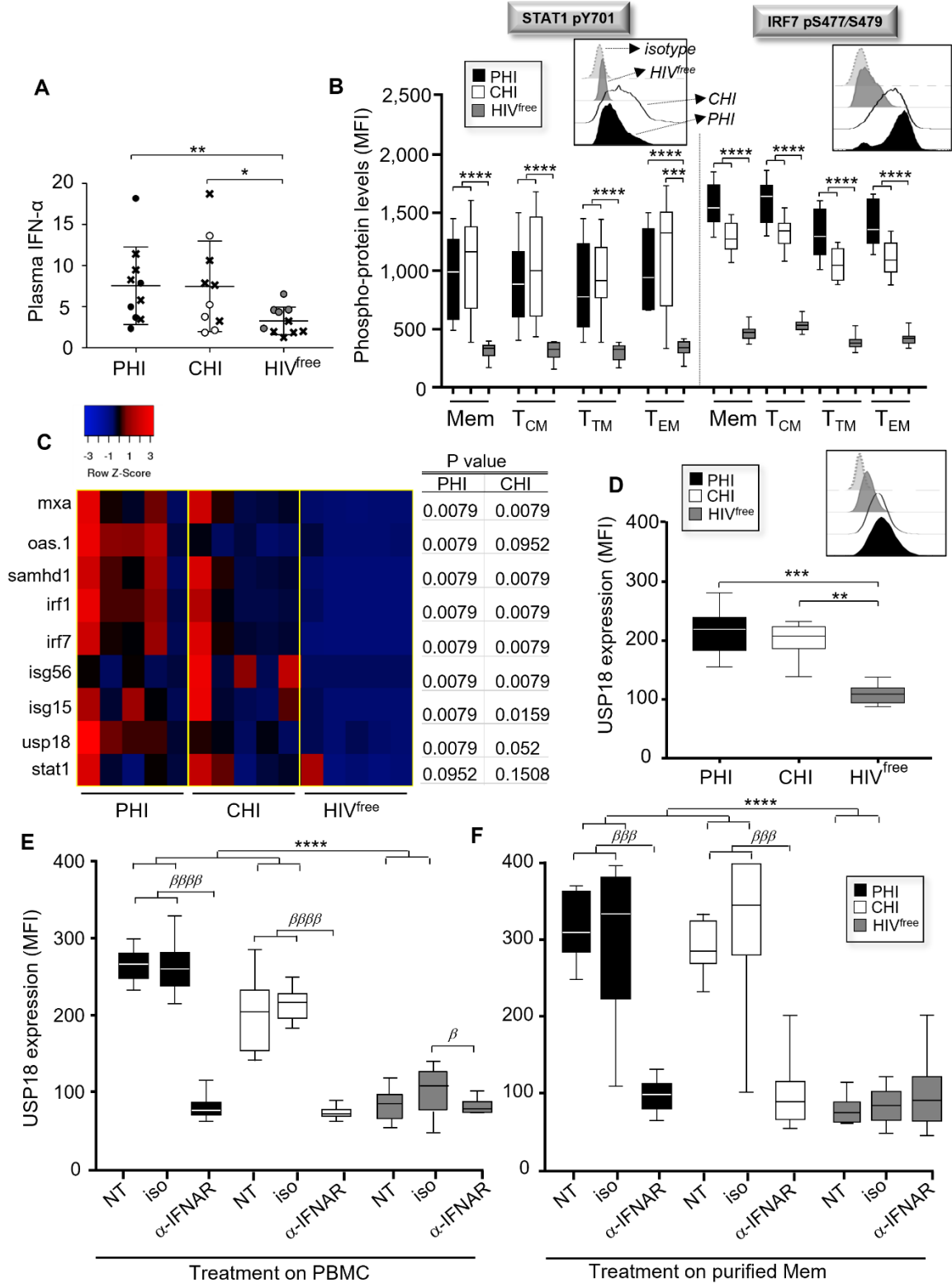


Fig 1. Mem from PHI and CHI display higher expression levels of USP18. (A) Plasma concentration of IFN- α in pg/mL for PHI, CHI and HIV^{free} subjects. Crosses represent subjects used in C. (n = 10). (B) Levels of STAT1 pY701 and IRF7 pS477/479 on 7-AAD^{neg}CD3⁺CD4⁺CD45RA^{neg} Mem, as well as CD27⁺CCR7⁺ central memory (T_{CM}), CD27⁺CCR7^{neg} transitional memory (T_{TM}), and CD27^{neg}CCR7^{neg} effector memory (T_{EM}) subsets (MFI, mean

fluorescence intensity) (n = 10). Representative histograms including isotype control are shown above. (C) Heat map representation of gene expression related to IFN- α signaling determined by real time RT-PCR on *ex vivo* Mem. The Z-score is the number of standard deviations from the mean data point. Reds are higher than the mean, blacks close to it and blues under it. Table shows *P* values of PHI or CHI compared to HIV^{free} (n = 5). (D) Expression of USP18 in *ex vivo* Mem from PHI, CHI and HIV^{free} (MFI) (n = 10). Representative histograms are also shown above. (E,F) Expression levels of USP18 in Mem after 24 hours of neutralizing α -IFNAR treatment (MFI) (n = 10). (E) α -IFNAR, its respective isotype control or no treatment (NT) have been administrated either on total PBMC or (F) directly on purified Mem. The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.5.2 Higher USP18 expression in Mem from HIV-1-infected subjects prevents optimal AKT activation in response to cytokine stimulation in a PTEN-dependent manner.

Recently, data collected on lung cancer cell lines established USP18 as a potential regulator of PTEN protein levels and stability (41). To investigate whether higher USP18 expression may regulate PTEN expression in Mem during HIV-1 infection, we first assessed the constitutive *ex vivo* levels of PTEN in PHI, CHI, ART⁺ and HIV^{free} subjects. We found that PHI and CHI subjects displayed higher levels of PTEN compared to uninfected controls ($P < 0.0001$; n = 10 [MFI]) (Fig 2A). Similarly, the percentages of PTEN⁺ Mem were higher in PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} donors (63.3 ± 17.9 [PHI], 53.8 ± 16.2 [CHI] and 9.9 ± 7.3 [HIV^{free}]; $P < 0.0001$) (S7A Fig). Of note, Mem from ART⁺ subjects displayed similar expression of PTEN than those from HIV^{free} controls (S5C Fig). We found highly significant correlation between USP18 and PTEN expression levels in Mem for all tested subjects ($P < 0.0001$, $r = 0.9511$; n = 30) (Fig 2B).

Next, we aimed to investigate whether interfering with USP18 levels impacts PTEN expression in Mem from HIV-1-infected subjects. PBMC from PHI, CHI and HIV^{free} subjects were first cultured with α -IFNAR or isotype control for 24 and 48 hours. Intracellular levels of PTEN were then determined on Mem by flow cytometry. Our data showed that a 24h-long treatment with α -IFNAR significantly reduced the levels of PTEN in PHI and CHI, yet it did not bring them down to the levels found in the HIV^{free} group (Fig 2C). By prolonging the α -IFNAR treatment to 48h, we found that the levels of PTEN in PHI and CHI were comparable to those found in HIV^{free} subjects. To further confirm that USP18 was the ISG responsible for regulating PTEN expression in Mem during HIV-1 infection, we specifically inhibited USP18 expression in Mem using small interfering RNAs (siRNA) silencing. Briefly, purified Mem from PHI, CHI and HIV^{free} subjects were either electroporated or transfected with siRNA specific for USP18 or with respective negative control siRNA for 2 hours, washed twice and then cultured with their autologous CD4-depleted PBMC (ratio Mem/PBMC = 1/4). Both levels of USP18 and PTEN were finally determined by flow cytometry in transfected Mem for all groups at 48 hours post-transfection. Electroporation alone or transfection with negative siRNA did not affect USP18 expression when compared to Mem that

were not electroporated. In contrast, Mem from infected subjects that were transfected with USP18 siRNA displayed an average of 79.4% and 82.4% reductions in USP18 expression, respectively for PHI and CHI subjects (S7B Fig). Same as for α -IFNAR treatments, USP18 silencing in Mem led to significant reductions of PTEN expression in PHI and CHI to levels comparable to the uninfected controls (Fig 2D). Of note, PTEN levels were similar between Mem that were electroporated alone and transfected with scrambled siRNA (S7C Fig).

Since PTEN is a negative regulator of PI3K/AKT signaling [37], we finally explored whether our HIV-1-infected groups had reduced AKT activation in response to IL-2 or IL-7 stimulations. We also assessed if we could rescue those activation levels by using either PTEN inhibitor SF1670, α -IFNAR or USP18 siRNA. In this context, we first pre-treated PBMC for all groups with or without SF1670, neutralizing α -IFNAR or its isotype control for 48 hours, and then stimulated the cells with cytokines for another round of 15 minutes before assessing AKT pS473 levels in Mem by PhosFlow. We also transfected purified Mem with USP18 siRNA or negative siRNA, cultured them with their autologous CD4-depleted PBMC for 48 hours and then added cytokines in cultures for 15 minutes before the FACS analysis. As expected, our data confirmed that Mem from PHI and CHI subjects displayed lower AKT activation in response to cytokine stimulations when compared to HIV^{free} controls (Fig 2E,F and S8A Fig). Basal levels of AKT pS473 determined in Mem that were not stimulated were similar between all tested groups (S8A,B Fig). Transcriptional analyses performed on purified Mem that have been stimulated or not with IL-2 or IL-7 showed similar mRNA expression of AKT except in the case of IL-7 stimulated Mem from CHI subjects (S3B Fig). Interestingly, our data showed that all pre-treatments, including USP18 silencing, led to significant improvements of cytokine-induced AKT activation in Mem from PHI and CHI in the range of uninfected controls (Fig 2E,F). Of note, levels of cytokine-induced AKT activations were similar between Mem that were electroporated alone and transfected with scrambled siRNA. Although we confirmed reduced IL-2-induced STAT5 pY694 levels in Mem from PHI and CHI subjects as previously reported [6], pre-treatments with α -IFNAR did not rescue STAT5 activation unlike AKT (S8C Fig). Finally, our data showed no significant differences for both basal and cytokine-induced AKT pS473 levels in Mem between ART⁺ subjects and uninfected controls (S5D Fig).

Overall, our data show that interfering with USP18 expression during HIV-1 infection leads to better AKT activation in a PTEN-dependent manner.

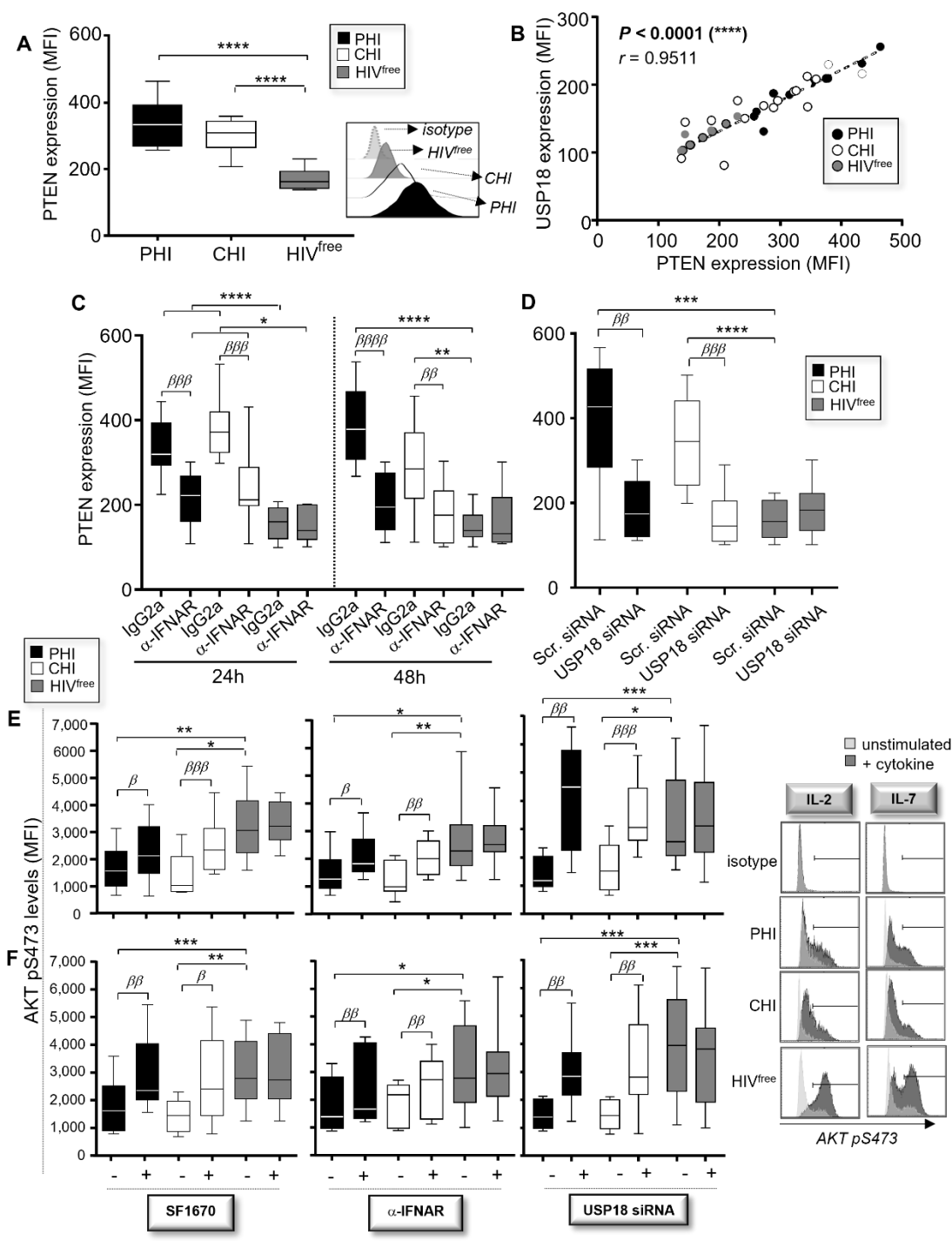


Fig 2. High USP18 expression in Mem from PHI and CHI impairs AKT activation. (A) *Ex vivo* PTEN expression levels in Mem from PHI, CHI and HIV^{free} subjects (MFI) (n = 10). Representative histograms including isotype control are also shown above. (B) Correlations between USP18 expression and PTEN expression in Mem for all subjects (n = 30). (C) PTEN expression levels in Mem that have been treated for 24 or 48 hours with α -IFNAR or its respective isotype control (n = 10). (D) Expression of PTEN in Mem that have been transfected with siRNA specific for USP18 or with scrambled siRNA (n = 10). (E, F) Levels of AKT pS473 following 15 minutes of IL-2 (E) or IL-7 (F) stimulation in Mem that have been pre-treated 48 hours with SF1670 (left), α -IFNAR or its respective isotype control (middle), or transfected or not for 48 hours with specific USP18 siRNA (right) (n = 10). Representative histograms for AKT p473

expression in cytokine-stimulated Mem for all groups of subjects including isotype control are also shown on the right side. The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.5.3 Higher USP18 expression in infected subjects impairs Mem protection against Fas-induced apoptosis.

Since IL-2 and IL-7 play a critical role in regulating Mem survival [6, 38, 39], we next investigated their efficacy to protect Mem from Fas-induced apoptosis. To trigger Fas-induced apoptosis, we used the anti-Fas antibody (clone CH11), which activates the Fas signaling pathway in cultured cells [4, 6]. Briefly, PBMC from PHI, CHI and HIV^{free} subjects were treated or not for 24 hours with CH11 antibody in the presence or absence of IL-2 or IL-7 stimulations. At 24 hours of culture, we assessed the numbers of apoptotic cells and apoptosis levels in Mem using Annexin-V staining for all conditions (for the constitutive or basal, and Fas-induced apoptosis). We calculated the numbers (N) of Fas-induced apoptotic Mem as determined by the formula: N of apoptotic Mem with CH11 - N of apoptotic Mem without CH11. Although we found a trend to higher numbers of Annexin-V⁺ Mem for the constitutive apoptosis in PHI and CHI when compared to HIV^{free} controls (10,020 ± 2,473; 10,484 ± 3,785; and 7,865 ± 3,785, respectively), our data show no significant differences between the study groups (Fig 3A, left side). However, in the absence of cytokine stimulation, we found significant higher numbers of Fas-induced apoptotic Mem from PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} subjects ($P < 0.0001$) (Fig 3A [right side] and S9A Fig). Similar results were found when using percentages of apoptosis instead of absolute numbers of Mem (S9B Fig). We found that the stimulations with IL-2 and IL-7 led to lower numbers of Fas-induced apoptotic Mem for all tested groups. In the same sets of experiments, we further decided to evaluate the levels of Mem protection against Fas-induced apoptosis when the cells are stimulated by cytokines. The levels of Mem protection with cytokine stimulation in fold changes (FC) were determined by the formula: N of Fas-induced apoptotic Mem without cytokine / N of Fas-induced apoptotic Mem with cytokine. We found that the levels of cytokine-mediated Mem protection were significantly lower in PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} controls (2.0 ± 0.5 [PHI], 2.1 ± 0.6 [CHI] and 4.3 ± 2.4 [HIV^{free}]; 1.9 ± 0.5 [PHI], 1.6 ± 0.5 [CHI] and 4.9 ± 2.8 [HIV^{free}], respectively for IL-2 and IL-7 stimulations; $P \leq 0.0016$) (Fig 3B).

We next investigated whether cell pre-treatments with SF1670, α -IFNAR, or USP18 siRNA improve cytokine-mediated Mem protection in PHI and CHI subjects. Briefly, PBMC were pre-treated with or without SF1670, α -IFNAR or isotype control for 48 hours. As described below, pre-treated cells were then cultured for 24 hours in the presence or absence of CH11 antibodies and cytokines. Similarly, purified Mem were transfected with USP18 or scrambled siRNA and then

cultured with their autologous CD4-depleted PBMC for 48 hours before assessing cytokine-mediated Mem protection. Not only did all pre-treatments significantly increased cytokine-mediated Mem protection in HIV-1-infected subjects, but specific USP18 silencing also brought the cell protection to levels comparable to the HIV^{free} group (Fig 3C,D). We found that the increased Mem resistance to apoptosis driven by USP18 gene silencing was not associated with a reduction of Fas receptor expression (S10 Fig). Finally, we calculated the increases of cytokine-mediated Mem protection in the context of USP18 silencing for all tested groups. The increases determined in fold changes (FC) were obtained using the formula: cytokine-mediated Mem protection with USP18 siRNA / cytokine-mediated Mem protection with scrambled siRNA. Our data showed that targeting USP18 expression in PHI and CHI subjects led to significant increases of cytokine-mediated Mem protection (Fig 3E). We found highly significant correlations between the increases of Mem protection against Fas-induced apoptosis and AKT activation in both IL-2- and IL-7-stimulated Mem in the context of USP18 gene silencing ($P = 0.0031$, $r = 0.5215$ and $P = 0.0139$, $r = 0.4444$ respectively; $n = 30$) (Fig 3F).

In summary, we show that interfering with USP18 during primary HIV-1 infection protects Mem from apoptosis in a PTEN and AKT-dependent manner and decreases the numbers of apoptotic Mem.

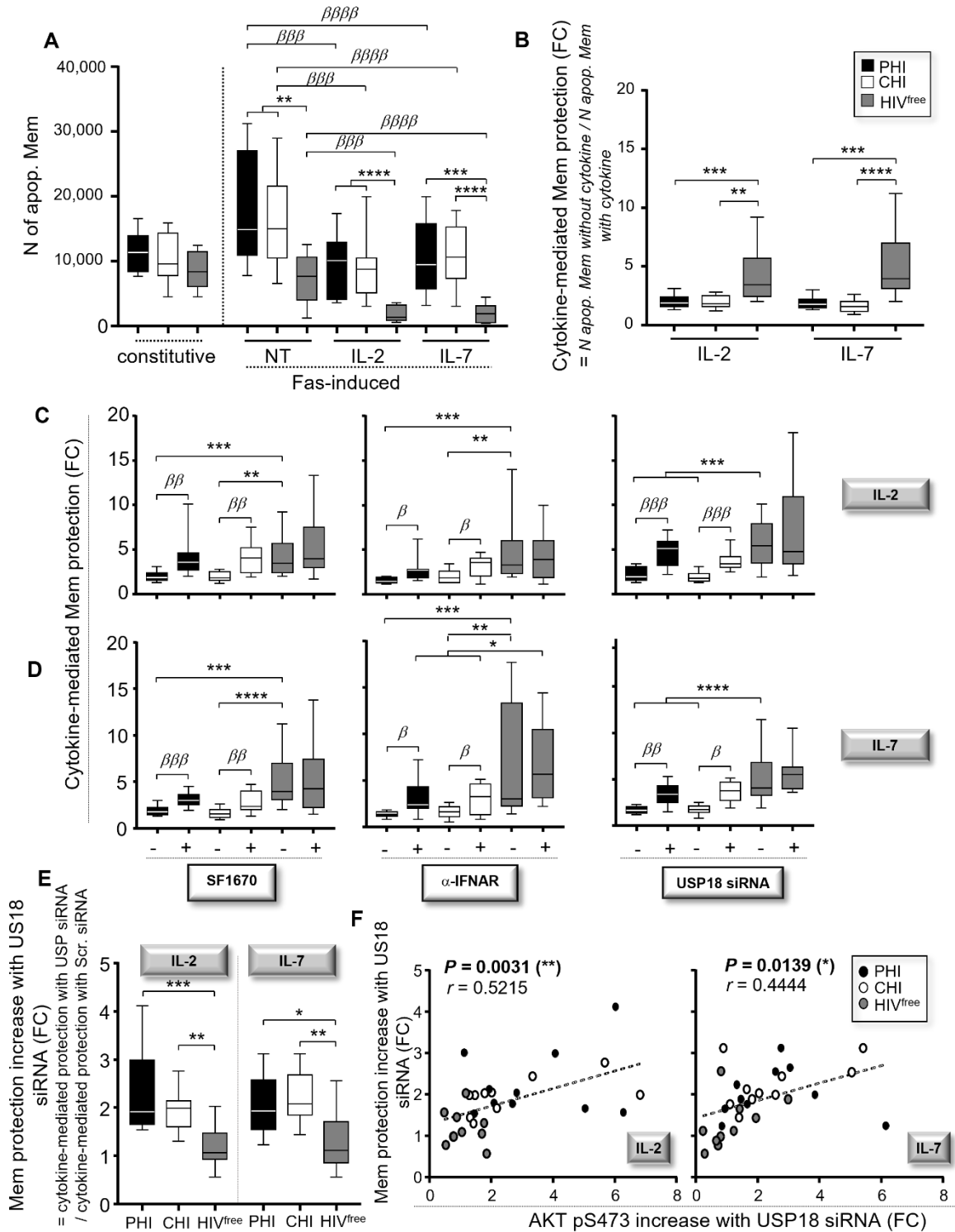


Fig 3. Interfering with USP18 in Mem from PHI and CHI improves cytokine responses and cell resistance to apoptosis. (A) Numbers (N) of constitutive apoptotic Mem (without any treatment) and Fas-induced apoptotic Mem in the presence or absence of IL-2 or IL-7 stimulation. N of Fas-induced apoptotic Mem were calculated according to the formula: N of apoptotic Mem with CH11 – N of apoptotic Mem without CH11 (n = 10). (B) Cytokine-mediated Mem protection are shown in fold changes (FC). Cytokine-mediated Mem protection were determined by the formula: Number of Fas-induced apoptotic Mem without cytokine / Number of Fas-induced apoptotic Mem with cytokine (n =

10). (C,D) Fold changes of IL-2- (C) or IL-7 (D)-mediated Mem protection in cells that have been pre-treated for 48h with SF1670 (left), α -IFNAR or its respective isotype control (middle), or pre-transfected or not for 48 hours with USP18 siRNA (right) (n = 10). (E) Increases of Mem protection with USP18 siRNA determined in fold changes (FC). We calculated the increases of Mem protection in the context of USP18 targeting with the formula: cytokine-mediated Mem protection with USP18 siRNA / cytokine-mediated protection with scrambled siRNA. (F) Correlations between the increases of Mem protection and AKT activation after USP18 siRNA transfection in both IL-2- and IL-7-stimulated Mem (FC, fold change; n = 30). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.5.4 Interfering with USP18 expression in HIV-1-infected subjects improves long-lasting Mem maintenance in an AKT-dependent manner.

Since the TcR triggering results in rapid activation of PI3K/AKT signaling [39, 40], we decided to investigate if this activation was lower in Mem from the PHI and CHI groups compared to the HIV^{free} group and if interfering with PTEN, IFN-I signaling or specifically with USP18 would rescue this activation. First, PBMC from the three study groups were pre-treated or not with SF1670, α -IFNAR or isotype control for 48 hours, before being stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Abs) for an additional 15 minutes. Levels of AKT pS473 were finally determined in activated Mem by PhosFlow for all conditions of cultures. We also activated purified Mem with anti-CD3 and anti-CD28 Abs, transduced them with lentiviral CRISPR/Cas9 vectors mediating USP18 gene editing (lentiviral vectors for USP18 knock-out; LV_{USP18 KO}) or control lentiviral vectors (LV_{Ctrl}) for 4 hours, washed them twice and cultured them for 48 hours with their autologous CD4-depleted PBMC. At 48 hours post-transduction, cells were subjected to another 15-minute-long round of TcR activation before assessing AKT activation levels. Although the basal levels of AKT pS473 were similar in un-activated Mem from all tested groups, our data showed that AKT activation in response to TcR triggering was systematically lower in Mem from PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} donors (Fig 4A). Both pre-treatments of Mem with SF1670 or α -IFNAR led to significant improvements of AKT activation in response to TcR triggering to levels comparable to those in the HIV^{free} group (Fig 4A, left and middle panels). We found that a 48 hour-long Mem transduction with lentiviral CRISPR/Cas9 vectors mediated USP18 gene editing resulted in more than 87% inhibition of protein levels (S11A Fig). Of note, Mem that were transduced with control lentiviral vectors displayed similar USP18 expression when compared to uninfected Mem. Similarly to cell pre-treatments, we found that specifically interfering with USP18 expression in activated Mem led to significant improvements of AKT activation to levels comparable to those of the HIV^{free} group (Fig 4A, right panels).

Considering that Mem are first and foremost defined by their long-lasting maintenance, we next assessed the ability of Mem from PHI, CHI, and HIV^{free} subjects to persist up to 28 days of culture in response to multiple rounds of TcR triggering as previously done [4, 41]. Briefly, purified Mem

were first stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence or absence of SF1670, α -IFNAR or isotype control for 2 hours, washed twice and then cultured with their autologous CD4-depleted PBMC. Cultured cells were then re-stimulated at day 7, 14 and 21 of culture with or without the specific inhibitors. Once again, to specifically interfere with USP18 expression, we purified Mem at day 0 of cultures, transduced them with LV_{USP18 KO} or LV_{Ctrl} for 4 hours, washed them twice and cultured them with their autologous CD4-depleted PBMC for 7 days. Cells were then re-stimulated at day 7, 14 and 21 of cultures. At day 7, 14, 21 and 28, total numbers of viable Mem were counted, and the half-lives of these cells were estimated for each study groups. We also determined in Mem the levels of apoptosis using Annexin-V staining and the expressions of USP18 and AKT pS473 by flow cytometry. We also assessed by ELISA the levels of both IFN- α and virus productions in supernatants during the time course of culture.

As expected, USP18 gene editing led to sustained inhibition of the elevated levels of USP18 expression in Mem from PHI and CHI subjects (S11B Fig). The elevated USP18 expression in Mem from viremic subjects could be explained by sustained IFN- α production during the time course of culture (S12A Fig). Our data showed that Mem from PHI and CHI subjects were not able to persist in culture, unlike Mem from HIV^{free} donors (Fig 4B). Total counts of viable Mem from HIV^{free} subjects were approximately 2.1-fold higher at day 7 and 5.3-fold higher at day 14 than those obtained from HIV-1-infected subjects ($P \leq 0.0043$; $n = 6$). Strikingly, almost all Mem from HIV-1-infected subjects died by day 21, whereas Mem from uninfected controls continued to survive for at least 28 days after four rounds of activation. The half-lives of gated Mem obtained from PHI, CHI and HIV^{free} subjects were 12, 10.5, and 22.2 days, respectively (Fig 4B). Interestingly, the reduced ability of Mem from infected subjects to persist was associated with lower expression levels of AKT pS473 during the time course of culture (Fig 4C). In addition, we found positive correlations between the counts of viable Mem and expression levels of AKT pS473 at day 7 and day 14 of cultures ($P = 0.0153$, $r = 0.5618$ and $P < 0.0001$, $r = 0.8785$ respectively; $n = 18$) (Fig 4D,E).

lines represent Mem half-lives for each group of subjects. (C) Levels of AKT pS473 following TcR activation every 7 days for 28 days. (D,E) Correlations between cell counts and AKT pS473 levels in Mem at 7 (D) and 14 (E) days of culture (FC, fold change; n = 18). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

Treatments with SF1670, α -IFNAR or USP18 gene editing resulted in significant improvement of cell counts and half-lives in Mem from infected subjects from day 7 of culture (Fig 5A,B). Although all treatments significantly increased the numbers of viable Mem in PHI and CHI subjects during the cultures and allowed even some Mem to persist up to 21 days, they did not reach Mem counts found in cultures from HIV^{free} controls. In addition, although we systematically found HIV-1 production in cultures from infected subjects, USP18 interference did not impact the viral production (S12B Fig). This seemed to indicate that improvements of Mem survival, especially when USP18 was targeted, were not associated with reduced viral production in cultures. In contrast, all treatments led to significant increases of AKT pS473 levels intrinsic to Mem from PHI and CHI subjects (Fig 5C). We also found significant correlations between the increases of cell counts and AKT pS473 levels with USP KO in Mem at 7 and 14 days of treatment ($P = 0.001$, $r = 0.7083$ and $P = 0.0005$, $r = 0.7380$ respectively; n = 18) (Fig 5D,E).

Overall, our data confirm the efficacy of PTEN and USP18 interferences in improving long-lasting Mem maintenance in an AKT-dependent manner.

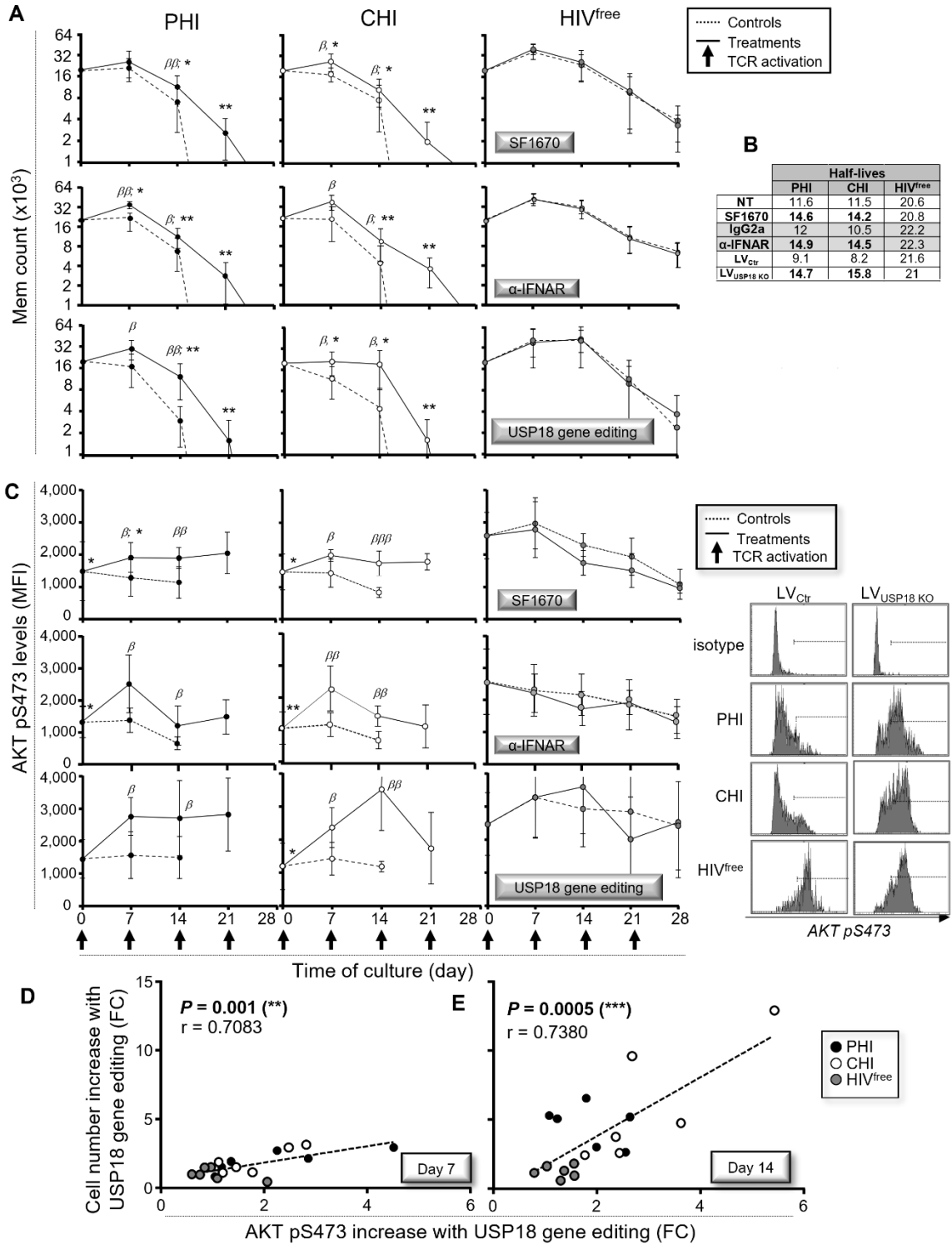


Fig 5. Targeting USP18 in PHI and CHI results in improved Mem maintenance in an AKT-dependent manner. (A) Mem counts from PHI, CHI, and HIV^{free} following TcR activation every 7 days for 28 days with or without SF1670 (top), α -IFNAR or its respective isotype control (middle), or CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (bottom) treatments. Results are expressed as the average of six independent experiments \pm SD in log₂ scale. (B) Half-lives were also determined for all study groups of subjects in the presence or absence of specific treatments. (C) Levels of AKT pS473 following TcR activation every 7 days for 28 days with or without SF1670 (top), α -IFNAR (middle), or

CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (bottom) treatments. Representative histograms are also shown on the right side. (D,E) Correlations between the increases of cell counts and AKT pS473 levels after CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing in Mem at 7 (D) and 14 (E) days of treatment (FC, fold change; n = 18). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.5.5 Defective long-lasting Mem maintenance in HIV-1-infected subjects is explained by increased cell death.

We next aim to identify the main cause of reduced Mem counts in HIV-1-infected subjects at day 7 of culture. To investigate whether reduced numbers of Mem may be explained by lower proliferation rates, we stained purified Mem with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) at day 0. Our data showed comparable percentages of proliferating CFSE^{low} Mem in cultures from PHI, CHI and HIV^{free} subjects (Fig 6A). Similarly, reduced numbers of Mem in cultures from HIV-1-infected subjects at day 7 could not be explained by different cell distribution pattern when compared to HIV^{free} donors. Indeed, we found similar cell distribution among Mem for all study groups as determined by the percentages of T_{CM}, T_{TM} and shorted-lived T_{EM} cells [39] (Fig 6B). Although the targeted USP18 editing in HIV-1-infected subjects led to significant increases of Mem at day 7 of culture, it did not impact their levels of proliferation or cell distribution patterns (Fig 6A,B). Put together, these results demonstrated that proliferation and cell differentiation did not play a significant role in long-lasting Mem maintenance.

In contrast, we found higher levels of apoptosis in Mem from PHI and CHI subjects compared to HIV^{free} donors at day 7 of culture (38.6 ± 8.4 [PHI], 49.2 ± 11.2 [CHI] and 13.8 ± 5.5 [HIV^{free}]) (Fig 6C). Treatments with SF1670, α -IFNAR, and LV_{USP18 KO} also led to significant reduction of Mem apoptosis in PHI and CHI subjects, although percentages of apoptotic Mem in culture from uninfected controls were systematically lower. Finally, we found a positive correlation between the reductions of Mem apoptosis and the increases of AKT pS473 levels after USP18 gene editing in Mem at day 7 of culture ($P = 0.0311$, $r = 0.5088$; n = 18) (Fig 6D). The reduction of Mem apoptosis following USP18 gene editing also correlated with the increases of cell counts ($P = 0.0081$, $r = 0.6028$; n = 18) (Fig 6E).

In summary, our data indicate that Mem apoptosis regulates the cell numbers in our long-term culture assay rather than proliferation or cell differentiation.

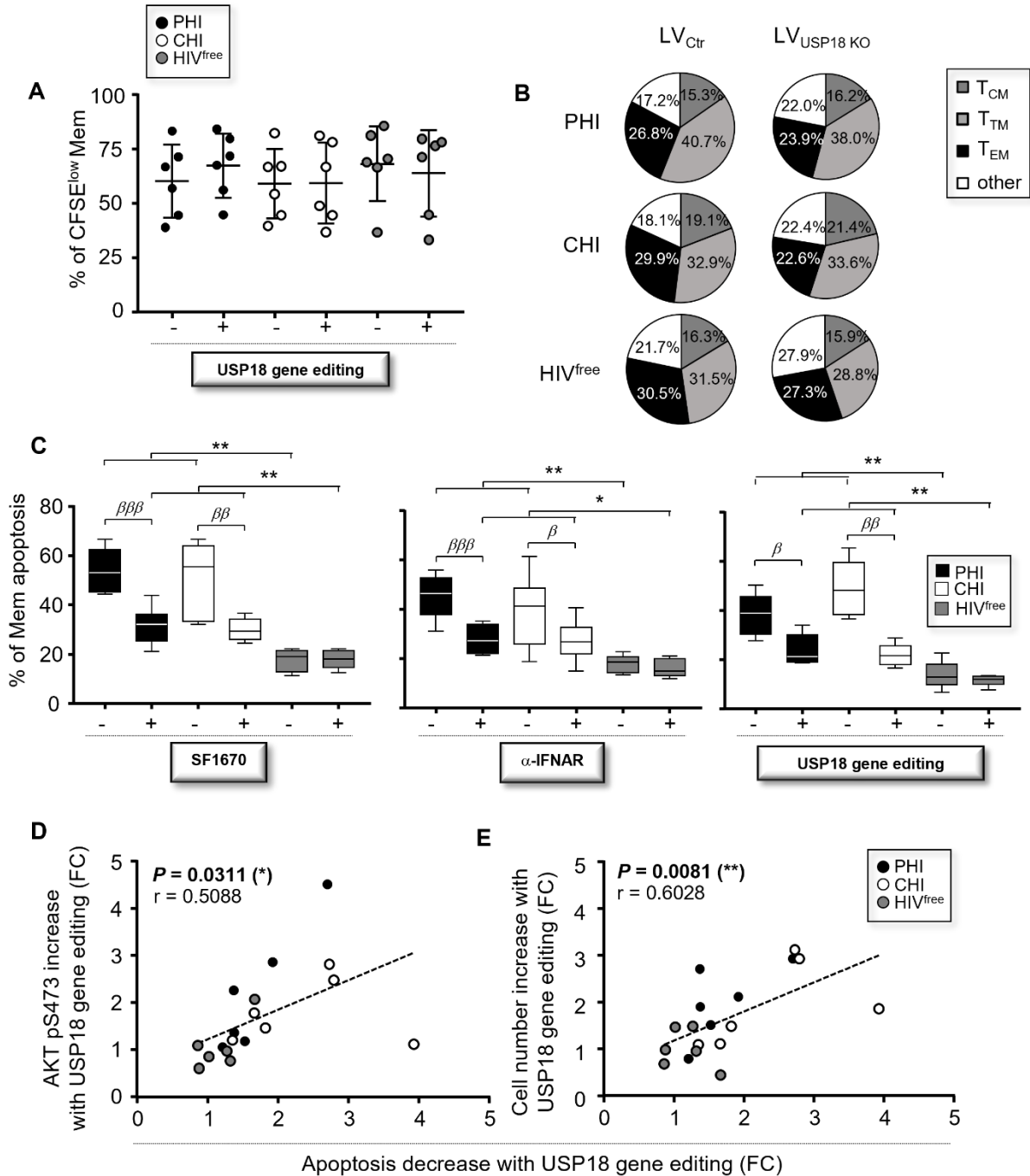


Fig 6. Improvements of Mem maintenance in PHI and CHI with USP18 gene editing are associated with lower cell death. (A) Levels of proliferation determined at day 7 of culture by the percentages of viable CFSE^{low} Mem with or without CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (n = 6). (B) Distribution of Mem subsets at day 7 of culture with or without CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (n = 6). (C) Percentages of apoptotic Mem on day 7 with or without SF1670 (left), α-IFNAR or its respective isotype control (middle), or CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (right) (n = 6). Levels of apoptosis were determined using Annexin-V staining. (D) Correlation between the reductions of Mem apoptosis and the increases of AKT pS473 levels after USP18 gene editing in Mem at day 7 of culture (FC, fold change; n = 18). (E) Correlation between the reductions of Mem apoptosis and the increases of cell counts after USP18 gene editing treatment at day 7 (FC, fold change; n = 18). The error bars indicate standard deviations from the means. β, symbol used for paired t test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.5.6 Interfering with USP18 expression in primary-infected subjects also rescues HIV-1-specific cells from apoptosis and involves increased AKT pS473 levels.

Since evidence show that HIV-1-specific CD4 T-cells display enhanced apoptotic potential that the other Ag-experienced cells [42], we decided to assess if interfering with PTEN or USP18 could also reduce the apoptosis of those cells. First, PBMC from PHI, CHI, and ART⁺ subjects were stimulated with HIV-1 Gag p55 antigens and anti-CD28 Abs for 18 hours in the presence or absence of SF1670 inhibitor. We added the antiviral AZT in cultures from ART⁺ subjects to maintain medical pressure and prevent *de novo* infections and viral replication. The efficacy of AZT treatment was confirmed by the absence of detectable p24 levels in supernatants from ART⁺'s cultures. We also inhibited USP18 expression in Mem from all groups of HIV-1-infected subjects before assessing the Gag-specific stimulation. Briefly, we transduced purified CD4 T-cells with LV_{USP18 KO} or LV_{Ctrl} for 4 hours, washed the cells twice, and cultured them for 48 hours with their autologous CD4-depleted PBMC (ratio CD4/PBMC = 1/4). Finally, transduced cells were stimulated for an additional 18 hours with Gag antigens and anti-CD28 Abs. At 18 hours post-stimulation with Gag, we collected cells and assessed the expression of USP18, IFN- γ and AKT pS473 as well as the percentages of apoptotic cells by Annexin-V staining within the HIV-1-specific CD4 T-cells. HIV-1-specific CD4 T-cells from infected subjects were determined by their positive staining for IFN- γ following Gag stimulation (Fig 7A). Of note, we included HIV^{free} donors as negative controls for HIV-1-specific stimulations. Uninfected controls were used for setting gating regions and discerning negative from positive cells (HIV^{free}: 0.08 \pm 0.12% of IFN- γ ⁺CD4 T-cells at 18 hours Gag post-stimulation; Fig 7B). Our data showed that PHI displayed lower proportion of HIV-1-specific CD4 T-cells when compared to ART-suppressed subjects after Gag stimulation ($P = 0.0476$, $n = 6$) (Fig 7B). Although it did not reach significance, we also found a trend to reduced proportion of HIV-1-specific cells in CHI when compared to ART⁺ subjects (0.77 \pm 0.23% and 1.32 \pm 0.56%, respectively). We confirmed increased USP18 expression in HIV-1-specific CD4 T-cells from PHI and CHI subjects when compared to those from ART⁺ (S13 Fig; cells with no transduction or transduced with LV_{Ctrl}). We also confirmed approximately 81.2% and 83% inhibitions of USP18 expression in HIV-1-specific CD4 T-cells from PHI and CHI subjects when their purified CD4 T-cells were pre-transduced with LV_{USP18 KO} (S13 Fig). In this context, our results showed that treatment with SF1670 and USP18 gene editing with PHI and CHI subjects led to significant increases of proportion of HIV-1-specific cells (Fig 7B).

Our data further showed increased percentages of apoptotic Annexin-V⁺ HIV-1-specific CD4 T-cells in PHI and CHI subjects when compared to patients under ART (36.8 \pm 6.1, 42 \pm 10.9 and

16.2 ± 5.9, respectively; $P = 0.0022$) (Fig 7C). As expected, interfering with PTEN or with USP18 expression in viremic subjects led to significant reduction of apoptosis in Gag-specific cells, although levels of apoptosis in PHI and CHI subjects were still higher compared to those of ART⁺ subjects (Fig 7C). We also found reduced expression levels of AKT pS473 in HIV-1-specific CD4 T-cells from viremic subjects compared to ART⁺ patients ($P = 0.0022$ and $P = 0.0173$, respectively; $n = 6$) (Fig 7D). SF1670 treatment or USP18 gene editing led to increases of AKT activation in PHI and CHI subjects (Fig 7D). Finally, we found a significant correlation between the reductions of apoptosis and increases of AKT pS473 levels in HIV-1-specific CD4 T-cells with USP18 gene editing ($P = 0.0040$, $r = 0.6427$; $n = 18$) (Fig 7E).

Overall, our results show that interfering with PTEN or USP18 during primary HIV-1 infection not only improves Mem survival, but also protects HIV-1-specific cells as well.

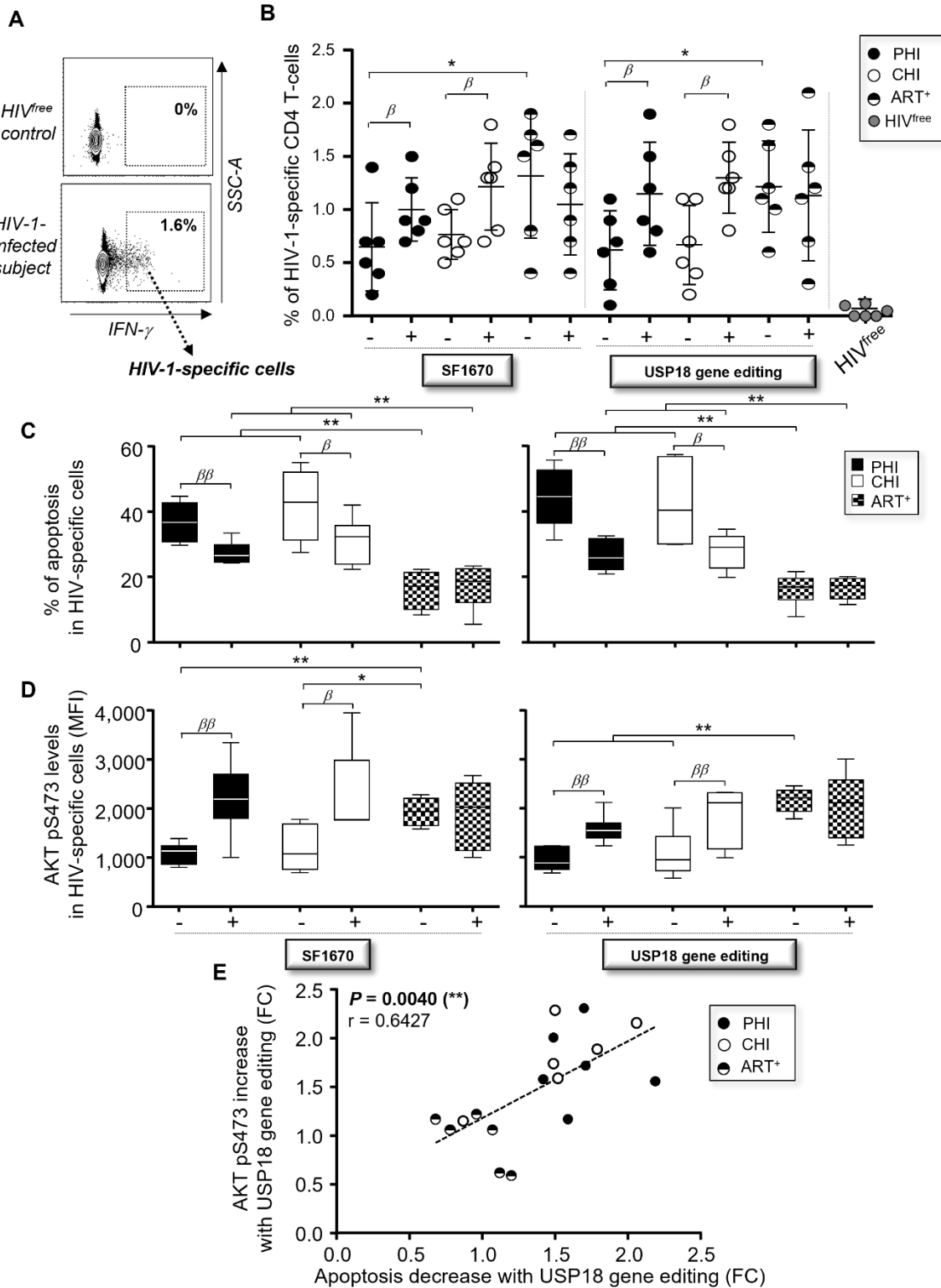


Fig 7. Interfering with USP18 reduces apoptosis of HIV-1-specific CD4 T-cells in an AKT-dependent manner. (A) Gating strategy for HIV-1-specific CD4 T-cells following Gag stimulation for 18 hours. HIV-1-specific clones were determined by IFN- γ expression. (B) Percentages of HIV-1-specific CD4 T-cells (on total CD4) in CHI, PHI, ART⁺ and HIV^{free} subjects after Gag stimulation in the presence or absence of SF1670. Percentages of HIV-1-specific cells were

also determined in culture after 18 hours of Gag stimulation when CD4 T-cells have been pre-transduced or not for 48 hours with LV_{USP18 KO}. HIV^{free} donors were included as negative control for HIV-1 stimulation (n = 6). (C,D) Levels of apoptosis assessed by Annexin-V staining (C) and AKT pS473 expression (D) in HIV-1-specific CD4 T-cells at 18 hours post-stimulation in the presence of absence of SF1670 (left) or CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (right) (n = 6). (E) Correlation between the reductions of apoptosis and increases of AKT pS473 levels in HIV-1-specific CD4 T-cells after USP18 gene editing (FC, fold change; n = 18). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).

6.6 Discussion

Type I interferons (IFN-I) are central to the innate immune response against viral infections including HIV-1 [10, 12, 43]. In recent years however, the notion that IFN-I have detrimental effects if they are produced for long periods of time, as is the case during persistent viral infections, has become more evident [22, 43, 44]. Similarly to others [16-21], we found elevated IFN- α levels in plasma during the early and later stages of HIV-1 infection, which correlated with viral loads (Fig 1A and S1 Fig). We also found sustained production of IFN- α and viruses in supernatants in PHI and CHI subjects up to 21 days of our *in vitro* cultures (S12 Fig). However, despite indications of an IFN-I signature in HIV-1 infection [22, 32-34], the molecular mechanisms by which sustained IFN-I signaling negatively impacts the immune system, especially Mem, which are a major target during primary infection, are still unclear.

Here, we provide a molecular mechanism related to the elevated IFN-I signaling in Mem during primary HIV-1 infection that is clearly responsible for their defective cell survival (S14 Fig). In this context, our data reveal that IFNAR blockade in Mem during HIV-1 infection normalized the high expression of the down-stream interferon-induced gene, USP18, in the range of those from uninfected controls (Fig 1D-F). Our data further shows that PTEN expression was reduced following either IFNAR blockade or specific USP18 gene silencing (Fig 2C,D). Similarly, it was previously shown that engineered gain of USP18 expression in human lung cancer cell lines stabilized PTEN protein by preventing its ISGylation post-translational modification pathway [45]. Interfering with PTEN activity or specifically with USP18 expression during HIV-1 infection led to significant improvements of Mem survival in an AKT-dependent manner (Fig 3-6). These improvements were illustrated by increased long-lasting cell maintenance, cell response to γ -chain cytokines and resistance to Fas-induced apoptosis (Fig 2-5) [46]. Other observations have shown that IFNAR blockade also inhibited TRAIL-induced apoptosis in CD4 T-cells during *in vitro* infection, and was associated with reduced frequencies of TRAIL⁺ and apoptotic cells in infected subjects [18, 24, 47]. Although a previous report has indicated that prolonged IFN- α treatment could impair cytokine-induced AKT activation [48], we show the beneficial impact of blocking this

signaling in Mem and HIV-1 specific CD4 T-cells and, for what we believe is the first time, we present an explanation on the molecular mechanism involved in this signaling.

Although our findings lead to a straightforward mechanism behind the deleterious effects of sustained IFN-I signaling on the survival of Mem (S14 Fig), there are still other factors to consider if we want to thoroughly map the molecular network involved during this signaling as well as its full impact. (i) One such aspect, is the extent at which increased USP18 expression is found. Other populations, such as CD3⁺CD4^{neg}, CD3^{neg}CD4^{neg}, and monocytes, from PHI and CHI also showed increased USP18 expression compared to the uninfected control group (S15 Fig). This places USP18 as a potential key component of the immune system critical function as it could affect a broad spectrum of cell populations during HIV-1 infection. (ii) Another factor to consider is the fact that, USP18 is not only an isopeptidase that stabilizes PTEN expression, but also a negative regulator of IFN-I signaling [31, 49]. In the case of this study however, HIV-1-infected subjects displayed elevated IFN-I signaling despite an increase in USP18 expression. It is important to note that the isopeptidase activity of USP18 is independent of its IFN-I regulatory functions [50]. This might explain how high USP18 expression in Mem during HIV-1 infection could stabilize PTEN expression and be concomitantly associated with sustained IFN-I signaling. Of note, the IFN-I regulatory functions of USP18 depend on its capacity to bind IFNAR2 and inhibit JAK/STAT signaling and involves other factors. Through direct interaction with USP18, the insulin receptor substrate-4 was shown to counteract its inhibitory effect on JAK/STAT signaling [51]. Conversely, STAT2 was shown to be a crucial component of the USP18-mediated suppression of IFN-I signaling [52]. Therefore, it would be interesting to investigate how USP18 impacts IFN-I signaling regulation during HIV-1 infection, and whether STAT2 and/or IRS-4 are involved. (iii) An additional aspect to consider in the case of sustained IFN-I signaling, aside from Mem survival, is that of their defective function which appears during the early stage of primary HIV-1 infection. In this regard, HIV-1-infected patients display hyper-activated and exhausted CD4 T-cells that are characterized by poor effector functions and high expression of multiple inhibitory receptors such as programmed cell death 1 [53]. Interestingly, recent data collected by Crawford A. *et al* have shown that CD4 T-cell defective function during HIV-1 infection was associated with an elevated IFN-I-induced transcriptional program. Further experiments are however warranted to know whether we could also counteract CD4 T-cell defective function during HIV-1 infection by specifically interfering with USP18 expression. Although we confirmed reduced effector functions illustrated by decreased cell ability to secrete cytokines and polyfunctionality (i.e. ability to secrete multiple cytokines), a 24 hour-long IFNAR blockade did not rescue these immune defects (S16 Fig). However, the critical role of PI3K/AKT signaling pathway in regulating T-cell function is now

well established [54]. Therefore, we cannot exclude the possibility that longer IFNAR blockade or specific targeting of USP18, which are acting through AKT-dependent mechanisms, might improve cell functions during persistent HIV-1 infection as well. (iv) The elevated IFN-I signaling and USP18 expression in Mem from HIV-1-infected subjects can be explained by their sustained IFN- α and virus production in the environment (S12A,B Fig). Therefore, it is not surprising that long-term ART when administrated early during the first months of primary HIV-1 infection was effective in normalizing both IFN- α production and USP18 expression intrinsic to Mem (S5 Fig). Interfering with IFN-I signaling or specifically with USP18 expression may still be a therapeutic approach to consider in some cases of treated patients. Despite effective control of HIV-1 replication with ART, a minority of treated patients called immune non-responders (INR) fails to show increased CD4 T-cell counts to the level observed in uninfected control donors [55, 56]. INR remain at greater risk for health complications and non-AIDS diseases including cardiovascular disease, liver disease, renal disease, and malignancies when compared to immune responders (IRs) in whom the CD4 T-cell counts are properly restored [57, 58]. Although the molecular mechanisms that are responsible for the lack of CD4 T-cell recovery in INR are still unclear, several pieces of observations have indicated that their CD4 T-cell recovery may be adversely affected by the sustained expression of several ISG [59-61]. (v) The effect of USP18 modulation on HIV-1 infectivity remains to be fully explored, especially in humanized mice infected with HIV-1 where IFNAR blockade is associated with reduced T-cell activation [32-34]. It is well-established that CD4 T-cell activation is a key factor in facilitating HIV-1 infection and cell depletion [62, 63]. Therefore, we cannot rule out a potential effect of reduced infectivity to contribute to some of the cell survival as the USP18 targeting should be reducing inflammatory/ISG driven activation as well. In the context of our experiments, the relative short time of treatments enables higher AKT activation and cell survival seemingly independently of viral reinfection as maintaining exogenous IFN- α in culture in the presence of fusion inhibitor T20 did not significantly reduce Mem apoptosis compared to untreated Mem (S12C Fig). However, longer treatments might reduce viral infectivity to a significant degree, thus reducing Mem cell death to even greater extents.

As mentioned earlier, although our group has recently provided evidence that the increased production of tryptophan-related catabolite kynurenine during primary HIV-1 infection affected IL-2-induced STAT5 activation in Mem, interfering with this disturbance was not sufficient to restore proper cell survival [6]. Here, we found that blocking IFN-I signaling or directly interfering with USP18 expression also led to significant improvements of Mem survival during primary HIV-1 infection. The molecular mechanisms described in this study did not seem to involve STAT5 activation since we found that IFNAR blockade in Mem from infected subjects had no effect on

IL-2-mediated defective STAT5 phosphorylation (S3B and S8C Figs). In contrast, targeting the increased IFN-I signaling, especially the high USP18 expression in Mem from infected subjects, led to significant increase of AKT activation in a PTEN-dependent manner. Although interfering with IFN-I or specifically with USP18 expression during primary HIV-1 infection significantly improved Mem survival in an AKT-dependent manner, it did not reach the levels that were observable in uninfected controls (Fig 2-5). Similarly, although treatments of HIV-1-specific CD4 T-cells from PHI subjects with USP18 gene editing led to reduced apoptosis levels, these levels were higher compared to those from ART⁺ subjects (Fig 7C). These observations indicate that defective Mem survival during primary HIV-1 infection is a complex mechanism, which may involve independent, but synergic molecular disturbances such as sustained IFN-I signaling and high kynurenine production among others. Of note, the catabolism of tryptophan into kynurenine is known to be mediated by the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), whose protein expression and activity are found increased during HIV-1 infection [64, 65]. Since previous results showed positive correlation between increased ISG expression and IDO levels in HIV-1-infected subjects [66, 67], we cannot exclude the fact that IFN-I blockade may also be effective in counteracting the heightened production of kynurenines during HIV-1 infection. Assessing whether targeting IFN-I and kynurenine-related pathways simultaneously might have a synergistic effect on Mem survival improvement during HIV-1 infection is also warranted.

Although those results are preliminary, USP18 gene editing in cells extracted from one spleen of an HIV-1-infected patient did comfort our observations with PBMC. Indeed, inhibiting USP18 reduced Mem apoptosis even in HIV-1-specific cells (S17 Fig). It remains important to confirm the role of USP18 in tissues with a great number of patients or by using *in vivo* models, such as humanized mice or non-human primate. Taking this into consideration, it is likely that USP18 plays a role in Mem numbers in lymphoid tissue, although its effect might be dwarfed by other mechanisms, such as pyroptosis, more present in those locations compared to peripheral blood [9, 68].

In summary, our data indicates that the interference of sustained IFN-I in human HIV-1-infected subjects, which leads to a better control of USP18 and PTEN, is a valuable tool to consider for Mem recovery and survival via AKT activation. We acknowledge the fact that proposing such therapeutic strategies to fight HIV-1 infection may also bring some concerns, since they could also be detrimental to the patients by protecting their HIV-1-infected cells and sustaining the latent HIV-1 reservoir [69, 70]. Finally, if such treatments have to be considered one day, great consideration should be given to the timing and duration of the IFNAR blockade in patients,

especially when taking into account that this blockade accelerated CD4 T-cell depletion in an acute SIV model [71]. However, our data points to USP18 as an important driver for the detrimental phenotypes observed in Mem from HIV-1-infected subjects. Targeting USP18, specifically its isopeptidase activity, could bypass those unintended consequences, as there are fewer pathways impacted when compared to those regulated by IFN-I signaling.

6.7 Materials and methods

6.7.1 Ethics statement.

All infected patients were participants in the Montreal HIV infection study that received approval from the McGill University Health Centre Ethical Review Board (ethic reference number SL-00.069 [blood] and 2019-5170 [spleen]). All subjects provided an informed and written consent for participation.

6.7.2 Study population.

PBMC and plasma were collected from primary infected patients (PHI), untreated ART-naïve and chronically infected subjects (CHI) and patients under ART (ART⁺) who displayed both viral suppression and full CD4 recovery (> 400 CD4/ μ l blood post-treatments). Each group of HIV-1-infected patients included in the overall study was homogeneously selected and displayed similar clinical data. Clinical information of all infected patients including viral loads and CD4 counts is summarized in S1 Table. We also selected age-matched uninfected control donors as negative control for HIV-1 infection.

6.7.3 Products.

RPMI-1640 media, FBS, antibiotics and PBS were obtained from Wisent Inc. Recombinant IL-2 and IL-7 cytokines as well as the PTEN inhibitor SF1670 were provided from Sigma Aldrich. Anti-Fas CH11 antibody is from MBL International Corporation. We purchased all antibodies and reagents for flow cytometry from BD Biosciences, except for the antibody to CD45RA-ECD, IFNAR2, IRF7 pS477/479 and USP18, which were from Beckman Coulter, Miltenyi Biotec and Santa Cruz Biotechnology respectively (Table S3). 7-aminoactinomycin D (7-AAD) came from ThermoFisher. Neutralizing anti-IFNAR antibody (α -IFNAR; clone MMHAR-2) and respective isotype control were obtained from EMD Millipore. Concentrations of SF1670, α -IFNAR and isotype controls used in our study were 3 μ M, 5 μ g/mL and 5 μ g/mL respectively. Concentration

for IL-2 and IL-7 were 25 IU/mL and 0.3 ng/mL, respectively. The fusion inhibitor T20 was purchased from Sigma Aldrich.

6.7.4 ELISA assays.

Plasma and culture supernatant levels of IFN- α were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (high sensitivity human IFN alpha ELISA kit; PBL Assay Science). We also used the sensitive HIV-1 p24 ELISA kit (Abcam) to determine HIV-1 production in cell cultures.

6.7.5 Purification of Mem.

Mem were purified using the untouched memory CD4 isolation kit (EasySep human memory CD4⁺ T-cell Enrichment Kit; StemCell Technologies) allowing for more than 94.6% purification without any cell stimulation and apoptosis.

6.7.6 Real-time reverse-transcription (RT)-PCR analysis.

Total RNA was isolated from purified Mem using an RNeasy kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). RNA was then reverse transcribed with oligo(dT) primers and SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies). PCR was performed using Taq polymerase (GE Health-care) using set of primers to evaluate ISG expression. The summary of all primers used in this study is presented in S2 Table. All data are presented as relative quantifications with efficiency correction based on the relative expression of target genes versus the gapdh gene as the reference gene. cDNA was amplified using SyBR Green I OPCR master mix (Applied Biosystems), and all data were collected using the Rotor-Gene RG-3000 (Corbet Research) and analysed by the comparative threshold cycle (CT) method using the Rotor Gene Q serie software 2.3.1.

6.7.7 Western blots.

Purified Mem from all groups were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis to assess USP18 expression as previously described [4, 72]. Of note, results are expressed as densitometric quantification of specific bands performed using ImageJ software. The levels of expression of USP18 were normalized to β -actin and were later expressed as the ratio of densitometric values of protein of interest divided by densitometric values of actin within the same blot.

6.7.8 Transfection and siRNA assays.

We first purified 5.10^6 Mem from all tested groups and electroporated them using Nucleofector II technology according to the Amaxa Biosystems manufacturer's protocol. Specific USP18 siRNA and Silencer negative control siRNA were obtained from ThermoFisher Scientific. Of note, $5\mu\text{g}$ of siRNA were transfected or not for each condition for 2 hours without antibiotics. Purified Mem were thereafter washed twice to remove dead necrotic cells, counted and cultured until 48 hours with their autologous CD4-depleted PBMC (at ratio Mem/PBMC = $\frac{1}{4}$). At 48 hours post-transfection, some cells were kept to measure USP18 and PTEN protein levels by flow cytometry.

6.7.9 PhosFlow assays.

PhosFlow assays were performed to assess the intracellular expression levels of STAT1 pY701, IRF7 pS477/479, STAT5 pY694, and AKT pS473. Briefly, cellular fixation was done using 4% PFA for 10 minutes at 36°C followed by surface staining for 10 minutes at 4°C . Afterwards, the cellular permeabilization was done using 90% ice cold methanol for 30 minutes at 4°C followed by 30 minutes of intracellular staining in PBS+2% FBS at room temperature. Of note, we systematically titrated all antibodies and washed the cells three times at the end of the protocol to ensure that all background fluorescences were at an appropriately low position on the fluorescence scale. The viability marker 7-AAD was used to exclude dead cells from analyses. BD LSR II Fortessa flow cytometer (BD) was used to collect the data which were analyzed using the DIVA software.

6.7.10 Intracellular staining assays.

Staining assays were performed to assess the intracellular expression levels of PTEN and USP18. The cellular permeabilization was done using 0.25% (W/V) saponine in PBS for 30 minutes at room temperature. The following multi-parameter antibody cocktail was used: anti-CD3-BB515, anti-CD4-BV605, anti-CD45RA-APC-Cy7, anti-PTEN-APC and anti-USP18-Alexa Fluor700. Of note, anti-USP18 IgG_{1κ} Abs was conjugated to Alexa700 dye using the Zenon mouse IgG₁ labeling kit (Life Technologies Inc.) according to the manufacturer's protocol. The viability marker 7-AAD was used to exclude dead cells from analyses. BD LSR II Fortessa flow cytometer (BD) was used to collect the data which were analyzed using the DIVA software. Once again, we titrated all antibodies and washed the cells multiple times during the staining protocol to minimize all background fluorescences.

6.7.11 Fas-induced apoptosis and cytokine-mediated Mem protection.

We first cultured 10^6 PBMC with either SF1670, IFNAR or its respective isotype control (rat anti-mouse IgG2a Abs) for 48 hours. We also transfected or not Mem with USP18 siRNA or negative control siRNA for 48 hours. Cells were then treated or not with 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-Fas CH11 Abs in the presence or absence of cytokines (IL-2 or IL-7) for an additional 24 hours. We determined in Mem for all tested groups an all conditions both the numbers (N) and percentages of constitutive apoptosis (without any treatments), Fas-induced apoptosis and the cytokine-mediated Mem protections when the cells were stimulated with IL-2 or IL-7. Number of Fas-induced apoptotic Mem were determined by the formula: N of apoptotic Mem with CH11 – N of apoptotic Mem without CH11. Similarly to cell numbers, % of Fas-induced apoptosis were determined by the formula: % of apoptosis in Mem with CH11 – % of apoptosis in Mem without CH11. As a reminder, cytokine-mediated Mem protections were calculated in fold change (FC) with the formula: Number of Fas-induced apoptotic Mem without cytokine / Number of Fas-induced apoptotic Mem with cytokine.

6.7.12 Production of lentiviral vectors and Mem transduction.

To produce lentiviral vectors, we used the packaging plasmid psPAX2 and envelope plasmid pMD2G as previously done [4]. As transfer vector, we used either USP18 CRISPR/Cas9 KO plasmid or its respective negative control plasmid (Santa Cruz Biotechnology; sc-402259 and sc-418922, respectively). Briefly, the recombinant virion particles were produced by transient polyethylenimine co-transfection of 10^7 293T cells in 175 cm^3 flasks using 50 μg transfer vector (USP18 CRISPR/Cas9 KO plasmid or control CRISPR/Cas9 plasmid), 200 μg of psPAX2, and 200 μg of pMD2G. The transfection medium was replaced after 24 hr with fresh serum free DMEM medium (Sigma Aldrich). Viral supernatants were collected at 6 days post-transfection, filtered through a 0.45-mm filter and concentrated 150-fold by centrifuging through filtration columns (Centricon Plus-20, molecular weight cutoff 100 kDa; Millipore) at 3000g at 4°C. The concentrated recombinant virus were stored in -80°C for further usage. Viral titers (ng/mL) were assessed by using HIV-1 p24 ELISA. Of note, we used 100 ng of lentiviral vectors (LV) per 1.10^6 purified Mem for 4 hours, washed the cells twice and cultured them until 48 hours with their autologous CD4-depleted PBMC (ratio Mem/PBMC = $\frac{1}{4}$) to achieve significant USP18 inhibition.

6.7.13 Long-lasting Mem maintenance assays.

2.10⁴ purified Mem were first activated with 0.5 µg/mL anti-CD3 and 1 µg/mL anti-CD28 Abs in the presence or absence of ST1670, anti-IFNAR or its respective isotype control for 2 hours. Mem were then washed twice, counted and cultured with 8.10⁴ autologous CD4-depleted PBMC. Cultured cells were re-stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs with or without the specific inhibitors at days 7, 14 and 21. To interfere with USP18 expression during the long-term culture, we also purified Mem from all groups, transduced them with LV_{USP18 KO} or LV_{Ctrl} for 4 hours. At 4 hours post-transduction, we counted the cells and cultured 2.10⁴ of them with 8.10⁴ autologous CD4-depleted PBMC. Cultured cells were re-stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 Abs at days 7, 14 and 21. Total numbers of viable Mem were counted, and the half-lives of these cells were estimated for each study groups at days 7, 14, 21 and 28 of culture. We also determined in gated Mem the levels of apoptosis using Annexin-V staining and the expressions of USP18 and AKT pS473 by flow cytometry. We also assessed by ELISA the levels of both IFN-α and virus productions in supernatants during the time course of culture. Finally, we also determined at day 7 of culture the levels of cell proliferation, differentiation and apoptosis in Mem for all donors as previously done [4].

6.7.14 HIV-1-specific stimulation.

PBMC were specifically stimulated for 18 hours with 5 µg/mL HIV-1 p55 Gag antigens (Austral Biologicals) and 1 µg/mL anti-CD28 Abs in the presence of GolgiPlug and GolgiStop (BD Biosciences). HIV-1-specific stimulations were performed with or without SF1670. We also pre-transduced for 48 hours purified CD4 T-cells from HIV-1-infected subjects before the HIV-1 Gag stimulation. Of note, we added 10 µM AZT (Sigma Aldrich) in cultures from ART⁺ subjects to prevent *de novo* infections (confirmed by HIV-1 p24 ELISA in culture supernatants). Finally, we assessed by flow cytometry the levels of apoptosis using Annexin-V staining and AKT pS473 in responsive IFN-γ⁺ HIV-1-specific CD4 T-cells. Of note, we included HIV^{free} donors as negative controls for HIV-1-specific stimulations. Uninfected controls were used for setting gating regions and discerning positive from negative cells. BD LSRII Fortessa flow cytometer (BD) was used to collect the data which were analyzed using the DIVA software.

6.7.15 Spleen processing and cell isolation.

Spleen tissue was processed within 30 min of surgery (patient info: 47 year old, VL = 3.21 Log copies/ml, CD4 count = 611 cells/µl and CD8 = 1513 cells/µl, 10 years of infection). Blocks were

cut into small pieces and forced through a 70µm sterile filter using the plunger of a syringe. Filtrate was kept at 4°C for 2 hours until further processing. Unfiltered tissue was dissociated enzymatically by digestion with Liberase DL (Roche, Laval, QC, Canada) at 0.1 mg/ml for 1h at 37°C. The digestion material was diluted 3 fold with PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS). Mononuclear cells were then isolated from splenocyte filtrate or tissue suspension by centrifugation over ficoll (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC Canada). Splenocytes were then counted using 0.2% trypan blue to evaluate viability (around 85%), and finally frozen in FBS containing 10% DMSO for further use.

6.7.16 Statistical analysis.

We used the non-parametric Mann-Whitney *U* test that assumes independent samples for all statistical analyses between study groups of subjects (* symbol). On the other hand, statistical analyses between two different *in vitro* conditions were performed using two-sided Student paired *t* test. Spearman's correlation test was used to identify association among study clinical and immunological variables (β symbol). *P* values of less than 0.05 were considered significant. Of note, several symbols were used depending the statistical analyses. One symbol, $0.05 > P > 0.01$; two symbols, $0.01 > P > 0.001$; three symbols, $0.001 > P > 0.0001$; and four symbols, $P < 0.0001$.

6.8 Acknowledgments

We are grateful to the patients participating in the Canadian Cohort of HIV-1-infected subjects, their physicians and attending staff members. We would also like to thank Drs. S. Stäger, professor at the IAF-INRS as well as R. Telittchenko for critically reviewing the manuscript.

Members of Montreal Primary Infection Study Group

a. Director. Dr. J-P. Routy

b. Administrative staff members. M. Legault, D. Albert, A. Massicotte, N. Cotta-Grand

c. Regular members. N. Chomont, A. Finzy, P. Ancuta, N. Bernard, J. van Grevenynghe.

6.9 Supporting Information

S1 Table. Clinical and immunological data of all selected HIV-1-infected subjects including viral loads and absolute numbers of CD4 counts for 10 PHI, 10 CHI and 10 ART⁺ subjects.

Study HIV-1-infected population [n = 30]

<i>Characteristics</i>	Primary HIV-1-infected (PHI) patients [n = 10]	Chronically HIV-1-infected (CHI) patients [n = 10]	Successfully treated * (ART+) patients [n = 10]
Time of infection, d			
<i>Mean ± SD</i>	63.2 ± 26.8	> 3 y	> 3 y
<i>Range</i>	32-119	-	-
Age, y			
<i>Mean ± SD</i>	42.3 ± 7.6	36.9 ± 8.3	35.7 ± 6.9
<i>Range</i>	30-53	21-49	23-45
Male sex, no. (%)	9 (90)	10 (100)	8 (80)
CD4 count, cells/μL			
<i>Mean ± SD</i>	460 ± 175	434 ± 143	617 ± 235
<i>Range</i>	200-760	260-780	410-990
CD8 count, cells/μL			
<i>Mean ± SD</i>	2007 ± 2252	771 ± 252	692 ± 419
<i>Range</i>	464-7910	410-1170	360-1600
CD4/CD8 ratio			
<i>Mean ± SD</i>	0.41 ± 0.28	0.61 ± 0.22	1.17 ± 0.72
<i>Range</i>	0.07-1	0.32-0.85	0.28-2.61
VL, Log₁₀copies/mL			
<i>Mean ± SD</i>	5.48 ± 0.79	4.55 ± 0.67	< 1.6 **
<i>Range</i>	4.58-6.65	3.38-5.67	-

* ART+ patients were treated for at least 2.5 years and within 3 months of the infection (early administration)

** ART+ patients had an undetectable viral load, 40 copies/mL is the minimum detection threshold

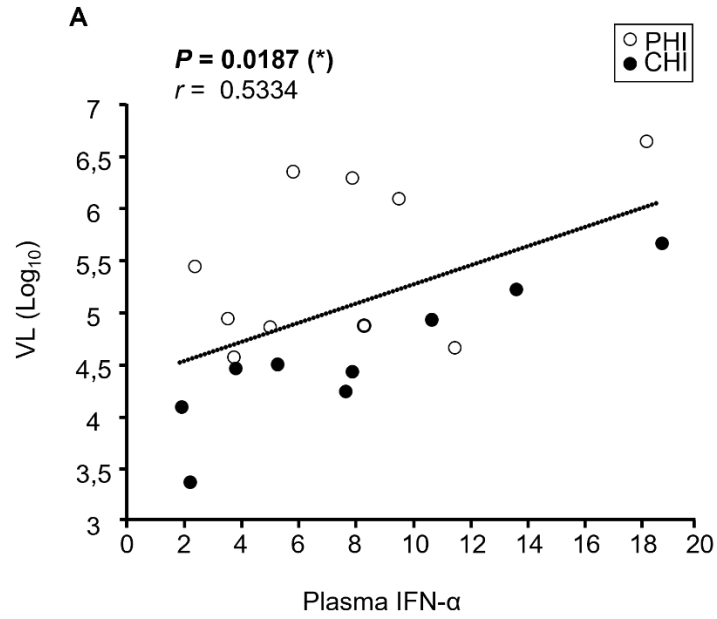
S2 Table. Primers used for the real time RT-PCR.

Gene Name	Forward	Reverse
<i>mxr</i>	5'-AGA AGG AGC TGG AAG AAG-3'	5'-CTG GAG CAT GAA GAA CTG-3'
<i>oas.1</i>	5'-CCA TCC TCA AGT CGA CAA GAA-3'	5'-TTG GGC TTT GGG CAC CTT-3'
<i>samhd1</i>	5'-AGA TCA CGC CAC TGC ACT CCA-3'	5'-GTT CTC GGG CTG TCA TCG CAA C-3'
<i>irf1</i>	5'-CTT TCG CTG TGC CAT GAA CTC-3'	5'-AGC TGC CCT TGT TCC TGC T-3'
<i>irf7</i>	5'-CCC CAT CTT CGA CTT CAG AG-3'	5'-AAG GAA GCA CTC GAT GTC GT-3'
<i>isg56</i>	5'-TCA GGT CAA GGA TAG TCT GGA G-3'	5'-AGG TTG TGT ATT CCC ACA CTG TA-3'
<i>isg15</i>	5'-TCC TGG TGA GGA ATA ACA AGG G-3'	5'-GTC AGC CAG AAC AGG TCG TC-3'
<i>usp18</i>	5'-CCT GAG GCA AAT CTG TCA GTC-3'	5'-CGA ACA CCT GAA TCA AGC AGT TA-3'
<i>gapdh</i>	5'-GAC CTG ACC TGC CGT CTA-3'	5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT-3'
<i>stat1</i>	5'-ATG GCA GTC TGG CGG CTG AAT T-3'	5'-CCA AAC CAG GCT GGC ACA ATT G-3'
<i>stat5a</i>	5'-TTA CTG AAG ATC AAG CTG GGG-3'	5'-TCA TTG TAC AGA ATG TGC CGG-3'
<i>akt</i>	5'-TCT ATG GCG CTG AGA TTG TG-3'	5'-CTT AAT GTG CCC GTC CTT GT-3'

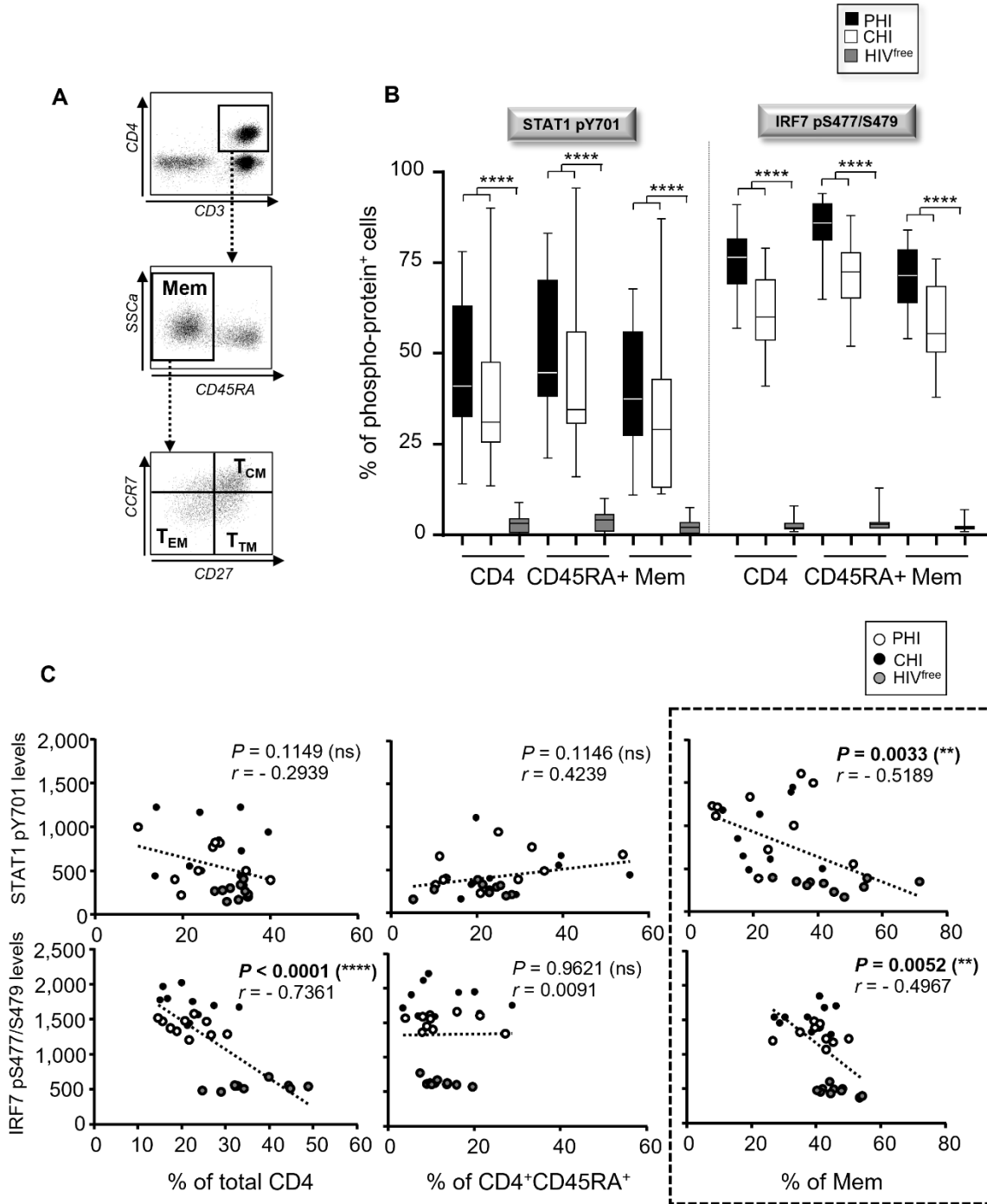
S3 Table. List of all antibodies used (including information about the vendor, clone IDs and fluorophore).

	Immunogen	clone ID	fluorophore	vendor
Surface	CD3	UCHT-1	Alexa Fluor 700	BD Biosciences
	CD3	UCHT-1	BB515	BD Biosciences
	CD4	RPA-T4	APC H7	BD Biosciences
	CD27	M-T271	BV421	BD Biosciences
	CCR7	3D12	PE-Cy7	BD Biosciences
	PD-1	EH12.1	PE-Cy7	BD Biosciences
	CD45RA	2H4	ECD	Beckman Coulter
	IFNAR1	85228	APC	R & D systems
	IFNAR2	REA124	PE	Miltenyi Biotec
	Phosflow	STAT1 pY701	4a	PE
STAT5 pY694		47/Stat5 (pY694)	PE	BD Biosciences
AKT pS473		M89-61	PE	BD Biosciences
IRF7 pS477/S479		REA310	PE	Miltenyi Biotec
STAT1 s727		Stat1S727-C6	FITC	Thermo Fisher
Intracellular		PTEN	A2B1	Alexa Fluor 647
	IFN- γ	4S.B3	Alexa Fluor 647	BD Biosciences
	IL-2	MQ1-17H12	FITC	BD Biosciences
	TNF- α	MAb11	BV 421	Biolegend
	USP18	E-5	Unconjugated*	Santa Cruz

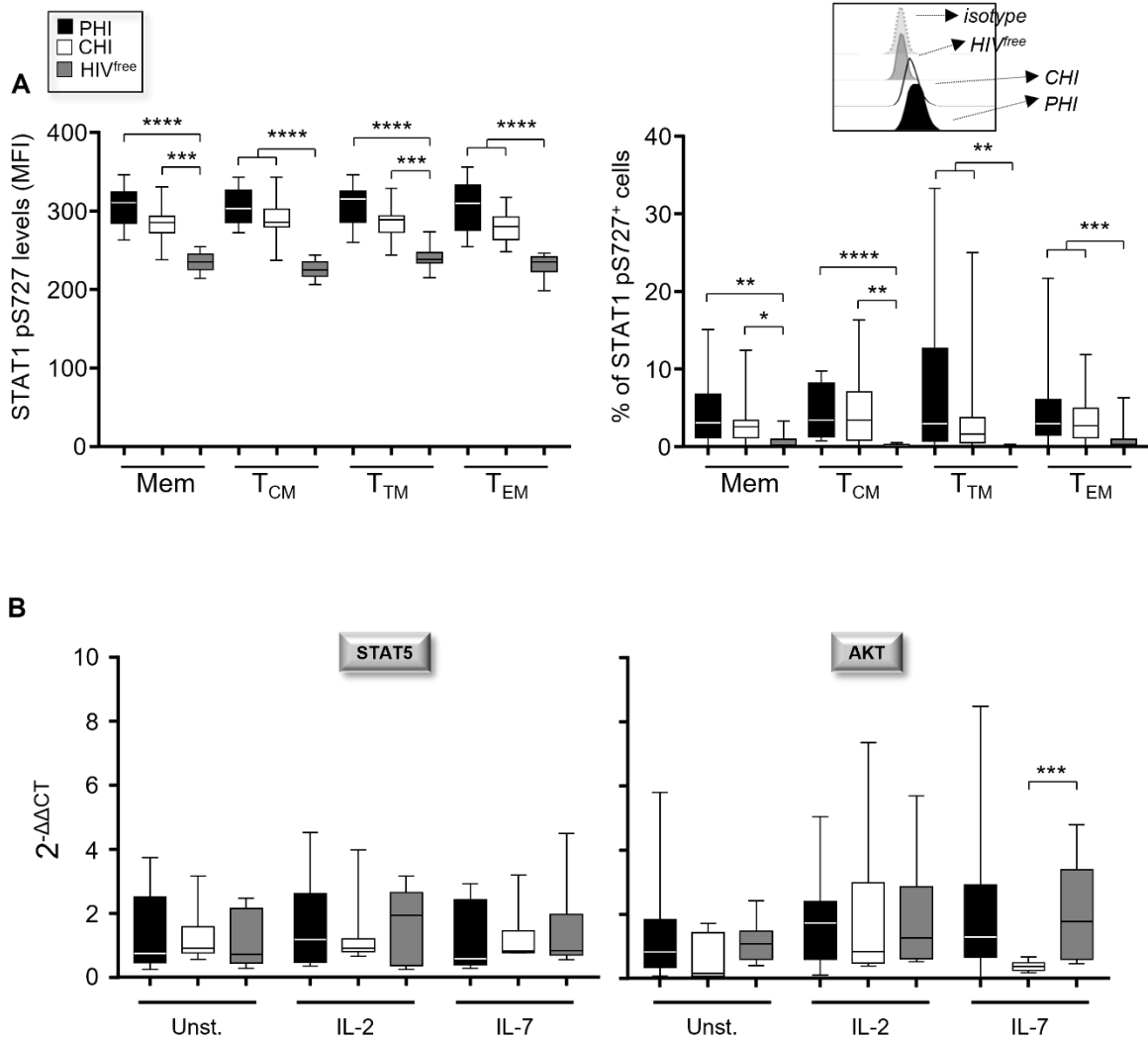
*Abs were conjugated to Alexa700 dye using the Zenon mouse IgG1 labeling kit (Life Technologies Inc.) according to the manufacturer' protocol



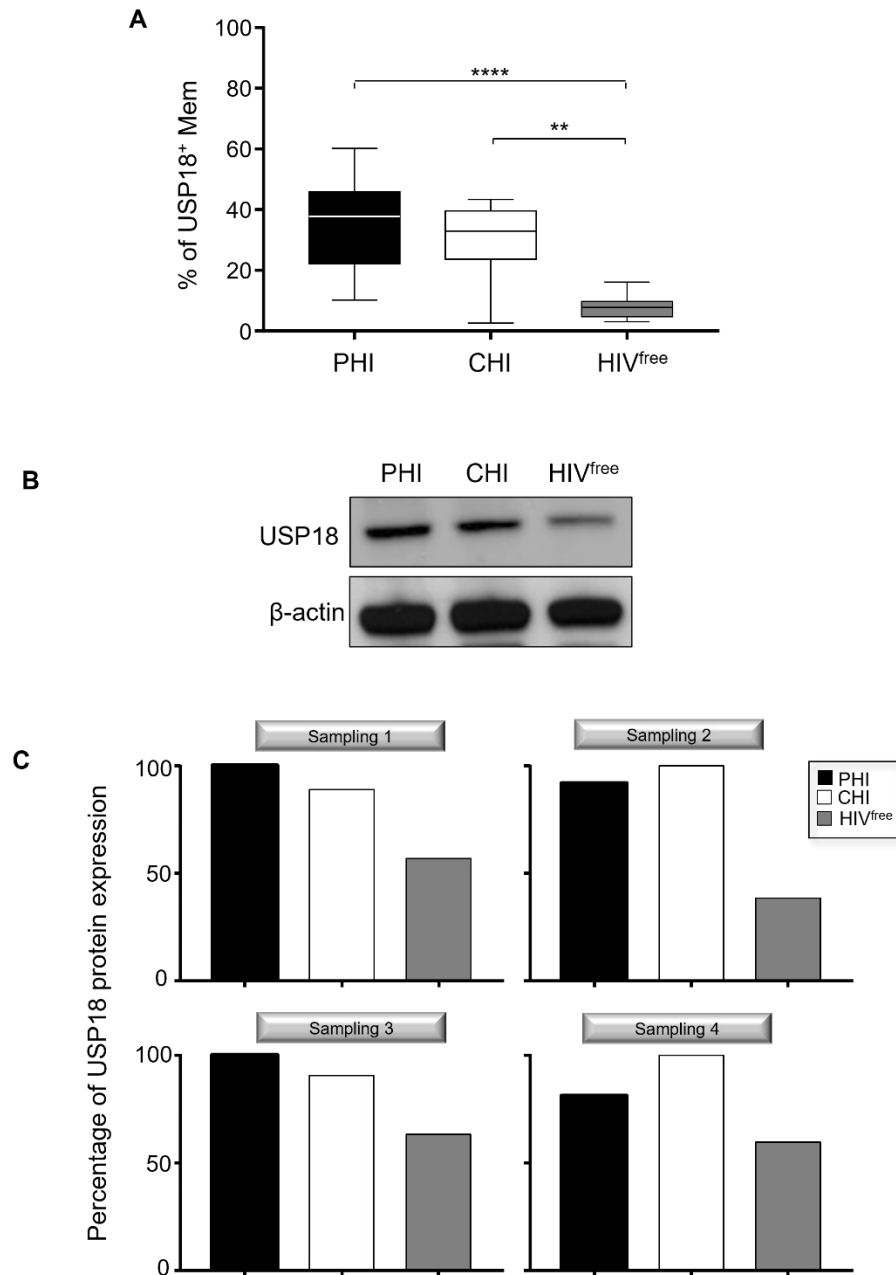
S1 Fig. Increased plasma IFN-α in HIV-1-infected subjects correlates with viral load. (A) Correlation between viral load (VL; Log₁₀) and plasma IFN-α (pg/mL) levels in HIV-1-infected subjects. (n = 19)



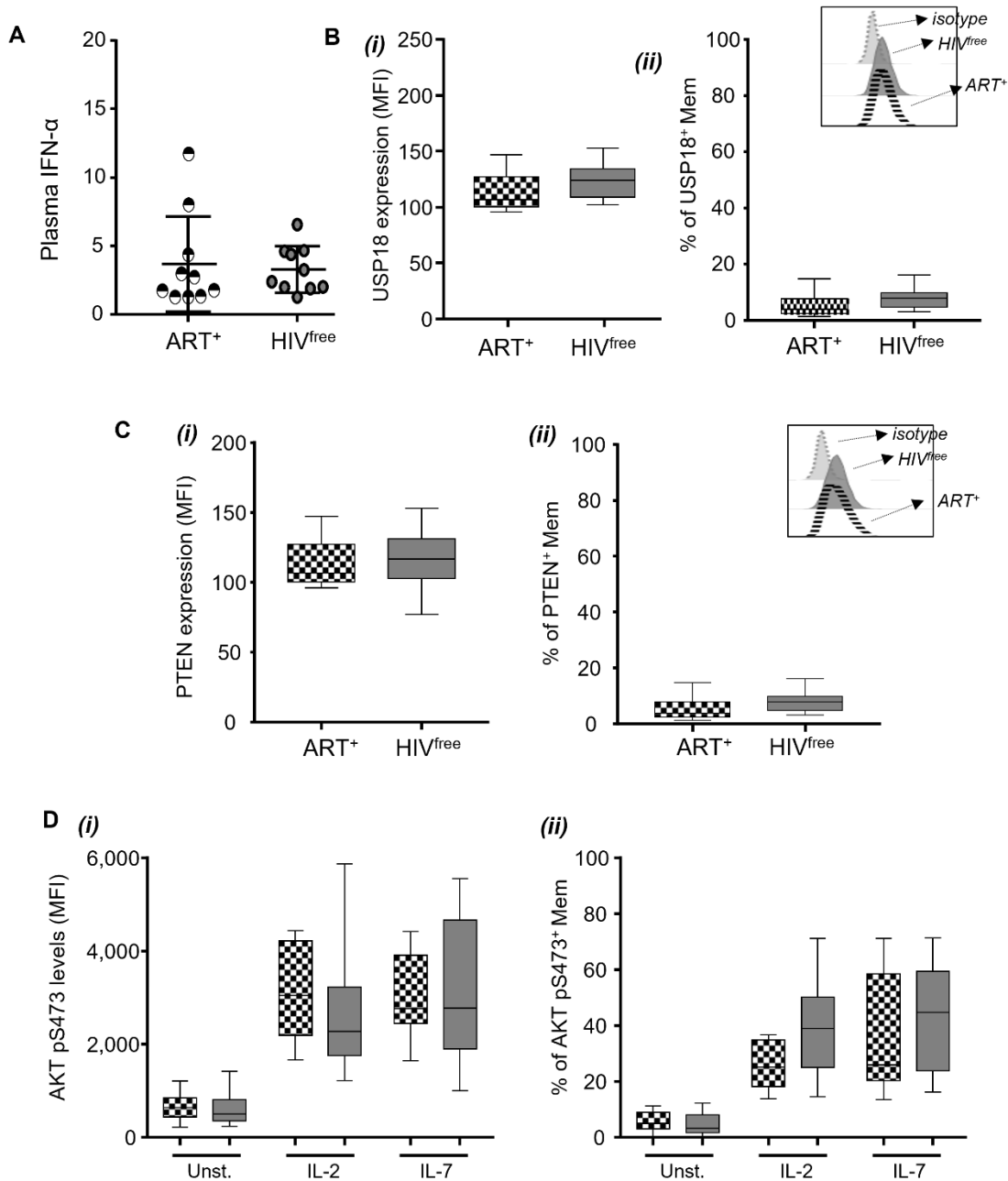
S2 Fig. Increased levels of IFN-I signaling in CD45RA⁺ CD4 T-cells during HIV-1 infection are not associated with cell loss. (A) Gating strategy to define total Mem, T_{CM}, T_{TM} and T_{EM} subsets. (B) % of STAT1 pY701⁺ (left) or IRF7 pS477/S479⁺ (right) cells on total, CD45RA⁺ and Mem CD4 T-cells in PHI, CHI and HIV^{free} subjects determined by PhosFlow (n = 10). (C) Correlations between phospho-protein levels (MFI) and cell percentages in total, CD45RA⁺ and Mem CD4 T-cells (n = 30). The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



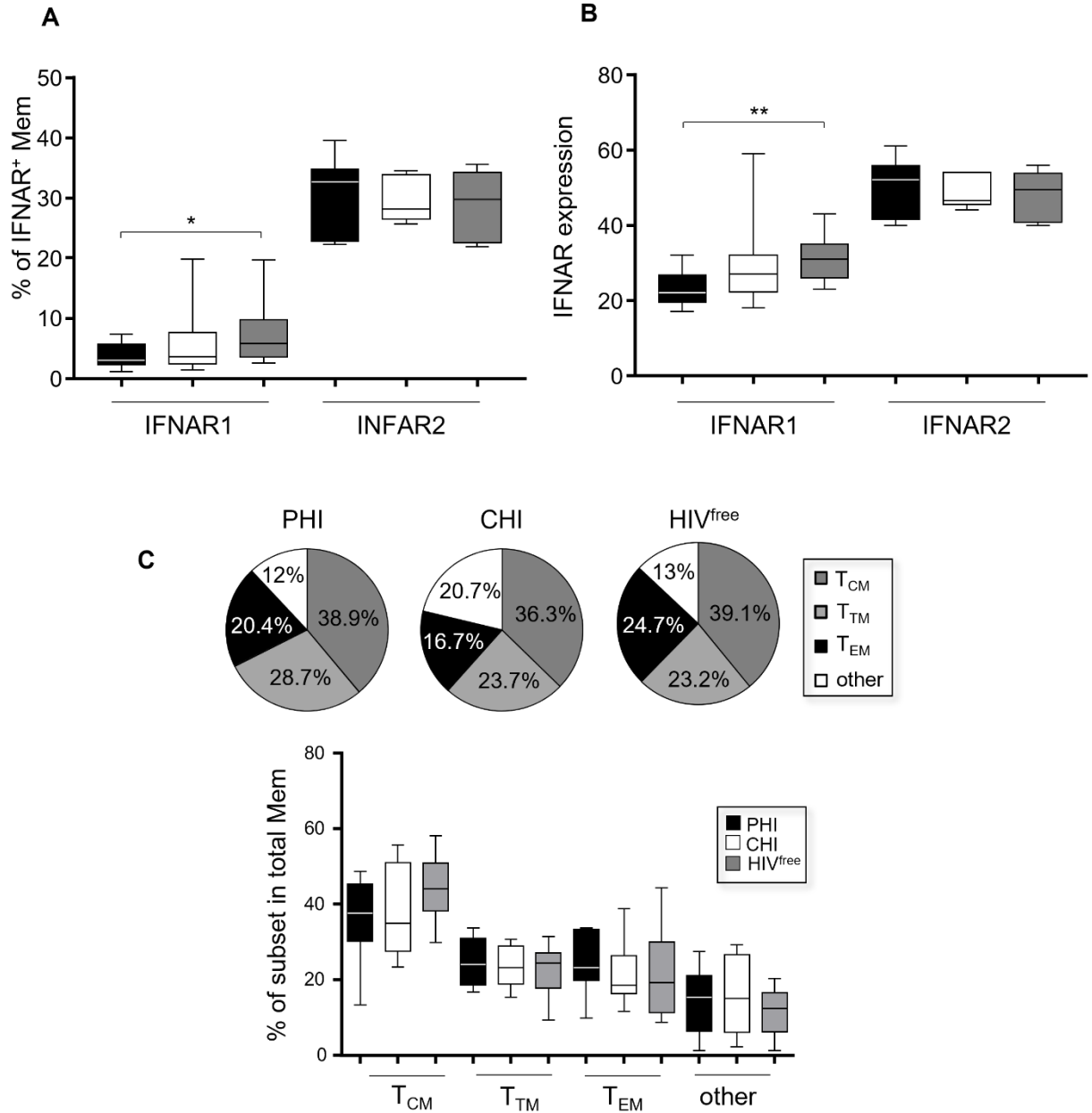
S3 Fig. Mem from all study groups of subjects displayed similar expression levels for total STAT1 and IRF-7 expression. (A) Expression of STAT1 pS727 including representative histograms in Mem from PHI, CHI and HIV^{free} subjects. (B) mRNA expression of STAT5 and AKT in unstimulated and cytokine-stimulated Mem. N = 10. The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



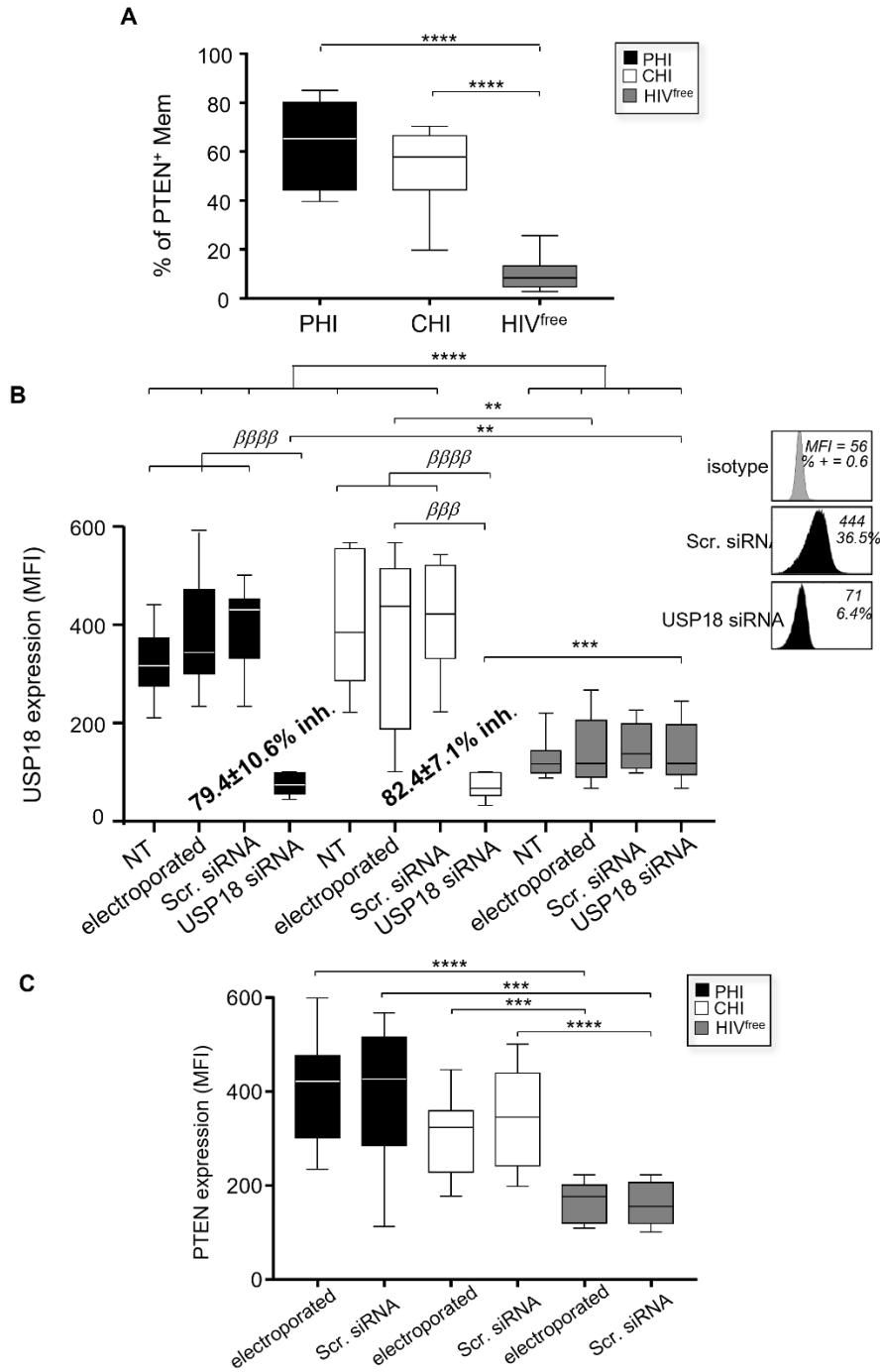
S4 Fig. Western blot analyses confirmed increased constitutive expression of USP18 in Mem from PHI and CHI subjects when compared to HIV^{free} controls. (A) % of *ex vivo* USP18⁺ Mem in PHI, CHI and HIV^{free} (n = 10). (B, C) USP18 expression determined in *ex vivo* Mem by western blot (n = 4). (B) Representative blots for USP18 and β -actin (sampling n2). (C) Densitometric quantification of USP18 expression with four samplings (PHI, CHI and HIV^{free} control). Results shown represent the USP18 relative expression after β -actin normalization in each sampling. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



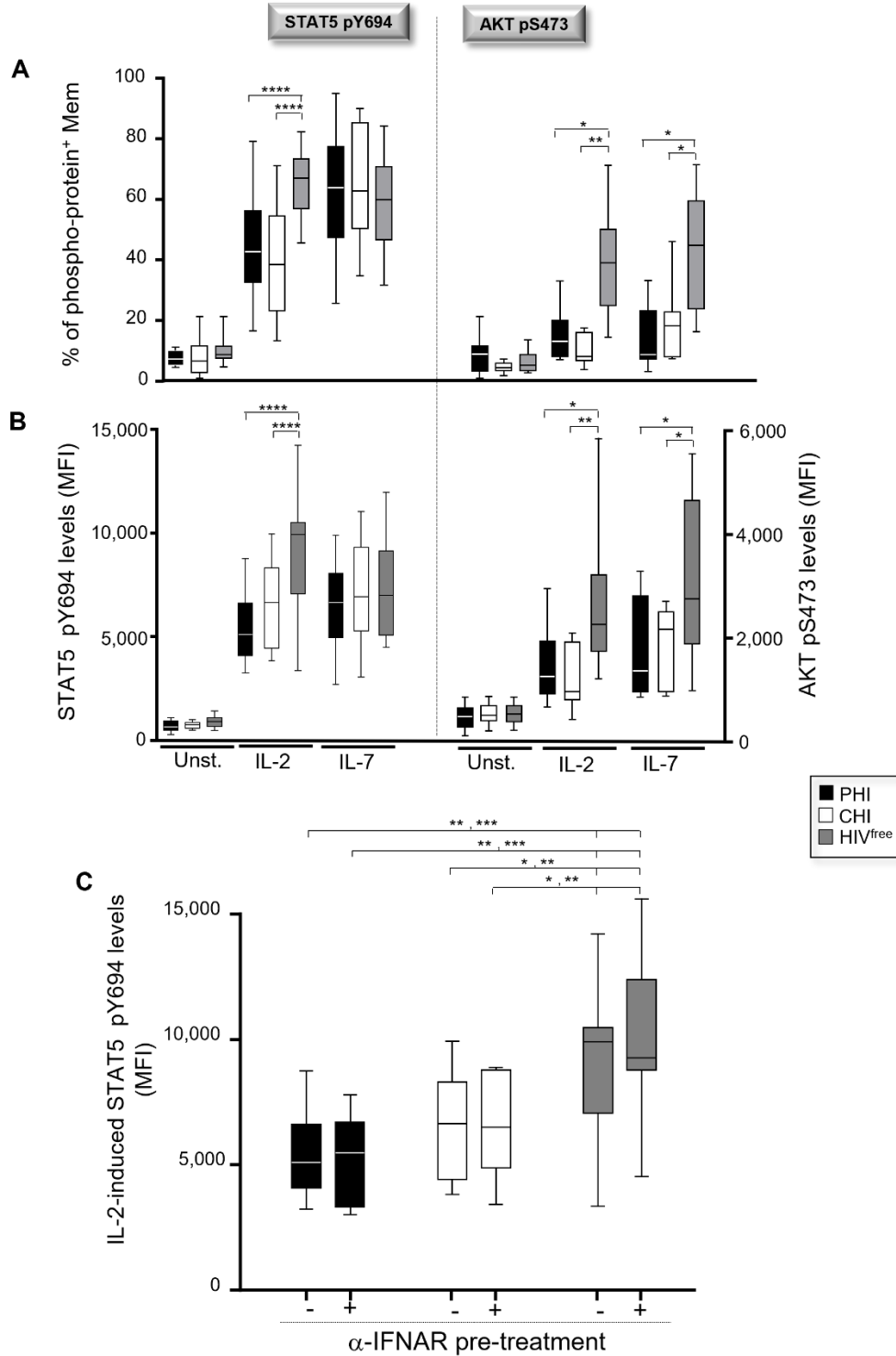
S5 Fig. ART when administered early and after years of treatment normalizes IFN- α production and IFN-I signaling intrinsic to Mem. (A) Plasma concentration of IFN- α in ART⁺ and HIV^{free} subjects determined by ELISA (pg/mL). (B) Expression levels of USP18 on *ex vivo* Mem from ART⁺ and HIV^{free} subjects in MFI (i) or percentages of USP18⁺ Mem (ii). (C) Expression levels of PTEN on *ex vivo* Mem from ART⁺ and HIV^{free} subjects in MFI (i) or percentages of USP18⁺ Mem (ii). (D) *In vitro* AKT pS473 expression levels in Mem in the presence or absence of cytokine stimulations in MFI (i) or percentages of USP18⁺ Mem (ii). (A-D) (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



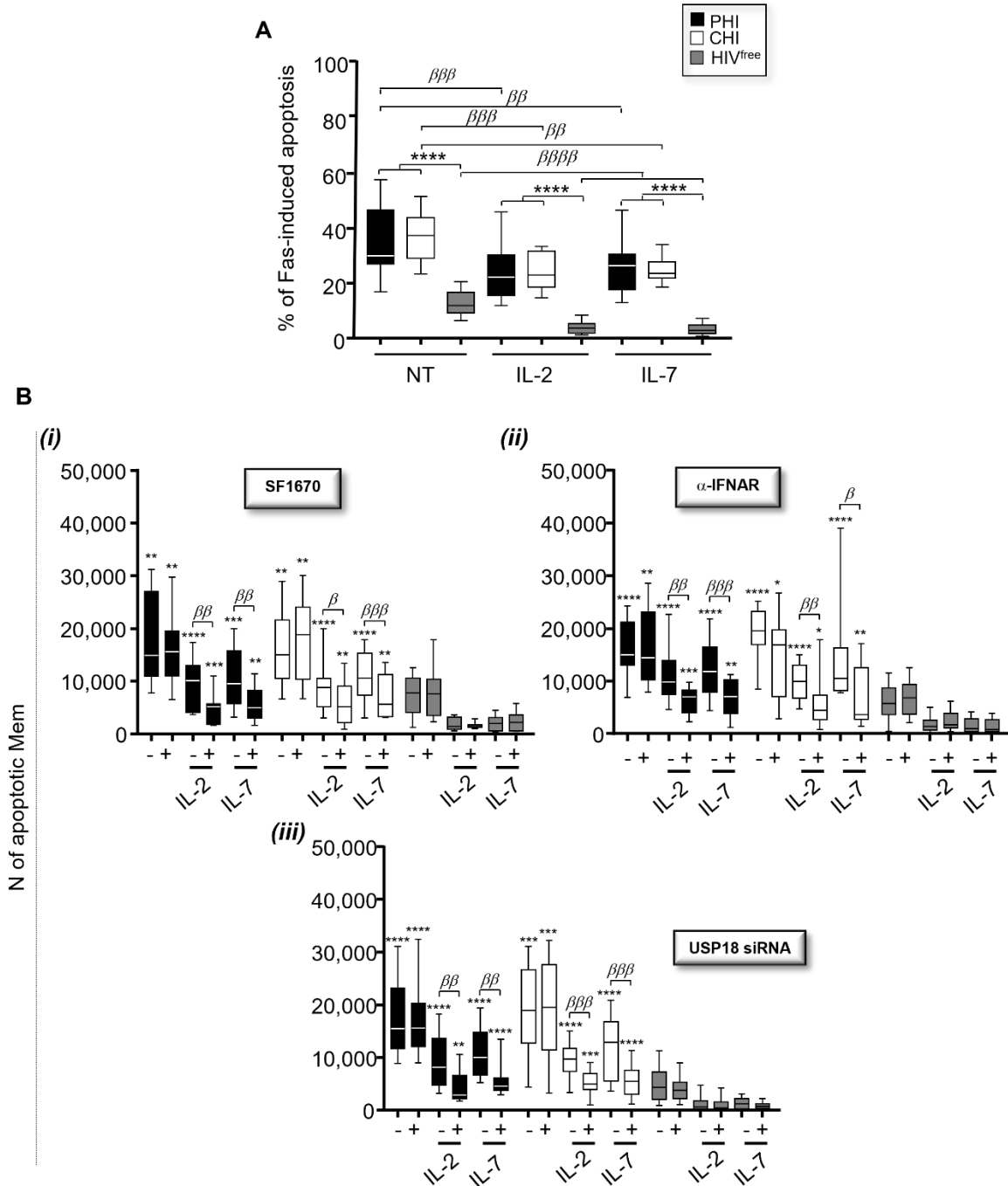
S6 Fig. Ex vivo Mem from PHI, CHI and HIV^{free} subjects display similar IFNAR expression and subset distribution. (A,B) Ex vivo IFNAR1 and IFNAR2 surface expression in Mem determined as percentages of positive cells (A) and mean fluorescence intensities or MFI (B). (C) Ex vivo distribution of Mem subsets. Representative pie charts for each study group of subjects are shown above. (A-C) (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



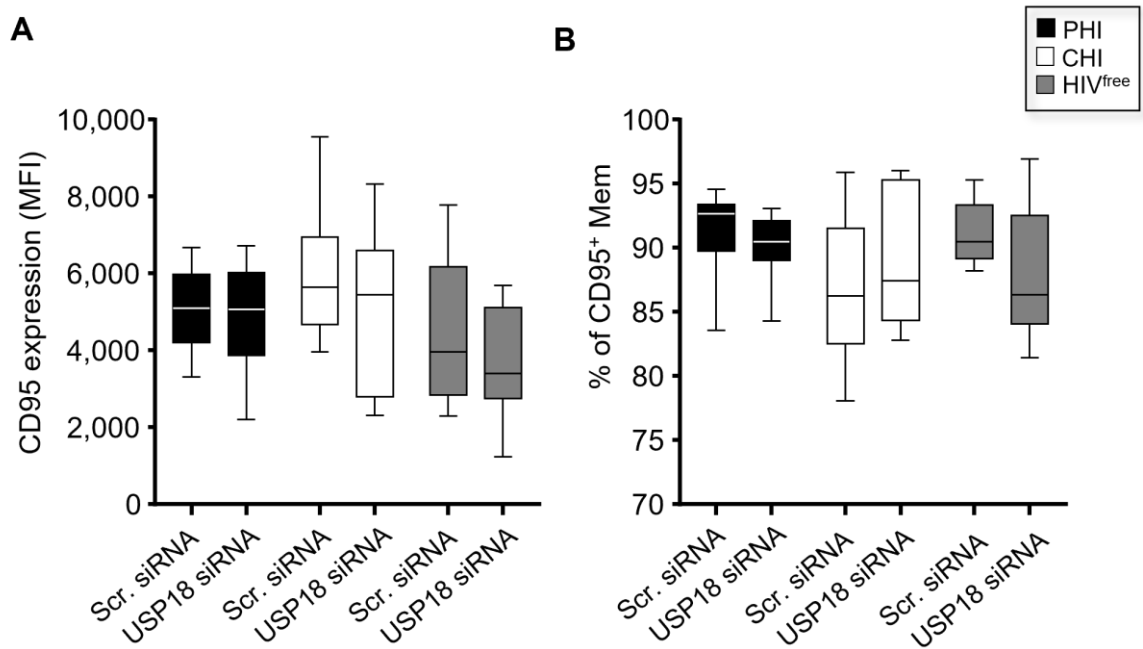
S7 Fig. Specific USP18 gene silencing led to significant inhibition of its protein expression in Mem from HIV-1-infected subjects. (A) % of *ex vivo* PTEN⁺ Mem in PHI, CHI and HIV^{free}. **(B)** USP18 Expression levels in Mem following 48 hours of specific USP18 siRNA transfection in PHI, CHI and HIV^{free} subjects (MFI). Representative histograms including isotype control and transfected Mem for one PHI are also shown on the right side (MFI and % of positive cells). **(C)** PTEN expression in Mem that have been electroporated alone or transfected with scrambled siRNA. **(A-C)** (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. β, symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



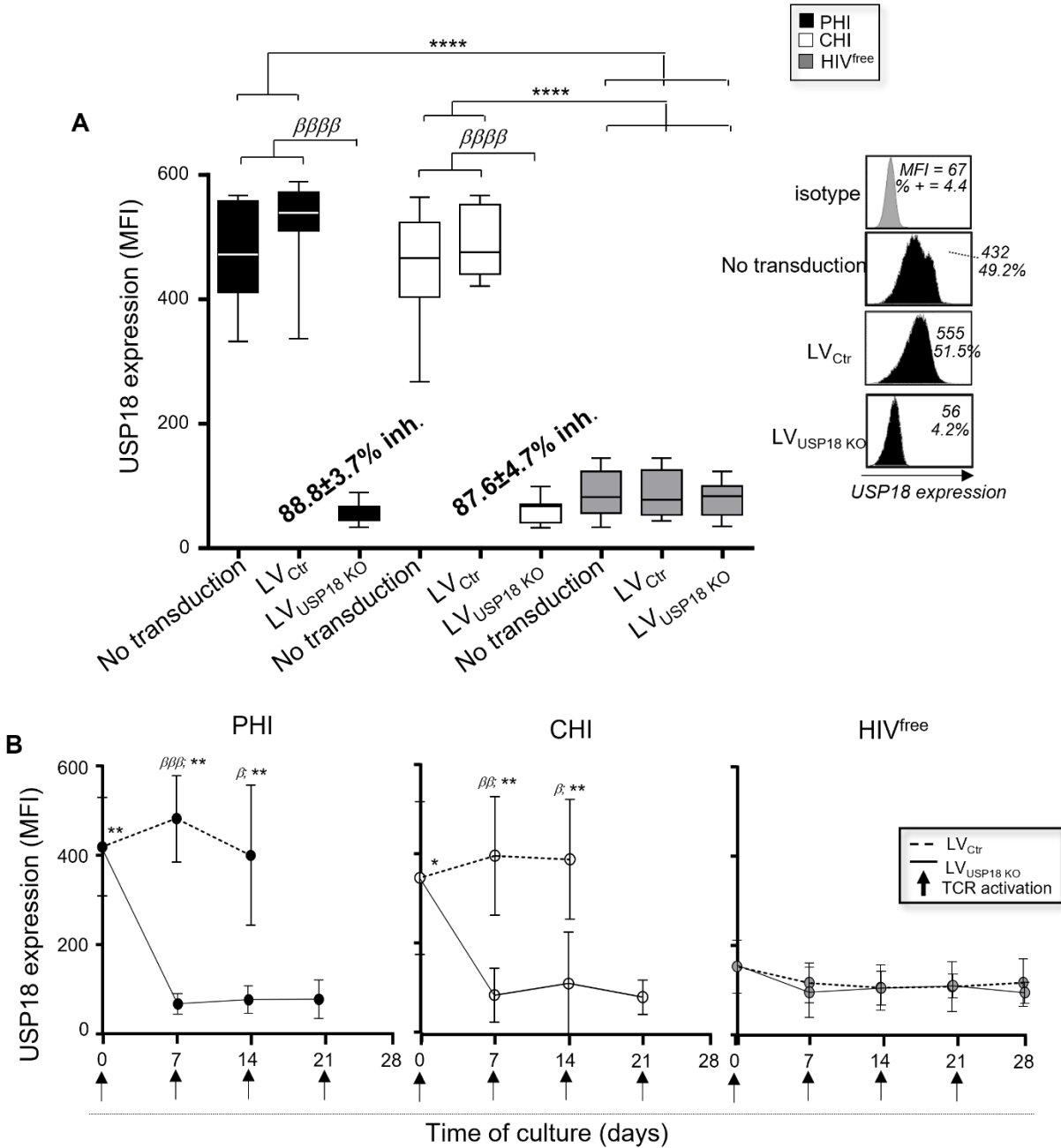
S8 Fig. Interfering with IFN-I signaling in Mem does not improve IL-2-mediated STAT5 activation. (A,B) Expression levels of STAT5 pY694 and AKT pS473 on Mem following 15 minutes of IL-2 or IL-7 stimulation determined as **(A)** percentages of positive cells and **(B)** mean fluorescence intensities or MFI. **(C)** PBMC were first incubated overnight with α -IFNAR or respective isotype control, and then stimulated with IL-2 for another 15 minutes before assessing STAT5 activation levels by PhosFlow (MFI). **(A-C)** (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



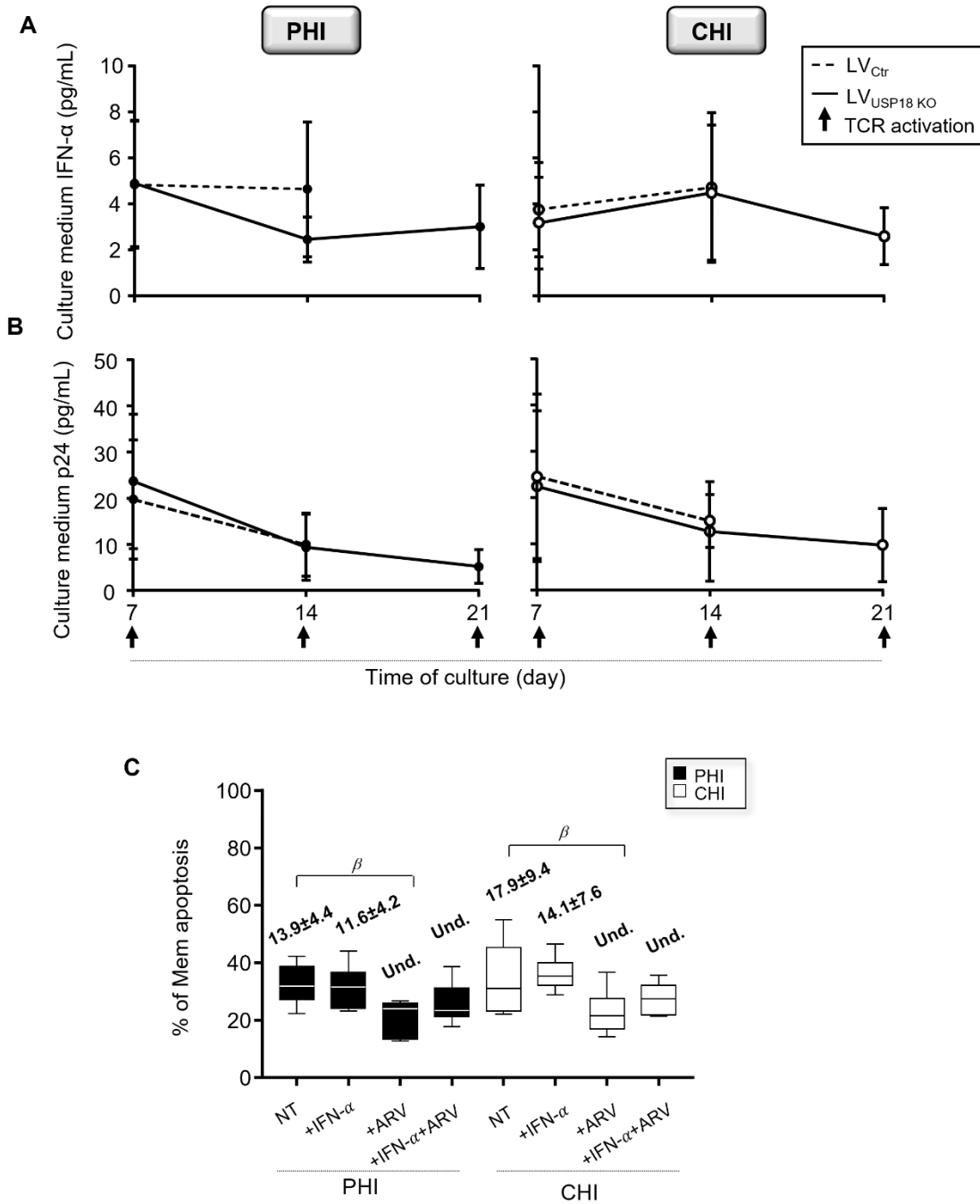
S9 Fig. Interfering with USP18 in Mem from PHI and CHI improves cell resistance to apoptosis as determined by the percentages of apoptosis. (A) Percentage of Fas-induced apoptosis in Mem in the presence or absence of IL-2 or IL-7 stimulation. Fas-induced apoptosis was calculated according the formula: % of apoptosis in Mem with CH11 – % of apoptosis in Mem without CH11 (n = 10). **(B)** Number of Fas-induced apoptotic Mem in the presence or absence of IL-2 or IL-7 stimulation in Mem that have been pre-treated for 48h with SF1670 (i), α -IFNAR or its respective isotype control (ii), or pre-transfected or not for 48 hours with USP18 siRNA (iii). Number of Fas-induced apoptotic Mem was calculated according the formula: N of apoptotic Mem with CH11 – Number of apoptotic Mem without CH11 (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



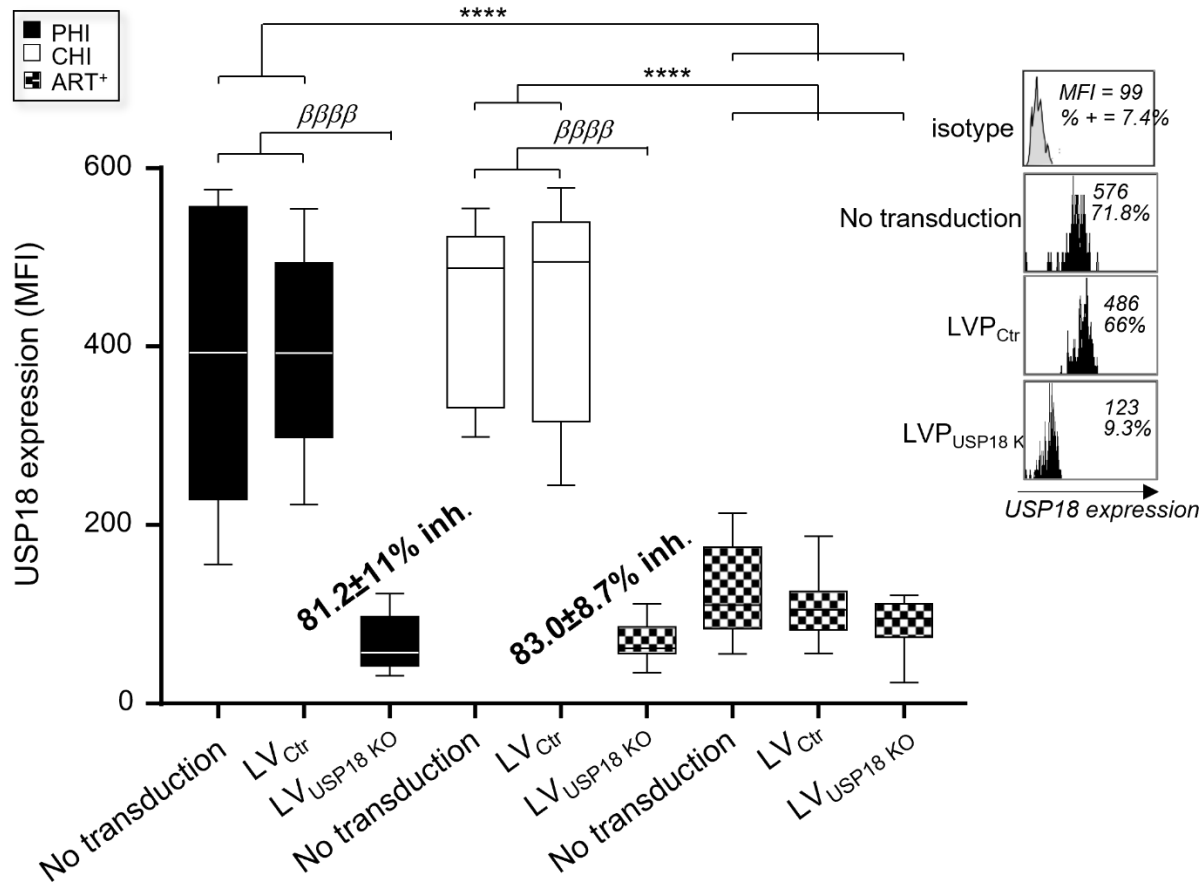
S10 Fig. USP18 siRNA transfection in Mem does not impact their CD95 expression levels. (A,B) Expression levels of CD95 in Mem that have been pre-transfected 48 hours with specific USP18 siRNA or scramble control. Results are expressed as (A) mean fluorescence intensities and (B) percentages of positive cells. (A,B) (n =10). The error bars indicate standard deviations from the means.



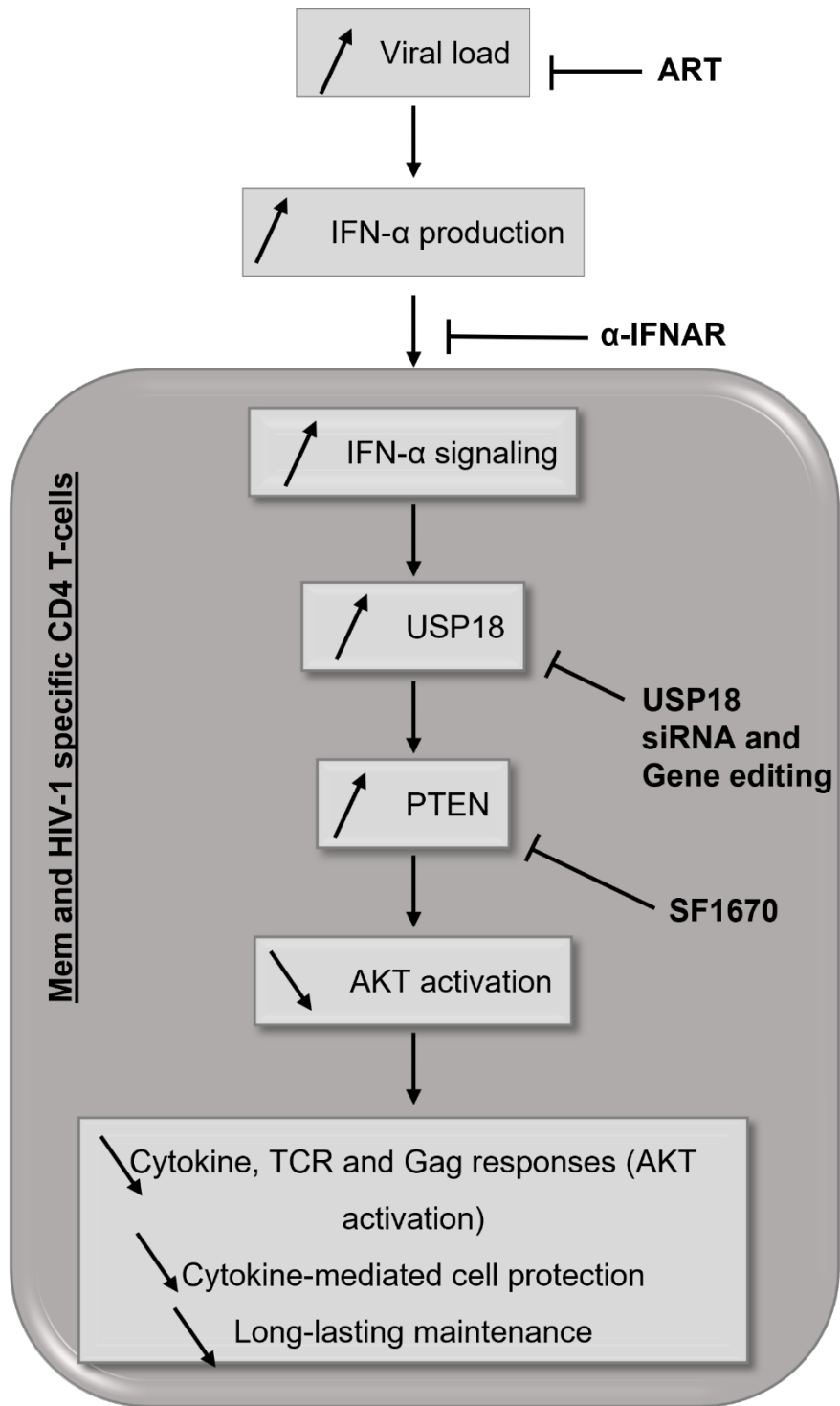
S11 Fig. CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing in Mem results in significant and sustained inhibition of USP18 expression. (A) USP18 expression in Mem that have been transduced or not for 48 hours with lentiviral CRISPR/Cas9 vectors mediating USP18 gene editing (lentiviral vectors for USP18 knock-out or LV_{USP18 KO}) or control lentiviral vectors (LV_{Ctrl}) in PHI, CHI and HIV^{free} subjects (MFI; n = 10). Representative histograms including isotype control are also shown on the right side for one PHI subjects. (B) USP18 expression in Mem from PHI, CHI and HIV^{free} subjects following Mem TcR activation every 7 days for 28 days in the presence or absence of CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing (n = 6). The error bars indicate standard deviations from the means. β, symbol used for paired t test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



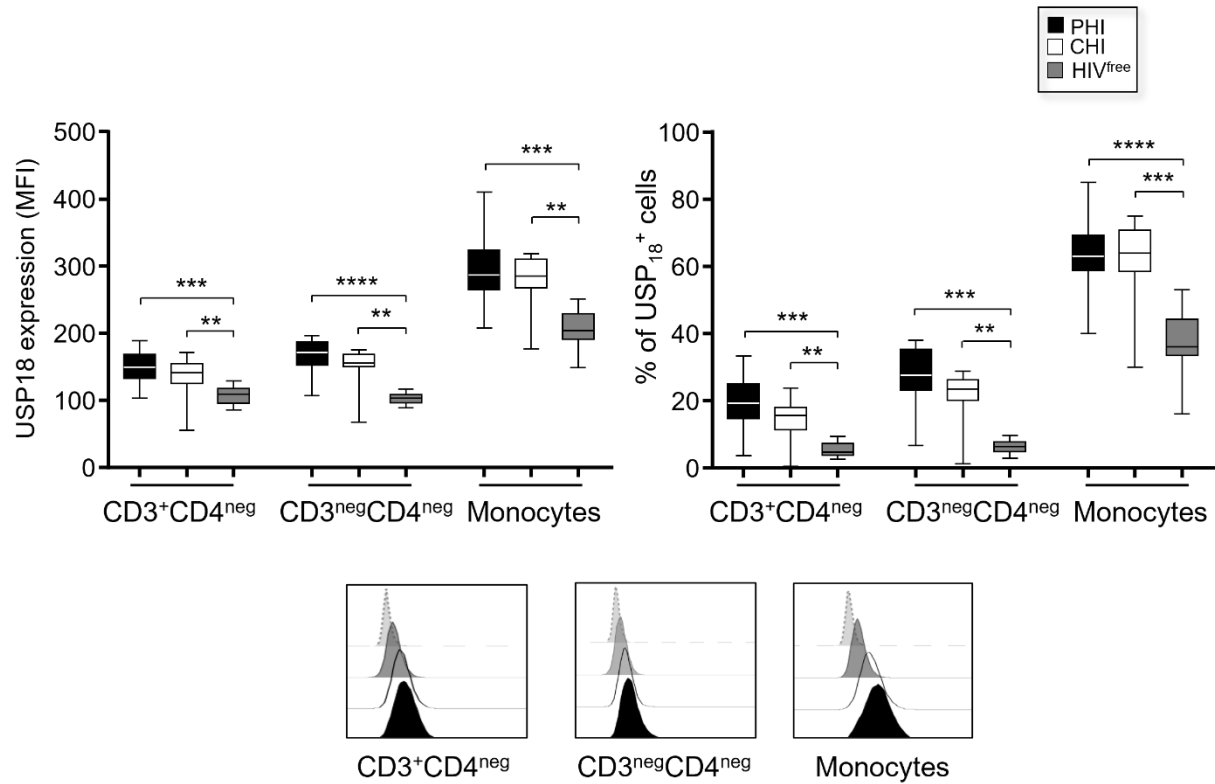
S12 Fig. Specifically interfering with USP18 expression in Mem does not impact IFN- α secretion or virus production during long-lasting *in vitro* assay. (A) IFN- α and (B) p24 levels in culture medium from PHI and CHI subjects at day 7, 14 and 21 days of culture when Mem have been transduced or not at day 0 with LV_{USP18 KO}. Results are expressed in pg/mL (n = 6). (C) Apoptosis levels in Mem from PHI and CHI at day 7 of culture when treated or not with two antiretrovirals (ARV) (n = 6). In this context, we used 10 μ M AZT and one fusion inhibitor to prevent any *de novo* infection (100 nM T20). We also added or not at day 0 of cultures 150 IU/ml IFN- α to sustain IFN-I signaling in the absence of virus. The levels of HIV-1 p24 in pg/ml assessed at day 7 in supernatants are also indicated in bold for all conditions (Und., undetectable levels). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison with no treatment or NT).



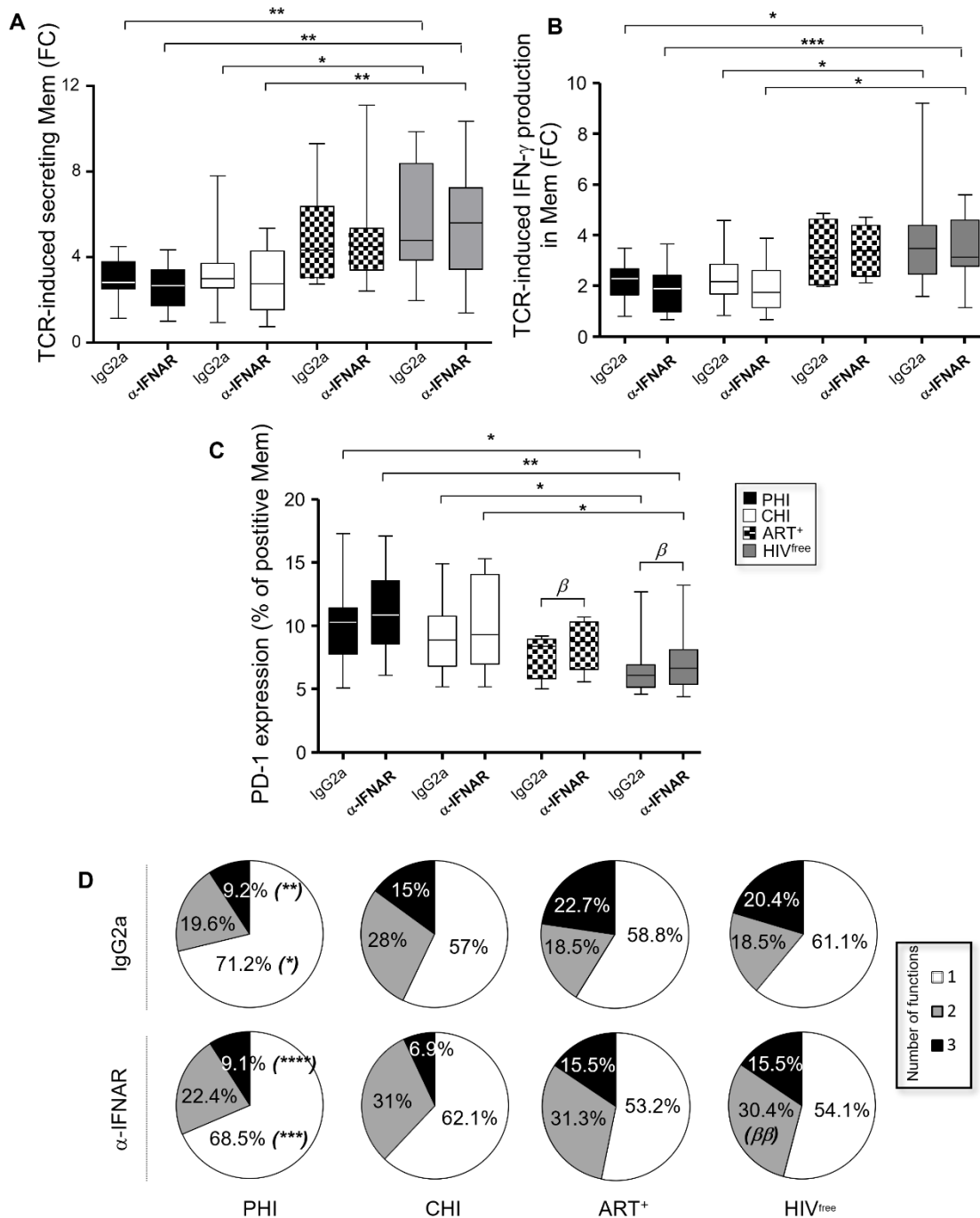
S13 Fig. Significant inhibition of USP18 expression levels in HIV-1-specific CD4 T-cells with CRISPR/Cas9 mediated USP18 gene editing. USP18 expression levels (MFI) in IFN γ ⁺ HIV-1-specific CD4 T-cells following 18 hours of Gag stimulation when cells have been pre-transduced or not with LV_{USP18 KO}. Representative histograms including isotype control are also shown on the right side for one PHI. (n = 10). The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between treated Mem and control). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



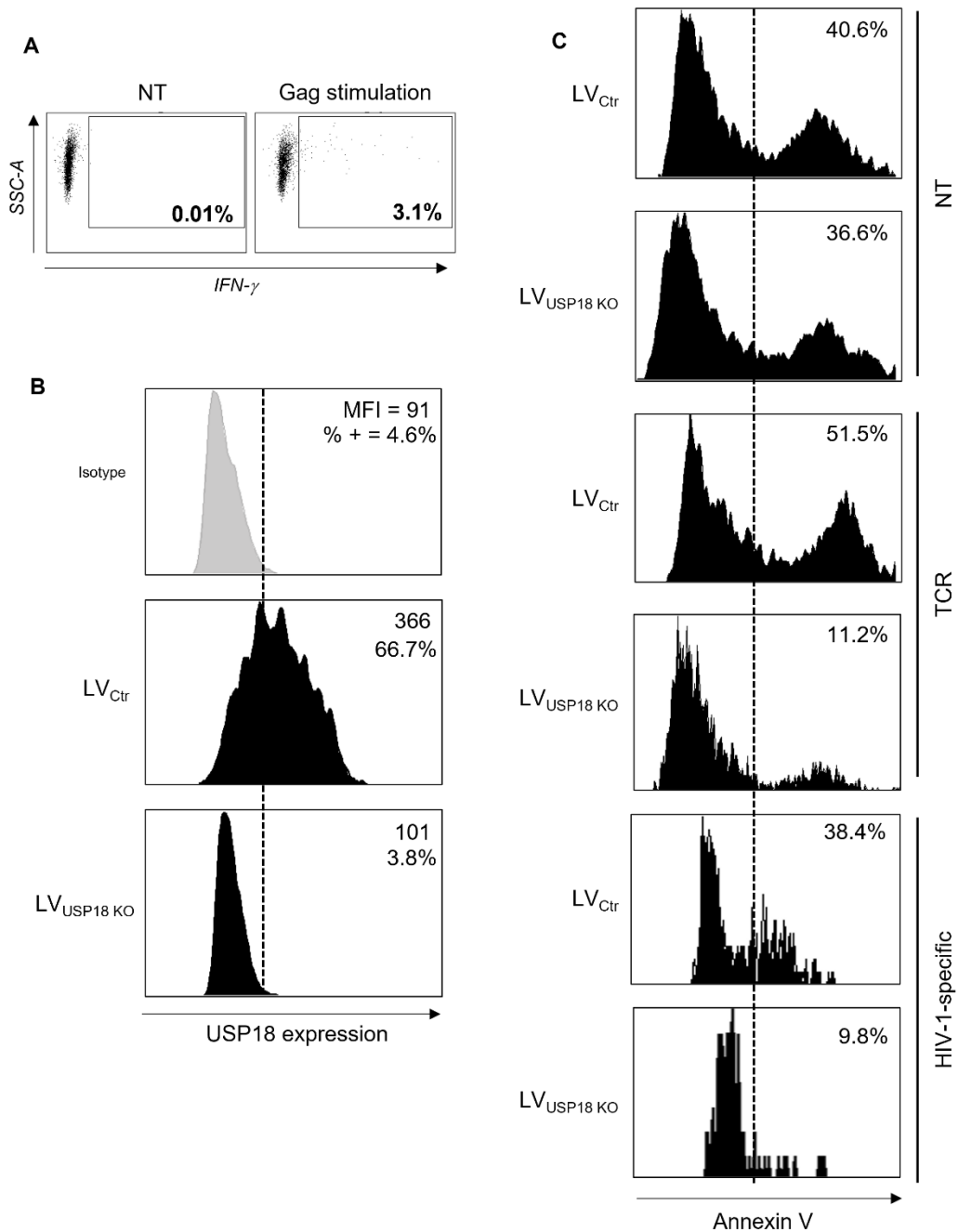
S14 Fig. Interplay between sustained IFN-I signaling, USP18 expression and reduced AKT activation in memory CD4 T-cells during HIV-1 infection.



S15 Fig. USP18 expression is increased in other cell populations during HIV-1 infection. Constitutive expression of UPS18 is higher in CD3⁺CD4^{neg}, CD3^{neg}CD4^{neg} and monocytes from PHI and CHI when compared to HIV^{free} subjects as determined with MFI values (left) and percentages of positive cells (right) (n = 10). Representative histograms including isotype control are also shown below. The error bars indicate standard deviations from the means. *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison between study groups).



S16 Fig. Functional defects observed in viremic HIV-1-infected subjects are not rescued by IFNAR blockade. (A) Results are shown as the increases in FC (Fold change) of TCR-induced secreting Mem in the presence or absence of IFNAR blockade. Secreting cells are defined as producing either IFN- γ , TNF- α , IL-2, or combinations of multiple of them. No statistical differences were observed in the percentage of secreting Mem in the absence of TCR activation for all study groups of subjects. (B) Results shown are the increases in FC of TCR-induced IFN- γ producing Mem in the presence or absence of IFNAR blockade. (C) Percentages of PD-1 positive cells in Mem in the presence or absence of IFNAR blockade. (D) Representative distribution of secreting PD-1 positive Mem in the presence or absence of IFNAR blockade. (A-D) N = 10. The error bars indicate standard deviations from the means. β , symbol used for paired *t* test (comparison between Mem treated α -IFNAR and IgG2a controls). *, symbol used for Mann-Whitney test (comparison with HIV^{free} controls).



S17 Fig. Targeting USP18 expression in spleen CD4 T-cells from an HIV-1-infected subject results in reduced apoptosis. Briefly, spleen cells were collected and transduced for 48 hours with LV_{Ctrl} or LV_{USP18 KO}. Transduced cells were then activated or not using anti-CD3 and anti-CD28 Abs (TCR stimulation), or p55 Gag and anti-CD28 Abs (HIV stimulation). **(A)** Gating strategy to detect the virus-specific CD4 T-cells at 18 hours of HIV-1 stimulation using IFN- γ expression. **(B)** USP18 expression in gated Mem after 48 hours of cell transduction. Isotype control is also shown in grey. **(C)** Levels of apoptosis on transduced CD4 T-cells after cell activation. Representative histograms show the apoptosis in Mem and IFN- γ ⁺ virus-specific cells for TCR and HIV stimulation, respectively.

7 BIBLIOGRAPHIE ARTICLE

1. Bostik P, Noble ES, Mayne AE, Gargano L, Villinger F, Ansari AA. Central memory CD4 T cells are the predominant cell subset resistant to anergy in SIV disease resistant sooty mangabeys. *AIDS*. 2006;20(2):181-8. doi: 10.1097/01.aids.0000198092.77948.8a. PubMed PMID: 16511410.
2. Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, Xu L, et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science*. 2006;312(5779):1530-3. doi: 10.1126/science.1124226. PubMed PMID: 16763152; PubMed Central PMCID: PMCPMC2365913.
3. Mattapallil JJ, Douek DC, Buckler-White A, Montefiori D, Letvin NL, Nabel GJ, et al. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med*. 2006;203(6):1533-41. doi: 10.1084/jem.20060657. PubMed PMID: 16735692; PubMed Central PMCID: PMCPMC2118314.
4. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med*. 2008;14(3):266-74. doi: 10.1038/nm1728. PubMed PMID: 18311149.
5. van Grevenynghe J, Halwani R, Chomont N, Ancuta P, Peretz Y, Tanel A, et al. Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection. *Semin Immunol*. 2008;20(3):196-203. doi: 10.1016/j.smim.2008.07.008. PubMed PMID: 18757210.
6. Dagenais-Lussier X, Aounallah M, Mehraj V, El-Far M, Tremblay C, Sekaly RP, et al. Kynurenine Reduces Memory CD4 T-Cell Survival by Interfering with Interleukin-2 Signaling Early during HIV-1 Infection. *J Virol*. 2016;90(17):7967-79. doi: 10.1128/JVI.00994-16. PubMed PMID: 27356894; PubMed Central PMCID: PMCPMC4988137.
7. Aounallah M, Dagenais-Lussier X, El-Far M, Mehraj V, Jenabian MA, Routy JP, et al. Current topics in HIV pathogenesis, part 2: Inflammation drives a Warburg-like effect on the metabolism of HIV-infected subjects. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;28:1-10. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.01.001. PubMed PMID: 26851985.
8. Dagenais-Lussier X, Mouna A, Routy JP, Tremblay C, Sekaly RP, El-Far M, et al. Current topics in HIV-1 pathogenesis: The emergence of deregulated immuno-metabolism in HIV-infected subjects. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(6):603-13. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.09.001. PubMed PMID: 26409789.
9. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505(7484):509-14. doi: 10.1038/nature12940. PubMed PMID: 24356306; PubMed Central PMCID: PMCPMC4047036.
10. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(12):975-90. doi: 10.1038/nrd2422. PubMed PMID: 18049472.

11. Teijaro JR. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol.* 2016;16:31-40. doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.001. PubMed PMID: 26812607; PubMed Central PMCID: PMC4821698.
12. Acchioni C, Marsili G, Perrotti E, Remoli AL, Sgarbanti M, Battistini A. Type I IFN--a blunt spear in fighting HIV-1 infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):143-58. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.10.004. PubMed PMID: 25466629.
13. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011;1(6):519-25. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.008. PubMed PMID: 22328912; PubMed Central PMCID: PMC3274382.
14. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011;472(7344):481-5. doi: 10.1038/nature09907. PubMed PMID: 21478870; PubMed Central PMCID: PMC3409588.
15. Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol.* 2008;126(3):235-42. doi: 10.1016/j.clim.2007.08.015. PubMed PMID: 17916442; PubMed Central PMCID: PMC2275778.
16. d'Ettorre G, Paiardini M, Ceccarelli G, Silvestri G, Vullo V. HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(4):355-64. doi: 10.1089/aid.2010.0342. PubMed PMID: 21309730.
17. Hardy GA, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, et al. Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One.* 2013;8(2):e56527. doi: 10.1371/journal.pone.0056527. PubMed PMID: 23437155; PubMed Central PMCID: PMC3577907.
18. Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13974-9. doi: 10.1073/pnas.0505251102. PubMed PMID: 16174727; PubMed Central PMCID: PMC1224361.
19. Lehmann C, Harper JM, Taubert D, Hartmann P, Fatkenheuer G, Jung N, et al. Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(5):522-30. doi: 10.1097/QAI.0b013e31817f97cf. PubMed PMID: 18645522.
20. 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 Res Hum Retroviruses.* 1991;7(4):375-80. doi: 10.1089/aid.1991.7.375. PubMed PMID: 1906289.
21. Boasso A, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Shearer GM. HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation. *PLoS One.* 2008;3(8):e2961. doi: 10.1371/journal.pone.0002961. PubMed PMID: 18698365; PubMed Central PMCID: PMC2491901.

22. Dagenais-Lussier X, Loucif H, Murira A, Laulhe X, Stager S, Lamarre A, et al. Sustained IFN-I Expression during Established Persistent Viral Infection: A "Bad Seed" for Protective Immunity. *Viruses*. 2017;10(1). doi: 10.3390/v10010012. PubMed PMID: 29301196; PubMed Central PMCID: PMC5795425.
23. Daugan M, Murira A, Mindt BC, Germain A, Tarrab E, Lapierre P, et al. Type I Interferon Impairs Specific Antibody Responses Early during Establishment of LCMV Infection. *Front Immunol*. 2016;7:564. doi: 10.3389/fimmu.2016.00564. PubMed PMID: 27994594; PubMed Central PMCID: PMC5136549.
24. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, et al. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(18):7000-5. doi: 10.1073/pnas.0600363103. PubMed PMID: 16632604; PubMed Central PMCID: PMC51444883.
25. Osokine I, Snell LM, Cunningham CR, Yamada DH, Wilson EB, Elsaesser HJ, et al. Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):7409-14. doi: 10.1073/pnas.1401662111. PubMed PMID: 24799699; PubMed Central PMCID: PMC4034239.
26. Teijaro JR. Too much of a good thing: Sustained type 1 interferon signaling limits humoral responses to secondary viral infection. *Eur J Immunol*. 2016;46(2):300-2. doi: 10.1002/eji.201546224. PubMed PMID: 26783074; PubMed Central PMCID: PMC5113021.
27. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science*. 2013;340(6129):207-11. doi: 10.1126/science.1235214. PubMed PMID: 23580529; PubMed Central PMCID: PMC3640797.
28. Wilson EB, Brooks DG. Interfering with type I interferon: a novel approach to purge persistent viral infection. *Cell Cycle*. 2013;12(18):2919-20. doi: 10.4161/cc.26175. PubMed PMID: 23974094; PubMed Central PMCID: PMC3875659.
29. Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, et al. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science*. 2013;340(6129):202-7. doi: 10.1126/science.1235208. PubMed PMID: 23580528; PubMed Central PMCID: PMC3704950.
30. Honke N, Shaabani N, Zhang DE, Hardt C, Lang KS. Multiple functions of USP18. *Cell Death Dis*. 2016;7(11):e2444. doi: 10.1038/cddis.2016.326. PubMed PMID: 27809302; PubMed Central PMCID: PMC5260889.
31. Basters A, Knobloch KP, Fritz G. USP18 - a multifunctional component in the interferon response. *Biosci Rep*. 2018;38(6). doi: 10.1042/BSR20180250. PubMed PMID: 30126853; PubMed Central PMCID: PMC6240716.
32. Cheng L, Ma J, Li J, Li D, Li G, Li F, et al. Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2017;127(1):269-79. doi: 10.1172/JCI90745. PubMed PMID: 27941247; PubMed Central PMCID: PMC5199717.

33. Cheng L, Yu H, Li G, Li F, Ma J, Li J, et al. Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI Insight*. 2017;2(12). doi: 10.1172/jci.insight.94366. PubMed PMID: 28614789; PubMed Central PMCID: PMC5470878.
34. Zhen A, Rezek V, Youn C, Lam B, Chang N, Rick J, et al. Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J Clin Invest*. 2017;127(1):260-8. doi: 10.1172/JCI89488. PubMed PMID: 27941243; PubMed Central PMCID: PMC5199686.
35. Fritsch RD, Shen X, Sims GP, Hathcock KS, Hodes RJ, Lipsky PE. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *J Immunol*. 2005;175(10):6489-97. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6489. PubMed PMID: 16272303.
36. Okada R, Kondo T, Matsuki F, Takata H, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *Int Immunol*. 2008;20(9):1189-99. doi: 10.1093/intimm/dxn075. PubMed PMID: 18635582.
37. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2013;3:326. doi: 10.3389/fonc.2013.00326. PubMed PMID: 24475377; PubMed Central PMCID: PMC3893597.
38. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2003;171(1):61-8. PubMed PMID: 12816983.
39. Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, et al. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(1):79-91. doi: 10.1084/jem.20061681. PubMed PMID: 17190839; PubMed Central PMCID: PMC2118424.
40. Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev*. 2003;192:7-20. PubMed PMID: 12670391.
41. Olagnier D, Sze A, Bel Hadj S, Chiang C, Steel C, Han X, et al. HTLV-1 Tax-mediated inhibition of FOXO3a activity is critical for the persistence of terminally differentiated CD4+ T cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(12):e1004575. doi: 10.1371/journal.ppat.1004575. PubMed PMID: 25521510; PubMed Central PMCID: PMC4270795.
42. Yue FY, Kovacs CM, Dimayuga RC, Gu XX, Parks P, Kaul R, et al. Preferential apoptosis of HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005;174(4):2196-204. PubMed PMID: 15699152.
43. Wilson EB, Brooks DG. Decoding the complexity of type I interferon to treat persistent viral infections. *Trends Microbiol*. 2013;21(12):634-40. doi: 10.1016/j.tim.2013.10.003. PubMed PMID: 24216022; PubMed Central PMCID: PMC3864553.
44. Snell LM, McGaha TL, Brooks DG. Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends Immunol*. 2017;38(8):542-57. doi: 10.1016/j.it.2017.05.005. PubMed PMID: 28579323.

45. Mustachio LM, Kawakami M, Lu Y, Rodriguez-Canales J, Mino B, Behrens C, et al. The ISG15-specific protease USP18 regulates stability of PTEN. *Oncotarget*. 2017;8(1):3-14. doi: 10.18632/oncotarget.13914. PubMed PMID: 27980214; PubMed Central PMCID: PMC5352120.
46. Fraietta JA, Mueller YM, Yang G, Boesteanu AC, Gracias DT, Do DH, et al. Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003658. doi: 10.1371/journal.ppat.1003658. PubMed PMID: 24130482; PubMed Central PMCID: PMC3795023.
47. Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, Hardy AW, Chougnet C, Dolan MJ, et al. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005;106(10):3524-31. doi: 10.1182/blood-2005-03-1243. PubMed PMID: 16046522; PubMed Central PMCID: PMC1895067.
48. Nguyen TP, Bazdar DA, Mudd JC, Lederman MM, Harding CV, Hardy GA, et al. Interferon-alpha inhibits CD4 T cell responses to interleukin-7 and interleukin-2 and selectively interferes with Akt signaling. *J Leukoc Biol*. 2015;97(6):1139-46. doi: 10.1189/jlb.4A0714-345RR. PubMed PMID: 25784743; PubMed Central PMCID: PMC4438745.
49. Honke N, Shaabani N, Merches K, Gassa A, Kraft A, Ehrhardt K, et al. Immunoactivation induced by chronic viral infection inhibits viral replication and drives immunosuppression through sustained IFN-I responses. *Eur J Immunol*. 2016;46(2):372-80. doi: 10.1002/eji.201545765. PubMed PMID: 26507703; PubMed Central PMCID: PMC5063111.
50. Malakhova OA, Kim KI, Luo JK, Zou W, Kumar KG, Fuchs SY, et al. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J*. 2006;25(11):2358-67. doi: 10.1038/sj.emboj.7601149. PubMed PMID: 16710296; PubMed Central PMCID: PMC1478183.
51. Jiao B, Shi X, Chen Y, Ye H, Yao M, Hong W, et al. Insulin receptor substrate-4 interacts with ubiquitin-specific protease 18 to activate the Jak/STAT signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(62):105923-35. doi: 10.18632/oncotarget.22510. PubMed PMID: 29285303; PubMed Central PMCID: PMC5739690.
52. Arimoto KI, Lochte S, Stoner SA, Burkart C, Zhang Y, Miyauchi S, et al. STAT2 is an essential adaptor in USP18-mediated suppression of type I interferon signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(3):279-89. doi: 10.1038/nsmb.3378. PubMed PMID: 28165510; PubMed Central PMCID: PMC5365074.
53. Rallon N, Garcia M, Garcia-Samaniego J, Cabello A, Alvarez B, Restrepo C, et al. Expression of PD-1 and Tim-3 markers of T-cell exhaustion is associated with CD4 dynamics during the course of untreated and treated HIV infection. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193829. doi: 10.1371/journal.pone.0193829. PubMed PMID: 29518102; PubMed Central PMCID: PMC5843247.
54. Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *J Leukoc Biol*. 2018. doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-349R. PubMed PMID: 29357116.

55. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1217-26. doi: 10.1093/infdis/jir507. PubMed PMID: 21917895; PubMed Central PMCID: PMC3218674.
56. Piconi S, Trabattoni D, Gori A, Parisotto S, Magni C, Meraviglia P, et al. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS.* 2010;24(13):1991-2000. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833c93ce. PubMed PMID: 20651586.
57. Baker JV, Peng G, Rapkin J, Krason D, Reilly C, Cavert WP, et al. Poor initial CD4+ recovery with antiretroviral therapy prolongs immune depletion and increases risk for AIDS and non-AIDS diseases. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(5):541-6. doi: 10.1097/QAI.0b013e31817bebb3. PubMed PMID: 18645520; PubMed Central PMCID: PMC3617548.
58. Lewden C, Chene G, Morlat P, Raffi F, Dupon M, Dellamonica P, et al. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;46(1):72-7. doi: 10.1097/QAI.0b013e318134257a. PubMed PMID: 17621240.
59. Cha L, de Jong E, French MA, Fernandez S. IFN-alpha exerts opposing effects on activation-induced and IL-7-induced proliferation of T cells that may impair homeostatic maintenance of CD4+ T cell numbers in treated HIV infection. *J Immunol.* 2014;193(5):2178-86. doi: 10.4049/jimmunol.1302536. PubMed PMID: 25063872.
60. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, et al. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *J Infect Dis.* 2011;204(12):1927-35. doi: 10.1093/infdis/jir659. PubMed PMID: 22006994.
61. Younes SA, Talla A, Pereira Ribeiro S, Saidakova EV, Korolevskaya LB, Shmagel KV, et al. Cycling CD4+ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest.* 2018;128(11):5083-94. doi: 10.1172/JCI120245. PubMed PMID: 30320604; PubMed Central PMCID: PMC6205369.
62. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, et al. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood.* 2008;111(2):699-704. doi: 10.1182/blood-2007-05-088435. PubMed PMID: 17909079; PubMed Central PMCID: PMC2200839.
63. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 1990;9(5):1551-60. PubMed PMID: 2184033; PubMed Central PMCID: PMC3551849.
64. Jenabian MA, El-Far M, Vyboh K, Kema I, Costiniuk CT, Thomas R, et al. Immunosuppressive Tryptophan Catabolism and Gut Mucosal Dysfunction Following Early HIV Infection. *J Infect Dis.* 2015;212(3):355-66. doi: 10.1093/infdis/jiv037. PubMed PMID: 25616404.
65. Maneglier B, Malleret B, Guillemin GJ, Spreux-Varoquaux O, Devillier P, Rogez-Kreuz C, et al. Modulation of indoleamine-2,3-dioxygenase expression and activity by HIV-1 in human

macrophages. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23(5):573-81. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00703.x. PubMed PMID: 19656212.

66. Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Front Immunol.* 2017;8:1360. doi: 10.3389/fimmu.2017.01360. PubMed PMID: 29163470; PubMed Central PMCID: PMC5663846.

67. Scagnolari C, Monteleone K, Selvaggi C, Pierangeli A, D'Ettorre G, Mezzaroma I, et al. ISG15 expression correlates with HIV-1 viral load and with factors regulating T cell response. *Immunobiology.* 2016;221(2):282-90. doi: 10.1016/j.imbio.2015.10.007. PubMed PMID: 26563749.

68. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19(3):280-91. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.012. PubMed PMID: 26962940; PubMed Central PMCID: PMC4835240.

69. Chomont N, DaFonseca S, Vandergeeten C, Ancuta P, Sekaly RP. Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(1):30-6. doi: 10.1097/COH.0b013e3283413775. PubMed PMID: 21242891.

70. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900. doi: 10.1038/nm.1972. PubMed PMID: 19543283; PubMed Central PMCID: PMC2859814.

71. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature.* 2014;511(7511):601-5. doi: 10.1038/nature13554. PubMed PMID: 25043006; PubMed Central PMCID: PMC4418221.

72. van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, Peretz Y, et al. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3877-88. doi: 10.1172/JCI59211. PubMed PMID: 21926463; PubMed Central PMCID: PMC3195482.

8 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

8.1 Importance de la signalisation IFN-I lors de l'infection par le VIH-1

Les IFN-I, faisant partie intégrale de la réponse immunitaire innée, sont souvent considérés comme la première ligne de défense contre plusieurs infections virales incluant le VIH-1. Leur rôle dans la réponse immunitaire innée provient de l'expression de plus de 300 ISG contribuant à l'inflammation, l'immunomodulation et la défense de l'hôte (Schoggins et al., 2011). En plus de la réponse innée, la signalisation IFN-I contribue de manière importante à la réponse adaptative, notamment en amorçant la différenciation des monocytes en macrophages et DC favorisant l'activation des fonctions adaptatives des lymphocytes T (Iijima et al., 2011). Ces deux facettes de la réponse IFN-I en font un élément crucial des réponses antivirales, particulièrement efficaces pour contrôler les infections aiguës. Cependant les évidences que cette signalisation cause des effets néfastes lorsqu'elle est maintenue, comme c'est le cas lors d'infections persistante ou de maladie auto-immune, se sont accumulées dans les dernières années. Comme mentionné précédemment, le phénotype suppressif de cette signalisation est marqué par la réduction de la prolifération des DC et du nombre total de monocytes, macrophages et cellules « Natural Killer » (Boasso et al., 2008; Teijaro, 2016). En plus des effets néfastes sur différents aspects de l'immunité innée, la signalisation IFN-I soutenue engendre une perte des lymphocytes B et une perturbation du follicule B altérant l'immunité humorale ainsi qu'une perte de lymphocytes CD4 et une diminution de l'activité antivirale de lymphocytes CD8 affectant l'immunité cellulaire (Cheng et al., 2017; Daugan et al., 2016; Fallet et al., 2016).

C'est dans ce contexte que notre projet vient s'ajouter aux évidences de l'impact négatif de la signalisation IFN-I sur la survie des CD4 mémoires lors de l'infection par le VIH-1. En effet, des études ont montré le rôle de la signalisation IFN-I sur l'apoptose médiée par TRAIL/DR5 chez les CD4 mémoires (Herbeuval et al., 2005a, 2005b). En outre, bien que certaines études aient déjà démontré que la signalisation IFN- α pouvait interférer avec la capacité des lymphocytes CD4 à répondre à l'IL-2 et IL-7 interférant avec la signalisation AKT et menant à une diminution de leur maintien homéostatique (Cha et al., 2014; Nguyen et al., 2015) ainsi qu'une sensibilisation à l'apoptose médiée par Fas (Fraietta et al., 2013), nous présentons dans ce projet une explication du mécanisme moléculaire impliqué dans ces phénotypes. Nous avons ainsi démontré que la signalisation IFN-I chez les CD4 mémoires menait à une augmentation de l'expression d'USP18, ceci causant une augmentation de la présence de PTEN interférant avec l'activité d'AKT diminuant ainsi la capacité des cellules à répondre à différents signaux de survie (S14 Fig).

Pour conclure, nos travaux s'incluent dans un contexte où globalement la présence maintenue d'interféron de type I lors d'infections persistantes est liée à la pathogénèse virale. Il a déjà été bien établi que la présence persistante d'IFN-I affecte l'immunité humorale, innée et cellulaire. Ainsi, ce projet permet de souligner et de clarifier une des voies de signalisation par lesquelles les IFN-I affectent l'immunité cellulaire.

8.2 Rôle d'USP18 lors d'autres infections virales

Le double rôle d'USP18 rend les déductions de son impact lors d'autres infections difficiles à dire. Par exemple, lors de l'infection par le VHC, l'effet délétère d'USP18 vient de son effet inhibiteur de la signalisation IFN-I permettant la persistance virale (Chen et al., 2011; Li et al., 2014). De façon similaire, USP18 favorise la production virale du VHB indépendamment de son activité isopeptidase (Li et al., 2020). Ainsi, il semble que dans le cas d'infections chroniques où la réponse IFN-I est connue comme étant lacunaire, USP18 peut favoriser l'infection via son activité d'inhibition de la réponse IFN-I. D'autre part, USP18 pourrait potentiellement jouer un rôle dans les infections aiguës tel l'influenza A et SRAS-CoV-2 les deux induisant des enzymes ciblant ISG15 (Munnur et al., 2021). De façon intéressante, SRAS-CoV-2 induit un état de deISGylation menant à un phénotype pro-inflammatoire chez les macrophages réduisant leur capacité à présenter des antigènes. Ainsi, l'activité isopeptidase d'USP18 pourrait favoriser d'autant plus ce phénotype en empêchant l'activité d'ISGylation d'ISG15. En ce qui concerne l'autre rôle d'USP18, il est maintenant bien établi que la sévérité de l'infection par SRAS-CoV-2 est associée à un délai dans la réponse IFN-I (Lei et al., 2020). Ainsi, son rôle d'inhibiteur de la réponse IFN-I pourrait contribuer à la sévérité de la maladie si USP18 est exprimé tôt lors de cette infection. Donc, lors de l'infection par SRAS-CoV-2, USP18 pourrait potentiellement exacerber la maladie via ces deux activités faisant de cette protéine une cible de traitement potentiellement intéressante.

8.3 Rôle du traitement

Dans un autre ordre d'idées, de façon indirecte, notre projet se joint à plusieurs évidences de l'efficacité des ART pour le traitement du VIH-1. En effet, nos résultats démontrent que les ART sont efficaces pour atteindre des niveaux normalisés d'IFN- α plasmatique, menant ainsi à une expression d'USP18 comparable aux contrôles non-infectés (S5 Fig).

Cependant, jusqu'à 10 % des PVVIH sous ART ne réussissent pas à rétablir une population de lymphocytes CD4 malgré une suppression virale adéquate (Yang et al., 2020). Ces personnes, souvent référées comme des « immune non-responder », ont un risque plus élevé de progresser vers le SIDA. Deux phénotypes liés aux lymphocytes CD4 sont ressortis de la littérature entourant ces PVVIH, soit des défauts dans les fonctions mitochondriales (Younes et al., 2018; Zhao et al., 2021) ainsi que des défauts dans leur capacité à répondre à l'IL-7 (Nguyen et al., 2016; Shive et al., 2014; Tanaskovic et al., 2014). Considérant le rôle de la voie de signalisation USP18/PTEN sur la capacité des lymphocytes CD4 à répondre à cette interleukine, notre étude souligne de nouvelles avenues potentielles de traitements.

8.4 Avenues de traitements

Un des aspects souvent abordé dans le contexte de recherche fondamentale demeure comment les nouveaux mécanismes découverts pourraient être utilisés comme traitements ou pour améliorer les traitements actuels. Ainsi, la section suivante portera sur trois éléments de la signalisation décrite ci-haut pour lesquels nous avons réussi à interférer de manière significative jusqu'à des niveaux souvent normalisés : IFN-I, USP18 et PTEN.

8.4.1 IFN-I

L'avantage principal de la signalisation IFN-I comme cible de traitement provient du fait qu'un anticorps interférant avec sa signalisation via sa liaison aux IFNAR ait été récemment accepté comme traitement pour le lupus érythémateux disséminé (U.S. FDA, BLA 761123, 2021). Dans ce contexte, deux études chez la souris montrent le potentiel très prometteur de traitements utilisant des α -IFNAR pour traiter l'infection par le VIH-1. Ces études ont montré que d'interférer avec la signalisation IFN-I chez des modèles de souris humanisées infectées par le VIH-1 permet de réduire significativement la charge virale, le réservoir viral dans les tissus lymphoïdes, l'hyperactivation des cellules T et rétablit les fonctions des CD4 mémoires spécifiques au VIH-1 (Cheng et al., 2017; Zhen et al., 2017). Il demeure important de considérer le moment pendant lequel ce genre de traitement est administré. En effet, l'équipe de Sandler *et al.* a montré que d'administrer des α -IFNAR au moment de l'infection par le VIS aggrave l'infection (Sandler et al., 2014). En outre, la réponse IFN-I est cruciale pour combattre des infections aiguës tel l'influenza A et le SRAS-CoV-2 (Galani et al., 2021; Xia et al., 2020), ainsi des traitements continus aux α -IFNAR serait une forme d'immunosuppression pouvant rendre ces infections endémiques d'autant plus dangereuses.

Dans le contexte de nouveaux traitements, il est important de considérer que les PVVIH sous traitements ART de notre étude ont des niveaux d'IFN- α plasmatique ainsi que d'USP18 et de PTEN chez leur CD4 mémoires comparables à ceux des contrôles non-infectés (S5 Fig). Ainsi, les bénéfices potentiels de cibler cette voie de signalisation ne sont peut-être pas assez importants en considérant les risques mentionnés plus haut. Cela étant dit, des traitements anti-IFNAR lors de notre protocole de traitements de longue durée des CD4 mémoires à la suite d'activation TCR ont permis d'augmenter le nombre de CD4 mémoires des patients ART de manière significative ainsi que leur niveau d'activation d'AKT après 21 jours de culture (Annexe I). Ces résultats soulignent le potentiel des traitements α -IFNAR en combinaison avec un régime antirétroviral

allégé permettant d'améliorer certains effets secondaires des ART ou pour tenter de rétablir des niveaux normaux pour le PVVIH ne répondant pas adéquatement à leur régime de traitements.

8.4.2 USP18

USP18 est au cœur de la signalisation décrite dans cette thèse et son implication dans l'expression élevée de PTEN en fait une cible de choix pour combattre la perte de CD4 dû à l'infection par le VIH-1. Selon ce contexte, une délétion complète d'USP18 a été démontré comme étant bénéfique pour les macrophages lors de l'infection par le VIH-1 en améliorant leur réactivité face aux IFN-I (Taylor et al., 2018). En plus d'améliorer la réponse au IFN-I, cette délétion d'USP18 permet aussi une augmentation de p21 bloquant ainsi la réplication du VIH-1 dans les cellules myéloïdes THP-1 (Osei Kuffour et al., 2018). Il faut cependant considérer que d'éliminer l'activité d'inhibiteur de la signalisation IFN-I d'USP18 pourrait avoir des effets plus négatifs que positifs sur des populations cellulaires déjà affectées par une présence chronique d'IFN-I. L'importance d'USP18 est aussi soulignée dans un contexte de développement homéostatique où son absence cause une interféronopathie de type 1 menant à un syndrome pseudo-TORCH, qui est caractérisé comme la présence de symptômes comparables à ceux d'infections congénitales causées par toxoplasmose, rubéole, cytomégalovirus ou herpès sans présence de ces organismes, chez l'humain (Meuwissen et al., 2016). Dans ce contexte, il est important qu'un traitement visant USP18 comme cible doive inhiber spécifiquement son activité isopeptidase sans affecter son rôle comme inhibiteur de signalisation IFN-I. Une preuve de ce concept a été effectuée par l'équipe de Malakhova *et al.* qui a montré que de réintroduire un USP18 avec une modification au niveau du site actif isopeptidase chez la souris leur confère une réponse antivirale supérieure tout en évitant une hypersensibilité aux IFN-I présente chez les souris sans USP18 (Malakhova et al., 2006). Ainsi, inhiber l'activité isopeptidase d'USP18 semble être une stratégie intéressante pour non seulement augmenter la survie des CD4 mémoires, mais aussi potentiellement améliorer les réponses antivirales. À ce jour, aucun inhibiteur spécifique de cette fonction d'USP18 n'a été identifié.

8.4.3 PTEN

Finalement, le dernier aspect de la voie de signalisation décrite dans cette thèse susceptible d'être modulé à des fins de traitement est PTEN. Cet enzyme catalyse spécifiquement la déphosphorylation de PIP3, menant à l'inhibition d'AKT diminuant ainsi la croissance et la survie cellulaire (Chu et al., 2004). De manière intéressante, PTEN a déjà été démontré comme ayant

un rôle dans les fonctions de phagocytose des macrophages et cellules myéloïdes lors d'infections bactériennes notamment en réduisant le chimiotactisme, le recrutement aux sites d'inflammation ainsi que les réponses médiées par le récepteur Fc (Cao et al., 2004; Li et al., 2009; Subramanian et al., 2007). En plus de son rôle lors d'infections bactériennes, certaines études ont aussi regardé la possibilité d'inhiber PTEN pour améliorer les fonctions de phagocytose des macrophages alvéolaires (Canetti et al., 2007; Hubbard et al., 2011). De façon importante, une étude par Li *et al* a rapporté des effets bénéfiques de SF1670, l'inhibiteur de PTEN utilisé dans notre projet, dans le contexte des fonctions de granulocytes dans un modèle murin (Li et al., 2011). Cela dit, deux aspects demeurent à considérer par rapport au potentiel d'utiliser des inhibiteurs de PTEN comme traitements :

- La majorité de ces inhibiteurs ciblent plusieurs phosphatases (Spinelli et al., 2015) requérant ainsi des travaux pour balancer l'efficacité et la sélectivité des composés.
- La plupart des travaux considèrent les effets de l'inhibition de PTEN dans le contexte de son activité phosphatase envers PIP3, mais PTEN possède aussi d'autres cibles pour son activité phosphatase (Leslie et al., 2009)

Pour conclure, ce projet a permis de jeter la lumière sur l'importance de la voie de signalisation IFN-I / USP18 / PTEN sur la survie de CD4 mémoires lors de l'infection par le VIH-1 offrant ainsi trois cibles potentiels de traitements avec les α -IFNAR montrant le plus de potentiel dans un avenir proche.

8.5 Perspectives

Comme mentionné précédemment, USP18 est connu principalement pour avoir deux fonctions, soit sa fonction isopeptidase permettant de dissocier ISG15 de PTEN stabilisant l'expression de ce dernier ainsi que sa fonction dans la régulation négative de la signalisation IFN-I en se liant à la sous-unité IFNAR-2 du récepteur inhibant ainsi la voie JAK-STAT (Mustachio et al., 2017; Sarasin-Filipowicz et al., 2009) (Figure 4.1.). La première fonction est celle décrite et étudiée lors de ce projet, ainsi une question demeure : pourquoi les CD4 des PVVIH, qui expriment USP18 de façon importante, affichent un phénotype de signal IFN-I maintenu? Il est intéressant de noter qu'une étude récente par Sugawara *et al.* semble démontrer qu'en fait les CD4 des PVVIH sont, en effet, réfractaire à la signalisation IFN-I et que cet état réfractaire est médié par USP18 (Sugawara et al., 2021). Cependant, la majorité des résultats permettant à leur équipe d'arriver à cette conclusion provient de résultats présentés sous forme de ratio entre les niveaux après traitements IFN α 2b et les niveaux basals. Or, que ce soit dans notre étude ou celle de l'équipe de Sugawara, les CD4 de PVVIH montrent une signalisation IFN-I basale plus élevée que les contrôles non-infectés. Ainsi, il est fort probable que le phénotype observé dans leur étude est une réflexion d'un niveau plus élevé initial de signalisation IFN-I plutôt que d'une condition réfractaire aux IFN-I. Ceci étant dit, deux raisons pourraient expliquer les phénotypes de signalisation IFN-I chez les CD4 mémoires des PVVIH malgré la présence plus importante d'USP18 :

- STAT2 est non seulement un effecteur positif et spécifique essentiel de la signalisation IFN-I, il est aussi crucial pour la régulation négative de cette voie signalétique médiée par USP18 (Arimoto et al., 2017). L'importance de STAT2 comme régulateur de cette voie est soulignée par deux études récentes démontrant que des mutations homozygotes de STAT2 mènent à une interféronopathie de type I chez la souris et l'humain (Duncan et al., 2019; Gruber et al., 2020).
- Le substrat du récepteur à l'insuline 4 (IRS-4) est un facteur de régulation impliqué dans la voie de signalisation de l'insuline favorisant l'incorporation cellulaire de glucose, le métabolisme lipidique ainsi que la prolifération cellulaire à la suite de son activation (Lavan et al., 1997). En plus de ces fonctions communes avec les autres IRS, IRS-4 est connu pour interagir avec USP18 ceci inhibant les fonctions de régulation négative de ce dernier (Jiao et al., 2017).

Dans ce contexte, il devient intéressant d'explorer l'effet que ces deux candidats pourraient avoir sur le rôle de régulateur de signalisation IFN-I d'USP18. En plus du fait qu'IRS-4 ai été confirmé

comme pouvant se lier à USP18, les PVVIH sont connus comme ayant une réponse à l'insuline défectueuse (Pedro et al., 2018). Ainsi, il ne serait pas inattendu que l'infection par le VIH-1 mène à une expression altérée d'IRS-4 ou de ses régulateurs tels CK1γ2 (Li et al., 2018) et miR-493 (Cui et al., 2017) chez les CD4 mémoires des PVVIH ceci inhibant l'activité de régulation d'USP18. Cela étant dit, contrairement à STAT2 qui est nécessaire pour le recrutement d'USP18 à IFNAR2, la manière par laquelle IRS-4 affecte l'activité d'USP18 n'a toujours pas été démontrée. De façon très intéressante, il ne serait pas surprenant que l'effet inhibiteur d'IRS-4 soit en lien avec STAT2. En effet, les études montrant la capacité d'IRS-4 et STAT2 à lier USP18 ont aussi identifié leur site de liaison, soit aux acides aminés 321-372 et 317-371 respectivement (Arimoto et al., 2017; Jiao et al., 2017). Ainsi, l'interaction entre IRS-4 et USP18 pourrait potentiellement interférer avec la liaison de STAT2 à USP18 empêchant son recrutement à IFNAR2 et permettant une signalisation IFN-I ininterrompue (Figure 8.1.). L'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant une version mutante d'IRS-4 aux sites de liaison d'USP18 pourrait révéler si et comment IRS-4 inhibe l'activité régulatrice d'USP18 en comparant les phénotypes de signalisation IFN-I et les niveaux de colocalisation entre USP18 et STAT2 (Figure 8.1.).

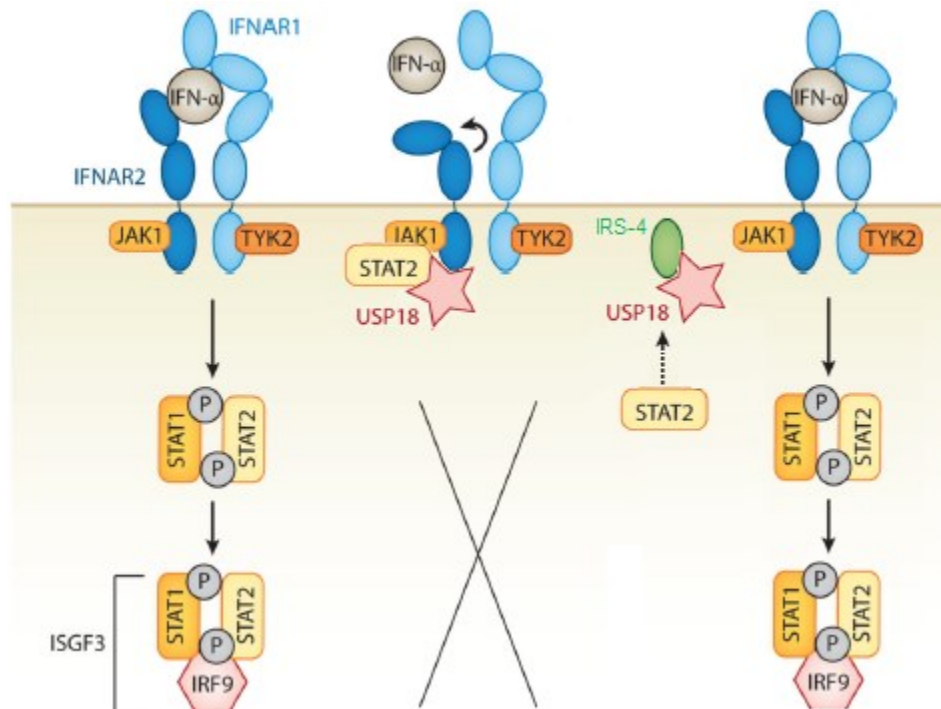


Figure 8.1. Hypothèse des interactions entre IRS-4, USP18 et STAT2 dans la régulation de la signalisation IFN-I.

L'inhibition de la signalisation IFN-I par USP18 est médiée par STAT2 qui permet son recrutement à la sous-unité IFNAR2. La liaison d'IRS-4 à USP18 pourrait empêcher l'interaction entre ce dernier et STAT2 permettant une signalisation IFN-I ininterrompue. Modifiée de (Schneider et al., 2014)

De façon intéressante, IRS-4 est aussi connu pour affecter la prolifération cellulaire via la signalisation PI3K (Hoxhaj et al., 2013). Ainsi, peut-être que l'interaction entre IRS-4 et USP18 pourrait potentiellement jouer un double rôle en diminuant la capacité d'IRS-4 d'interagir avec PI3K.

Un autre aspect d'USP18 pouvant potentiellement jouer un rôle dans le maintien de la signalisation IFN-I est l'existence de deux isoformes de cette protéine. Bien que peu d'information soit disponible sur ces isoformes, Burkart et al. montrent que les deux formes possèdent une activité de régulation de la signalisation IFN-I ainsi qu'une activité de DeISGylation (Burkart et al., 2012). Outre leur taille, ce qui distingue principalement les deux isoformes est leur localisation avec la forme courte se retrouvant proportionnellement plus au noyau et la forme complète dans le cytosol. Dans ce contexte, il serait possible que la présence plus importante de la forme courte, se retrouvant proportionnellement plus au noyau, puisse avoir des effets de DeISGylation sans inhiber autant la signalisation IFN-I. Ceci étant dit, nos travaux peuvent difficilement nous éclairer en ce qui concerne cette hypothèse, surtout que nos immunobuvardages ne révèlent pas de bande USP18 plus petite indiquant la présence de l'isoforme plus court. En ce sens, un immunobuvardage comparant les fractions cytosoliques et nucléaires permettrait d'évaluer le rôle de cet isoforme d'USP18 lors de l'infection par le VIH-1.

Dans un autre ordre d'idées, il serait aussi intéressant d'explorer le rôle de la voie de signalisation décrite ici chez d'autres populations cellulaires. En effet, lors de notre étude, nous avons démontré principalement les phénotypes médiés par USP18 chez la population CD4 mémoire. Cependant, nous avons aussi observé une expression d'USP18 plus importante chez d'autres populations cellulaires (S15 Fig). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette voie de signalisation sur d'autres populations cellulaires, comme les lymphocytes T CD8, qui pourraient potentiellement être moins sensibles au IFN- α (Catalfamo et al., 2011) et les Treg pour lesquels une étude récente a démontré le rôle d'ISG15 sur leur fréquence chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (Pacella et al., 2020). En plus, une étude récente a montré le rôle d'USP18 chez les cellules myéloïdes dans lesquelles sa présence mène à une accumulation de p53 favorisant la réplication du VIH-1 (Osei Kuffour et al., 2019). Dans ce même ordre d'idées, serait-il intéressant d'explorer le rôle de la signalisation IFN-I / USP18 / PTEN chez la population CD4 naïves? Il est bien établi que les Mem sont particulièrement dépendants de la stimulation par les cytokines à chaînes gamma (Raeber et al., 2018) ainsi que l'importance de l'activation d'AKT surtout lors de l'infection par le VIH-1 (van Grevenynghe et al., 2008). Ceci est reflété par les résultats de cette étude qui montrent une corrélation inverse entre les niveaux de

phosphorylation de STAT1 et IRF7 et le pourcentage de Mem (Fig. S2). Ainsi, il serait attendu que la population naïve soit moins touchée par l'expression d'USP18 lors de l'infection par le VIH-1. De plus, USP18 pourrait potentiellement stabiliser FOXO3a (Wang et al., 2020) affectant d'autant plus la survie des Mem y étant déjà susceptible.

Finalement, nos résultats suggèrent aussi qu'USP18 à un rôle important dans la survie des CD4 mémoires provenant de la rate (S17 Fig). D'une part, il est possible que d'autres mécanismes telle la pyroptose soit un facteur plus important pour la perte des CD4 mémoires dans ces tissus (Doitsh & Greene, 2016; Doitsh et al., 2014). D'autre part, la pénétration pharmacologique des traitements dans les tissus profonds est connue pour être un élément limitant des traitements ART (Cory et al., 2013; Jacobs et al., 2019). Ainsi, il est possible que la normalisation des phénotypes observés chez les CD4 mémoires de ART lors de notre étude y soit moins importante réitérant l'importance d'USP18 pour ces populations cellulaires même sous ART.

8.6 Conclusion

En conclusion, l'immunosuppression médiée par les IFN-I provient de multiples facteurs, plusieurs qui restent à être identifiés, et cause des problèmes non seulement lors d'infections persistantes, mais aussi lors de différentes conditions chroniques telles que les maladies auto-immunes.

Ce projet apporte une pierre à l'édifice dans la compréhension des mécanismes liés à cette immunosuppression. Ainsi, nos travaux indiquent que la signalisation IFN-I lors de l'infection par le VIH-1 mène, notamment chez les CD4 mémoires, à une augmentation de l'expression d'USP18. USP18, par son activité isopeptidase, augmente la présence de PTEN interférant avec l'activité d'AKT et diminuant ainsi la capacité des cellules à répondre à différents signaux de survie, notamment aux cytokines IL-2 et IL-7 ainsi que l'activation TCR. Nous avons aussi démontré qu'il était possible d'interférer à différentes étapes de la voie de signalisation avec des anticorps neutralisants contre IFNAR, de la modification génétique ciblant USP18 et un inhibiteur de PTEN menant à une diminution de la sensibilité à Fas et une amélioration de la survie à long terme des CD4 mémoires.

Le rôle multiple et complexe des IFN-I sur l'infection par le VIH-1 reste à être étudié en profondeur si l'on souhaite les cibler comme avenues de traitements, notamment en utilisant des anticorps neutralisants, car ils sont à la fois liés à l'inhibition de l'établissement du réservoir ainsi qu'à l'inversement de la latence (Van der Sluis et al., 2020) en plus d'être essentiel lors de la phase aiguë de l'infection (Sandler et al., 2014). Une stratégie ciblant spécifiquement l'activité isopeptidase d'USP18 permettrait potentiellement d'éviter ces problèmes en ayant un effet plus spécifique à la voie décrite ici.

9 BIBLIOGRAPHIE CONCLUSION

Arimoto, K.-I., Löchte, S., Stoner, S.A., Burkart, C., Zhang, Y., Miyauchi, S., Wilmes, S., Fan, J.-B., Heinisch, J.J., Li, Z., et al. (2017). STAT2 is an essential adaptor in USP18-mediated suppression of type I interferon signaling. *Nat Struct Mol Biol* 24, 279–289.

Canetti, C., Serezani, C.H., Atrasz, R.G., White, E.S., Aronoff, D.M., and Peters-Golden, M. (2007). Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of FcγR phagocytosis by prostaglandin E2 in alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 8350–8356.

Cao, X., Wei, G., Fang, H., Guo, J., Weinstein, M., Marsh, C.B., Ostrowski, M.C., and Tridandapani, S. (2004). The inositol 3-phosphatase PTEN negatively regulates Fcγ receptor signaling, but supports Toll-like receptor 4 signaling in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 172, 4851–4857.

Catalfamo, M., Wilhelm, C., Tcheung, L., Proschan, M., Friesen, T., Park, J.-H., Adelsberger, J., Baseler, M., Maldarelli, F., Davey, R., et al. (2011). CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J Immunol* 186, 2106–2116.

Cha, L., de Jong, E., French, M.A., and Fernandez, S. (2014). IFN-α exerts opposing effects on activation-induced and IL-7-induced proliferation of T cells that may impair homeostatic maintenance of CD4+ T cell numbers in treated HIV infection. *J Immunol* 193, 2178–2186.

Cheng, L., Ma, J., Li, J., Li, D., Li, G., Li, F., Zhang, Q., Yu, H., Yasui, F., Ye, C., et al. (2017). Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest* 127, 269–279.

Chu, E.C., and Tarnawski, A.S. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 10, RA235–RA241.

Cory, T.J., Schacker, T.W., Stevenson, M., and Fletcher, C.V. (2013). Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Curr Opin HIV AIDS* 8, 190–195.

Cui, A., Jin, Z., Gao, Z., Jin, M., Zhu, L., Li, L., Jin, C., and An, Y. (2017). Downregulation of miR-493 promoted melanoma proliferation by suppressing IRS4 expression. *Tumour Biol* 39, 1010428317701640.

Doitsh, G., and Greene, W.C. (2016). Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe* 19, 280–291.

Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., et al. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509–514.

Duncan, C.J.A., Thompson, B.J., Chen, R., Rice, G.I., Gothe, F., Young, D.F., Lovell, S.C., Shuttleworth, V.G., Brocklebank, V., Corner, B., et al. (2019). Severe type I interferonopathy and unrestrained interferon signaling due to a homozygous germline mutation in STAT2. *Sci Immunol* 4, eaav7501.

Fraietta, J.A., Mueller, Y.M., Yang, G., Boesteanu, A.C., Gracias, D.T., Do, D.H., Hope, J.L., Kathuria, N., McGettigan, S.E., Lewis, M.G., et al. (2013). Type I interferon upregulates Bak and contributes to T cell loss during human immunodeficiency virus (HIV) infection. *PLoS Pathog* 9, e1003658.

Galani, I.-E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., Pavlos, E., Koukaki, E., Fragkou, P.C., Panou, V., Rapti, V., et al. (2021). Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol* 22, 32–40.

Gruber, C., Martin-Fernandez, M., Ailal, F., Qiu, X., Taft, J., Altman, J., Rosain, J., Buta, S., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., et al. (2020). Homozygous STAT2 gain-of-function mutation by loss of USP18 activity in a patient with type I interferonopathy. *J Exp Med* 217, e20192319.

Herbeuval, J.-P., Grivel, J.-C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005a). CD4⁺ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524–3531.

Herbeuval, J.-P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M. (2005b). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13974–13979.

Hubbard, L.L.N., Wilke, C.A., White, E.S., and Moore, B.B. (2011). PTEN limits alveolar macrophage function against *Pseudomonas aeruginosa* after bone marrow transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 1050–1058.

Jacobs, J.L., Halvas, E.K., Tosiano, M.A., and Mellors, J.W. (2019). Persistent HIV-1 Viremia on Antiretroviral Therapy: Measurement and Mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 10, 2383.

Jiao, B., Shi, X., Chen, Y., Ye, H., Yao, M., Hong, W., Li, S., Duan, X., Li, Y., Wang, Y., et al. (2017). Insulin receptor substrate-4 interacts with ubiquitin-specific protease 18 to activate the Jak/STAT signaling pathway. *Oncotarget* 8, 105923–105935.

Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1997). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 21403–21407.

Leslie, N.R., Maccario, H., Spinelli, L., and Davidson, L. (2009). The significance of PTEN's protein phosphatase activity. *Adv Enzyme Regul* 49, 190–196.

Li, X., Zhong, L., Wang, Z., Chen, H., Liao, D., Zhang, R., Zhang, H., and Kang, T. (2018). Phosphorylation of IRS4 by CK1 γ 2 promotes its degradation by CHIP through the ubiquitin/lysosome pathway. *Theranostics* 8, 3643–3653.

Li, Y., Jia, Y., Pichavant, M., Loison, F., Sarraj, B., Kasorn, A., You, J., Robson, B.E., Umetsu, D.T., Mizgerd, J.P., et al. (2009). Targeted deletion of tumor suppressor PTEN augments neutrophil function and enhances host defense in neutropenia-associated pneumonia. *Blood* 113, 4930–4941.

Li, Y., Prasad, A., Jia, Y., Roy, S.G., Loison, F., Mondal, S., Kocjan, P., Silberstein, L.E., Ding, S., and Luo, H.R. (2011). Pretreatment with phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibitor SF1670 augments the efficacy of granulocyte transfusion in a clinically relevant mouse model. *Blood* 117, 6702–6713.

Malakhova, O.A., Kim, K.I., Luo, J.-K., Zou, W., Kumar, K.G.S., Fuchs, S.Y., Shuai, K., and Zhang, D.-E. (2006). UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J* 25, 2358–2367.

Meuwissen, M.E.C., Schot, R., Buta, S., Oudesluijs, G., Tinschert, S., Speer, S.D., Li, Z., van Unen, L., Heijmans, D., Goldmann, T., et al. (2016). Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *Journal of Experimental Medicine* 213, 1163–1174.

Mustachio, L.M., Kawakami, M., Lu, Y., Rodriguez-Canales, J., Mino, B., Behrens, C., Wistuba, I., Bota-Rabassedas, N., Yu, J., Lee, J.J., et al. (2017). The ISG15-specific protease USP18 regulates stability of PTEN. *Oncotarget* 8, 3–14.

Nguyen, T.P., Bazdar, D.A., Mudd, J.C., Lederman, M.M., Harding, C.V., Hardy, G.A., and Sieg, S.F. (2015). Interferon- α inhibits CD4 T cell responses to interleukin-7 and interleukin-2 and selectively interferes with Akt signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 97, 1139–1146.

Nguyen, T.P., Shukla, S., Asaad, R., Freeman, M.L., Lederman, M.M., Harding, C.V., and Sieg, S.F. (2016). Responsiveness to IL-7 but not to IFN- α is diminished in CD4+ T cells from treated HIV infected patients who experience poor CD4+ T-cell recovery. *AIDS* 30, 2033–2042.

Osei Kuffour, E., Schott, K., Jaguva Vasudevan, A.A., Holler, J., Schulz, W.A., Lang, P.A., Lang, K.S., Kim, B., Häussinger, D., König, R., et al. (2018). USP18 (UBP43) Abrogates p21-Mediated Inhibition of HIV-1. *J Virol* 92, e00592-18.

Osei Kuffour, E., König, R., Häussinger, D., Schulz, W.A., and Münk, C. (2019). ISG15 Deficiency Enhances HIV-1 Infection by Accumulating Misfolded p53. *MBio* 10, e01342-19.

Pacella, I., Spinelli, F.R., Severa, M., Timperi, E., Tucci, G., Zagaglioni, M., Ceccarelli, F., Rizzo, F., Coccia, E.M., Patel, R.S., et al. (2020). ISG15 protects human Tregs from interferon alpha-induced contraction in a cell-intrinsic fashion. *Clin Transl Immunology* 9, e1221.

Pedro, M.N., Rocha, G.Z., Guadagnini, D., Santos, A., Magro, D.O., Assalin, H.B., Oliveira, A.G., Pedro, R. de J., and Saad, M.J.A. (2018). Insulin Resistance in HIV-Patients: Causes and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 514.

Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601–605.

Sarasin-Filipowicz, M., Wang, X., Yan, M., Duong, F.H.T., Poli, V., Hilton, D.J., Zhang, D.-E., and Heim, M.H. (2009). Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43. *Mol Cell Biol* 29, 4841–4851.

Shive, C.L., Mudd, J.C., Funderburg, N.T., Sieg, S.F., Kyi, B., Bazdar, D.A., Mangioni, D., Gori, A., Jacobson, J.M., Brooks, A.D., et al. (2014). Inflammatory cytokines drive CD4+ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease. *J Infect Dis* 210, 619–629.

Spinelli, L., Lindsay, Y.E., and Leslie, N.R. (2015). PTEN inhibitors: an evaluation of current compounds. *Adv Biol Regul* 57, 102–111.

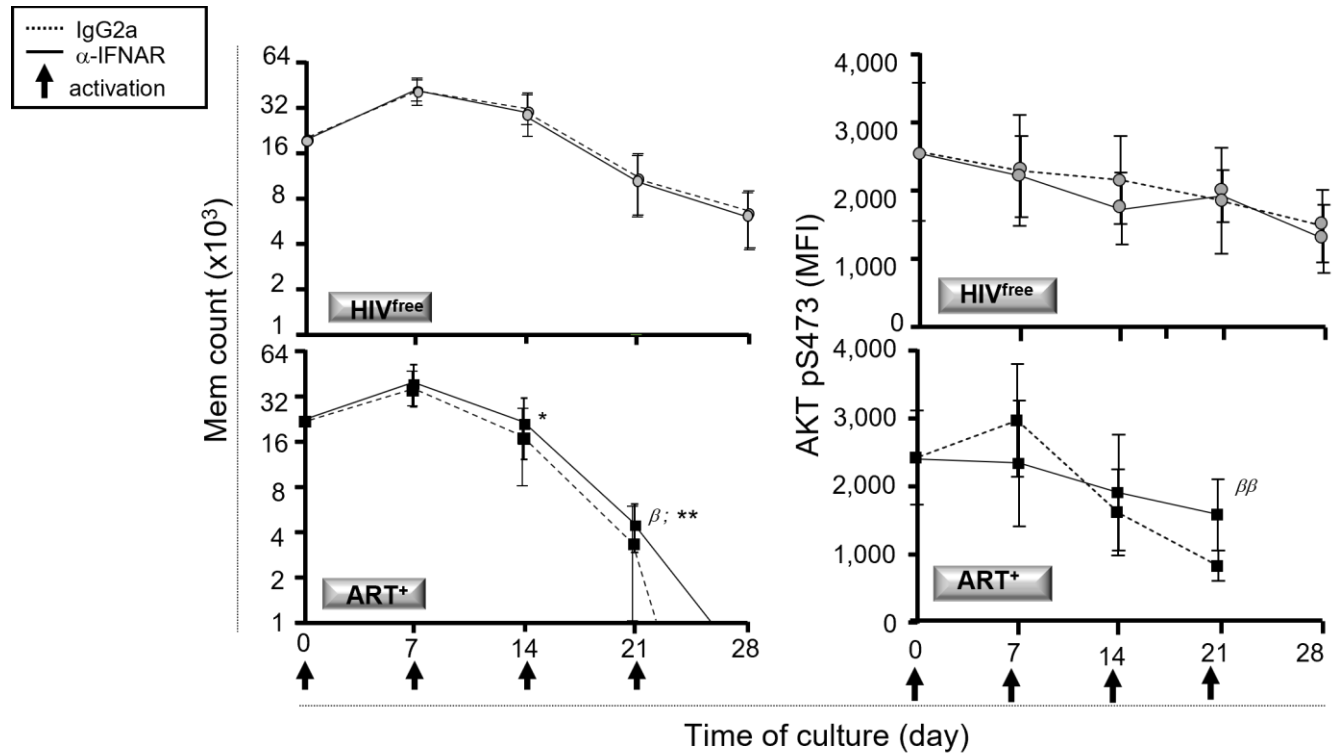
Subramanian, K.K., Jia, Y., Zhu, D., Simms, B.T., Jo, H., Hattori, H., You, J., Mizgerd, J.P., and Luo, H.R. (2007). Tumor suppressor PTEN is a physiologic suppressor of chemoattractant-mediated neutrophil functions. *Blood* 109, 4028–4037.

Sugawara, S., El-Diwany, R., Cohen, L.K., Rousseau, K.E., Williams, C.Y.K., Veenhuis, R.T., Mehta, S.H., Blankson, J.N., Thomas, D.L., Cox, A.L., et al. (2021). People with HIV-1 demonstrate type 1 interferon refractoriness associated with upregulated USP18. *J Virol* JVI.01777-20.

U.S. Food & Drug Administration. Health Service Act for Saphnelo (anifrolumab-fnia) injection. BLA 761123. Lettre d'approbation. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2021/761123Orig1s000ltr.pdf (Consulté le 15 novembre 2021)

- Tanaskovic, S., Fernandez, S., Price, P., and French, M.A. (2014). Interleukin-7 signalling defects in naive CD4+ T cells of HIV patients with CD4+ T-cell deficiency on antiretroviral therapy are associated with T-cell activation and senescence. *AIDS* 28, 821–830.
- Taylor, J.P., Cash, M.N., Santostefano, K.E., Nakanishi, M., Terada, N., and Wallet, M.A. (2018). CRISPR/Cas9 knockout of USP18 enhances type I IFN responsiveness and restricts HIV-1 infection in macrophages. *J Leukoc Biol*.
- Van der Sluis, R.M., Zerbato, J.M., Rhodes, J.W., Pascoe, R.D., Solomon, A., Kumar, N.A., Dantanarayana, A.I., Tennakoon, S., Dufloo, J., McMahan, J., et al. (2020). Diverse effects of interferon alpha on the establishment and reversal of HIV latency. *PLoS Pathog* 16, e1008151.
- Xia, C., Wolf, J.J., Sun, C., Xu, M., Studstill, C.J., Chen, J., Ngo, H., Zhu, H., and Hahm, B. (2020). PARP1 Enhances Influenza A Virus Propagation by Facilitating Degradation of Host Type I Interferon Receptor. *Journal of Virology* 94, e01572-19.
- Yang, X., Su, B., Zhang, X., Liu, Y., Wu, H., and Zhang, T. (2020). Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J Leukoc Biol* 107, 597–612.
- Younes, S.-A., Talla, A., Pereira Ribeiro, S., Saidakova, E.V., Korolevskaya, L.B., Shmagel, K.V., Shive, C.L., Freeman, M.L., Panigrahi, S., Zweig, S., et al. (2018). Cycling CD4+ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 128, 5083–5094.
- Zhao, J., Schank, M., Wang, L., Li, Z., Nguyen, L.N., Dang, X., Cao, D., Khanal, S., Nguyen, L.N.T., Thakuri, B.K.C., et al. (2021). Mitochondrial Functions Are Compromised in CD4 T Cells From ART-Controlled PLHIV. *Front Immunol* 12, 658420.
- Zhen, A., Rezek, V., Youn, C., Lam, B., Chang, N., Rick, J., Carrillo, M., Martin, H., Kasparian, S., Syed, P., et al. (2017). Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 127, 260–268.

10 ANNEXE I



Annexe I. Les Mem des ART+ traitées avec des anticorps neutralisants IFNAR démontrent une amélioration de leur persistance à 21 jours de culture

(gauche) Nombre absolu de Mem viables provenant de ART+ et HIVfree en présence ou absence d'anticorps neutralisants IFNAR. (droite) Niveaux d'AKT pS473 dans les Mem viables provenant de ART+ et HIVfree en présence ou absence d'anticorps neutralisants IFNAR. Résultats représente la moyenne de six expériences indépendantes +/- É.T. en log₂. * utilisé lors d'un test Mann-Whitney (inter-individus). β utilisé lors d'un *t* test (intra-individus).