USPC
Université Sorbonne
Paris Cité

PARIS DIDEROT

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS CITÉ

PRÉPARÉE À L'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT

École doctorale BioSPC, Bio Sorbonne Paris Cité (N° 562)

UMR 9196, CNRS/Paris 11, Gustave Roussy, Villejuif

Virologie moléculaire d'un rétrovirus endogène humain fonctionnel

Par Cécile LEMAITRE

Dirigée par le Dr. Thierry HEIDMANN, UMR9196, Gustave Roussy

Présentée et soutenue publiquement à Villejuif le 30 Septembre 2016

MEMBRES DU JURY :

Président du Jury : Pr. Sylvie VAN DER WERF
Rapporteur : Dr. Frédérick ARNAUD
Rapporteur : Dr. Jean-Luc BATTINI
Examinateur : Dr. Claudine PIQUE
Examinateur : Pr. Uriel HAZAN
Membre invité : Dr. Marie DEWANNIEUX

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les membres de mon jury, en commençant par le Pr Sylvie Van der Werf qui a accepté d'être la présidente de ce jury. Je remercie également le Dr Frédérick Arnaud et le Dr Jean-Luc Battini, mes deux rapporteurs, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aussi au Dr Claudine Pique et au Pr Uriel Hazan pour leur travail d'examinateur. J'en profite aussi pour témoigner toute ma gratitude à Uriel Hazan qui m'a initiée à la virologie à l'ENS Cachan, a toujours été très disponible et m'a donné de précieux conseils tout au long de ma scolarité, en particulier celui de me tourner vers le laboratoire de Thierry lorsque je cherchais un stage de master 2.

Je réalise qu'avoir l'opportunité de faire une thèse, d'approfondir un sujet et de continuer à apprendre est une grande chance, et je voudrais très sincèrement remercier Thierry et Marie qui m'ont formée pendant toutes ces années. Merci Thierry de m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Ta disponibilité, ton écoute et tes conseils tout au long de la thèse m'ont permis de mener à bien ce travail et de progresser aussi. Marie, je souhaite te dire toute ma reconnaissance et mon admiration. J'ai beaucoup appris avec toi, à la paillasse bien sûr, mais aussi de par nos discussions et en observant ta grande rigueur scientifique et ta curiosité. Merci pour ton humour, ton soutien, la confiance que tu m'as accordée et qui m'a permis d'avancer d'un point de vue scientifique et personnel aussi.

Une thèse est un travail très collectif…un grand merci à tous mes collègues du labo qui chacun ont contribué à la réussite de ce projet ! Seila, ton bureau a toujours été grand ouvert et tu as été très présente. Merci pour ton écoute, ta générosité, pour toutes tes attentions (les petits cœurs m'accompagnent !), les conseils que tu m'as donnés et puis toutes ces discussions, certaines plus sérieuses que d'autres…tu l'as bien compris, il fallait que tu sois là le 30 Septembre !! Anthony, ma thèse n'aurait surement pas été la même sans ta présence au labo et ton énergie communicative. Beaucoup de complicité et d'amitié pendant ces quelques années, des discussions approfondies sur tous les sujets (!) du matin autour d'un café au soir sur le quai du RER, des débats plus ou moins productifs mais dont on ne se lassera jamais (bravo au passage pour tous ces rôles de composition !!)…Merci de m'avoir écoutée, conseillée, soutenue et ce n'est pas toujours facile, j'en suis consciente !! Seb, on a partagé nos expériences de thésard ! Quel que soit le résultat de nos manips, il y a toujours eu une bonne ambiance, beaucoup de rire (grâce à tes blagues bien sûr : une pensée toute particulière au Wesh buffer), de taquinerie et de râlage (je ne pouvais pas ne pas le mentionner !) en pièce

373…heureusement qu'il existe un proverbe qui dit : « qui aime bien, châtie bien », parce qu'entre Anthony et toi et, il faut tenir le choc… Mathis, cher collègue de bureau, ta présence a été importante, stimulante et rassurante aussi. Nos discussions sont souvent l'occasion pour moi de prendre du recul. On a vécu ensemble quelques aventures un peu hors du commun et heureusement que tu étais là ! Caro, merci d'avoir partagé avec moi les joies et peines liées à HERV-K, mais aussi beaucoup de choses en dehors…la passion de la danse en particulier : salsa, bachata, kizomba, Pachanga, Rosa…Cuba ? (bientôt j'espère !) Tous ces moments de joie ont été précieux pendant la thèse et j'espère que cela va continuer ! Cécile, merci pour tes conseils (conscience des pensées, pensées positives, amour !) et ta bonne humeur au quotidien et…tes chaussures, toutes plus belles les unes que les autres ! Ta présence énergisante, au labo, à la gym (en particulier en posture sur la tête !), sur les lignes de départ du Paris-Saint-Germain ou du Paris-Versailles, a été motrice…bientôt de nouveaux défis : Mud day ? Marathon de Paris ? (mais est-ce vraiment un défi pour toi ?). Gérard, merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils et aussi pour cette fameuse relecture finale du manuscrit …qui n'était pas une mince affaire ! J'en profite aussi pour remercier Sylvie et Francis, les deux autres spécialistes du microscope électronique, qui ont participé à l'aventure de la Tetherin et cherché sans relâche les particules HERV-K dans mes échantillons ! Anne, merci pour ton enthousiasme et ton optimisme communicatifs. Ta curiosité dans beaucoup de domaines a été très agréable pendant toutes ces années ! Patrycja, ton énergie, ton sourire en toute circonstance et ta façon de prendre la vie du bon côté m'ont beaucoup marquée. J'ai aimé discuté, rigoler et même pagayer avec toi ! Grégoire, un grand merci pour tous tes conseils de lecture, de Barthes à Rolin en passant par Murakami et Nicolas Bouvier, j'ai beaucoup voyagé grâce à toi cette année ! Jhen, je suis très contente d'avoir pu travailler avec toi. Merci pour ton aide, tes conseils, nos discussions (all in English !) et les nombreux cheesecake que vous m'avez fait goûtés avec Marie. Merci Odile pour ta disponibilité et ta compagnie en particulier lors des « nocturnes » au labo. Jérôme, merci pour les articles que tu m'as envoyés, ton second degré, tes encouragements et ta volonté sans faille de me convaincre de faire un post-doc sur Ebola… Christian, ta présence et ton recul ont été importants pendant ces années, j'ai beaucoup aimé parler de science avec toi et aussi des dernières expos ou concerts à la Philharmonie. Matthieu, on s'est croisés mais même en peu de temps, j'ai pu apprécier ton humour…mes pauses café quand vous déjeuniez à la cafet à midi ont toujours été bien animées et l'occasion d'une bonne détente ! Agathe, tu es arrivée au labo à la fin de ma thèse, merci pour tes conseils, tes attentions. Corinne, merci pour ta gentillesse et ton aide. Enfin, une pensée à tous les anciens du labo, en particulier Guillaume,

mon modèle pendant les premières années de ma thèse ! Je n'oublie pas non plus tous les stagiaires qui ont contribué à la bonne ambiance générale. Raphaël, les quelques mois en ta compagnie ont été très agréables…tu as initié le mouvement vers la Taverne de la butte où nous avons passé de nombreuses et très chouettes soirées.

En dehors de l'UMR 9196, je voudrais tout particulièrement remercier Joël pour le temps qu'il m'a accordé et toutes ses connaissances, notamment en matière de signalisation cellulaire ! Merci aussi à Audrey, super collaboratrice de l'équipe de J.L. Perfetini, c'était un plaisir de travailler avec toi ! Un grand merci à l'équipe enseignante de Paris 7, surtout à Rachel et Anne qui m'ont permis d'avoir une expérience d'enseignement que j'ai adorée !

La thèse est une aventure intellectuelle…elle a été aussi bien sportive, grâce à Isabelle et Hélène, qui ont grandement contribué à mon équilibre ! Merci à vous deux pour toutes ces heures de détentes, d'étirement et de postures diverses et variées !

Parce que la thèse est un travail très prenant qui implique aussi beaucoup la vie personnelle, je voudrais en profiter pour remercier mes amis qui m'ont toujours beaucoup entourée. Liçou, amie, confidente, complice de toujours (ensemble en maternelle, ensemble en thèse !), merci d'être là, avec Andi aussi, à l'écoute, toujours attentive aux autres, en toutes circonstances. Sabine, merci pour les moments ressourçants que l'on a passés ensemble ces derniers temps, nos discussions pendant ou après nos après-midi expo. Amélie, tu m'as permis de prendre beaucoup de recul sur la thèse, m'a donné des idées pour la suite et tu es aussi une super co-joggeuse…pour l'équilibre dans nos quotidiens bien remplis ça a été important ! Armelle, les moments passés avec toi sont de vrais rayons de soleil, tu as une pêche communicative et nos rendez-vous à Orange, sur les pistes de skis ou à Paris sont toujours supers ! Un clin d'œil à Sabine, avec qui j'ai vécu des sensations fortes en khôlle de bio qui ont fait naître une grande complicité… et à Aline aussi…tout a commencé rue des Feuillantines et quelques années plus tard, on se retrouve boulevard Port Royal, le hasard fait bien les choses ! Une grosse pensée affectueuse pour tous mes BGB. Clairounette, ex super coloc, merci pour ta présence pendant ces années, nous avons beaucoup partagé, notamment la découverte des trésors de l'Argentine avec Olivier qui a été un moment marquant de la période de thèse ! Anne-Iris, je repense souvent à nos retrouvailles à la gare de Bishkek et à nos aventures kazakhes qui m'ont permis d'aborder la quatrième année de thèse pleine de vitalité et d'envies ! Didou, la viro c'est un peu toi aussi : de nos premiers pas (épiques il faut le dire) en TP à Cachan…en passant par cette fameuse analyse d'article et les cours Pasteur ! Max, tu me manques avec tes idées parfois un peu farfelues mais toujours très drôles ! Svet, Greg, je repense souvent aux killing kiwies, on était mauvais mais c'était bien quand même ! Marie et Marc, on a découvert la bio

ensemble à H4 et on ne s'est pas quittés depuis ! Nos soirées entre BGBs parisiens, notamment cette année ont vraiment participé à la réussite de cette thèse ! Une pensée aussi à Gabriel, Marie C, Lucas, Nina, Larissa, Eloaz et Soria. La thèse n'aurait pas été la même sans ces rendez-vous hebdomadaires au cours de classique de Gisèle. Mathilde, entre deux arabesques on a partagé nos expériences de labo et ça a été un soutien important. Laelia, ton énergie et ta petite dose de folie (que je partage !) m'ont très souvent fait sortir du cours avec le sourire. Une pensée enfin pour Brice, parce que c'est ensemble qu'on a vécu les premières années de nos thèses…

Un mot pour mes collègues de Londres du laboratoire de J. Stoye, en particulier Melvyn, Marta et Virginie. Ces quelques mois ont été si riches scientifiquement et humainement, je ne suis pas prête de les oublier !

Le dernier mot est pour ma famille. Papa, Maman, vous m'avez toujours soutenue, patiemment encouragée dans tous mes projets, si bien comprise et poussée à aller plus loin. J'admire votre grande curiosité, votre goût pour la connaissance, votre générosité …cette thèse c'est aussi grâce à vous, elle vous est dédiée. Jul et Lou, mes deux sœurs adorées, merci pour votre soutien sans faille (pas facile parfois d'avoir une grande sœur un peu…foldingue !), cette si grande complicité et tout le reste… Un grand merci enfin à Mam, Max, Pépé, Any, Nicole, Hélène, Fred, Julie, Marie, Léonard, Françoise, Jean-Phi, Ant, Quent, Kévin, Bernadette, Christophe, avec qui je partage tant et qui ont rendu l'aventure de la thèse plus douce.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES 6
LISTE DES ABRÉVIATIONS 10
TABLE DES FIGURES 16

INTRODUCTION 17
PRÉAMBULE 18
CHAPITRE 1 : Caractéristiques générales des rétrovirus infectieux 21
1. Présentation des rétrovirus infectieux 21
1.1 Quelques éléments sur la découverte des rétrovirus 21
1.2 Structure type d'une particule rétrovirale et éléments de classification 22
1.3 Organisation génétique d'un rétrovirus 25
1.4 Protéines codées par les ORF 27
1.4.1 Les protéines structurales 27
1.4.1.1 La polyprotéine Gag 27
1.4.1.2 La protéine d'enveloppe 28
1.4.2 Les enzymes virales 28
1.4.2.1 Pro 28
1.4.2.2 Pol 29
1.4.2.3 La dUTPase 31
1.4.3 Les protéines accessoires 31
2. L'enveloppe rétrovirale : une protéine structurale aux rôles variés 33
2.1 Structure de la protéine d'enveloppe (modèle des gammarétrovirus) 33
2.2 Synthèse et maturation de la protéine d'enveloppe 36
2.3 Fonctions liées à l'entrée dans la cellule cible 37
2.3.1 Interaction des enveloppes rétrovirales avec des récepteurs spécifiques 37
2.3.2 Fusion des membranes virale et cellulaire 39
2.3.3 Fusion cellule-cellule viro-induite et formation de syncytia 42
2.4 Fonctions non canoniques de l'enveloppe rétrovirale 43
2.4.1 Immunosuppression 43
2.4.2 Transformation cellulaire 45
3. La réplication des rétrovirus 46
3.1 Etapes précoces du cycle de réplication 47
3.1.1 Entrée du rétrovirus dans la cellule cible 47
3.1.2 Transcription inverse 47
3.1.3 Décapsidation 47
3.1.4 Entrée dans le noyau 49
3.2 Intégration de l'ADN du rétrovirus dans le génome de l'hôte 49
3.3 Etapes tardives du cycle de réplication 50
3.3.1 Expression de l'ADN proviral 50
3.3.1.1 Transcription 50
3.3.1.2 Traduction 50
3.3.2 Assemblage de la particule virale 51
3.3.3 Bourgeonnement 53
3.3.4 Maturation des particules virales 53
3.3.5 Transmission des rétrovirus 54
CHAPITRE 2 : Origine et diversité des rétrovirus endogènes 55
1. Découverte des rétrovirus endogènes 55
2. Diversités structurale et phylogénétique des séquences d'ERV 56
3. Acquisition et amplification des ERV 59
4. Datation et devenir des ERV, le cas particulier des HERV 61
4.1 Méthodes de datation 61
4.2 Devenir des ERV 62

4.3 Le cas particulier des rétrovirus endogènes humains (HERV) 63
5. HERV-K(HML2) : une famille récente avec des représentants quasi-fonctionnels 67
5.1 La famille HML2 dans les génomes humains 67
5.2 Reconstitution de progéniteurs HERV-K(HML2) : étude systématique de la structure et des propriétés de la famille HERV-K(HML2) 70
5.2.1 Reconstruction indépendante de trois provirus HERV-K(HML2) ancestraux 70
5.2.1.1 Deux provirus consensus : Phoenix et HERV-K_{CON} 70
5.2.1.2 Un clone moléculaire « ressuscité » à partir de HERV-K 113 : oriHERV-K113 72
5.2.1.3 Vérification de l'expression protéique des différents éléments ancestraux 73
5.2.2 Les enseignements tirés de ces reconstructions 73
5.2.2.1 Les provirus consensus sont infectieux mais avec des titres très bas 73
5.2.2.2 L'amplification de HERV-K(HML2) se fait par réinfection 75
5.2.2.3 Trois recombinaisons sont suffisantes pour générer un clone infectieux *in vivo* 75
5.2.2.4 Les étapes tardives du cycle de réplication de HERV-K(HML2) présentent des particularités 76
5.3 Etude des propriétés des protéines d'enveloppe HERV-K(HML2) 76
5.3.1 Identification d'une enveloppe endogène fonctionnelle 76
5.3.2 Modulation des propriétés fonctionnelles de Env HERV-K(HML2) par troncation de sa queue cytoplasmique 77
5.3.3 Etude du tropisme de l'enveloppe HERV-K(HML2) 78
5.4 Deux protéines originales produites à partir de la protéine Env HERV-K(HML2) : Rec et le peptide signal 80
5.4.1 La protéine accessoire Rec 80
5.4.2 Le peptide signal 81
5.5 Existence de trois autres bétarétrovirus : MMTV, JSRV et ENTV 82
5.5.1 Présentation de MMTV, JSRV et ENTV, trois rétrovirus oncogènes chez leurs hôtes respectifs 82
5.5.2 Existence de copies endogènes de MMTV et JSRV 84
5.5.3 MMTV et JSRV sont des rétrovirus complexes 85
5.5.4 L'entrée de MMTV, JSRV et ENTV dans les cellules cibles est dépendante du pH 86
CHAPITRE 3 : Les rétrovirus endogènes, des éléments sous le contrôle de leur hôte 89
1. Le contrôle de l'expression des ERV 89
1.1 Les modifications épigénétiques 89
1.2 Les ARN régulateurs 91
2. Le contrôle de la réplication des ERV par les facteurs de restriction cellulaires 92
2.1 Des facteurs de restriction d'origine virale 93
2.1.1 Fv1 : le prototype 93
2.1.2 Protéines d'enveloppe interférentes 94
2.1.3 enJSRV 94
2.1.4 La suppressyn humaine, un candidat facteur de restriction 96
2.2 TRIM5alpha 96
2.3 Les protéines APOBEC3 97
2.4 MOV10 99
2.5 Les protéines IFITM et SERINC3/5 99
3. La Tetherin : un facteur de restriction au spectre très large 100
3.1 Découverte 100
3.2 Structure et localisation 102
3.3 Expression et induction 104
3.4 Rôle antiviral 104
3.5 Rôle de senseur et de régulateur des réponses immunes antivirales 106
3.6 Diversité des Tetherin 107
3.7 Les antagonistes viraux de la Tetherin 109
3.7.1 Des protéines accessoires en tant qu'antagonistes 109
3.7.1.1 Nef SIV 109
3.7.1.2 Vpu HIV-1 110
3.7.2 Des glycoprotéines d'enveloppe en tant qu'antagonistes 111
3.7.3 Autres protéines virales antagonistes de la Tetherin 113
3.8 Autres rôles de la Tetherin 114
3.9 Importance de la Tetherin *in vivo* 114

4. Régulation de la réplication des ERV par les réponses immunitaires innées et adaptatives 115
4.1 La reconnaissance des ERV par le système immunitaire (SI) inné 115
4.1.1 Les PRR (pathogen recognition receptor) 115
4.1.2 Les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques 116
4.2 Le statut des ERV par rapport au système immunitaire adaptatif 117
5. Réactivation des ERV 118
CHAPITRE 4 : Conséquences physiopathologiques de la présence et de l'expression des ERV au sein des cellules de l'hôte 121
1. Conséquences de la présence des séquences d'ERV dans les génomes 121
1.1 Conséquences délétères de néo-insertions d'ERV (exemples chez la souris) 121
1.2 Conséquences bénéfiques de la présence des ERV sur les gènes adjacents (exemples chez la souris et l'homme) 122
2. Rôle physiologique fondamental des protéines d'enveloppe de différents ERV dans la placentation 123
2.1 Les syncytines 123
2.2 Autres enveloppes impliquées dans la placentation 125
3. Expression des ERV et cancers 126
3.1 Rétrovirus exogènes/endogènes et cancers : le contexte 126
3.1.1 Rétrovirus exogènes et cancers 126
3.1.2 Rétrovirus endogènes et cancers : les leçons tirées de l'étude des modèles animaux 128
3.1.3 Rétrovirus endogènes humains et cancers : quelques considérations évolutives 129
3.2 Les HERV comme marqueurs dans les cancers : illustration avec la famille HERV-K(HML2) 131
3.2.1 HERV-K(HML2) et tumeurs germinales (GCT) 131
3.2.2 HERV-K(HML2) et mélanome 132
3.2.3 HERV-K(HML2) et cancer du sein 134
3.3 Les HERV dans les cancers : rôle causal possible 135
3.3.1 Mutagenèse insertionnelle 135
3.3.2 Protéines oncogéniques codées par les HERV 135
3.3.3 Immunomodulation induite par les HERV 137
3.3.4 HERV et exosomes 138
3.4 Les propriétés oncogéniques de l'enveloppe JSRV : modèle possible pour l'étude des propriétés de l'enveloppe HERV-K(HML2) 138
3.4.1 L'enveloppe rétrovirale comme oncogène 138
3.4.2 Les voies de signalisation impliquées dans la transformation cellulaire médiée par l'enveloppe JSRV 139
3.4.2.1 La voie PI3K-Akt 139
3.4.2.2 La voie des MAP kinases 140
3.4.2.3 Interaction de l'Env JSRV avec son récepteur HYAL-2 141
3.4.2.4 Autres voies de signalisation impliquées 141
3.4.3 Pertinence des modèles cellulaires pour l'étude de la transformation médiée par l'Env JSRV 142
3.4.4 Les domaines de l'enveloppe JSRV impliqués dans la transformation cellulaire 143
3.4.4.1 Importance de la queue cytoplasmique 143
3.4.4.2 Rôle de la SU 143
3.4.5 Les cibles précoces de l'enveloppe JSRV 146
3.5 Expression de protéines d'HERV dans les cancers et potentiel thérapeutique 146
4. Expression des HERV et autres pathologies 149
4.1 HERV et maladies auto-immunes 149
4.1.1 Expression des HERV en contexte auto-immun 149
4.1.2 Différents mécanismes possibles 149
4.2 HERV et maladies neurologiques 150
4.2.1 Exemple de la sclérose en plaque (SEP ou MS) 151
4.2.2 Exemple de la schizophrénie (SCZ) 152
4.2.3 Exemple de la maladie de Charcot (ou ALS) 152
4.3 HERV et maladies infectieuses 153
OBJECTIFS DE LA THÈSE 155

RÉSULTATS 156
CHAPITRE 1 : La protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) et ses propriétés d'antagoniste d'un facteur de restriction cellulaire 157
1. Résumé de l'article 1 157
2. Article 1 : The HERV-K human endogenous retrovirus envelope protein antagonizes Tetherin antiviral activity 159
CHAPITRE 2 : La protéine d'enveloppe et ses propriétés oncogéniques 173
1. Résumé de l'article 2 173
2. Article 2 : The HERV-K(HML2) envelope protein possesses oncogenic properties 176
DISCUSSION 213
DISCUSSION 214
1. La protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) et ses propriétés d'antagoniste d'un facteur de restriction cellulaire 214
1.1 Un antagoniste d'origine endogène 214
1.2 Les domaines de l'enveloppe impliqués dans l'action anti-Tetherin 217
1.2.1 Le domaine d'interaction avec la Tetherin 217
1.2.2 Les domaines de l'enveloppe HERV-K(HML2) impliqués spécifiquement dans l'effet anti-Tetherin 218
1.2.3 Le rôle de la protéine accessoire Rec 219
1.3 Un mécanisme d'action original 220
1.4 Autres rôles de la Tetherin et potentielles implications physiopathologiques de l'interaction Env HERV-K(HML2) /Tetherin 221
1.4.1 Le rôle immunomodulateur de la Tetherin 221
1.4.2 Tetherin, Env HERV-K(HML2) et cancers 222
2. La protéine d'enveloppe et ses propriétés oncogéniques 223
2.1 L'enveloppe HERV-K(HML2) active la voie des MAP kinases, comme l'oncogène Env JSRV 223
2.1.1 Induction de la phosphorylation de ERK 1/2 et de p38 223
2.1.2 Induction de facteurs de transcription impliqués dans la transformation cellulaire 226
2.2 Les domaines de l'enveloppe HERV-K(HML2) impliqués dans l'activation de la transduction du signal 228
2.2.1 Importance de la queue cytoplasmique de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans la transduction du signal 228
2.2.2 Le rôle de Rec dans la transduction du signal 229
2.2.3 Le rôle du récepteur de l'enveloppe HERV-K(HML2) 230
2.3 L'enveloppe HERV-K(HML2) induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans le modèle des cellules MCF10A 231
2.4 Les propriétés oncogéniques de l'enveloppe HERV-K(HML2) et son statut d'endogène 233
2.5 Enveloppe HERV-K(HML2) et pathogenèse *in vivo* 233
2.5.1 Cancers et résistance aux traitements 233
2.5.2 Perspectives thérapeutiques 234
2.5.3 Enveloppe HERV-K(HML2) et autres situations physio-pathologiques 235
CONCLUSION GÉNÉRALE 236
BIBLIOGRAPHIE 238

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

AAV6 : adeno-associated virus type 6
ADCC : antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity
Agm : african green monkey
AGS : Aicardi-Goutières syndrome
AHV : avian hemangioma virus
AIM2 : absent in melanoma 2
ALS : amyotrophic lateral sclerosis
ALV : avian leukosis virus
APOBEC : apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
AR : androgen receptor
AR : arthrite rhumatoïde
ASCT2 : ASC amino-acid transporter 2
ASLV : avian sarcoma leucosis virus
ATL : adult T-cell leukemia/lymphoma

B

BFV : Barmah forest virus
BLV : bovine leukemia virus
BST2 : bone marrow stromal cell antigen 2

C

c-onc : cellular oncogene
CA : capside
CaMKK : calcium/calmodulin dépendant kinase
CAR : chimeric antigen receptor
CD4 : cluster of differenciation 4
CERV : chimpanzee endogenous retrovirus
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : cytomegalovirus
Cpz : chimpanzee
cPPT : central PPT
CT : cytoplasmic tail
CT : cytotrophoblaste
CTL : cytotoxic T lymphocyte
CUL4 : cullin 4
CXCL10 : C-X-C chemokine 10

D

DC : dendritic cell
DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DUSP6 : dual specificity phosphatase 6

E

E-Cadh : E (Epithelial)-cadherin
EBV : Epstein-Barr virus
EGFR : epidermal growth factor receptor
EGR1 : early growth response 1
EIAV : equine infectious anemia virus
EMT : epithelial mesenchymal transition
enJSRV : endogenous JSRV
ENTV : enzootic nasal tumor virus
Env : envelope
Epo : erythropoietin
Epo-R : erythropoietin receptor
ERE : estrogen responsive element
ERK : extracellular signal-regulated kinases
ERV : endogenous retrovirus
ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport
ETV4 : ETS variant 4
ETV5 : ETS variant 5

F

F : fusion peptide
FeLV : feline leukemia virus
FFV : feline foamy virus
FIV : feline immunodeficiency virus

G

Gag : group specific antigen
GaLV : gibbon-ape leukemia virus
GCT : germ cell tumor
gor : gorilla
GP : glycoprotein
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRE : glucocorticoid responsive element
gsn : greater spot-nosed (monkey)

H

HA : hemmaglutinin
HBV : hepatitis B virus
HBx : hepatitis B protein x
HC : hydrocortisone
HCV : hepatitis C virus
HERV : human endogenous retrovirus
HHV8 : human herpes virus 8
HIV : human immunodeficiency virus
HLA : human leukocyte antigen
HML : human MMTV-like

HN : hemmaglutinin neuraminidase
HPV : human papilloma virus
HRES-1 : HTLV related endogenous sequence 1
HSV : herpes simplex virus
HTDV : human teratocarcinoma-derived virus
HTLV : human-T lymphotropic virus
HYAL-2 : hyaluronidase 2

I

IAP : intracisternal A particles
IAPE : intracisternal A particles elements with an envelope
ICAM : intercellular adhesion molecule 1
ICP0 : infected cell polypeptide 0
ICTV : international committee on taxonomy of viruses
ID : inhibitor of DNA binding protein
IDDM : insulin-dependant diabetes mellitus
IdU : 5-iodo-2'-désoxyuridine
IE1 : intermediate early 1
IFN I : type 1 interferon
IFNG : gamma interferon
IFNT : tau interferon
IL6 : interleukin 6
IN : integrase
IRES : internal ribosome entry site
ISD : immunosuppressive domain
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J

JLR : JSRV late restriction
JSRV : Jaagsiekte sheep retrovirus

K

KO : knock-out
KoRV-A : koala retrovirus A
KSHV : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

L

LED : lupus érythémateux disséminé
LFA-1 : leukocyte function-associated antigen-1
LINE : long interspersed repeated element
LTR : long terminal repeat

M

MA : matrix
mac : macaque

MAPK : mitogen-activated protein kinases
MAVS : mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA-5 : melanoma differentiation-associated protein 5
MDCK : Madin-Darby canine kidney cells
MDEV : *Mus dunni* endogenous virus
MelARV : murine melanoma associated retrovirus
MFSD2 : major facilitator superfamily domain-containing protein 2
MHR : major homology region
MITF : microphthalmia-associated transcription factor
MLV : murine leukemia virus
MMP : matrix metalloproteinase
MMTV : mouse mammary tumour virus
MoMLV : Moloney murine leukemia virus
mon : mona (monkey)
MPLV : myeloproliferative leukemia virus
MPMV : Mason Pfizer monkey virus
MSRV : multiple sclerosis-associated retrovirus
mTOR : mammalian target of rapamycin

N

N-Cadh : N (Neural)-cadherin
NC : nucleocapsid
Nef : negative regulatory factor
NES : nuclear export signal
NF-kB : nuclear factor kappa B
NHEJ : non homologous end joining
NK : natural killer
NLS : nuclear localisation signal

O

oBST2 : ovine BST2
OPA : ovine pulmonary adenocarcinoma
ORF : open reading frame

P

PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PBS : primer binding site
PCR : polymerase chain reaction
pDC : plasmacytoid dendritic cell
PERV : porcine endogenous retrovirus
PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIC : pre-integration complex
PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
piRNA: piwi RNA
PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger protein
Pol : polymerase
PPT : poly purine tract

PRE : progesterone responsive element
Pro : protease
PRR : pathogen recognition receptor

R

RALBP1 : ralA binding protein 1
RBD : receptor binding domain
RcRE : Rec responsive element
RDR: RD-114 and D-type retrovirus receptor
RE : réticulum endoplasmique
RER : réticulum endoplasmique rugueux
Rev : regulator of expression of virion
RIG-I : retinoic acid-inducible gene 1
RON: macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
RRE : Rev responsive element
RSV : Rous sarcoma virus
RT : reverse transcriptase/transcription
RTC : reverse transcription complex

S

SA : splice acceptor
Sag : superantigen
SAMHD1 : SAM domain and HD domain-containing protein 1
SARS : severe acute respiratory syndrome
SCZ : Schizophrenia
SD : splice donor
SEP : sclérose en plaque (en anglais : MS pour multiple sclerosis)
SFFV : spleen focus-forming virus
SFV : simian foamy virus
SI : système immunitaire
SINE : short interspersed repeated element
SIV : simian immunodeficiency virus
SLE : systemic lupus erythematosus
sm : sooty mangabey (monkey)
SRP : signal recognition particle
+sssDNA: plus-strand strong-stop DNA
STING : stimulator of interferon gene
SU : surface

T

TAA : tumour associated antigen
Tan : tantalus (monkey)
TAR : trans-activation response element
Tat : transactivator
Tax : transactivator of pX
TCA : testis cancer antigen

TCR : T-cell receptor
TE : transposable element
TfR1 : transferrin receptor 1
TGN : trans Golgi network
TLR : toll-like receptor
TM : transmembrane
TREX1 : three prime repair exonuclease 1
TRIM : tripartite motif
TSD : target duplication site

V

v-onc : viral oncogene
Vif : virion infectivity factor
VLP : virus like particle
Vpr : viral protein r
Vpu : viral protein u
Vpx : viral protein x
VSV : vesicular stomatitis virus
VT : villous cytotrophoblast

W

WDSV : Walleye dermal sarcoma virus

Z

ZCCHC12 : zinc finger CCHC-type containing 12

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Mécanisme d'amplification d'un rétrotransposon....18
Figure 2. Structure schématique des différents rétrotransposons de mammifères....19
Figure 3. Structure générale d'un provirus et d'une particule rétrovirale....23
Figure 4. Diversité des familles rétrovirales....24
Figure 5. Représentation schématique de la glycoprotéine d'enveloppe d'un gammarétrovirus....33
Figure 6. Quelques exemples de récepteurs de rétrovirus caractérisés à ce jour....38
Figure 7. La fusion membranaire induite par l'enveloppe rétrovirale....41
Figure 8. Les propriétés immunosuppressives des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirale....44
Figure 9. Cycle de réplication des rétrovirus infectieux....46
Figure 10. Les différentes étapes de la transcription inverse d'un rétrovirus....48
Figure 11. Diversité des rétrovirus endogènes....56
Figure 12. Endogénéisation d'un rétrovirus....59
Figure 13. Devenir des rétrovirus endogènes....62
Figure 14. Evolution des HERV chez les primates....66
Figure 15. Les deux types de provirus HERV-K(HML2) dans les génomes humains....67
Figure 16. Reconstitution de Phoenix, progéniteur infectieux putatif de la famille HERV-K(HML2)....71
Figure 17. Etude des propriétés des protéines d'enveloppe HERV-K(HML2) endogènes spécifiquement humaines....77
Figure 18. Le tropisme large de l'enveloppe HERV-K(HML2) consensus....79
Figure 19. Les facteurs de restriction cellulaires dans le cycle de multiplication d'un rétrovirus....92
Figure 20. La Tetherin/BST2, structure et fonction antivirale....103
Figure 21. Caractéristiques des principaux antagonistes de la Tetherin/BST2....113
Figure 22. Transcriptome des gènes d'enveloppe endogènes codants du génome humain....123
Figure 23. Les Syncytines humaines et leur implication dans le développement placentaire....124
Figure 24. Tableau récapitulatif des principales associations entre la famille HERV-K(HML2) et les cancers....131
Figure 25. Activité oncogénique de l'enveloppe infectieuse JSRV....145
Figure 26. Cancers et mutations dans la voie de signalisation ERK....223
Figure 27. Hypothèses sur les voies d'activation parallèles de ERK par l'enveloppe HERV-K(HML2)....225
Figure 28. Les queues cytoplasmiques des enveloppes HERV-K(HML2) et JSRV....228
Figure 29. Le modèle du rhéostat....232
Figure 30. Bilan sur le rôle des différents domaines fonctionnels de l'enveloppe HERV-K(HML2)....236

INTRODUCTION

PRÉAMBULE

Les génomes eucaryotes possèdent des séquences répétées en proportions variables, souvent en excès par rapport au nombre de séquences codantes. Le séquençage du génome humain a ainsi révélé que son contenu en séquences codantes n'excédait pas les 5% alors que près de la moitié du matériel génétique correspond à des séquences répétées. Certaines d'entre elles sont organisées en tandem et jouent un rôle structural dans l'organisation des chromosomes. C'est le cas des centromères et des télomères, qui protègent et structurent les chromosomes au cours du cycle cellulaire. D'autres séquences répétées sont dispersées de façon aléatoire dans l'ADN, c'est le cas des éléments transposables (TE). Mobiles et capables d'amplification au sein du génome, ces séquences sont classées en deux grandes catégories :

- Les transposons de type II (ou transposons à ADN), dont la mobilité est assurée par un mécanisme de « couper-coller », c'est à dire d'excision de l'élément suivie de la réinsertion de l'ADN libéré à un autre locus.
- Les transposons de type I (ou rétrotransposons), dont la mobilité requiert un intermédiaire ARN et une étape de transcription inverse de l'ARN en ADN double brin, celui-ci s'insèrant ensuite à un nouveau locus (Fig. 1).

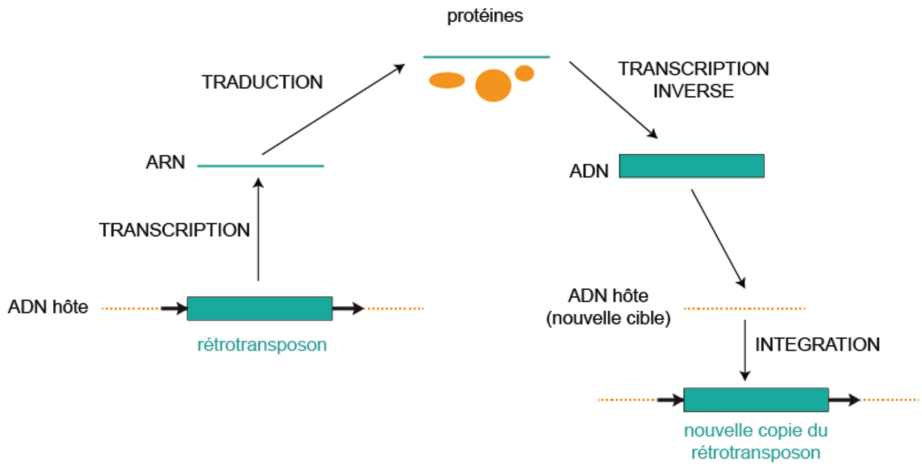


Figure 1. Mécanisme d'amplification d'un rétrotransposon
Les éléments transposables du génome sont transcrits, comme les autres gènes, par la machinerie cellulaire de l'organisme hôte. Les ARN messagers servent de matrice pour la synthèse de protéines des rétrotransposons. Celles-ci catalysent la transcription inverse de l'ARN génomique du rétrotransposon en ADN. Cet ADN est ensuite intégré à un nouveau locus du génome et peut continuer à se multiplier par le même mécanisme.

Chez les mammifères, les transposons à ADN sont peu nombreux et très dégénérés, ce qui s'explique par l'absence d'amplification récente et la dégénérescence concomitante des éléments ancestraux, en l'absence de pression de sélection pour leur conservation. Par contre, les données de séquençage obtenues pour les génomes de l'homme et de la souris ont mis en évidence la grande part qu'y représentent les rétrotransposons, avec presque 40% de l'ADN total. Ces rétrotransposons peuvent à leur tour être subdivisés en deux catégories (Fig. 2) :

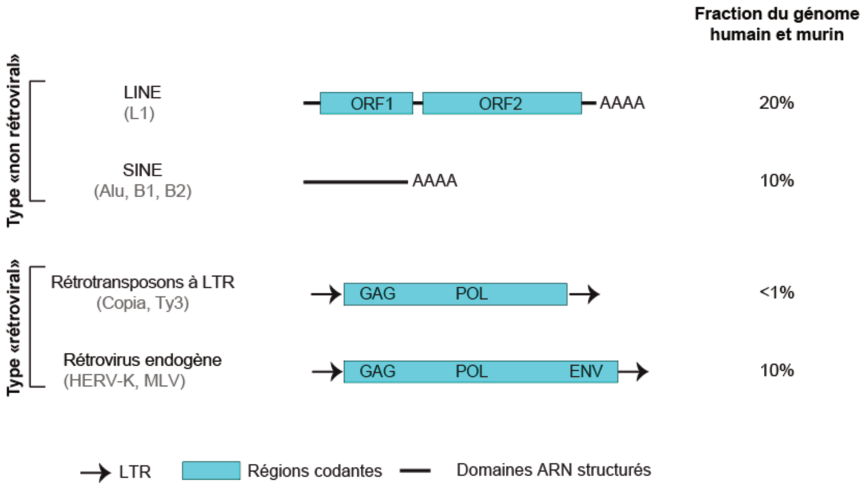


Figure 2. Structure schématique des différents rétrotransposons de mammifères
On distingue deux classes de rétrotransposons dans les génomes : les rétrotransposons de type non rétroviral, qui ne possèdent pas de LTR et dont les LINE et les SINE sont les deux grands représentants et les rétrotransposons de type rétroviral, qui regroupent les rétrotransposons à LTR et les rétrovirus endogènes. Les structures représentées ici sont très schématiques et correspondent à l'organisation générale de ces éléments. Quelques exemples caractéristiques de chaque classe sont cités (à gauche, en gris). L'abondance approximative de ces différents éléments dans les génomes humain et murin est indiquée à droite du schéma.

- Les rétrotransposons de type non rétroviral, qui ne possèdent pas de LTR, parmi lesquels on distingue des éléments autonomes comme les LINE (Long INterspersed repeated Elements) et des éléments non autonomes comme les SINE (Short Interspersed repeated Elements), qui utilisent la machinerie des LINE pour transposer au sein des génomes.
- Les rétrotransposons de type rétroviral qui regroupent les rétrotransposons à LTR et les rétrovirus endogènes (ou ERV), deux types d'éléments dont la structure est très proche de la forme provirale intégrée des rétrovirus infectieux mais qui ont des origines phylogénétiques différentes. Les rétrotransposons à LTR sont présents chez l'ensemble des eucaryotes et possèdent deux gènes homologues aux *gag* et *pol* des rétrovirus, encadrés par deux séquences répétées de type LTR. La majorité d'entre eux sont dépourvus du gène d'enveloppe (*env*). Sur les arbres phylogénétiques, les ERV forment

un groupe à part. Ils possèdent la plupart du temps une enveloppe et appartiennent à la famille des rétrovirus. Ils sont directement issus de « l'endogénéisation » de rétrovirus infectieux, suite à une infection de la lignée germinale. Ils ont également une distribution beaucoup plus restreinte que les rétrotransposons à LTR puisqu'on ne les retrouve que chez les Vertébrés.

Notre étude va porter essentiellement sur cette dernière catégorie d'éléments, les rétrovirus endogènes. S'ils ont longtemps été considérés comme des parasites du génome, voire qualifiés « d'ADN poubelle », on sait à présent, notamment depuis l'avènement de la biologie moléculaire et le développement des méthodes de séquençage à haut débit, qu'ils renferment une quantité importante d'informations sur l'évolution des génomes et qu'ils ont un impact important - positif ou négatif- sur la biologie de leurs hôtes.

L'introduction qui suit présente le contexte dans lequel s'est inscrit ce travail de thèse. Dans un premier chapitre, nous évoquerons les rétrovirus infectieux ou « exogènes », en insistant sur la glycoprotéine d'enveloppe (synthèse, structure, fonction) dont certaines propriétés particulières ont été étudiées au laboratoire et à travers ce travail de thèse en particulier. Dans un deuxième chapitre, nous parlerons des rétrovirus endogènes et montrerons à la fois leur proximité avec les rétrovirus exogènes, leur originalité et leur diversité. Nous insisterons sur le cas particulier des rétrovirus endogènes humains (HERV) afin de présenter la famille d'éléments HERV-K(HML2) dont il est question dans cette thèse. Dans un troisième chapitre nous décrirons le contrôle exercé par l'hôte sur ces éléments endogènes, en particulier à travers la description de protéines cellulaires, les facteurs de restriction. Le quatrième et dernier chapitre de l'introduction sera consacré aux conséquences biologiques de la présence et de l'expression des ERV dans les cellules. Nous illustrerons à cette occasion l'ambivalence de ces éléments, à la fois essentiels pour la physiologie de l'hôte mais parfois pathogènes (l'association HERV-cancers sera particulièrement détaillée). Bien que cette thèse porte sur un rétrovirus endogène humain, nous donnerons des exemples chez d'autres hôtes afin d'illustrer au mieux la diversité et la complexité de cette classe d'éléments du génome. HERV-K(HML2) est notamment très proche des rétrovirus ovin et murin, JSRV et MMTV, à la fois infectieux et endogènes, des comparaisons entre ces trois éléments seront donc souvent effectuées.

CHAPITRE 1 : Caractéristiques générales des rétrovirus infectieux

1. Présentation des rétrovirus infectieux

1.1 Quelques éléments sur la découverte des rétrovirus

Le terme rétrovirus est apparu bien après les premières descriptions de pathologies rétrovirales. En effet, les premiers cas de leucoses bovines et tumeurs pulmonaires associées au virus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) ont été décrits au cours du 19ème siècle. En 1904, Vallée et Carré ont montré que l'anémie équine était transmissible et que son agent- dont on connaît à présent l'identité lentivirale- était de nature filtrable. En 1908, Ellermann et Bang ont réussi à transmettre l'érythroleucémie du poulet et ont ainsi ouvert la voie de la caractérisation des rétrovirus oncogènes. Quelques années plus tard, en 1911, Rous a décrit la possibilité de transfert par filtrat du sarcome chez le poulet et l'agent transmissible associé a été appelé RSV, du nom de son découvreur (pour Rous Sarcoma Virus). Un pas important vers la compréhension de la nature de ces agents infectieux a été fait en 1961 par Rous qui a montré que les particules présentes dans les filtrats contenaient de l'ARN. C'est ainsi que les rétrovirus oncogènes ont été qualifiés de virus à ARN causant des tumeurs. Cette nouvelle donnée était en apparence contradictoire avec le fait que le phénotype transformé des cellules infectées par le RSV soit stable même après de nombreuses mitoses. Cela a mené Howard Temin à postuler que dans la cellule infectée, le génome ARN du RSV était copié en ADN, ce dernier s'intégrant dans les chromosomes de l'hôte. Temin a appelé ce nouveau concept « hypothèse du provirus » par analogie à la forme prophage intégré du bactériophage tempéré. Le principe d'une intégration de l'ADN des virus tumorigènes dans les cellules somatiques transformées a été beaucoup débattu pour être finalement formellement démontré en 1968. En 1970, la mise en évidence par Baltimore, Temin et Mizutani de l'enzyme transcriptase inverse a donné un éclairage nouveau à l'ensemble des observations réalisées jusqu'alors. Cette découverte a eu des conséquences importantes en entraînant notamment un renversement du Dogme Central de la Biologie Moléculaire, selon lequel l'information génétique dans la cellule est transmise de façon unidirectionnelle de l'ADN vers la protéine en passant par l'ARN. Plus généralement, l'étude des rétrovirus a permis d'avancer dans la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires (e.g. prolifération cellulaire, contrôle du cycle cellulaire, oncogenèse) et de mettre en place des outils pour les biotechnologies et la thérapie génique. Dans cette première partie, nous illustrerons la diversité des rétrovirus, présenterons leur structure et détaillerons les différentes protéines qu'ils codent.

1.2 Structure type d'une particule rétrovirale et éléments de classification

Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui présentent un génome constitué de deux brins identiques d'ARN de polarité positive (taille variant de 5 à 11 kb), reliés entre eux par de nombreuses interactions faibles (Fig. 3). L'acide nucléique est protégé par une coque protéique, la capside. L'enveloppe virale est de nature lipidique et issue de la membrane plasmique de la cellule infectée. A sa surface, des glycoprotéines d'origine virale sont présentes et forment les spicules. Les rétrovirus infectent toutes les espèces de vertébrés. Leur nom souligne la caractéristique majeure de la famille : l'ARN viral, une fois entré dans la cellule sert de matrice pour la transcription inverse (catalysée par une enzyme virale, la transcriptase inverse). La particule rétrovirale, à symétrie icosahédrique, présente un diamètre compris entre 80 et 100 nm. Sa morphologie, observée en microscopie électronique, a déterminé une classification des rétrovirus en 4 groupes (A, B, C et D) (Fig. 4) :

- Les particules des rétrovirus de type A sont : immatures, non enveloppées et non infectieuses et uniquement observées à l'intérieur des cellules. Elles bourgeonnent et s'accumulent au sein du réticulum endoplasmique. Elles sont issues de rétroéléments comme les IAP (Intracisternal A-type particles) chez la souris.
- Les particules des rétrovirus de type B sont : enveloppées, extracellulaires, et présentent un cœur sphérique condensé et acentrique. Leur cœur est assemblé dans le cytoplasme puis transporté à la membrane plasmique où la particule est enveloppée et relarguée. L'enveloppe lipidique du virion porte des spicules de protéines d'enveloppe proéminentes (ex : MMTV).
- Les particules des rétrovirus de type C, comme celles de type B, sont : extracellulaires, enveloppées, mais ont un cœur sphérique centré et les spicules sont peu visibles. Elles s'assemblent à la membrane plasmique. La plupart des rétrovirus mammifères et aviaires (MLV, ALV, HTLV, HIV) présentent ce type de morphologie.
- Les particules des rétrovirus de type D sont également proches de celles de type B et souvent légèrement plus grandes (jusqu'à 120 nm). Elles s'assemblent, comme les types B, en intracytoplasmique et sont relarguées à la membrane plasmique. Elles sont formées d'un cœur cylindrique et présentent des spicules moins proéminentes que les particules de type B (ex : MPMV).

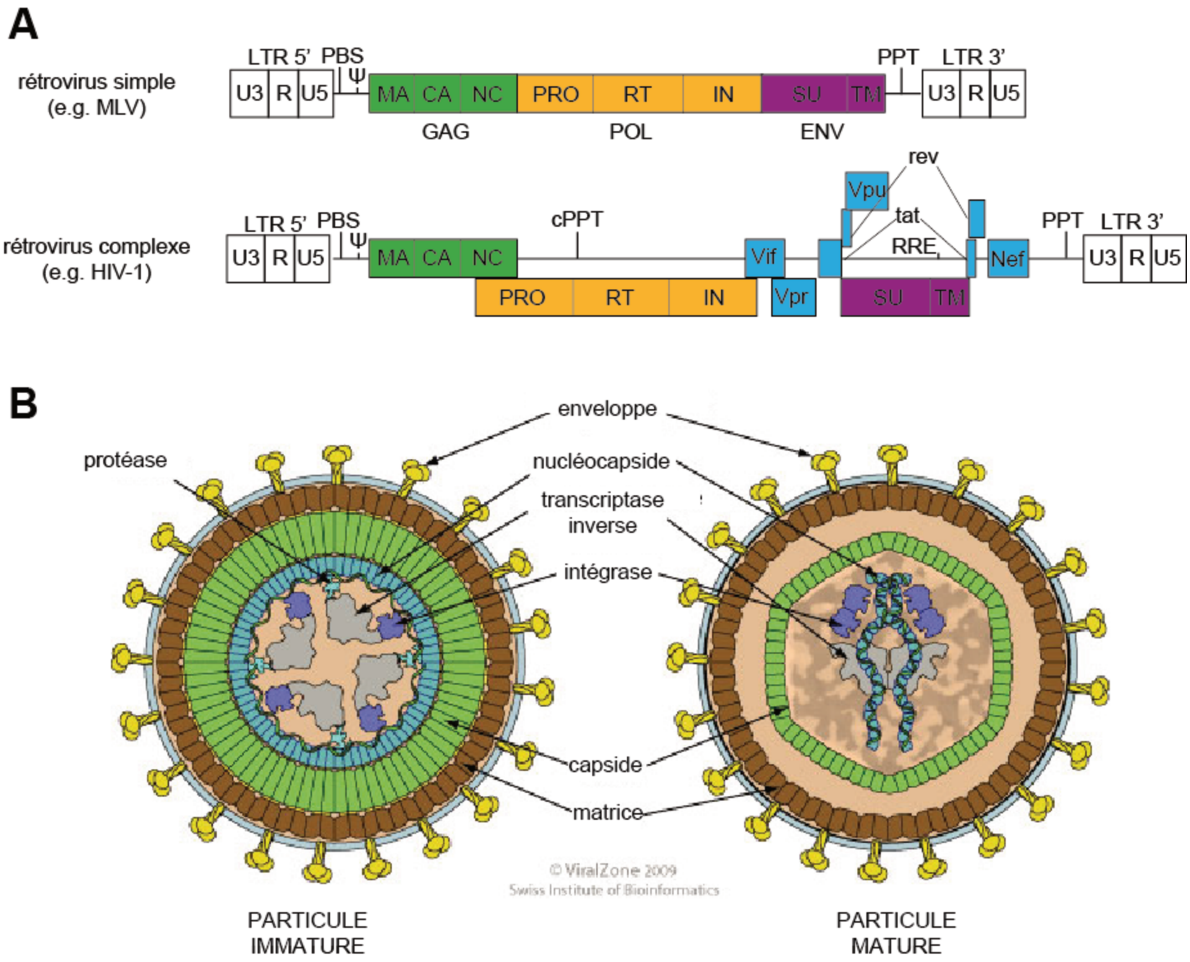


Figure 3. Structure générale d'un provirus et d'une particule rétrovirale
(A) Organisation génomique d'un rétrovirus simple (dont le prototype est le virus MLV pour murine leukemia virus) et d'un rétrovirus complexe (dont le prototype est HIV-1 pour human immunodeficiency virus type 1). Les différents cadres de lecture et éléments non transcrits sont représentés. MA : matrice, CA : capside, NC : nucléocapside, Pro : protéase, RT : transcriptase inverse, IN : intégrase, SU : sous-unité de surface, TM : sous-unité transmembranaire, LTR : long terminal repeat (éléments dupliqués en 5' et 3' du provirus, contenant notamment des signaux promoteurs et régulateurs de la transcription), PBS : primer binding site, Ψ : signal d'encapsidation, PPT : poly purine tract, cPPT : central PPT, RRE : Rev responsive element (élément de réponse à Rev, nécessaire pour l'export des ARN viraux). (B) Schéma adapté du site internet viralzone (http://viralzone.expasy.org) représentant une particule rétrovirale HIV-1 immature (à gauche) et mature (à droite).

Depuis, une nouvelle classification, validée par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) et établie sur la séquence de leur génome, et plus particulièrement celle du gène *pol,* a vu le jour. Cette classification divise la famille des *Retroviridae* en deux sous-familles et 7 genres (Fig. 4) :

- La sous-famille *Orthovirinae*, comprenant 6 genres : Alpharétrovirus, Bétarétrovirus, Gammarétrovirus, Deltarétrovirus, Epsilonrétrovirus, Lentivirus ;
- La sous-famille *Spumavirinae* comprenant le genre Spumavirus.

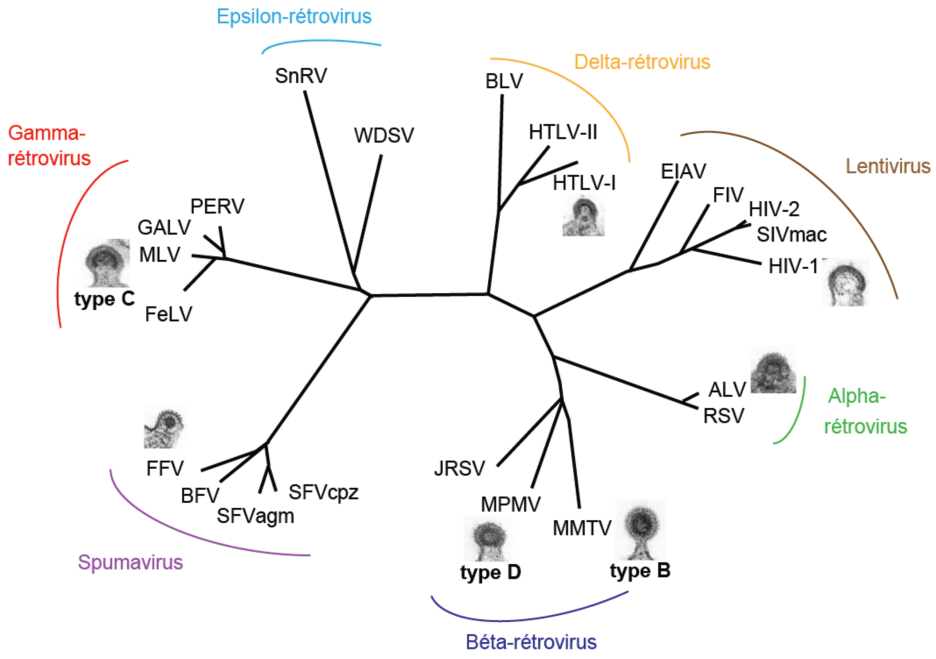


Figure 4. Diversité des familles rétrovirales
Les rétrovirus sont regroupés en deux sous-familles (*Orthovirinae* et *Spumavirinae*) et 7 genres (Alpha-, Béta-, Delta-, Gamma-, Epsilon- rétrovirus, Spumavirus, Lentivirus) selon des critères phylogénétiques. L'arbre phylogénétique est adapté de (Weiss, 2006). Pour chaque genre (à l'exception des Epsilonrétrovirus), la morphologie typique d'une particule en cours de bourgeonnement est illustrée par un cliché de microscopie électronique (Oshima et al., 2004). La classification basée sur des critères morphologiques est indiquée sous certaines structures (type B, C et D). La morphologie de type A, non représentée dans cet arbre, correspond aux particules immatures intracellulaires.

Certains membres des *Orthovirinae* ont des propriétés oncogéniques. C'est le cas par exemple du gammarétrovirus félin FeLV ou bien du deltarétrovirus humain HTLV-1, qui peuvent tous deux induire le développement de leucémies chez leur hôte respectif. Le lentivirus HIV-1 induit quant à lui une immunodéficience sévère. Notons que HTLV-1 et HIV-1 sont les deux seuls rétrovirus pathogènes caractérisés chez l'homme à ce jour.

Les Spumavirinae sont moins connus et n'ont pour l'instant été associés à aucune pathologie. L'élément prototypique en est le virus Foamy humain. Dans la suite de cette introduction, les Spumavirus ne seront plus évoqués.

1.3 Organisation génétique d'un rétrovirus

Le génome du rétrovirus, une fois réverse-transcrit, est intégré dans l'ADN de l'hôte grâce aux activités enzymatiques de l'intégrase virale. On parle alors de forme provirale ou de provirus (Fig. 3A). Ceux-ci sont repérables dans les génomes par la présence des LTR, séquences répétées directes à chaque extrémité. Flanquant ces LTR, de courtes répétitions caractéristiques, nommées les TSD (Target Duplication Sites) sont également observées. Elles sont générées par l'intégrase au moment de l'insertion du nouvel élément, suite à une coupure décalée des deux brins d'ADN de la séquence-cible d'intégration.

Les LTR contiennent les signaux nécessaires à la transcription des éléments (promoteur au début du LTR 5' et signal de polyadénylation au sein du LTR 3') et sont constitués de 3 parties (Fig. 3A) :

- U3 : correspond à la région promotrice non transcrite du LTR 5', seule la copie du LTR 3' est transcrite et présente dans l'ARN génomique viral.
- R : commence au niveau du site d'initiation de la transcription en 5', et en 3' se termine au niveau du signal de polyadénylation; cette région se trouve donc répétée aux extrémités 5' et 3' des transcrits rétroviraux.
- U5 : en 3', cette séquence, qui s'étend jusqu'à la fin du LTR, est en aval du signal de polyadénylation. Seule la copie du LTR 5' est contenue dans l'ARN génomique viral.

La répétition de la région R aux deux extrémités du transcrit viral permet de régénérer des provirus aux LTR complets lors du processus de réverse-transcription, que nous évoquerons un peu plus bas.

Entre les deux LTR se trouvent les cadres ouverts de lecture codant les protéines nécessaires au cycle de réplication (Fig. 3A). Tous les provirus infectieux comptent plusieurs gènes dits essentiels : *gag*, qui code une polyprotéine structurale possédant en général des motifs de liaison aux acides nucléiques ; *pro*, codant la protéase (parfois dans la même phase de lecture que *pol*), *pol*, dont le produit contient les activités transcriptase inverse, intégrase et RNAse H, et enfin *env,* qui code une glycoprotéine impliquée dans l'entrée des particules dans la cellule. Parfois le provirus contient un autre gène, appelé *dut*, qui code la synthèse d'une

désoxyuridine triphosphatase (dUTPase). A la différence des autres gènes, *dut* peut se retrouver à différentes positions.
Un rétrovirus présentant uniquement les trois gènes essentiels est qualifié de simple (c'est le cas de tous les rétrovirus infectieux de la sous-famille Orthovirinae à l'exception des virus HTLV et BLV). Parfois, d'autres cadres de lecture s'ajoutent et codent des protéines que l'on qualifie d'accessoires ou d'auxiliaires mais qui sont nécessaires à la réplication *in vivo*. On parle dans ce cas de rétrovirus complexe (e.g. HTLV-1, BLV et l'ensemble des Lentivirus). Notons également que certains provirus présentent un autre type d'ORF : les oncogènes ou *onc*, dont nous reparlerons plus en détail dans le dernier chapitre et qui induisent la formation rapide de tumeurs chez l'hôte ou la transformation de la cellule infectée.

Enfin, les rétrovirus contiennent de courtes séquences relativement conservées, également nécessaires à leur cycle de réplication : le PBS (Primer Binding Site) et le PPT (Poly Purine Tract) (Fig. 3A).

- Le PBS est un motif long de 10 à 18 nt, qui suit directement le LTR 5'. En général, le PBS est complémentaire de l'extrémité 3' d'un ARNt, qui peut ainsi s'hybrider sur l'ARN rétroviral et servir d'amorce pour la synthèse du premier brin d'ADN lors de la réverse-transcription. Dans certains cas, le PBS est coupé en deux parties, distantes de plusieurs kilobases; l'hybridation de l'ARNt impose alors une circularisation partielle de l'ARN du rétrovirus.
- Le PPT est une courte séquence dans l'ARN du rétroélément, située juste en amont du LTR 3' et particulièrement riche en nucléotides de type purines. Elle possède la particularité d'être résistante à la dégradation par la RNAse H (impliquée dans la dégradation de la matrice d'ARN après synthèse du premier brin d'ADNc), et reste donc hybridée au premier brin d'ADNc où elle sert d'amorce à la réverse-transcriptase pour la synthèse du second brin d'ADN. Certains rétrovirus comme HIV-1, FIV, EIAV et SFV-1 présentent une copie supplémentaire du PPT dans la région centrale de leur génome (Charneau and Clavel, 1991; Charneau et al., 1992; Poeschla et al., 2001; Stetor et al., 1999). Dans le cas du HIV-1, le PPT central (cPPT), situé dans le gène *intégrase*, sert de seconde amorce pour la synthèse du brin +. Sa présence est requise pour une réplication virale efficace (Hungnes et al., 1992).

1.4 Protéines codées par les ORF

1.4.1 Les protéines structurales

1.4.1.1 La polyprotéine Gag

Le gène *gag* (Group specific Antigen) code un précurseur polyprotéique dont le clivage par la protéase virale lors de la maturation des particules génère l'ensemble des protéines participant à la structure interne des rétrovirus (Fig. 3B). L'expression de *gag* seul dans des cellules est suffisante à la formation spontanée de « quasi » particules virales (les VLP pour virus like particles) qui bourgeonnent à la membrane plasmique. Les protéines Gag forment des interactions multiples : entre elles pour former des structures multimériques, avec certains types de lipides de la membrane plasmique, avec l'ARN génomique viral ainsi qu'avec certaines protéines cellulaires (e.g., moteurs moléculaires, réseaux de microtubules) et enfin avec les glycoprotéines d'enveloppe (interactions en particulier entre la queue cytoplasmique de l'enveloppe et le domaine MA de Gag, voir revue (Murakami, 2008)). Le nombre moyen de protéines Gag incorporées dans chaque particule varie - selon le genre du rétrovirus étudié et la méthode utilisée pour le déterminer– de 750 à 5000 (voir revue (Maldonado et al., 2014)). Le clivage par la protéase virale induit un changement radical de morphologie du virus, qui prend alors son aspect mature et caractéristique (Fig. 3B) (les particules HIV-1 ont « un cœur » de forme conique).

Tous les précurseurs Gag sont organisés de la même façon, en domaines distincts libérés par protéolyse : (NH2)-MA-X-CA-NC-Y-(COOH). X et Y représentent des segments qui peuvent être clivés en une ou plusieurs petites protéines (la protéine Gag du HIV-1 code par exemple la protéine p6 ainsi que deux peptides d'espacement SP1 et SP2) et qui sont dans certains cas absents (Gag de HTLV-1 ne présente que les domaines MA-CA-NC).

- La protéine MA constitue la matrice et contient des résidus clés qui permettent l'adressage et l'association du précurseur Gag au feuillet interne de la membrane plasmique cellulaire. La plupart des protéines MA rétrovirales sont myristoylées sur des résidus glycine (l'ancre myristate est une chaine d'acide gras à 14 carbones, ajoutée co-traductionnellement sur certaines protéines), modification souvent nécessaire à l'adressage correct de la polyprotéine et à la formation de la particule virale. De plus, les protéines MA contiennent

un segment hautement basique, important pour l'association de Gag avec la membrane plasmique.

- La protéine CA constitue la capside virale qui forme une « coque » entourant le complexe ribonucléoprotéique qui contient l'ARN génomique. L'ensemble est souvent appelé cœur ou « core » viral. La protéine CA est importante pour les étapes d'assemblage viral. Elle est responsable de la plupart des interactions des protéines Gag entre elles, via le domaine MHR (major homology region) très conservé parmi les rétrovirus (exception faite du genre spumavirus) (revue dans (Adamson and Jones, 2004)). CA est également requise pour les étapes précoces de l'infection, notamment avant la transcription inverse (Braaten et al., 1996).
- La protéine NC : Il s'agit d'une petite protéine basique qui forme la nucléocapside. Chez tous les rétrovirus, à l'exception des spumavirus, NC présente un ou deux motifs CCHC, appelés doigts de zinc, très conservés et qui ont une affinité particulière pour les acides nucléiques. Le domaine NC, quand il est encore partie intégrante du précurseur Gag, interagit avec le signal d'encapsidation de l'extrémité 5' de l'ARN génomique. NC contient également des séquences indispensables à la formation et au bourgeonnement du virion. De plus, la nucléocapside agit comme une protéine chaperonne pour l'ARN viral lors de la transcription inverse et le protège de la dégradation par les nucléases cellulaires (revue dans (Muriaux and Darlix, 2010)).

1.4.1.2 La protéine d'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe correspond à la protéine de surface du virus. Sa structure et ses rôles seront évoqués plus bas (paragraphe 2 du premier chapitre). Dans le reste du texte, le terme « enveloppe » désigne la glycoprotéine d'enveloppe.

1.4.2 Les enzymes virales

1.4.2.1 Pro

L'activité protéase est rarement codée par une phase de lecture ouverte propre, sauf chez les bétarétrovirus. Dans les autres cas, ce domaine est situé à la fin de *gag* (cas du rétrovirus ALV) ou au début du gène *pol* (cas du rétrovirus MoMLV). Des alignements de séquences ont mis en évidence la proximité de cette enzyme avec les protéases aspartiques cellulaires.

Celles-ci sont monomériques à la différence de la protéase virale qui n'est *a priori* active que sous forme d'homodimère. La protéase virale possède un site actif présentant un motif canonique D-T/S-G. Elle reconnaît un site spécifique de 7 à 8 acides aminés hydrophobes entourant le site de coupure. Son activité fondamentale dans le cycle viral permet le clivage des différents composants des précurseurs Gag et Pol et la maturation des virions. Chez certains rétrovirus, la protéase est également responsable d'un clivage dans la queue cytoplasmique de la glycoprotéine d'enveloppe, qui permet l'élimination d'un peptide, appelé peptide R, régulateur négatif de l'activité de fusion de l'enveloppe (Green et al., 1981; Henderson et al., 1984; Rein and Schultz, 1984).

L'activité de la protéase est régulée puisqu'elle n'intervient qu'au moment ou juste après le bourgeonnement du virus (revue dans (Swanstrom and Wills, 1997)). Les dimères d'enzymes ne se forment qu'au sein de la particule virale, et non pas parmi les protéines libres avant assemblage ; de cette façon, la protéase est uniquement active au sein des particules, à proximité immédiate de ses substrats et à distance des protéines cellulaires, ce qui limite sa toxicité. Cela permet aussi de garder ensemble toutes les protéines indispensables.

1.4.2.2 Pol

Le gène *pol* code trois types d'activités enzymatiques : réverse-transcriptase (RT), RNase H et Intégrase (IN) qui sont caractéristiques des rétrovirus. Dans la majorité des cas étudiés, la polyprotéine Pol est clivée en au moins deux sous-produits, l'un contenant les activités RT et RNase H, et l'autre le domaine Intégrase. Le domaine RT est très bien conservé et sert souvent de base de comparaison pour les études phylogénétiques. La RT peut présenter une préférence plus ou moins marquée pour l'ARNt permettant l'initiation de la synthèse du premier brin d'ADN, cette spécificité étant forcée *in vivo* par la séquence du PBS du rétrovirus considéré. L'activité ADN-polymérase ainsi que l'activité RNase H qui dégrade spécifiquement l'ARN viral des hybrides ARN/ADN permettent la synthèse de l'ADN proviral à partir de l'ARN génomique. Les RT des rétrovirus sont peu processives et ne présentent pas d'activité 3' exonucléase (relecture sur épreuve ou « proofreading »). Ceci est une grande source de mutagenèse et de variabilité virale.

Toutes les intégrases des rétrovirus sont composées de trois domaines indépendants (revue dans (Delelis et al., 2008)). La région N-terminale porte un motif HHCC, de type doigt de zinc et impliqué dans la formation de multimères, événement clé pour les fonctions de l'intégrase. La région centrale constitue le site catalytique avec un motif très conservé de type

D-$X_{39à58}$-D-X_{35}-E. La région C-terminale présente une activité non spécifique de liaison à l'ADN. Le mécanisme d'action de l'intégrase a pu être déterminé *in vitro* sur les virus HIV-1, MLV et ASLV. L'intégrase purifiée reconnaît les extrémités de l'ADN proviral néo-synthétisé, supprime deux nucléotides en 3' de chaque brin et joint ces extrémités 3'OH libres à l'ADN génomique cible par une réaction de trans-esterification (on parle de transfert de brin).

Le séquençage à haut débit a permis d'avoir une vision globale de la répartition des nombreuses copies provirales d'un même virus dans l'ADN hôte. A partir de l'analyse statistique des sites d'intégration de différents rétrovirus (HIV, MLV, ASLV et HTLV-1), dans des cellules humaines infectées par des vecteurs rétroviraux, trois grandes tendances quant aux préférences d'intégration émergent. Le virus HIV-1 s'intègre majoritairement dans les gènes hautement transcrits par l'ARN polymérase II (Mitchell et al., 2004). Le rétrovirus MLV s'intègre majoritairement au niveau des régions d'initiation de la transcription et la préférence pour les gènes actifs est nettement moins marquée que pour le virus HIV-1 (Bushman, 2003; Wu et al., 2003). Le rétrovirus ASLV ne présente qu'une très faible préférence d'intégration dans les gènes actifs et aucune tendance à s'intégrer dans les régions promotrices (Mitchell et al., 2004).

Bien qu'il existe une corrélation évidente entre insertion provirale et environnement génétique, aucune séquence consensus au site d'intégration n'a été identifiée dans le cas du virus HIV-1 par exemple. Le biais observé pour certaines régions du génome s'explique probablement par d'autres facteurs : une accessibilité variable de l'ADN suivant l'état de condensation de la chromatine, la présence de distorsions locales de l'ADN favorisant l'intégration, ou encore l'interaction de l'intégrase rétrovirale avec des facteurs protéiques se fixant à l'ADN (revue dans (Bushman et al., 2005)). Il a été par exemple établi que LEDGF/p75 est un partenaire clé de l'intégrase du virus HIV-1, intervenant notamment dans la spécificité d'intégration (Ciuffi et al., 2005). La déplétion de LEDGF/p75 entraîne une réduction drastique de l'intégration provirale au sein des unités transcriptionnelles et fait apparaître de nouvelles tendances (e.g. intégration près des îlots CpG). En dehors du genre Lentivirus, les intégrases rétrovirales n'ont pas d'affinité marquée pour LEDGF/p75 ce qui suggèrent que d'autres partenaires cellulaires/protéines virales agissent en tant que cofacteurs durant l'intégration.

1.4.2.3 La dUTPase

Le gène *dut,* qui code l'activité d'UTPase, n'est présent que chez les bétarétrovirus et les lentivirus des espèces non primates (Elder et al., 1992). La protéine est localisée dans les virions où elle dégrade efficacement et spécifiquement les nucléotides désoxyuridine triphosphate, pour empêcher leur incorporation dans l'ADN proviral. Cette enzyme ne semble pas requise pour la réplication dans des cellules en division, mais l'étude du rétrovirus EIAV suggère qu'elle a un rôle dans la réplication virale dans les cellules quiescentes comme les macrophages (Threadgill et al., 1993). Chez les lentivirus comme FIV et EIAV, le domaine dUTPase se situe entre les domaines RT et IN. Dans le cas du MPMV, il se situe en amont de la protéase et il dérive du précurseur Gag-Pro. Ceci indique probablement deux événements indépendants d'acquisition de ce gène au cours de l'évolution.

Dans cette première partie, nous avons dressé un tableau général du rôle des protéines virales dites « essentielles » (les détails sur la protéines d'enveloppes seront donnés au paragraphe 2 de ce chapitre). Certains rétrovirus possèdent en plus des protéines dites « accessoires » ou « auxiliaires » (Fig. 3A). Nous allons brièvement en illustrer l'importance en prenant l'exemple du lentivirus HIV-1.

1.4.3 Les protéines accessoires

Les protéines Tat et Rev ont des rôles importants dans la régulation de l'expression rétrovirale.

- Tat (transactivator of transcription) est une protéine à localisation nucléaire, codée par deux exons. Elle stimule la transcription du génome viral de plusieurs manières : en se liant à une structure particulière de l'ARN viral, appelée TAR (trans-activating response element), présente en 5' des transcrits HIV-1 naissants, en remodelant la chromatine et en augmentant la processivité de l'ARN polymérase II (revue dans (Musinova et al., 2015)). La protéine Tax de HTLV-1 remplit la même fonction.
- Rev (Regulator of viral protein expression) permet le transport des ARN non épissés ou mono-épissés à l'extérieur du noyau (tout ARN qui n'est pas complètement épissé est normalement retenu dans le noyau par la machinerie cellulaire, d'où la nécessité d'un mode d'export actif pour l'ARN viral). La protéine reconnaît un motif présent sur tous les ARN viraux qui ne sont pas complètement épissés, le RRE (Rev response element). Elle

possède un motif de liaison à l'ARN (RBD, pour RNA binding domain). Cette protéine accessoire possède également des signaux d'import et d'export nucléaire (NLS, pour Nuclear localisation signal et NES, pour Nuclear export signal) lui permettant de faire « la navette » entre le noyau et le cytoplasme (voir revue (Rausch and le Grice, 2015)). Ce mécanisme est partagé par l'ensemble des lentivirus, par les deltarétrovirus HTLV-1 et 2, chez qui la protéine régulatrice est appelée Rex et la séquence cible sur l'ARN RxRE pour Rex response élément (Unge et al., 1991), ainsi que par les bétarétrovirus JSRV (Nitta et al., 2009) et MMTV (Indik et al., 2005; Müllner et al., 2008) (avec Rej et Rem, respectivement).

D'autres protéines accessoires sont indispensables à la pathogenèse virale *in vivo*. Nous en retrouverons certaines aux chapitres 3 et 4. On peut citer :

- Nef (Negative factor) qui présente des effets pléïotropes. Par exemple, la diminution de la quantité de récepteur CD4 (Garcia and Miller, 1991; Laguette et al., 2009; Lindwasser et al., 2007) et de molécules du CMH (Schwartz et al., 1996; Stumptner-Cuvelette et al., 2001) à la surface des cellules infectées, ce qui a pour conséquence une relative protection vis à vis du système immunitaire et une augmentation de la propagation virale. Nef est également un antagoniste des protéines membranaires SERINC3 et SERINC5, deux facteurs de restriction qui s'opposent à la réplication du virus HIV-1 (Usami et al., 2015).
- Vpr (Viral protein R) qui est incorporée en grande quantité dans les virions. Sa présence est essentielle dès les premières étapes du cycle de réplication. Elle participe entre autres à la transcription inverse, à l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC pour pre-integration complex) (Le Rouzic and Benichou, 2005) et induit l'arrêt des cellules infectées en phase G2 du cycle cellulaire, par l'intermédiaire de l'E3-ubiquitine ligase CUL4 (Maudet et al., 2011).
- Vif (Virion infectivity factor) existe sous deux formes, l'une soluble, l'autre associée à la membrane plasmique. Elle a été découverte comme l'antagoniste d'un facteur de restriction cellulaire APOBEC3G, qui induit l'hypermutation de l'ADN viral au cours de la transcription inverse (voir détails dans le chapitre 3) (Malim and Emerman, 2008). Vif, incorporé dans les particules virales, entraîne l'ubiquitinylation d'APOBEC3G et induit sa dégradation par le protéasome (Yu et al., 2003).
- Vpu (Viral protein U) possède certaines fonctions redondantes de celles de Nef comme la réduction de la quantité de récepteur CD4 à la surface des cellules infectées (Margottin et al., 1998) et la diminution de la présentation en surface des molécules du CMH de classe I (Kerkau et al., 1997) et du CMH de classe II (Hussain et al., 2008). Elle constitue

également un antagoniste très efficace de la Tetherin, facteur de restriction cellulaire qui s'oppose au relargage des virions dans le milieu extracellulaire après leur bourgeonnement (voir détails dans le chapitre 3) (Neil et al., 2008).

Pour avoir une vision complète, il est important de noter qu'en plus des protéines essentielles et accessoires, la particule virale est composée d'un grand nombre de facteurs cellulaires, embarqués de façon passive ou active (suite à l'interaction spécifique avec des facteurs viraux), et dont les rôles dans l'infection virale et la pathogenèse sont encore mal appréciés (Ott, 2008).

2. L'enveloppe rétrovirale : une protéine structurale aux rôles variés

2.1 Structure de la protéine d'enveloppe (modèle des gammarétrovirus)

Tous les rétrovirus infectieux possèdent une glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire, permettant au virus de reconnaître les cellules cibles et d'y pénétrer. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur contenant deux sous-unités: SU (pour surface), qui possède les domaines reconnaissant un récepteur spécifique à la surface des cellules cibles, et TM (pour transmembranaire) qui permet l'ancrage de la glycoprotéine d'enveloppe dans la membrane virale ainsi que la fusion avec les membranes cellulaires (Fig. 5A).

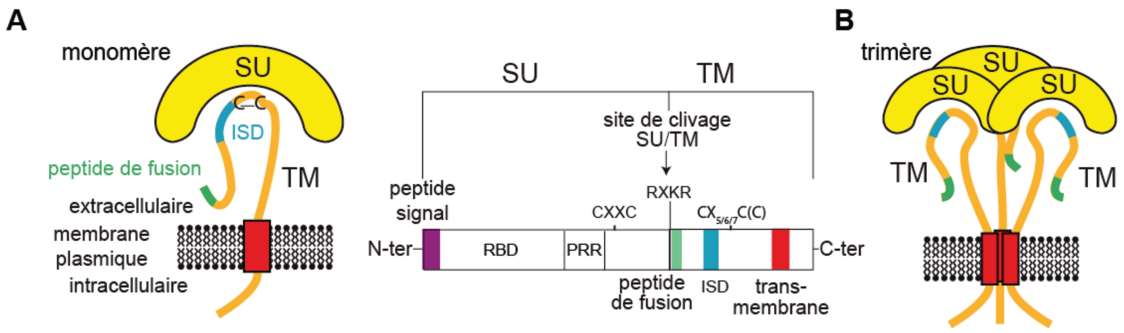


Figure 5. Représentation schématique de la glycoprotéine d'enveloppe d'un gammarétrovirus
(A) A gauche, un monomère de protéine d'enveloppe ancré dans la membrane plasmique est représenté. La sous-unité de surface (SU) est représentée en jaune. La sous-unité transmembranaire TM est composée d'un domaine intra-cytoplasmique, un domaine transmembranaire *stricto sensu*, une partie extracellulaire qui contient notamment le domaine immunosuppresseur (ISD, en bleu) et le peptide de fusion (en vert). Au centre, une représentation schématique linéaire du précurseur de la protéine d'enveloppe (avant clivage SU/TM). Le site de clivage, reconnu par la furine cellulaire (consensus : R/K-X-R/K-R), délimite les deux domaines SU et TM de la protéine. Différents domaines ou motifs importants sont également représentés : le peptide signal hydrophobe en violet, le domaine de liaison au récepteur (RBD), le motif C-X-X-C impliqué dans les interactions SU-TM, la région riche en proline (PRR), le peptide de fusion (en vert), la transmembrane (en rouge), le domaine immunosuppresseur putatif (ISD, en bleu) ainsi que le motif conservé C-$X_{5/6/7}$-C(C). (B) Les monomères d'enveloppe s'associent la plupart du temps en trimère avant de rejoindre la membrane plasmique. La

représentation en trimère de dimères SU-TM donne une idée de la structure de la glycoprotéine en conditions « physiologiques ».

Trois domaines principaux ont été identifiés au sein de la SU :

- Un domaine N-terminal de liaison au récepteur (RBD, « receptor binding domain ») comportant des régions hypervariables suffisantes pour l'interaction specifique avec le récepteur cellulaire.
- Un domaine C-terminal, impliqué dans les interactions de la SU avec la sous-unité TM. Ce domaine contient un motif C-X-X-C, impliqué dans l'interaction entre SU et TM. Chez les gammarétrovirus, une liaison covalente (pont disulfure) relie les motifs C-X-X-C de la SU et C-$X_{5,6,7}$-C(C) de la TM (Opstelten et al., 1998). Cette liaison covalente est également présente chez les alpha (Leamnson and Halpern, 1976) et deltarétrovirus (Li et al., 2008) mais pas chez les bétarétrovirus pour lesquels les sous-unités SU et TM sont attachées par des liaisons faibles (Henzy and Coffin, 2013).
- Une région riche en résidus proline appelée PRR (Polyproline Rich Region), qui relie le RBD et le domaine C-terminal de la SU. Elle est impliquée dans la stabilité de la protéine d'enveloppe et régule les changements de conformation qui interviennent après la liaison au récepteur (Lavillette et al., 1998).

La sous-unité TM est composée de trois régions distinctes :
Le domaine N-terminal extracellulaire (communément appelé ectodomaine), le domaine transmembranaire *stricto sensu*, et le domaine C-terminal correspondant à la queue cytoplasmique (CT). La résolution des structures cristallographiques de la sous-unité TM de plusieurs rétrovirus révèle qu'il s'agit d'une région à la structure tri-dimensionnelle conservée (Bénit et al., 2001). En détails, on identifie :

- Un peptide de fusion, domaine cryptique hydrophoble N-terminal, impliqué dans la fusion membranaire et séparé de la SU par un site consensus de clivage K/R-X-K/R-R que reconnaissent les furines cellulaires.
- Deux motifs « heptad repeats » (HR1 et HR2), structurés en hélice alpha et impliqués dans l'oligomérisation des protéines d'enveloppe. HR1 et HR2 sont séparés par une boucle qui comprend un motif C-$X_{5,6,7}$-C(C) impliqué dans l'interaction SU-TM. Chez les gammarétrovirus cette région comprend également un domaine très conservé de 17 acides-aminés appelé domaine immunosuppresseur (ISD), indispensable à la réplication virale *in vivo* (Blaise et al., 2001; Cianciolo et al., 1985; Mangeney and Heidmann, 1998).

- La queue cytoplasmique (CT) (revue dans (Tedbury and Freed, 2015))

La CT est la région de l'enveloppe la plus variable en taille, ce qui reflète probablement la variété des rôles qu'elle joue chez les différents rétrovirus. Dans la plupart des cas, la queue cytoplasmique est relativement courte, composée d'environ 25 à 35 acides-aminés. Les lentivirus ont en général des CT plus longues, comprenant 100 à 200 acides aminés, exception faite de la CT du virus FIV composée d'une cinquantaine d'acides aminés. La région cytoplasmique est importante car elle intervient dans la régulation du trafic des Env rétrovirales et dans celui des protéines Gag qui sont dirigées aux sites de bourgeonnement (e.g. (Ball et al., 1997)). La CT intervient également dans la détermination de la localisation précise de l'enveloppe à la membrane plasmique. A part quelques exceptions (e.g. le virus du sarcome de Rous, ou RSV), les protéines d'enveloppes ont une affinité pour les radeaux lipidiques riches en cholestérol de la membrane plasmique (e.g. (Beer et al., 2005)). Pour le virus MLV cette localisation préférentielle dépend de la palmitoylation de cystéines conservées dans la queue cytoplasmique (Li et al., 2002). Dans le cas du HIV-1, le regroupement de plusieurs Env en des endroits précis de la membrane plasmique dépend également de la CT. L'Env délétée de sa queue cytoplasmique reste localisée préférentiellement à la membrane plasmique mais ne présente plus aucune colocalisation avec la protéine Gag. La CT participe aussi au transport rétrograde de l'enveloppe, en régulant son endocytose. Par exemple, les CT des virus HIV et SIV contiennent deux signaux d'endocytose : une séquence Y-X-X-Φ, où Φ est un acide aminé hydrophobe, ainsi qu'un motif dileucine situé en C-terminal (Rowell et al., 1995). Ceci permet une internalisation rapide de l'enveloppe, limitant ainsi son accumulation à la membrane plasmique, ce qui constitue une protection vis à vis du système immunitaire. Le domaine CT des Env rétrovirales peut aussi interférer avec la transduction des signaux dans la cellule. Par exemple, la CT du virus HIV-1 présente un domaine d'interaction avec la kinase TAK1 qui déclenche la voie de signalisation canonique NF-kB (Postler and Desrosiers, 2012). Le même motif est conservé chez HIV-2 et certaines souches de SIV. Un domaine d'activation de la voie NF-kB a également été identifié dans la queue cytoplasmique du deltarétrovirus BLV (Beaufils et al., 1993), ce qui illustre l'importance de la CT dans la pathogénicité d'un grand nombre de rétrovirus. Un autre exemple vient renforcer cette idée : les CT de deux bétarétrovirus apparentés, JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus, infectant le mouton) et ENTV (enzootic nasal tumor virus, infectant la chèvre), responsables de tumeurs chez leurs hôtes (revue dans (Hofacre and Fan, 2010)) contiennent un motif de liaison aux domaines SH2 (Y-X-X-M) qui active la voie PI3K/Akt et favorise la transformation cellulaire (S. L. Liu et al., 2003; Maeda

and Fan, 2008; Maeda et al., 2005; Palmarini et al., 2001b). Enfin, la CT joue un rôle fondamental dans la régulation de la conformation des enveloppes rétrovirales et du processus de fusion (revue dans (Steckbeck et al., 2014)). La troncation (*ex vivo*) de la CT de plusieurs Env rétrovirales (e.g. Env JSRV, Env HIV-1) induit par exemple une augmentation de la fusion cellule-cellule (revue dans (Tedbury and Freed, 2015)). *In vivo*, le clivage de la CT par la protéase virale a été observé pour le gammarétrovirus MLV, le bétarétrovirus MPMV (Mason-Pfizer monkey virus) et le lentivirus EIAV (Equine infectious anemia virus) et est un pré-requis pour une fusion efficace (revue dans (Tedbury and Freed, 2015)).

Nous avons décrit la structure d'un monomère d'Env. L'enveloppe des rétrovirus est en fait organisée sous forme de trimère, embarqués en nombre variable sur les particules des différents genres rétroviraux (Fig. 5B). L'étude en cryo-tomographie électronique de la particule HIV-1 a révélé la présence de seulement 10-20 trimères par virion (Liu et al., 2008) alors que les virions MLV présentent un plus grand nombre de complexe d'Env à leur surface (environ 50 +/- 20, (Förster et al., 2005)).

2.2 Synthèse et maturation de la protéine d'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe, qui est synthétisée à partir d'un ARN viral sous-génomique, suit le chemin des protéines cellulaires sécrétées. La longueur du peptide signal, qui permet l'adressage de la protéine naissante au réticulum endoplasmique, varie entre les différents rétrovirus (en moyenne 20-30 acides aminés) mais renferme invariablement une courte région hydrophobe reconnue par le SRP (« signal recognition particle ») qui favorise l'ancrage de la chaîne polypeptidique naissante dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La protéine en cours de traduction est alors transloquée dans la lumière du RER. La première modification du précurseur d'Env correspond au clivage du peptide signal par des protéases cellulaires, les « signal peptidases ». Par la suite, dans le RER, le précurseur est glycosylé : des oligosaccharides riches en mannoses sont ajoutés sur certains résidus asparagines (on parle dans ce cas de N-glycosylation) présents au sein de motifs Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr et regroupés pour la plupart dans la sous-unité SU. A titre d'exemple, la SU de l'Env HIV-1 présente 20 à 35 sites de N-glycosylation, contre seulement 3-5 dans la sous-unité TM (Wang et al., 2013). La lumière du RE étant un environnement non réducteur et un lieu de synthèse protéique actif, la présence d'une forte concentration de « chaperones » moléculaires (e.g. protéine GRP78, la plus abondante du RE) est essentielle pour permettre le repliement correct des protéines et éviter la formation d'agrégats. Avant leur adressage à la

membrane plasmique, les protéines d'enveloppe doivent être assemblées en structures oligomériques, le plus souvent en trimères. Cette étape est nécessaire au transport des glycoprotéines du RE à l'appareil de Golgi et met en jeu une séquence contenue dans la sous-unité TM. Il s'agit plus précisément d'un motif de type « crémaillère à leucine » (leucine zipper $LX_6LX_6NX_6LX_6L$) capable de s'oligomériser avec les domaines homologues d'autres TM, formant une structure hélicoïdale de type « coiled coil ». Après oligomérisation, les complexes d'enveloppe sont transportées vers l'appareil de Golgi (Einfeld and Hunter, 1988), lieu de leur maturation terminale. Au cours du transport, puis dans le Golgi, les chaines N-glycanes sont restructurées et des O- glyscosylations (oligosaccharides ajoutés sur des acides aminés Ser ou Thr, pas de séquence consensus identifiée) sont ajoutées à la protéine. Ces glycosylations, qu'elles soient de type N- ou O-, sont essentielles pour la structure et les fonctions de l'Env. Elles permettent notamment sa solubilisation, son repliement correct, sa stabilisation et son clivage et facilitent son transport intracellulaire et la liaison au récepteur cellulaire. Les sucres constituent également une protection vis à vis du système immunitaire en réduisant le pouvoir immunogène de l'Env (Fenouillet et al., 1994).

Enfin, le précurseur d'enveloppe est clivé par une protéase cellulaire de type furine, présente dans l'appareil de Golgi et qui reconnaît un motif R/K-X-K/R-R, fortement conservé chez les rétrovirus. Le clivage du précurseur n'est pas requis pour le transport à la membrane plasmique mais est par contre essentiel à la fois pour l'incorporation dans les virions, l'interaction avec le récepteur spécifique et la fusion membranaire.

2.3 Fonctions liées à l'entrée dans la cellule cible

2.3.1 Interaction des enveloppes rétrovirales avec des récepteurs spécifiques

Les glycoprotéines d'enveloppe ont un rôle clé dans l'entrée des virions dans la cellule cible. Après l'étape d'adsorption du virus à la surface de la cellule grâce à de multiples interactions non spécifiques, la sous-unité SU, reconnaît un récepteur spécifique ancré dans la membrane plasmique. L'identification des récepteurs est un enjeu important car elle permet de renseigner sur le tropisme du rétrovirus et dans certains cas de fournir des indications quant à la physio-pathologie de ce dernier. Des exemples de récepteurs rétroviraux clonés sont présentés en figure 6. Ce sont souvent des transporteurs de petites molécules organiques ou inorganiques, ancrés dans la membrane plasmique, via leur domaine transmembranaire (une ou plusieurs traversée(s) de la bicouche lipidique), ou bien accrochés par une ancre GPI. Dans

certains cas, après une première interaction avec le récepteur, le rétrovirus utilise un co-récepteur, nécessaire aux étapes suivantes. C'est le cas par exemple des lentivirus HIV-1, HIV-2 et SIV.

En plus d'être un préalable à l'entrée du virus, l'interaction Env-récepteur peut mener à l'interférence à l'infection ou à la surinfection (revue dans (Nethe et al., 2005)). Ce phénomène se traduit par le fait qu'une cellule infectée par un rétrovirus ne peut être réinfectée efficacement par le même rétrovirus ou par un rétrovirus utilisant le même récepteur d'entrée. Elle peut cependant être infectée par un rétrovirus employant un récepteur différent. Historiquement, cette propriété a permis de regrouper les différents rétrovirus utilisant le même récepteur d'entrée en « groupes d'interférence » (Rein and Schultz, 1984; Sommerfelt and Weiss, 1990). D'un point de vue mécanistique, le « blocage » du récepteur peut se produire en surface cellulaire, par une inhibition compétitive, mais aussi et surtout dans le RE de la cellule infectée, lorsque les deux protéines sont en cours de synthèse. Les complexes enveloppe-récepteur peuvent soit atteindre la membrane plasmique, soit être dégradés par la machinerie cellulaire, conduisant dans tous les cas à une diminution du nombre de récepteurs disponibles en surface cellulaire.

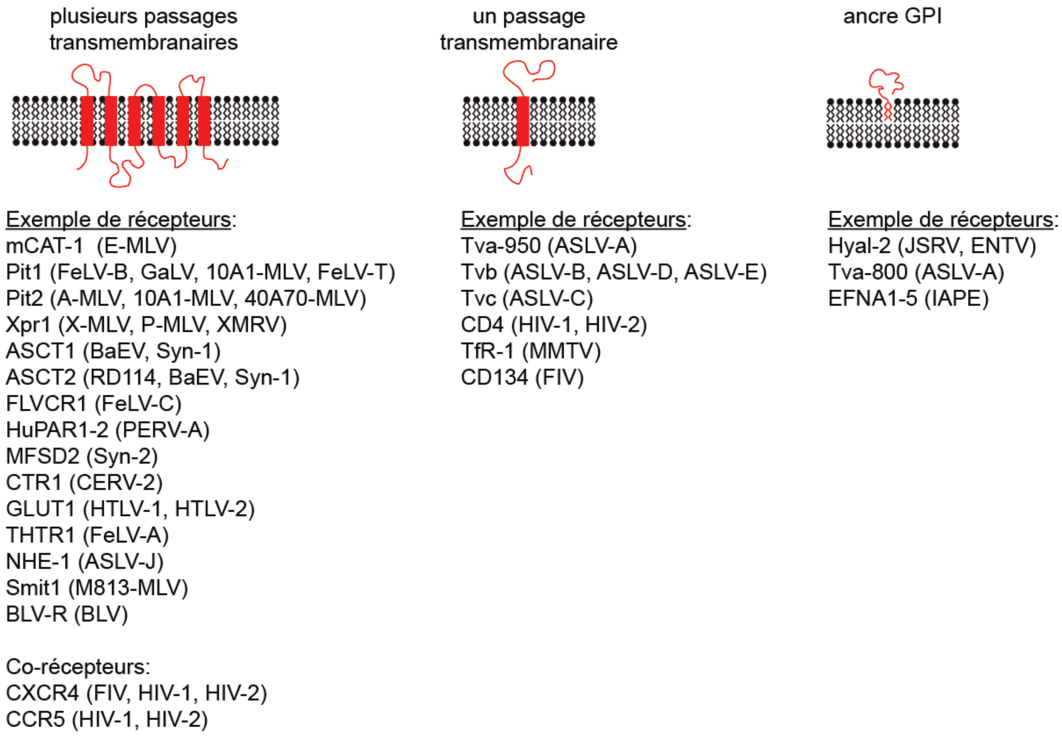


Figure 6. Quelques exemples de récepteurs de rétrovirus caractérisés à ce jour
Les récepteurs de la plupart des rétrovirus sont des protéines membranaires présentant plusieurs traversées de la bicouche lipidique. Certains récepteurs n'effectuent qu'une seule traversée de la membrane plasmique. Dans de rares cas, les récepteurs sont des protéines GPI-ancrées. Des exemples de récepteurs identifiés sont proposés avec entre parenthèses les virus correspondants. Adapatation de (Dewannieux et al., 2011; Tailor et al., 2003).

2.3.2 Fusion des membranes virale et cellulaire

Les glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales et plus largement, celles de la plupart des virus enveloppés, appartiennent au groupe des protéines de fusion de type I. Initialement, après clivage du précurseur en deux sous-unités SU et TM, ces protéines sont dans un état qualifié de métastable et ont besoin d'être activées pour acquérir une conformation favorable à la fusion. Les glycoprotéines d'Env existent donc sous au moins deux états conformationnels distincts : l'état pré-fusion, métastable et l'état post-fusion, stable. On distingue deux mécanismes qui permettent de passer du premier état au second.

- Un mécanisme impliquant uniquement la liaison au récepteur (et éventuellement à un co-récepteur), à **pH neutre** et en surface cellulaire (entrée indépendante du pH). Ce cas concerne la plupart des rétrovirus (McClure et al., 1990).

- Un mécanisme impliquant l'exposition de la protéine d'enveloppe à un environnement de **pH acide** (entrée dépendante du pH). Dans ce cas, l'activation se produit dans le compartiment endosomal voire lysosomal où est adressé le rétrovirus après endocytose suite à la liaison de la protéine d'enveloppe avec le récepteur présent à la surface de la cellule (White, 1992). L'orthomyxovirus Influenza, souvent utilisé comme modèle pour l'étude de la fusion, entre dans cette catégorie. L'infection dépend en effet de l'endocytose des particules virales dans des compartiments à pH acide où a lieu le changement conformationnel de la glycoprotéine de surface HA. Quelques rétrovirus, comme ALV, JSRV et MMTV (Bertrand et al., 2008; Mothes et al., 2000; Wang et al., 2008) nécessitent également un environnement acide pour leur entrée dans la cellule cible. L'entrée du virus ALV a lieu en deux étapes : l'interaction avec le récepteur à la membrane plasmique semble induire un premier changement de conformation (« priming » de l'Env induit par le récepteur) qui permet à l'enveloppe de devenir sensible à l'action du pH (Mothes et al., 2000). JSRV utilise également ce « priming » initial pour l'activation de la fusion. L'entrée du virus passe aussi par une étape d'endocytose médiée par la dynamine qui n'est pas observée pour ALV (Bertrand et al., 2008).

Cette vision dichotomique masque une réalité plus complexe. A titre d'exemple, un même rétrovirus, selon les conditions physiologiques ou le type cellulaire considérés, peut utiliser différentes voies d'entrée. Le virus HIV-1, classiquement décrit comme fusionnant à la

membrane plasmique, de façon indépendante du pH, peut dans certaines conditions emprunter les voies d'endocytose ou de macropinocytose (Daecke et al., 2005). Le rétrovirus MLV écotrope illustre également cette complexité. Son entrée dans les fibroblastes murins NIH 3T3 se fait par endocytose, alors que l'enveloppe fusionne à la membrane plasmique des cellules de sarcome de rat XC. Dans les deux cas l'entrée est dépendante du cytosquelette d'actine avec une participation requise du réseau de microtubule pour les étapes précoces de l'entrée dans les cellules NIH 3T3 (Kizhatil and Albritton, 1997).

La description mécanistique détaillée de la fusion rétrovirale est principalement extrapolée d'études réalisées sur la protéine HA du virus influenza. Des études fonctionnelles menées principalement sur les virus Influenza et HIV-1, ainsi que l'analyse de cristaux de structures post-fusion des Env HIV, SIV, HTLV et MoMLV (Caffrey et al., 1998; Fass et al., 1996; Kobe et al., 1999; Renard et al., 2005) soutiennent l'idée que les protéines de fusion des virus enveloppés utilisent un mécanisme commun présenté en figure 7A et 7B. A l'état natif, la glycoprotéine d'enveloppe est un complexe trimérique métastable ancré dans l'enveloppe rétrovirale. L'ectodomaine forme une structure hélicoïdale à trois brins et le peptide de fusion est alors enfoui au sein du trimère. A la suite d'une activation (interaction enveloppe récepteur ou baisse du pH, cf. ci-dessus), l'enveloppe subit un changement de conformation qui entraîne la libération du peptide de fusion et son ancrage dans la membrane cellulaire « cible » (membrane plasmique, endosomale, lysosomale). Cet intermédiaire de fusion est appelé « prehairpin » et relie deux membranes différentes. Par la suite, cette structure évolue en une épingle à cheveu « trimers of hairpin » (hélice à six brins, 3 HR1 et 3 HR2 en orientation antiparallèle), beaucoup plus stable thermodynamiquement et permettant le rapprochement et la fusion des membranes virale et cellulaire (Chernomordik et al., 1997). Afin que la fusion soit complète, il faut qu'un pore de fusion se forme et s'élargisse. Cette dernière étape dépend en particulier du cytosquelette et est influencée par la composition lipidique des deux membranes. La présence de phosphatidylserine est par exemple un facteur favorable à la fusion membranaire car elle permet la stabilisation des interactions virus-cellule (Callahan et al., 2003).

Au modèle classique de fusion s'ajoutent plusieurs niveaux de complexité. On décrit souvent l'interaction d'un trimère d'Env avec son récepteur mais il semble que la coopération entre plusieurs trimères d'Env soit souvent requise pour une fusion efficace. Dans le cas du HIV-1 la liaison au récepteur et au co-récepteur peut par exemple mettre en jeu deux trimères d'Env distincts (Salzwedel and Berger, 2000). De plus, la fusion membranaire est un processus coopératif : lors de l'infection, le virus induit le regroupement (« clustering ») des récepteurs à

la surface cellulaire, permettant d'augmenter l'infectivité (Siess et al., 1996; Valsesia-Wittmann et al., 1997).

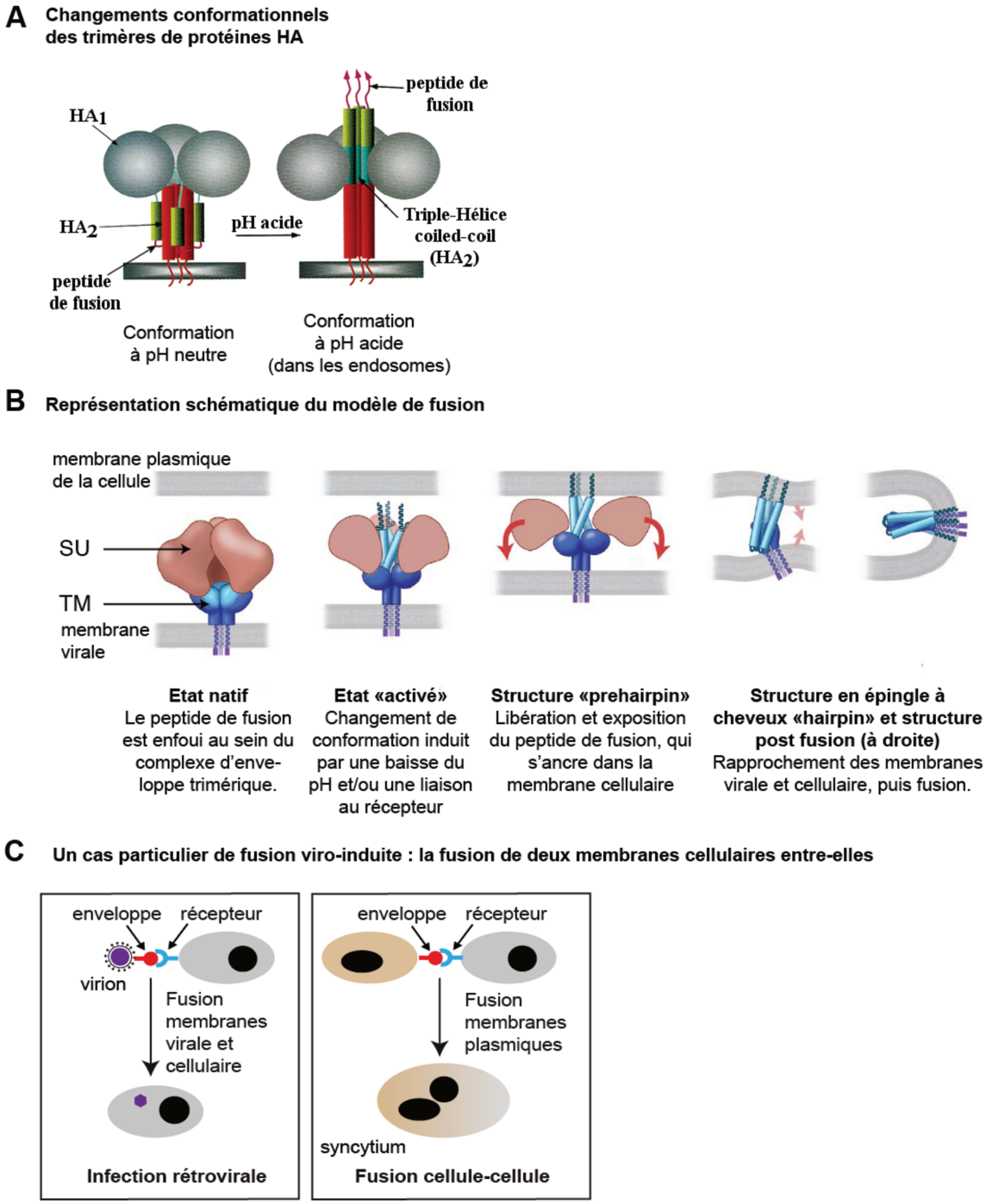


Figure 7. La fusion membranaire induite par l'enveloppe rétrovirale
(A) Représentation schématique des changements structuraux survenant dans les complexes trimériques HA après activation à pH acide. D'après Hunter, 1997. (B) Représentation schématique du modèle consensuel proposé pour le mécanisme de fusion. Adapté de (Eckert and Kim, 2001) . (C) (A gauche) Lors d'une infection, le virus reconnaît un récepteur spécifique, la plupart du temps situé à la membrane plasmique. La fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale a lieu soit en surface soit à l'intérieur de la cellule et permet la libération du contenu viral dans la cellule. (A droite) Dans certains cas, l'enveloppe virale induit la fusion des membranes de deux cellules, l'une exprimant l'enveloppe virale à sa surface, l'autre le récepteur spécifique. S'ensuit la formation d'une structure multinucléée, un syncytium.

2.3.3 Fusion cellule-cellule viro-induite et formation de syncytia

La fusion est un processus régulé dans le temps et dans l'espace. Une trop grande abondance à la surface cellulaire de glycoprotéines d'enveloppe produites pendant le cycle réplicatif pourrait induire : la mort cellulaire via la formation de syncytia, une toxicité due à l'interaction avec le récepteur ou bien encore une reconnaissance accrue par le système immunitaire. Pour ces raisons, la localisation et la quantité d'oligomères d'Env exposés à la membrane plasmique sont finement régulés par le trafic intracellulaire et des mécanismes de séquestration. Le clivage protéolytique de l'Env constitue un autre élément clé de régulation. En effet, la glycoprotéine est synthétisée sous forme d'un précurseur inapte à la fusion. Le clivage par les furines cellulaires, qui intervient à un moment précis du processus de synthèse de l'Env, permet de « libérer » le peptide de fusion. En outre, dans le cas des gammarétrovirus, un petit peptide de 16 acides aminés, le peptide R, localisé dans la région C-terminale de la queue cytoplasmique, inhibe la fusion. Ce n'est qu'après son clivage par la protéase virale, donc uniquement au cours de la maturation de la particule qu'elle devient compétente pour la fusion (Ragheb and Anderson, 1994).

L'expression de la protéine Env à la membrane plasmique peut avoir pour conséquence la fusion avec une cellule qui possède le récepteur spécifique, et *de facto* la formation de structures syncytiales (Fig. 7C). Il faut noter que la capacité d'une enveloppe rétrovirale à fusionner à la membrane d'une cellule cible ou à induire la fusion de deux membranes cellulaires sont deux choses bien différentes. La plupart des enveloppes sont pseudotypantes mais incapables d'induire, du moins en conditions physiologiques, la fusion cellule-cellule. L'exemple des syncytines illustre comment le mécanisme de fusion enveloppe virale-cellule est détourné au bénéfice de l'hôte. Ces enveloppes rétrovirales identifiées chez un grand nombre de mammifères sont en effet indispensables à la formation du syncytiotrophoblaste, structure syncytiale placentaire qui chez l'homme constitue l'interface materno-fœtale (voir chapitre 4 de l'introduction). La fusion cellule-cellule peut aussi avoir des effets cytopathiques. La formation de syncytia dans le cas du virus HIV-1 mène par exemple rapidement à l'apoptose (Laurent-Crawford et al., 1993).

2.4 Fonctions non canoniques de l'enveloppe rétrovirale

2.4.1 Immunosuppression

La fonction immunosuppressive des Env rétrovirales est liée à un motif très conservé de 17 acides aminés, appelé CKS17, localisé dans la sous unité TM (Fig. 8A). La première étude *in vitro* a démontré que la présence d'un peptide CKS17 synthétique dans les milieux de culture inhibait la prolifération de lymphocytes T cytotoxiques murins et humains stimulés soit par l'IL2 recombinante soit par un alloantigène (Cianciolo et al., 1985). Par la suite, des travaux réalisés au laboratoire ont permis de démontrer *in vivo* le rôle immunosuppresseur de deux enveloppes rétrovirales infectieuses (chez la souris avec MoMLV et chez le singe avec MPMV Env, resp. (Blaise et al., 2001; Mangeney and Heidmann, 1998)), ainsi que celui d'une enveloppe rétrovirale endogène, HERV-H (Mangeney et al., 2001), grâce à des modèles murins allogéniques. Dans ces études, des greffes de cellules tumorales sont réalisées chez des souris immunocompétentes. Les greffons devraient normalement être rejetés mais la présence d'une enveloppe rétrovirale, exprimée par transduction dans les cellules tumorales, permet de retarder le rejet de greffe (Mangeney and Heidmann, 1998) (Fig. 8B). La région responsable de cette immunosuppression, appelée l'ISD (pour domaine immunosuppresseur) a été caractérisée : il s'agit d'un domaine d'environ 60 aa englobant le CKS17, localisé dans la partie extracellulaire de la sous-unité TM et s'assemblant spontanément en trimère. Cette séquence est très conservée parmi les rétrovirus, exception faite des bétarétrovirus (e.g. MMTV, HERV-K) et des lentivirus (e.g. HIV-1) (Bénit et al., 2001). Cependant, deux études récentes (Morozov et al., 2012, 2013) suggèrent que les ISD de représentants de ces deux familles présentent une fonction immunosuppressive au moins *in vitro* illustrée en particulier par l'inhibition de la prolifération de cellules immunes et la modulation du profil cytokinique en présence de domaines TM recombinants ou synthétiques.

Bien que les déterminants moléculaires de ce phénomène d'immunosuppression restent encore à élucider, des résultats importants ont été obtenus ces dernières années. Tout d'abord, il a été montré que les deux propriétés –fusogénicité et immunosuppression- portées par les glycoprotéines d'enveloppe sont dissociables. En effet, *in vitro*, des mutations ponctuelles (deux positions clés) introduites dans l'ISD de certaines enveloppes rétrovirales murines et humaines induisent une perte de la fonction immunosuppressive des glycoprotéines, sans affecter leur activité de fusion cellule-cellule (Mangeney et al., 2007) ou leur capacité d'infection d'une cellule cible *in vitro* (Schlecht-Louf et al., 2010). Le domaine ISU est par

contre requis pour la réplication virale *in vivo,* comme le montre l'étude d'un mutant « non immunosuppresseur » du rétrovirus Friend. Ce dernier présente la même cinétique de propagation dans une souris irradiée (i.e. immunodéficiente) que le virus sauvage mais est rapidement éliminé chez la souris immunocompétente (Schlecht-Louf et al., 2010) (Fig. 8C).

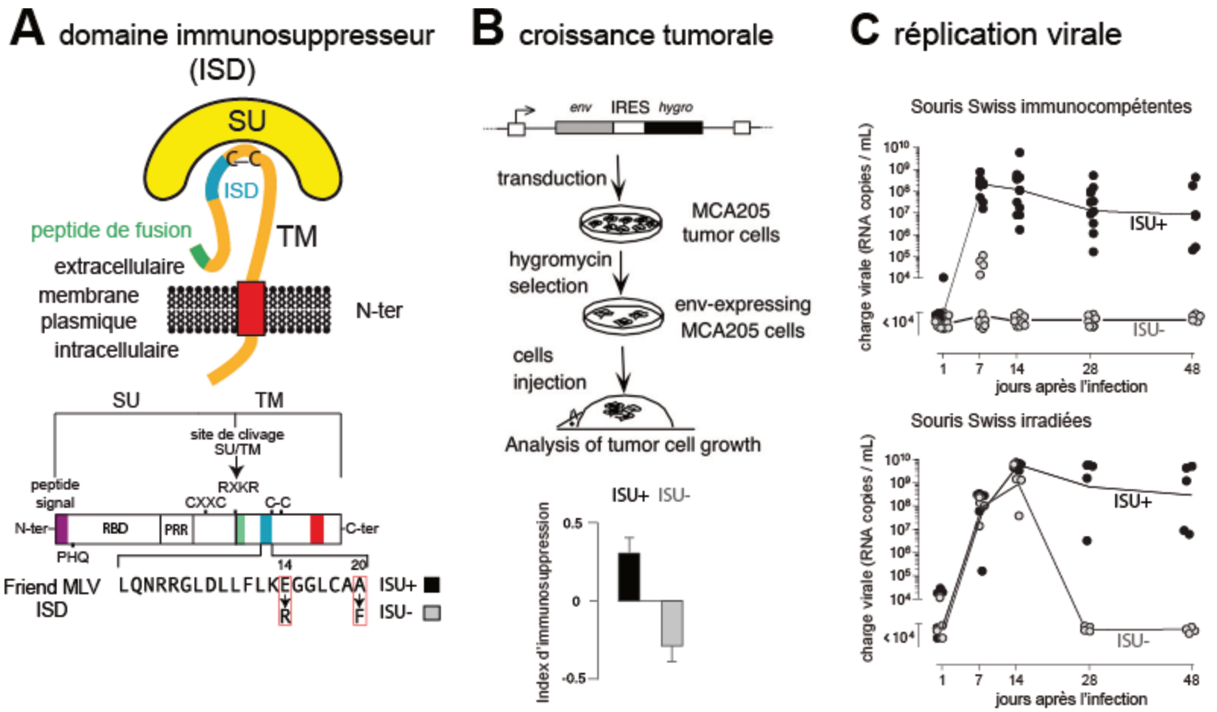


Figure 8. Les propriétés immunosuppressives des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirale
(A) Localisation et séquence consensus du domaine immunosuppresseur canonique de l'enveloppe rétrovirale. (En haut) Représentation schématique d'un monomère d'enveloppe rétrovirale ancré dans la membrane plasmique. Le domaine immunosuppresseur (en bleu) est localisé dans la partie extracellulaire de la sous-unité TM. (En bas) Séquence consensus de l'ISD de l'enveloppe rétrovirale du virus Friend MLV (ISU +). Les deux positions critiques pour l'effet immunosuppresseur sont encadrées en rouge. Lorsque les acides aminés correspondants sont mutés (E vers R et A vers F), l'enveloppe Friend perd ses propriétés immunosuppressives (ISU -). (B) (En haut). Schéma du protocole de l'expérience de rejet de greffe mis en place afin de démontrer les effets immunosuppresseur d'une enveloppe rétrovirale. Les cellules tumorales murines MCA205 sont transduites par un vecteur exprimant la protéine d'enveloppe ISU + ou ISU -. Les cellules sont ensuite sélectionnées par l'ajout d'hygromycine dans les milieux de culture, avant d'être injectées à la souris en conditions allogéniques. La surface des tumeurs est quantifiées plusieurs fois pendant la durée de l'expérience et sert de base au calcul de l'index d'immunosuppression. L'Env de Friend « sauvage », aux propriétés immunosuppressives (ISU +, en noir), présente un index d'immunosuppression positif. La version mutée (ISU -, en gris) de l'Env a un index d'immunosuppression négatif. (C) Mesure des titres viraux (nombre de copies d'ARN/mL) associés à la réplication des virus Friend ISU + (en noir) et ISU – (en gris) chez la souris Swiss immunocompétente (en haut) et immunodéprimée par irradiation (en bas). La chute du titre viral à partir de 14 jours après infection observée pour le virus ISU – est associée à la restauration d'un système immunitaire fonctionnel chez les souris. Adapté de (Mangeney et al., 2007; Schlecht-Louf et al., 2010).

Grâce à des expériences de déplétions successives de cellules immunes, il apparaît que l'immunosuppression portée par l'enveloppe du rétrovirus de Friend repose sur la capacité d'échappement aux cellules « natural killer » (NK) (des effecteurs de la réponse immunitaire

innée) et aux lymphocytes T CD8 (des effecteurs de la réponse immunitaire adaptative). Le récepteur des domaines immunosuppresseur n'est pas encore connu mais récemment, une équipe a démontré qu'un peptide immunosuppresseur dérivé de la TM de HIV-1 se lie de façon spécifique aux monocytes et aux lymphocytes B humains (Mühle et al., 2016), ce qui oriente la recherche d'un interactant potentiel vers ces deux compartiments.

D'un point de vue physiopathologique, ces propriétés pourraient participer à la progression tumorale *in vivo* (par exemple dans le cas du rétrovirus HTLV humain, qui possède des propriétés immunosuppressives et est un agent causal de leucémie) ou bien à la tolérance materno-fœtale (dans le cas des syncytines, protéines d'enveloppe endogènes, impliquées dans la formation du placenta, notamment de par leur activité fusiogène). D'un point de vue thérapeutique, la caractérisation de ce domaine immunosuppresseur est intéressante pour l'élaboration ou l'amélioration de vaccins. Une preuve de concept a déjà été obtenue à cet égard puisqu'une mutation diminuant l'effet immunosuppresseur de l'ISD de l'antigène vaccinal Env FeLV, a permis d'améliorer un vaccin vétérinaire déjà sur le marché et protégeant les chats de la leucémie (Schlecht-Louf et al., 2014).

2.4.2 Transformation cellulaire

Dans les anciennes classifications des rétrovirus, cinq genres étaient regroupés sous le terme «oncovirus», illustrant l'importance du lien entre rétrovirus et cancer. Les rétrovirus oncogènes induisent la formation de tumeurs chez leur hôte principalement via deux mécanismes : la présence d'un oncogène dans le génome du virus ou bien une mutagenèse insertionnelle conduisant à l'activation anormale de proto-oncogènes cellulaires ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. De façon remarquable, un petit groupe de rétrovirus présente un autre mécanisme de transformation cellulaire : leur glycoprotéine d'enveloppe, en plus de son rôle dans la fusion, est un oncogène *per se*. Entrent dans cette catégorie les rétrovirus SFFV (spleen focus-forming virus), MPLV (myeloproliferative leukemia virus), AHV (avian hemangioma virus), MMTV (mouse mammary tumor virus, même si l'enveloppe n'est pas le seul élément causal des tumeurs mammaires), ainsi que les deux rétrovirus ovins JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus) et ENTV (enzootic nasal tumor virus). Cette propriété atypique des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales sera évoquée en détails dans le chapitre 4 de cette introduction.

3. La réplication des rétrovirus

Le cycle de réplication des rétrovirus (Fig. 9) comprend des étapes à la fois extracellulaire et intracellulaire. On peut distinguer deux grandes phases, séparées par l'étape cruciale d'intégration du rétrovirus dans le génome de son hôte : la phase précoce (qui comprend l'entrée dans la cellule, la transcription inverse, la décapsidation, l'entrée dans le noyau) et la phase tardive (avec l'expression du rétrovirus, l'export des ARN viraux, la formation de la particule virale, le bourgeonnement et la maturation). Ces différentes étapes, qui mettent en scène les protéines décrites précédemment, seront évoquées brièvement, en prenant le modèle du HIV-1. Certaines des différences majeures entre les genres rétroviraux seront soulignées.

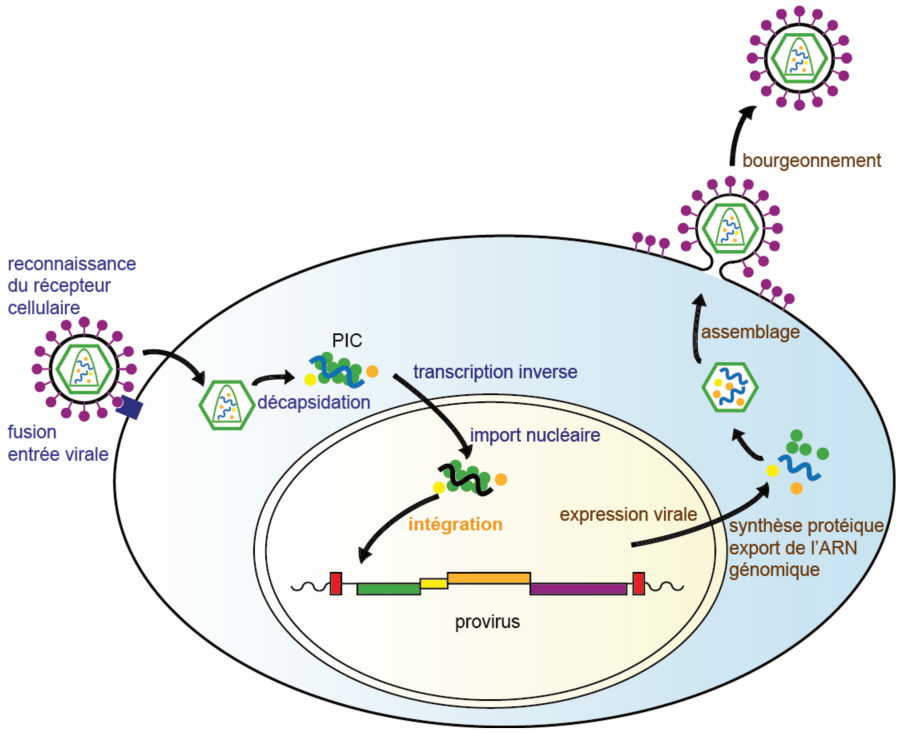


Figure 9. Cycle de réplication des rétrovirus infectieux
La première étape du cycle de réplication est l'adsorption de la particule virale à la surface cellulaire grâce à des interactions non spécifiques. L'enveloppe du rétrovirus interagit ensuite avec son récepteur spécifique, présent la plupart du temps à la membrane plasmique. Les membranes virale et cellulaire fusionnent, ce qui permet la libération du contenu du virus dans la cellule cible. Le génome ARN du virus est réverse-transcrit en ADN double brin. Simultanément, la particule virale est partiellement décapsidée, ce qui mène à la formation du PIC (ou complexe de pré-intégration). Ce dernier est importé au noyau. Ces étapes constituent la phase précoce du cycle de réplication (étapes en bleu sur le schéma) qui précède l'intégration du virus dans le génome de la cellule hôte (en jaune). Durant la phase tardive du cycle de réplication (étapes présentées en marron), l'ensemble des constituants nécessaires à la formation d'une nouvelle particule rétrovirale sont synthétisés par la machinerie cellulaire et s'assemblent. Le virus néo-formé bourgeonne ensuite à la surface de la cellule infectée. La protéase virale devient alors active et induit la maturation du virion par clivage protéolytique, étape indispensable pour l'infectiosité.

3.1 Etapes précoces du cycle de réplication

3.1.1 Entrée du rétrovirus dans la cellule cible

Le virion est d'abord adsorbé au contact de la cellule cible via des interactions de faible affinité. Dans le cas du virus HIV-1 un certain nombre de facteurs cellulaires ont été décrits comme favorisant l'attachement et donc la concentration des virions à la surface cellulaire (voir revue (Lavillette, 2011)). C'est le cas de la lectine de type C DC-SIGN, qui permet le transfert des virions vers les lymphocytes T CD4+ où les virus se répliquent majoritairement. L'entrée à proprement parler s'effectue suite à l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe virale avec un récepteur situé à la membrane plasmique de la cellule cible. La fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire (plasmique ou endosomale) a alors lieu et entraîne la libération du contenu rétroviral dans le cytoplasme de la cellule hôte (voir paragraphe 2.3.2 du chapitre 1 de l'introduction).

3.1.2 Transcription inverse

La transcrition inverse est catalysée par les activités enzymatiques RT et RNase H codées par le gène *pol.* A partir d'une matrice d'ARN simple brin, un ADN proviral double brin est formé. Ce processus peut être décrit en plusieurs étapes, comme l'illustre la figure 10 (la légende contient des détails) (Telesnitsky and Goff, 1997).

3.1.3 Décapsidation

Selon les travaux considérés, la décapsidation a lieu soit après la transcription inverse (Arhel et al., 2006) soit en même temps (Hulme et al., 2011). Dans tous les cas, une décapsidation trop précoce ou retardée a un impact négatif sur la transcription inverse ainsi que sur l'efficacité de l'import nucléaire. Suite à la décapsidation, la majorité des protéines CA sont perdues mais d'autres protéines restent associées au génome rétroviral pour former le complexe de pré-intégration (ou PIC pour Pre-integration Complex). Sa composition est sujette à débat. Les protéines virales MA, IN, Vpr et NC en font partie ainsi que la protéine cellulaire LEDGFp75 (Vandegraaff et al., 2006).

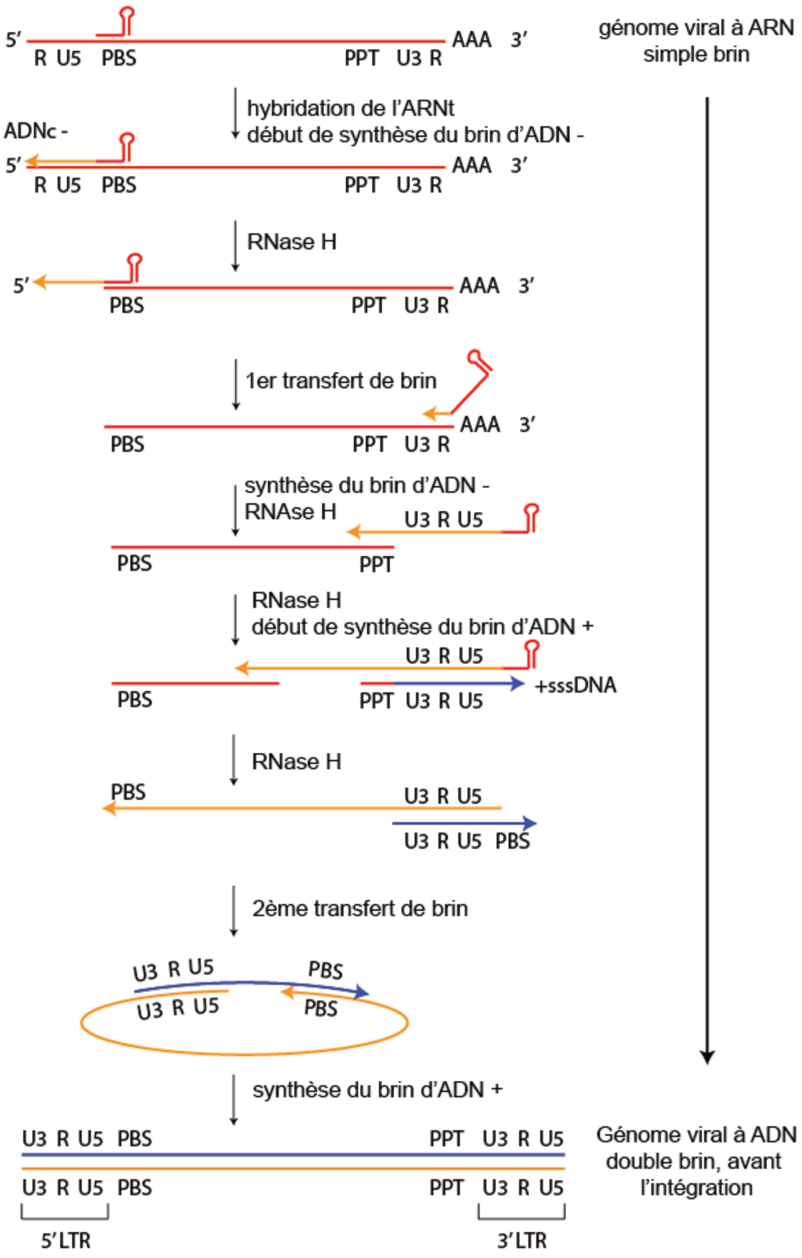


Figure 10. Les différentes étapes de la transcription inverse d'un rétrovirus
Le processus de transcription inverse peut être divisé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, un ARN de transfert vient s'hybrider à la séquence PBS de l'ARN du rétrovirus, ce qui permet la synthèse du premier brin d'ADN (nommé brin « - »). Après un premier transfert de brin, la RNase H dégrade l'ARN présent au sein d'hétéroduplex ARN/ADN. La région PPT, résistante à la RNase H, sert ensuite d'amorce à la synthèse du brin d'ADN « + » qui progresse jusqu'à ce qu'une partie de l'ARN de transfert soit réverse-transcrit (l'ADN synthétisé est alors appelé +sssDNA). Après dégradation de l'ARN de transfert par la RNase H, l'hybridation du +sssDNA avec le brin d'ADN « - » au niveau de la région PBS mène au second transfert de brin. Chacun des brins d'ADN est enfin complété pour former un ADN génomique double brin avec des séquences LTR répétées à chaque extrémité. D'après (Telesnitsky and Goff, 1997).

3.1.4 Entrée dans le noyau

Ces différentes protéines semblent intervenir plus ou moins directement dans l'import nucléaire, en particulier la protéine accessoire Vpr qui joue un rôle important à cette étape (Kamata et al., 2005; Le Rouzic et al., 2002). L'entrée dans le noyau diffère selon le genre rétroviral considéré : les oncorétrovirus pénètrent de façon passive lorsque la membrane nucléaire est disloquée pendant la mitose (Roe et al., 1993), alors que les lentivirus, grâce à des protéines spécifiques, sont capables d'infecter les cellules même à l'état quiescent (Weinberg et al., 1991). De nombreux facteurs cellulaires et rétroviraux sont impliqués dans cette étape clé.

3.2 Intégration de l'ADN du rétrovirus dans le génome de l'hôte

Après l'import nucléaire du PIC, l'intégrase catalyse l'insertion du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte. La transcription inverse génère un ADN viral linéaire à bouts francs. La première étape, catalysée par l'intégrase, consiste en l'excision de deux nucléotides en 3' de l'ADN viral, créant ainsi des extrémités OH libres. Celles-ci sont à l'origine d'une attaque nucléophile au niveau des liaisons phospho-diester sur chacun des brins de l'ADN génomique cible. La terminaison de l'intégration nécessite l'élimination des extrémités 5' non appariées de l'ADN proviral, la polymérisation des nucléotides manquants, puis la ligation. Ces trois dernières étapes sont catalysées par des enzymes cellulaires.

Notons cependant qu'au cours d'une infection par HIV-1, la majorité de l'ADNc viral détecté n'est pas intégré et s'accumule sous différentes formes dans le noyau de la cellule (revue dans (Sloan and Wainberg, 2011)) : (i) la plus abondante, l'ADNc linéaire, produit direct de la transcription inverse, (ii) le cercle à 2 LTR, formé par le mécanisme cellulaire de réparation de l'ADN, le NHEJ (non homologous end joining), (iii) le cercle à 1 LTR, généré par recombinaison homologue entre les 2 LTR de l'ADNc viral, (iv) des formes réarrangées, issues de l'autointégration de l'ADNc viral dans un ADN circulaire préexistant.

3.3 Etapes tardives du cycle de réplication

3.3.1 Expression de l'ADN proviral

3.3.1.1 Transcription

Le génome proviral est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire, à partir des signaux présents dans les LTR. Ces derniers possèdent des sites de liaisons à des facteurs de transcription cellulaires et à des protéines transactivatrices codées par des gènes accessoires viraux.

Après la transcription, les ARN rétroviraux sont maturés comme des ARN cellulaires, avec ajout d'une coiffe en 5', clivage et polyadénylation en 3'. Le génome rétroviral est très compact. Afin de permettre l'expression de plusieurs protéines à partir d'un minimum d'information génomique, l'une des « stratégies » virale consiste à produire à la fois des transcrits de taille complète (début : région R du LTR 5' et fin : région R du LTR 3'), majoritaires et appelés transcrits génomiques, ainsi que des transcrits sous-génomiques, issus d'un processus d'épissage.

Les transcrits génomiques ont plusieurs devenirs. Certains sont encapsidés (signal d'encapsidation psi) et constituent ainsi le génome du virion en cours d'assemblage. D'autres sont traduits et donnent naissance aux protéines Gag et Pol ou peuvent être modifiés par épissage pour donner les transcrits sous-génomiques.

On distingue plusieurs types de transcrits sous-génomiques : ceux qui sont issus d'un épissage unique, donnant les ARNm de l'Env et ceux qui sont issus d'épissages multiples, que l'on retrouve chez les rétrovirus complexes donnant les ARNm des protéines accessoires.

Les ARNm viraux, exportés du noyau, sont traduits par la machinerie cellulaire.

3.3.1.2 Traduction

Pendant la réplication du rétrovirus, de grandes quantités de protéines Gag doivent être générées car elles constituent la « charpente » du virion. Dans la plupart des cas, de petites quantités des enzymes codées par les gènes *pro* et *pol* (i.e. Pro, RT et IN) suffisent pour exercer les fonctions catalytiques associées. Afin d'établir cette stœchiométrie, les rétrovirus ont développé un mécanisme de traduction original. La traduction du gène *gag* placé en 5' du transcrit génomique se fait de façon standard : entrée du ribosome (modèle du « ribosome scanning») et décrochage à la fin de l'ORF, ou par l'intervention d'une séquence de type

IRES (pour Internal Ribosome Entry Site). La traduction de l'ARN génomique peut aussi mener à la synthèse d'une protéine de fusion appelée précurseur Gag-Pro-Pol (Hayman, 1978; Jamjoom et al., 1997). On sait que 10-20 protéines Gag sont synthétisées pour un précurseur Gag-Pro-Pol. La synthèse de ce dernier nécessite que le codon stop en 3' du gène gag ne soit pas reconnu. Deux mécanismes exclusifs permettent au ribosome « d'ignorer » le codon stop : le « readthrough », phénomène selon lequel le codon stop est parfois lu comme un codon sens, et le rephasage +1 (vers le 3' de l'ARN génomique) ou -1 (vers le 5' de l'ARN génomique), phénomène plus fréquent impliquant un décalage du ribosome et un changement de phase de lecture. Le gène *pro* est toujours situé entre *gag* et *pol* mais l'arrangement des cadres de lectures varie dans les différents génomes rétroviraux. Pour HIV-1 et d'autres rétrovirus, *pro* est dans la même phase ouverte de lecture que *pol.* Un seul rephasage est alors nécessaire pour synthétiser le précurseur Gag-Pro-Pol. Dans d'autres cas (e.g. MPMV, MMTV, HTLV-1), *pro* est dans un cadre de lecture propre ce qui sous-entend que deux rephasages de type -1 sont nécessaires : l'un pour créer la protéine de fusion Gag-Pro et le second pour générer les précurseurs Gag-Pro-Pol (pour revue voir (Hatfield and Oroszlan, 1990)). Le rephasage de type -1 repose sur la présence d'une structure secondaire particulière de l'ARN (tige boucle) qui arrête temporairement le déplacement du ribosome. En amont de cette structure se trouve un motif de type X XXY YYZ (X, Y et Z étant des ribonucléotides). Du fait de la dégénérescence du code génétique (i.e. plusieurs codons correspondent à un même acide aminé, le nucléotide 3' du codon étant le plus variable) cette séquence favorise le « glissement » du ribosome et des ARNt d'un nucléotide vers l'arrière (le motif lu sera alors XXX YYY Z), ce qui permet d'enchaîner la traduction dans la nouvelle phase de lecture.

3.3.2 Assemblage de la particule virale

On distingue classiquement deux types de formations des particules rétrovirales exogènes qui font écho aux types de particules présentées au début de l'introduction (paragraphe 1.2, Fig. 4).

- *L'assemblage de « type B/D »,* retrouvé chez les bétarétrovirus (e.g. MMTV, JSRV) : les particules s'assemblent à l'intérieur du cytoplasme puis migrent et bourgeonnent à la membrane plasmique.
- *L'assemblage de « type C »*, observé chez les Gammarétrovirus (MLV) et les Lentivirus (HIV, HTLV) : les particules se forment directement sous la membrane plasmique.

Dans les deux cas, l'acteur central est Gag : son expression seule suffit en effet à induire la formation de particules appelées VLP (pour Viral like particles) (Gheysen et al., 1989; Muriaux et al., 2001). La capacité de multimérisation de la polyprotéine est cruciale pour cette étape d'assemblage et repose en particulier sur les interactions entre les régions NC. Celles-ci ont aussi la capacité de se lier à l'ARN génomique viral, qui apporte « un cadre » autour duquel les protéines Gag se condensent. Dans le cas où l'ARN viral fait défaut, un ARN cellulaire peut jouer le même rôle et être de fait incorporé dans la particule virale. D'autres régions de Gag jouent un rôle important pour l'assemblage de certains rétrovirus. Par exemple, certaines délétions ou insertions dans la capside CA de HIV-1 empêchent la formation de néo-particules (Chazal N Gay B, Boulanger P., 1994; Wang et al., 1993).

Les protéines Gag sont adressées à la membrane plasmique, soit sous forme individuelle (dans le cas de l'assemblage de type C), soit sous leur « forme assemblée » (dans le cas de l'assemblage de type B/D). Plusieurs régions de la protéine sont requises pour cela, en particulier le domaine de matrice MA. Il est en effet la cible d'une modification co-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un myristate en N-terminal, permettant l'adressage à la membrane plasmique puis l'interaction avec les lipides cellulaires. En aval du signal de myristoylation se trouve un domaine riche en acides aminés basiques, portant une charge positive ce qui stabilise l'association entre Gag et les lipides membranaires via la formation d'interactions électrostatiques (Zhou et al., 1994).

L'ARN viral ne représente qu'une petite fraction de l'ARN total dans une cellule infectée mais est pourtant incorporé très efficacement au sein des virions. Cette spécificité repose sur l'existence d'une séquence d'encapsidation (Ψ, voir Fig. 3A) à la structure secondaire particulière au sein de l'ARN viral. Les rétrovirus incorporent également en grande quantité un ARN de transfert cellulaire spécifique qui interagit avec la RT et permet d'initier la transcription inverse dans une nouvelle cellule infectée (pour revue voir (Johnson and Telesnitsky, 2010)).

Les mécanismes d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe sur les particules virales sont complexes. Deux modèles ont été proposés :

- Un modèle d'incorporation passive, selon lequel les protéines Env se déplacent au sein de la membrane plasmique pour atteindre le site de bourgeonnement où elles sont embarquées passivement sur les particules naissantes. Ce mécanisme explique notamment la capacité des particules virales à embarquer des glycoprotéines d'autres rétrovirus, mais aussi des proteines de virus enveloppés comme les Vésiculovirus ou les Flavivirus (Young

et al., 1990). Les particules hétérologues obtenues sont appelées des pseudotypes et sont très utilisées en virologie expérimentale (exemples d'utilisation de pseudotypes VSV-G dans l'article 1 de ces travaux de thèse).

- Un modèle d'incorporation active, qui propose que l'embarquement des protéines d'enveloppe sur les particules en bourgeonnement repose sur une interaction spécifique entre le domaine cytoplasmique de la sous-unité TM de la protéine d'enveoppe et le domaine MA des protéines Gag.

Des études montrent que les protéines Gag et Env s'associent aux microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol que sont les radeaux lipidiques. La palmytoylation de la CT de l'enveloppe rétrovirale est un déterminant important pour le ciblage vers ces zones particulières (revue dans (Tedbury and Freed, 2015)). Notons que l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe sur les particules virales ne se fait pas exclusivement au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs études ont montré que les interactions entre les protéines Gag et Env pouvaient se faire au niveau de compartiments cellulaires internes, notamment au niveau de vésicules endosomales (Basyuk et al., 2003; Sandrin et al., 2004).

3.3.3 Bourgeonnement

Il s'agit de l'étape finale du cycle, au cours de laquelle les virions sont libérés dans le milieu extracellulaire. Pour les rétrovirus de type C, elle est concomitante de l'assemblage de la particule virale. Une étude réalisée sur HIV-1 (Carlson et al., 2008) a montré que le bourgeonnement est initié par l'assemblage d'une couche continue de Gag sous la membrane plasmique, qui induit la courbure des lipides. Le processus est parachevé grâce à l'intervention de la machinerie cellulaire ESCRT (4 complexes protéiques : ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III associés à l'ATP-ase Vps4 qui ont un rôle dans le bourgeonnement de vésicules intraluminales à l'intérieur des endosomes et également dans le tri des récepteurs de surface ubiquitinylés) qui aide à la formation du bourgeon membranaire et permet à la fois sa constriction et son abscission.

3.3.4 Maturation des particules virales

Au cours du bourgeonnement et juste après le relargage de la particule, la protéase virale clive au niveau de sites spécifiques (voir paragraphe 1.5.2.1) pour générer les différents

composants MA, CA, NC ainsi que les protéines p6, SP1 et SP2 pour le virus HIV-1. Cette étape permet de faire passer le virus d'un état immature à un état mature (Fig. 3B), caractérisé en microscopie électronique par la présence en son centre d'un cœur (conique dans le cas du virus HIV-1) dense aux électrons. Dans le virion immature, Gag est organisé de façon radiale, le domaine MA N-terminal est associé à l'enveloppe virale et l'extrémité C-terminale pointe vers le centre de la particule. Après clivage par la protéase, la couche de MA reste associée à la membrane, alors que la NC et l'ARN sont condensés en un complexe ribonucléoprotéique entouré de la capside.

3.3.5 Transmission des rétrovirus

Pour la plupart des virus, la transmission se fait par virions libres, relargués dans les fluides corporels. C'est cette propriété que l'on exploite en laboratoire lorsque l'on infecte une cellule cible en la mettant en contact avec le surnageant filtré d'une cellule infectée. Un autre mode de transmission peut être utilisé par les rétrovirus : il s'agit du passage cellule-cellule (revue dans (Law et al., 2016)). Dans le cas de l'infection par le virus HIV-1, les interactions entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte T non infecté représentent le moyen le plus efficace de dissémination virale en culture. Par analogie avec les synapses neurologiques et immunologiques, ce mode de transmission a été qualifié de synapse virologique. La formation de cette dernière est initiée par l'interaction entre l'enveloppe (présente sur le lymphocyte T infecté) et le récepteur (présent sur le lymphocyte T non infecté). Elle dépend également du cytosquelette d'actine et met en jeu des molécules d'adhésion telles que les ICAM (intracellular adhesion molecule) ou LFA-1 (leukocyte function-associated antigen 1), enrichies à l'interface cellulaire. Des images de microscopie montre que la protéine Gag du rétrovirus HIV-1 est recrutée au site de contact cellule-cellule où les virions sont successivement assemblés, relargués et internalisés par la cellule réceptrice. Ce mode de transmission protège les virus du système immunitaire et notamment de la reconnaissance par des anticorps neutralisants. La dissémination virale est également plus efficace car elle est polarisée, d'une cellule donneuse vers une cellule réceptrice (contrairement à ce qui est observé lors de la transmission par virions libres, soumise aux lois de la diffusion). Pour le virus HTLV-1, il s'agit du mode de dissémination exclusif (en plus de la transmission clonale).

CHAPITRE 2 : Origine et diversité des rétrovirus endogènes

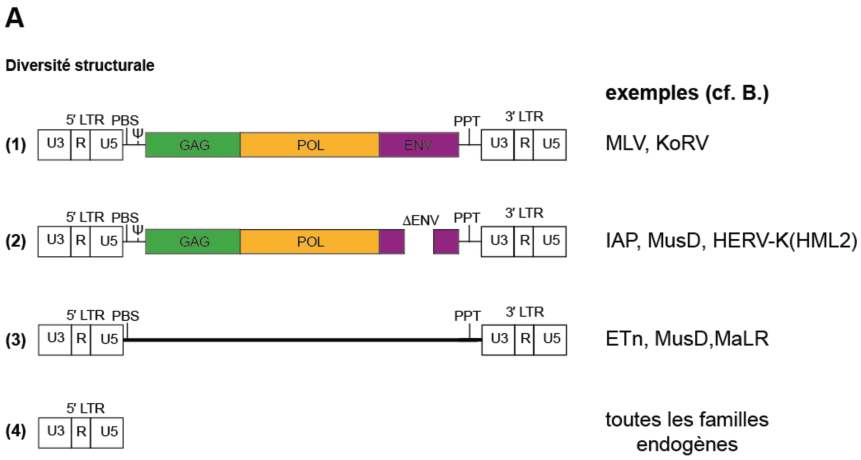
1. Découverte des rétrovirus endogènes

L'impact économique de la leucose aviaire (ou leucémie du poulet) induite par le rétrovirus ALV a accéléré, à partir du milieu des années 60, le développement de tests sérologiques visant à détecter les protéines Gag du rétrovirus (pour revue sur cette partie historique voir (Mager and Stoye, 2015; Weiss, 2006)). Contre toute attente, il apparut alors qu'un certain nombre d'oiseaux, non exposés au virus, ou ne présentant aucun symptôme, réagissaient positivement au test. L'étude plus approfondie de ce phénomène indiqua que l'antigène Gag était transmis de façon mendélienne, se comportant comme un allèle dominant dans des expériences de croisement *ex vivo* entre des cellules de poulet positive et négative pour Gag. Ces arguments, complétés par d'autres observations, convergeaient fortement vers l'idée que les protéines virales étaient codées par le génome du poulet. Cette conclusion nous paraît évidente avec notre bagage actuel en rétrovirologie, mais à l'époque la controverse était vive. Temin, par analogie avec le prophage intégré du bactériophage tempéré, avait proposé l'hypothèse de « l'ADN proviral » (cf paragraphe 1.1. du premier chapitre) mais les rétrovirus étaient encore majoritairement considérés comme des virus strictement à ARN (« RNA tumor viruses »). Ce n'est qu'avec la découverte de l'enzyme transcriptase inverse que l'idée de rétrovirus endogène, hérité comme un gène cellulaire, émergea. A partir de ce moment là, l'utilisation de sondes ARN ALV marquées, permit la détection, par hybridation Cot et par Southern blot, des multiples copies des séquences ADN correspondantes dans les génomes des poulets. Au même moment, des expériences similaires étaient réalisées chez la souris, révélant l'accumulation de particules rétrovirales suite à l'exposition de cellules murines non infectées aux radiations ou à des produits chimiques, ainsi que la présence de séquences provirales intégrées dans l'ADN génomique. Deux familles de rétrovirus endogènes murins furent ainsi découvertes : le virus de la tumeur mammaire (MMTV, pour mouse mammary tumor virus) et le virus de la leucémie (MLV, pour murine leukemia virus). Le séquençage de génomes complets a permis de mieux apprécier la contribution des ERV à la composition globale du génome des vertébrés, à titre d'exemple, environ 8% du génome humain est constitué de séquences rétrovirales endogènes. L'identification et l'annotation des ERV sont basées sur la recherche *in silico* de séquences conservées et/ou de motifs similaires à ceux que l'on retrouve chez les rétrovirus exogènes. Un article récent recense 87750 ERV

découverts dans 60 génomes de vertébrés (Hayward et al., 2013). Tout l'enjeu à présent est de comprendre leur impact sur la physiopathologie de leur(s) hôte(s).

2. Diversités structurale et phylogénétique des séquences d'ERV

Les études génomiques à grande échelle ont également révélé la diversité à la fois structurale et phylogénétique des ERV.



B

Diversité phylogénétique

classe	genre «exogène»	exemple de rétrovirus endogène	espèce hôte
I	gammarétrovirus	murine leukemia virus (MLV)	Souris
	gammarétrovirus	virus like 30 (VL30)	Souris
	gammarétrovirus	koala retrovirus (KoRV)	Koala
	gammarétrovirus	human ERV with H-tRNA PBS (HERV-H)	Homme
	gammarétrovirus	human ERV with W-tRNA PBS (HERV-W)	Homme
	gammarétrovirus	human ERV with E-tRNA PBS (HERV-E)	Homme
II	bétarétrovirus	mouse mammary tumour virus (MMTV)	Souris
	bétarétrovirus	intracisternal A-type particle (IAP)	Souris
	bétarétrovirus	Mus type-D related retrovirus	Souris
	bétarétrovirus	early transposon (ETn)	Souris
	bétarétrovirus	human ERV with K-tRNA PBS (HERV-K)	Homme
	bétarétrovirus	Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	Mouton
	alpharétrovirus	avian leukosis virus (ALV)	Poulet
III	spumavirus	mouse ERV with L-tRNA PBS	Souris
		human ERV with L-tRNA PBS	Homme
	lentivirus	rabbit endogenous lentivirus K (RELIK)	Lapin
		prosimian immunodeficiency virus (PSIV)	Lémur
		galeopterus variegatus endogenous lentivirus (GvaELV)	Colugo
		mustelidae endogenous lentivirus (MELV)	Belette

Figure 11. Diversité des rétrovirus endogènes
(A) Diversité structurale. Les différents types de provirus endogènes dans les génomes. (1) Juste après leur intégration dans les génomes, la structure des ERV est identique à celle d'un provirus intégré de rétrovirus exogène (cf. Fig 3. pour les explications détaillées). Au cours du temps les ERV accumulent des mutations, délétions ou insertions qui inactivent une ou plusieurs ORF (la structure (2) montre un provirus délété dans son gène d'enveloppe). Parfois, comme illustré en (3), les séquences virales caractéristiques sont remplacées par des séquences non virales et seuls les LTR et les motifs PBS et PPT subsistent. Les LTR solos (4) sont 10 fois plus représentés que les autres types de structures dans les génomes et sont générés par recombinaison homologue entre les deux LTR d'un élément complet. (B) Diversité phylogénétique. Le tableau présente quelques exemples de rétrovirus endogènes colonisant différentes espèces. Tous les ERV humains indiqués sont également retrouvés chez d'autres primates. Les différents rétrovirus cités sont regroupés en fonction du genre auquel ils sont associés (gamma-, béta- rétrovirus, spumavirus, lentivirus). Les trois grandes classes de rétrovirus endogènes sont également indiquées. Adapté de (Mager and Stoye, 2015).

- Concernant la diversité de structure des séquences rétrovirales endogènes, on distingue 4 formes fondamentales (Fig. 11A) : (1) Des structures quasiment identiques à celles des formes provirales intégrées des rétrovirus exogènes (exemple : les copies endogènes du rétrovirus MLV chez la souris, (Stoye and Coffin, 1987)) ; (2) des séquences dans lesquelles une ORF au moins a été perdue (souvent le gène d'enveloppe, exemple : les éléments IAP (Ribet et al., 2008) et MusD (Ribet et al., 2007) chez la souris) ; (3) des structures qui contiennent des éléments à deux LTR et qui présentent un PBS et un PPT correctement positionnés mais aucune autre séquence caractéristique d'un rétrovirus. Parmi ces éléments non autonomes, on peut citer les exemples des séquences ETn (Sonigo et al., 1987) chez la souris et MaLR chez l'homme (Smit, 1993); (4) un dernier groupe, environ 10 fois plus représenté dans les génomes que les trois précédents constitué de « LTR solos », produits de la recombinaison homologue entre les 2 LTR d'un même élément. Malgré l'abondance des séquences rétrovirales endogènes dans les génomes, seuls quelques ERV réplicatifs ont pu être isolés à ce jour. Un dernier type de structure, très rare dans les génomes (et non représenté sur le schéma), correspond aux pseudogènes « processés » qui présentent une structure d'ARNm avec une queue poly-A à l'extrémité 3' et des répétitions directes de tailles variables. Par exemple, une étude fait état de la présence de pseudogènes processés de la famille HERV-W dans les génomes et montre que de multiples événements indépendants de rétrotransposition de l'ARNm rétroviral médiés par les LINE sont à l'origine de leur acquisition (Pavlícek et al., 2002).
- Concernant la diversité phylogénétique, les séquences rétrovirales endogènes peuvent être regroupées en familles contenant un nombre variable d'éléments (1-1000 copies par famille, le nombre de famille par génome pouvant aller jusqu'à 100) sur le critère du partage d'un même ancêtre commun (Fig. 11B). Les rétrovirus endogènes ont été détectés chez toutes les espèces de vertébrés dans lesquelles ils ont été recherchés. Comparées aux rétrovirus infectieux « actuels » par l'alignement des séquences *pol*, les différentes familles d'ERV sont réparties en trois classes (revue dans (Mager and Stoye, 2015)). Les éléments de classe I sont proches des gamma- et epsilon-rétrovirus exogènes, ceux de classe II sont proches des alpha- et bétarétrovirus et les séquences apparentées aux spumavirus forment la classe III. Notons qu'aucun ERV proche des deltarétrovirus n'a été identifié jusqu'à présent, ni de séquences lentivirales endogènes chez l'homme et chez la souris, bien qu'elles existent chez d'autres mammifères comme le lapin, certains lémuriens, le colugo Malayan et les furets (Cui and Holmes, 2012; Gilbert et al., 2009; Han and Worobey, 2015; Hron et al., 2014; Katzourakis et al., 2007). Notons que les

génomes sont également colonisés par des séquences virales endogènes, d'origine non rétrovirale (Katzourakis and Gifford, 2010).

Compte tenu de cette grande diversité, nommer et classer les ERV est un exercice complexe, d'autant plus qu'ils ont co-évolué parfois pendant des millions d'années avec leur hôte (Vargiu et al., 2016). En outre, si l'on réalise les alignements sur d'autres séquences que les régions conservées du gène *pol*, comme le gène *env*, des incohérences apparaissent, reflétant les nombreuses recombinaisons entre des rétrovirus endogènes non apparentés (Bénit et al., 2001). Initialement, les provirus endogènes étaient nommés en fonction du virus exogène le plus proche (il existe par exemple des MLV exogènes et endogènes). A ce nom viennent souvent s'ajouter une ou deux lettres pour indiquer l'espèce dans laquelle l'ERV a été initialement identifié. Ainsi, HERV (Human endogenous retrovirus) désigne un ERV découvert la première fois chez l'homme, MuERV implique une identification initiale chez la souris. Dans la majorité des cas, les familles d'HERV sont nommées d'après l'ARN de transfert qui se lie au PBS viral afin d'initier la transcription inverse. Par exemple, le nom HERV-K indique un provirus ou un groupe de provirus qui utilisent l'ARN de transfert correspondant à l'acide aminé lysine. Ce mode de classification, en plus de mener parfois à des erreurs dans l'attribution de l'ARN de transfert, est maintenant considéré comme obsolète sachant que des provirus apparentés peuvent avoir des PBS différents (Jern and Coffin, 2008). Quelques particularités notables : la séquence du PBS n'était parfois pas disponible au moment de la découverte d'un nouvel élément, ce qui a donné lieu à des dénominations selon des critères arbitraires et très variés comme : la proximité d'un élément avec un gène cellulaire (e.g. HERV-ADP), un numéro de clone (HERV-S71, renommé depuis HERV-T, (Bénit et al., 2001)) ou encore les trois premiers acides aminés déduits de la séquence nucléotidique (e.g. HERV-FRD, (Seifarth et al., 1995)). A un autre niveau, il est parfois nécessaire de distinguer des provirus d'une même famille présents à différents loci. Là encore, plusieurs types de nomenclatures ont été utilisés. La plupart du temps, le nom de la famille est suivi d'un numéro (e.g. HERV-K 108, HERV-K 109 sont deux provirus de la famille HERV-K(HML2) présents à deux loci différents). Quelquefois, les provirus apparentés sont nommés selon des critères cytogénétiques (e.g. HERV-K 11q22) (revue dans (Stoye, 2012)).

3. Acquisition et amplification des ERV

D'un point de vue phylogénétique ou structural, les ERV et leurs équivalents infectieux sont très proches. Cela a conduit à l'hypothèse que les séquences rétrovirales endogènes étaient les traces fossiles d'infections ancestrales de cellules de la lignée germinale par des rétrovirus infectieux (Löwer et al., 1996). Suivant le schéma classique, un rétrovirus infecte les cellules somatiques et se transmet de façon horizontale. Il arrive - événement rare – qu'un rétrovirus infecte une cellule de la lignée germinale, impliquée dans la formation des gamètes. Au moment de la reproduction, ces gamètes permettent la formation d'une cellule œuf, pouvant alors contenir une copie provirale. On parle dans ce cas d'endogénéisation du rétrovirus. Le provirus intégré, comme tout gène cellulaire, est alors transmis de façon verticale à la descendance, indépendamment de sa capacité à produire des virions infectieux.

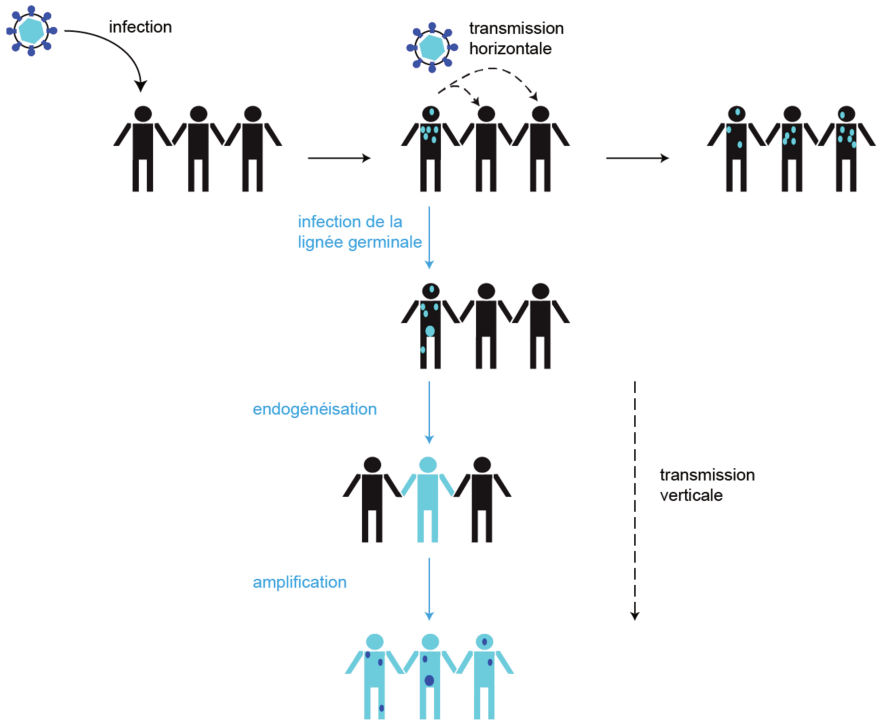


Figure 12. Endogénéisation d'un rétrovirus
« Classiquement », un rétrovirus infecte les cellules somatiques d'un individu et se transmet de façon horizontale. Dans de rares cas, un rétrovirus peut infecter les cellules de la lignée germinale d'un individu et se transmettre de façon verticale, comme n'importe quel gène cellulaire. Tous les descendants de l'individu possèderont alors une copie virale dans toutes leurs cellules. On parle alors d'endogénéisation du rétrovirus.

La plupart des familles d'ERV contiennent plusieurs copies dérivant les unes des autres, ce qui illustre leur capacité d'amplification dans les génomes. Différentes études ont montré que le mécanisme d'amplification utilisé par une famille peut être déduit de sa structure. Pour les éléments qui possèdent une enveloppe, l'amplification se fait par réinfections successives de

cellules germinales (revue dans (Dewannieux and Heidmann, 2013)). Il y a dans ce cas une étape extracellulaire qui nécessite la présence du récepteur fonctionnel à la surface de la cellule cible. A contrario, les éléments qui ont perdu leur enveloppe codent des particules rétrovirales strictement intracellulaire et l'amplification se fait par rétrotransposition selon un mécanisme de « copier-coller » (Dewannieux et al., 2004; Ribet et al., 2007, 2004) (Fig. 2). Une autre possibilité, pour les ERV ayant perdu leur *env*, est de mobiliser, par complémentation, l'enveloppe fonctionnelle d'un autre rétrovirus, mais les exemples sont rares dans le monde des endogènes.

Dans le génome murin, le nombre d'éléments par famille est variable et peut être très élevé (certaines familles contiennent plus de 1000 éléments). L'observation des cas extrêmes suggère que les familles qui contiennent le plus grand nombre d'éléments sont le plus souvent dépourvues d'enveloppe. Une étude réalisée *in silico* sur les ERV des génomes de 38 mammifères a permis de montrer que la perte du gène *env* est associée à un gain dans la capacité de propagation (Magiorkinis et al., 2012). Les auteurs proposent que c'est l'intracellularisation qui permet aux ERV de devenir des « super-spreaders ». Les travaux menés sur des éléments murins apparentés, IAP et IAPE, ont illustré la perte du gène d'enveloppe et l'intracellularisation *in vivo* (Ribet et al., 2008). Il existe deux différences essentielles entre ces éléments : (1) le gène *env* est présent chez les IAPE mais a été perdu au cours de l'évolution chez les IAP ; (2) la partie N-terminale de la protéine Gag (région MA), contient un signal de myristoylation (cf. chapitre 1 paragraphe 1.5.1.1) chez les éléments IAPE qui est absent des IAP. De fait, les particules IAPE sont adressées à la membrane plasmique où elles bourgeonnent, alors que les particules IAP restent localisées au niveau des citernes du réticulum endoplasmique. Lorsque des chimères de la région MA sont construites, la localisation de la particule correspondante et le mécanisme d'amplification sont modifiés. Par exemple, les éléments IAP « greffés » d'une protéine Gag portant un signal de myristoylation passent d'un mécanisme d'amplification par rétrotransposition intracellulaire à une infection extracellulaire, pourvu qu'il y ait également complémentation par une enveloppe (Ribet et al., 2008).

La plupart du temps, le rétrovirus ancestral ayant donné naissance à une famille d'ERV a disparu. Les traces fossiles que nous observons dans les génomes sont souvent le résultat de millions d'années de co-évolution entre l'ERV et son hôte et il est difficile d'inférer les effets initiaux de l'endogénéisation et les modifications mises en oeuvre pour une colonisation efficace des génomes. Il existe cependant un cas d'endogénéisation en cours chez un mammifère. Le virus exogène KoRV-A (pour Koala RetroVirus, de type gammarétrovirus)

qui se réplique dans la moelle osseuse infecte une proportion croissante de koala australiens causant des leucémies et des lymphosarcomes. En 2006, Tarlinton et ses coll. (Tarlinton et al., 2008, 2006) ont observé la transmission verticale de provirus et retrouvé de l'ADN rétroviral dans le sperme des animaux infectés démontrant ainsi l'existence de copies endogènes du KoRV-A chez les animaux du Nord de l'île. Les loci d'insertion ne sont pas encore fixés et la charge virale observée dans le plasma des animaux infectés est élevée, deux arguments en faveur d'une vague d'endogénéisation actuelle (il y a environ 100 ans). Plus récemment une étude (Simmons et al., 2012) a confirmé que tous les animaux du nord de l'Australie testés présentent un nombre élevé de copies du KoRV dans leur génome (150 en moyenne). Par contre, les animaux du Sud de l'île qui sont également sujets à l'infection par le KoRV ne montrent qu'un nombre très faible de copies provirales (1,5 à 0,0001 copies par génome - nombre de copies inférieur en moyenne à une copie par cellule), ce qui révèle le statut uniquement exogène du rétrovirus dans cette région. Ces observations en temps réel vont permettre de suivre l'efficacité de l'endogénéisation (du Nord vers le Sud de l'Australie), de comprendre comment le nombre de copies endogènes est contrôlé et aussi d'observer si l'endogénéisation est associée à une baisse de la pathogénicité (voir pour exemple : (Oliveira et al., 2007) et pour une revue : (Dewannieux and Heidmann, 2013; Mager and Stoye, 2015)). Pour finir, le KoRV est très proche du gammarétrovirus infectieux de Gibbon GaLV (78% de similitude au niveau nucléotidique) (Hanger et al., 2000; Tarlinton et al., 2008). Il est peu probable que ces deux virus soient apparus indépendamment et l'hypothèse actuelle, compte tenu de l'isolement géographique des deux espèces, privilégie un saut d'espèce probablement par l'intermédiaire d'un rongeur. Une séquence très proche de celle du GaLV vient d'ailleurs d'être identifiée chez un rongeur australien (*Melomys burtoni*), ce qui renforce cette idée (Alfano et al., 2016).

4. Datation et devenir des ERV, le cas particulier des HERV

4.1 Méthodes de datation

Deux méthodes sont classiquement employées pour estimer l'âge des éléments endogènes. La première, beaucoup utilisée pour les ERV des primates (e.g. (Gilbert and Feschotte, 2010; Goodchild et al., 1993)) repose sur le principe que le choix du site d'intégration du rétrovirus est essentiellement soumis au hasard. Par conséquent, deux provirus présents exactement au même locus dans deux espèces différentes sont le résultat d'un même événement d'intégration. Cette orthologie, qui peut être révélée par une PCR sur les régions d'ADN

flanquantes, indique que l'intégration a eu lieu avant la spéciation. La deuxième méthode se base sur l'analyse des LTR. Au moment de l'intégration dans le génome de l'hôte, les deux LTR proviraux sont identiques (voir chapitre 1 paragraphes 3.1.2 et 3.2) et plus on s'éloigne dans le temps, plus les mutations s'accumulent indépendamment dans ces deux séquences, à un taux proportionnel à la fréquence d'apparition de mutations neutres dans l'organisme hôte considéré. Ainsi, la mesure de la divergence entre les deux LTR d'un provirus donne une estimation de sa date d'intégration dans les génomes. Cependant, certains biais, comme par exemple les erreurs de la transcriptase inverse ou les recombinaisons inter-/intra-provirus, peuvent fausser le calcul (Tristem, 2000).

4.2 Devenir des ERV

Ces informations sur l'âge des provirus, conjuguées à des études structurales et fonctionnelles renseignent sur le destin des ERV (Fig. 13).

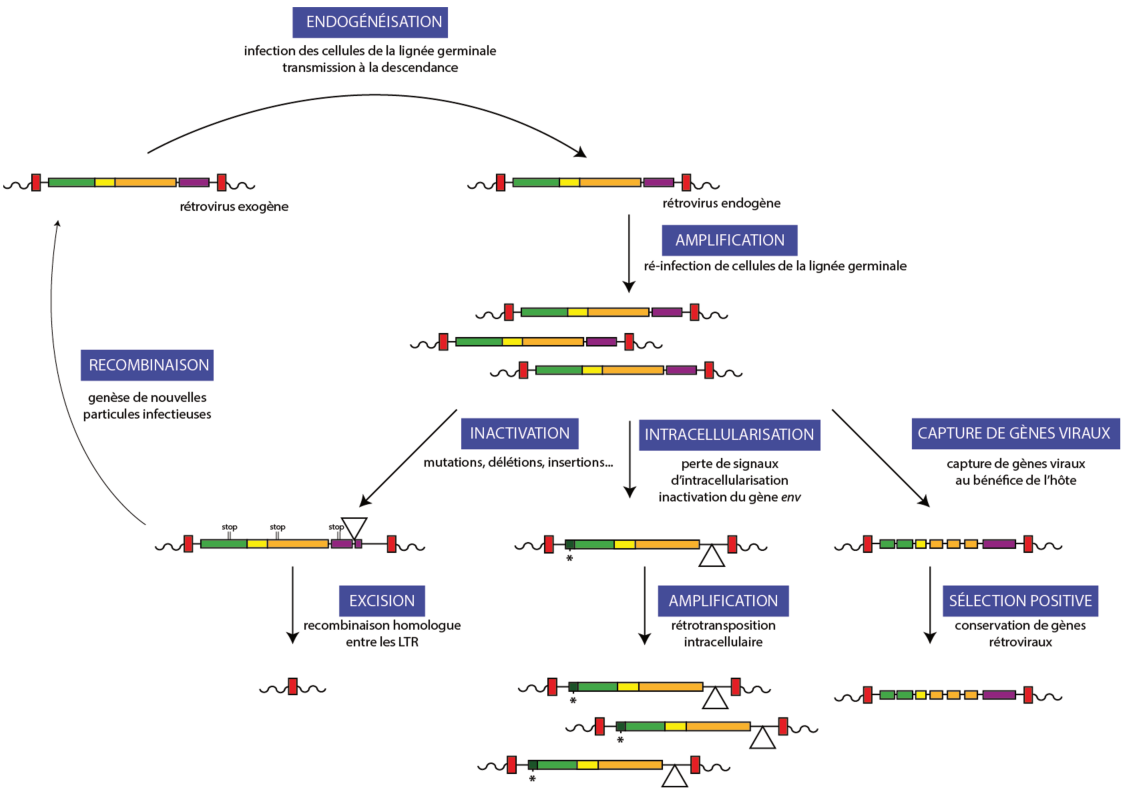


Figure 13. Devenir des rétrovirus endogènes
Schéma récapitulatif des différentes possibilités d'évolution d'un rétrovirus endogène après son intégration dans le génome de l'hôte. Le code couleur est le même que celui de la figure 3 (sauf que les LTR sont représentés en rouge). Les étoiles symbolisent des mutations ponctuelles, les triangles des délétions, et le « stop » un codon stop.

Il semble notamment que la formation de nouveaux ERV soit un phénomène continu au cours de l'évolution des mammifères. Les ERV apparaissent dans les génomes, se multiplient, de façon plus ou moins importante, et dans la majorité des cas dégénèrent par accumulation de mutations. Certains ERV ou gènes d'ERV sont maintenus par une pression de sélection dite purifiante, on parle alors d'exaptation ou de capture. L'exemple le plus frappant est celui des syncytines, dont nous reparlerons plus en détail dans le quatrième chapitre. Ce sont des protéines d'enveloppe d'ERV impliquées dans la formation des structures syncytiales à l'interface materno-fœtale du placenta (revue dans (Dupressoir et al., 2012; Lavialle et al., 2013a)). Parfois, le destin d'un même gène d'ERV est variable selon l'espèce considérée. C'est le cas du gène d'enveloppe du rétrovirus endogène de type V (ERV-V), entré dans les génomes des primates il y a plus de 45 millions d'années. L'Env-V se comporte comme une syncytine *bona fide* chez les singes de l'Ancien Monde mais a perdu ses propriétés canoniques de fusion, et n'est donc plus une syncytine chez les autres primates - humains en particulier – (Esnault et al., 2013).

Le destin d'un ERV peut également être intimement lié à celui d'un rétrovirus exogène, notamment par le biais de la recombinaison. Il s'agit d'un processus très fréquent chez les rétrovirus qui crée une grande diversité génétique et joue un rôle important dans l'évolution virale. Ainsi, les virus leucémogènes murins MLV-MCF (murine leukemia virus-mink cell focus-forming virus), également appelés MLV polytropes, apparaissent à la suite de recombinaisons entre le MLV écotrope réplicatif et des séquences *env* polytropes endogènes (Evans et al., 1985; Thomas et al., 1984). Un processus similaire de recombinaison en cours d'infection a été identifié chez les rétrovirus leucémogènes de chat (FeLV), où la capture d'*env* FeLV endogènes par un FeLV de type A produit un nouveau rétrovirus, FeLV B, de tropisme différent (Stewart et al., 1986). Les recombinaisons génétiques existent aussi entre rétrovirus endogènes. Ainsi, le virus endogène félin RD114 est composé des gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus endogène du chat (FcEV) et de l'*env* d'un rétrovirus endogène de babouin (BaEV) (Sen et al., 1978). L'origine même du BaEV résulte de la recombinaison entre deux autres ERV : le *gag* et *pol* de l'ERV de babouin PcEV et l'*env* de l'ERV simien SERV (van der Kuyl et al., 1999).

4.3 Le cas particulier des rétrovirus endogènes humains (HERV)

La datation des ERV a également permis de mettre en évidence deux dynamiques opposées. Alors que chez la Souris, plusieurs familles possèdent des éléments fonctionnels, capables de s'amplifier dans le génome et responsables de mutations spontanées ; chez l'homme, la quasi

totalité des familles sont inactives par accumulation de mutation, absence d'amplification, et la colonisation par de nouveaux ERV semble être suspendue (Stocking and Kozak, 2008; Subramanian et al., 2011).

Entre 31 et 40 familles distinctes ont été répertoriées dans le génome humain. Parmi les plus étudiées, on retrouve (pour revue (Magiorkinis et al., 2013)) (Fig. 14A):

- HERV-T : il s'agit d'une famille de taille moyenne présentant environ 60 copies (ou loci), l'amplification s'étant faite majoritairement par réinfection de la lignée germinale (Belshaw et al., 2005). Cette famille est éteinte depuis environ 35 millions d'années.
- HERV-L : c'est l'une des plus anciennes familles du génome. Ses membres sont représentés chez un grand nombre de mammifères et il est donc très probable que l'endogénéisation ait eu lieu chez leur ancêtre commun hypothétique (Bénit et al., 1999). Aucun gène d'enveloppe associé à cette famille n'a été retrouvé à ce jour ce qui indique que l'amplification s'est probablement faite de façon intracellulaire, par rétrotransposition.
- HERV-H : il s'agit de la famille la plus abondante du génome humain (les copies de HERV-H représentent environ 1/3 des loci d'HERV). L'invasion des génomes est datée autour de la divergence entre les singes de l'Ancien et du Nouveau Monde. Certaines copies ont un gène d'*env* (de Parseval et al., 2001) dont les propriétés immunosuppressives ont été démontrées *in vivo* (voir chapitre 1, paragraphe 2.4.1 (Mangeney et al., 2001)). Il semble que les provirus HERV-H se soient amplifiés par différents mécanismes incluant la rétrotransposition, la réinfection par des éléments compétents pour la réplication (Goodchild et al., 1995) et la trans-complémentation (i.e. utilisation de protéines fonctionnelles d'autres éléments) (Belshaw et al., 2005).
- HERV-W : il s'agit d'une petite famille, entrée dans les génomes avant la divergence entre les singes de l'Ancien et du Nouveau Monde et qui s'est amplifiée pendant une courte période (environ 5 millions d'années). Le gène d'enveloppe de ces éléments (également appelé *syncytine 1*) a été capturé par l'hôte et est indispensable à la formation du placenta humain (évoqué plus en détail dans le chapitre 4 de cette introduction) (Mi et al., 2000).
- HERV-K : Il s'agit d'un groupe de 11 familles (chacune étant donc issue d'un progéniteur infectieux propre), toutes apparentées au bétarétrovirus infectieux MMTV, d'où l'acronyme HML (pour 'Human MMTV-Like') qui est souvent accolé à HERV-K. La

lettre K, comme évoqué précédemment, indique que l'ARN de transfert lysine est utilisé pour le démarrage de la transcription inverse de ces éléments. Cette dénomination est obsolète puisque l'on sait par exemple que la famille HML5 utilisait plutôt l'ARN de transfert méthionine lors de son amplification dans les génomes (Lavie et al., 2004). Cette famille est par ailleurs l'une des plus anciennes du groupe HERV-K (Fig. 14B) : elle est présente à la fois chez les singes du Nouveau et de l'Ancien Monde mais absente dans la branche des prosimiens ce qui fait remonter son intégration à 55 millions d'années environ. Du fait de son âge, il serait tentant de faire l'hypothèse qu'elle soit l'ancêtre des autres familles HERV-K. Cependant, les alignements de séquences ne démontrent pas de liens de parenté assez forts (Lavie et al., 2004). La famille HML5 s'est éteinte très tôt dans l'histoire évolutive des primates, comme toutes celles du groupe HERV-K, à l'exception notable des éléments HML2, très actifs et dont nous allons parler en détail à présent.

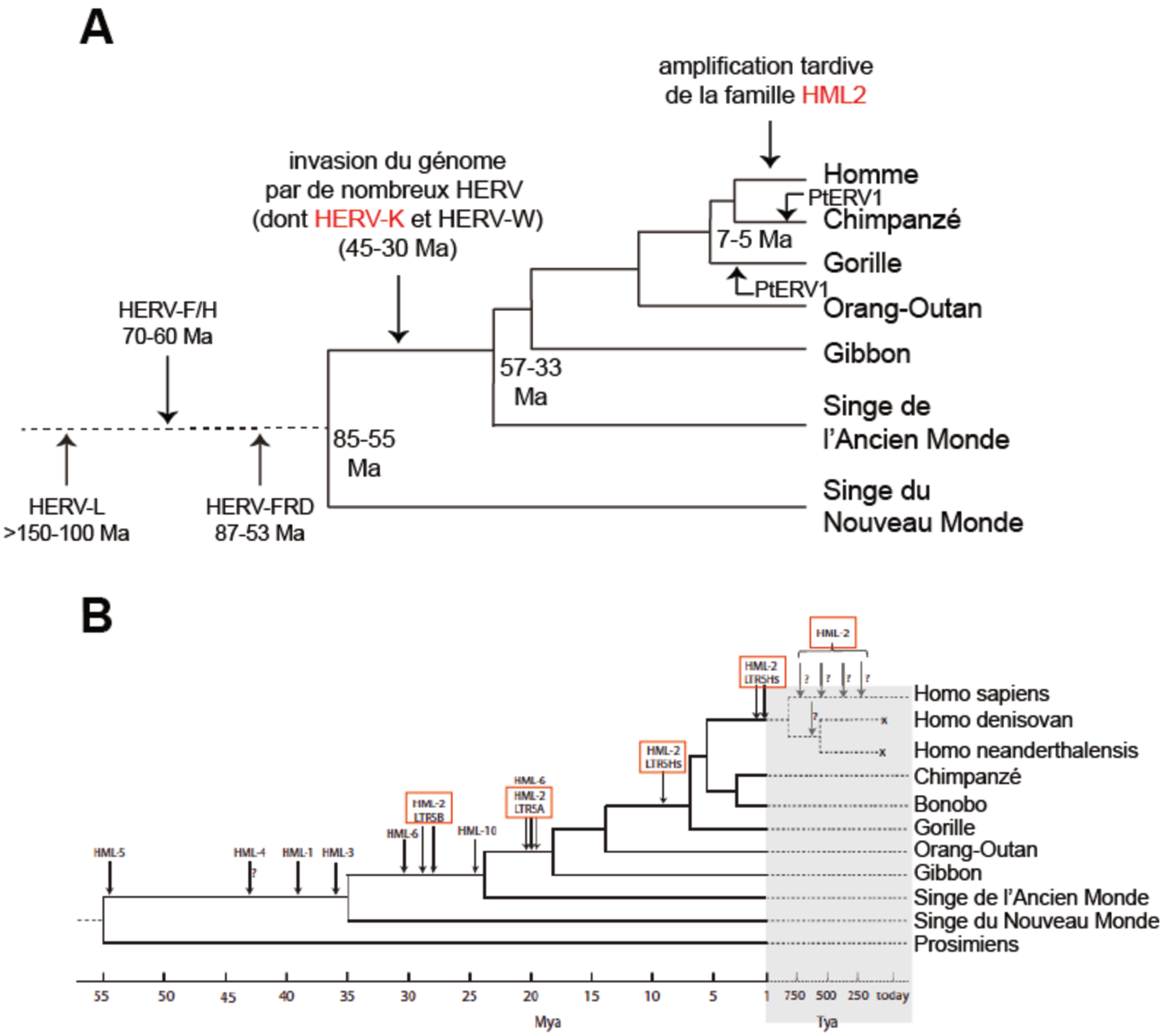


Figure 14. Evolution des HERV chez les primates

(A) L'évolution des HERV chez les primates est représentée par un cladogramme sur lequel les entrées de différentes familles de rétrovirus endogènes sont indiquées et datées approximativement. Les familles HERV-F/H et HERV-FRD sont entrées il y a 80-50 millions d'années dans les génomes et sont présentes chez tous les primates et même chez certains prosimiens. Les génomes ont subi une vague importante de colonisation par les rétrovirus endogènes (et par la famille HERV-K(HML2) en particulier) avant la divergence entre les hominoïdes et les Singes de l'Ancien Monde. Certains rétrovirus endogènes sont restés longtemps actifs dans les génomes. Certains provirus HERV-K(HML2) sont même spécifiques de l'homme. D'autres rétrovirus endogènes, comme le PtERV1 sont présents chez le chimpanzé et le gorille mais absent du génome humain. (B) Phylogénie des espèces de primates et amplification des différentes familles du groupe HERV-K. La date approximative de l'intégration de différentes familles HERV-K est indiquée par des flèches. Les points d'interrogation indiquent qu'aucune datation ne peut être donnée dans l'échelle de temps considérée. L'entrée et les différentes vagues d'amplification de la famille HML2, la plus active du génome humain, sont encadrées en rouge. D'après (Hanke et al., 2016).

5. HERV-K(HML2) : une famille récente avec des représentants quasi-fonctionnels

5.1 La famille HML2 dans les génomes humains

C'est à la famille HML2 que l'on doit les insertions les plus récentes de rétrovirus endogènes dans le génome de nos ancêtres, la première ayant eu lieu il y a environ 35-40 millions d'années. Subramanian et coll. ont dressé en 2011 (Subramanian et al., 2011) un catalogue précis de tous les provirus HML2 présents sous différentes formes (complets, quasi-complets, LTR solos) dans le génome humain. Les auteurs de cette étude recensent 91 provirus complets - ou presque complets - ainsi que 944 LTR solos, résultats de la recombinaison homologue entre les deux LTR. Les provirus HERV-K(HML2) sont classiquement regroupés dans deux catégories selon la présence (type 2) ou l'absence (type 1) d'une séquence de 292 paires de bases (pdb) à la jonction *pol-env* (Löwer et al., 1993) (Fig. 15).

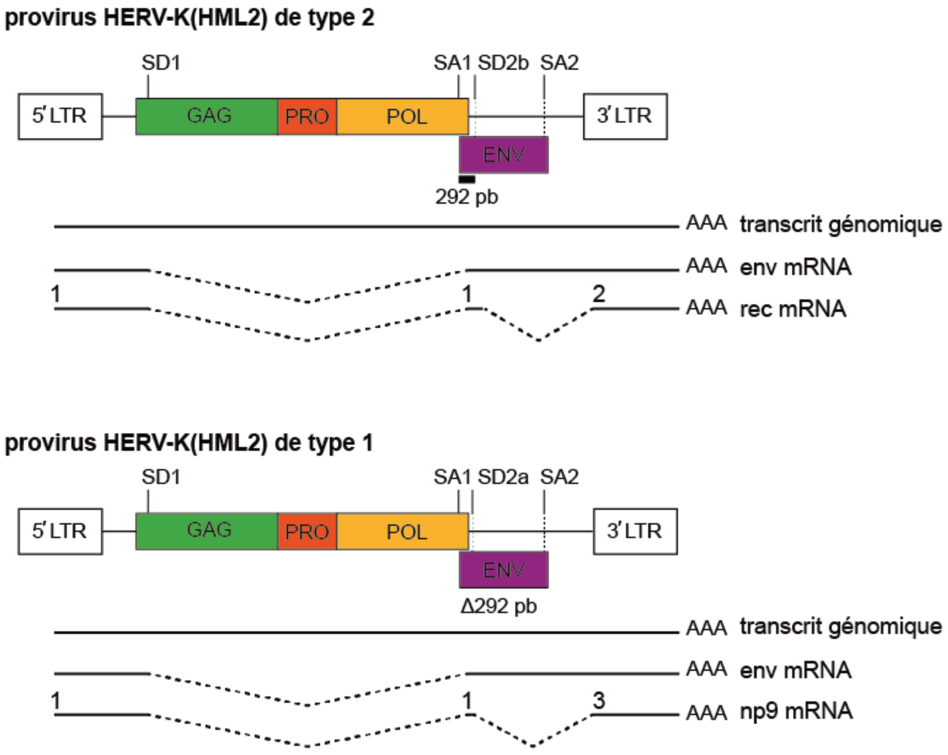


Figure 15. Les deux types de provirus HERV-K(HML2) dans les génomes humains
Représentation schématique des provirus HERV-K(HML2) complets de type 1 et de type 2 et des ARNm qui leurs sont associés. La représentation du provirus est la même que celle de la Fig. 3. La position des sites donneurs et accepteurs d'épissages (resp. SD et SA) est indiquée. Il existe deux types de provirus HERV-K(HML2) dans les génomes humains qui diffèrent par la présence (type 2 ; rectangle noir) ou l'absence (type 1 ; Δ292 pb) d'une séquence de 292 pb à la jonction entre *pol* et *env*. Cette séquence de 292 pb contient un site donneur d'épissage (SD2b) utilisé pour générer un transcrit doublement épissé à partir duquel sont synthétisés les deux exons de la protéine accessoire Rec. Pour les provirus de type 1, un site donneur d'épissage alternatif (SD2a), situé en aval du motif de 292 pb, est utilisé pour générer des ARNm codant la protéine Np9. Les chiffres placés au dessus des transcrits rec et np9 repèrent les différents cadres de lecture.

Les provirus de type 2 codent la protéine accessoire Rec, homologue fonctionnelle de Rev (HIV-1), impliquée dans l'export nucléaire des ARNm non épissés. Dans les provirus de type 1, le site donneur (SD2b) est délété et une autre protéine, Np9 (environ 9 kDa), est générée à partir d'un site d'épissage cryptique. Par ailleurs, du fait de la délétion, ces éléments n'expriment pas la protéine Env. Parmi les 91 provirus HERV-K(HML2) du génome humain, 20 ont une structure de type 1, 55 sont de type 2. Les 16 provirus restants n'entrent dans aucune de ces catégories du fait de délétions trop importantes englobant la région discriminante de 292 pdb. Par la suite, nous ne considèrerons que les provirus HERV-K(HML2) de type 2 car ce sont les seuls éléments potentiellement fonctionnels du génome.

En plus de ce critère structural, les provirus HERV-K(HML2) sont classés selon la séquence de leurs LTR. L'intérêt de ce type d'analyse est de donner des informations sur la date d'entrée dans les génomes en plus de permettre un regroupement sur des critères d'homologie de séquences. Dans le cas de la famille HML2, les provirus se répartissent en trois groupes : LTR5Hs, LTR5A et LTR5B. Les éléments les plus récents appartiennent à la sous-famille LTR5Hs qui comprend tous les provirus de type 1 et également 28 provirus retrouvés spécifiquement chez l'Homme (i.e., absents aux loci orthologues chez le chimpanzé et les autres primates). Ceci suggère fortement que cet ensemble d'éléments se répliquait et s'amplifiait dans la lignée germinale de nos ancêtres il y a 5-6 millions d'années. Il existe même un polymorphisme insertionnel au sein de ce groupe qui traduit la dynamique récente de la famille. Cette notion de polymorphisme est importante pour les rétrovirus endogènes et désigne des différences à un locus donné entre deux individus : présence d'un provirus complet, d'un LTR solo ou bien d'une répétition en tandem du même provirus voire absence totale de séquence virale. Depuis l'étude de Subramanian et coll. publiée en 2011, d'autres éléments HML2 ont été identifiés dans les régions centromériques des chromosomes (Contreras-Galindo et al., 2013; Zahn et al., 2015). Des représentants d'intégrations polymorphes, absents dans l'ADN des donneurs ayant servis à établir le séquençage du génome humain ont été découverts (Macfarlane and Badge, 2015; Marchi et al., 2014). De plus, une étude récente a exploité les données de séquençage des génomes de Neanderthal et Denisovan (Meyer et al., 2012; Prüfer et al., 2014), deux espèces éteintes d'hominidés qui ont divergé de l'Homme actuel (Sapiens) il y a environ 553000 à 589000 ans. Les auteurs y ont identifié 6 provirus HERV-K(HML2) absents de l'assemblage le plus récent du génome humain ainsi que de nombreuses séquences analysées dans deux études récentes (Lee et al., 2014; Marchi et al., 2014), illustrant la possibilité d'insertions très récentes de la famille HML2 dans cette branche éteinte des Hominidés. Une nuance est cependant apportée à ce

résultat : il est possible en effet que ces éléments soient polymorphes et en fait présents chez Sapiens à très faible fréquence allélique. Il est également envisageable que ces provirus soient entrés dans les génomes avant la divergence Sapiens/Hominidés sans être fixés (i.e. le provirus situé à un locus donné n'est pas présent chez 100% des individus) chez la population d'ancêtres communs expliquant ainsi leur perte dans la branche Sapiens. Le groupe de Coffin (auteur du « catalogue » de 2011) (Wildschutte et al., 2016) a répertorié 36 insertions non fixées dans le génome humain à partir de l'étude de 2500 échantillons. 19 d'entre elles avaient déjà été identifiées en partie par les auteurs de l'étude évoquée juste au dessus (Lee et al., 2014). Parmi ces insertions, 30 présentent une séquence complète, l'une d'entre elles correspondant même à un provirus intact potentiellement réplicatif.

L'un des éléments HML2 le plus préservé et étudié est HERV-K113, représenté à une fréquence allélique d'environ 16% (varie entre 13 et 30% selon le groupe ethnique considéré) et entré dans les génomes il y a environ 1 million d'années (Jha et al., 2009; Turner et al., 2001). Le provirus présente des phases de lecture ouvertes pour tous les gènes mais des mutations dans *pol* et *env* ont réduit voire abrogé la fonction des protéines associées (RT et Env) (Beimforde et al., 2008; Hanke et al., 2009). Malgré la relative conservation de quelques provirus HERV-K(HML2), dont HERV-K113, aucune copie infectieuse n'a été jusqu'à présent identifiée dans les génomes humains ou des singes de l'Ancien Monde. Il est probable, comme le suggère fortement l'étude du groupe de Coffin de 2016 (Wildschutte et al., 2016), que quelques provirus capables de se répliquer soient présents à faible fréquence dans la population ou que, ponctuellement, des événements de recombinaison régénèrent un virus HERV-K(HML2) infectieux. Etudier la mobilité de la famille HML2 représente un enjeu important pour la compréhension des pathologies humaines éventuellement associées mais aussi un véritable défi technique. Il faudrait en effet être capable de mettre en évidence un polymorphisme insertionnel chez un individu – par exemple, identifier un provirus à un locus donné dans un tissu donné et montrer que ce même provirus est absent au même locus dans un autre tissus du même individu (pour revue voir (Magiorkinis et al., 2013)).

En conclusion, bien que la famille HERV-K(HML2) comprenne les provirus endogènes les plus récents et les mieux préservés du génome humain, aucun d'entre eux ne code une séquence identique à celle qu'il possédait au moment de l'intégration chromosomique. Même les loci qui présentent des phases de lecture ouvertes pour chacun des gènes essentiels contiennent de nombreuses mutations accumulées au cours de l'évolution qui ont un impact important sur l'expression, la structure et la fonction des protéines codées, en particulier pour les protéines structurales et les enzymes virales. Il est donc difficile, à partir de l'image fossile

que nous avons du virus dans les génomes, d'analyser ses propriétés, sa réplication, son infectivité et surtout de tirer des conclusions générales sur l'ensemble de la famille. La reconstruction et l'expression dans des cellules de séquences HML2 ancestrales, progéniteurs infectieux putatifs, ont permis d'aborder une grande partie de ces questions.

5.2 Reconstitution de progéniteurs HERV-K(HML2) : étude systématique de la structure et des propriétés de la famille HERV-K(HML2)

5.2.1 Reconstruction indépendante de trois provirus HERV-K(HML2) ancestraux

Trois séquences ancestrales de HERV-K(HML2) ont été générées indépendamment : Phoenix (Dewannieux et al., 2006) et HERV-K_{CON} (Young and Bieniasz, 2007) sont deux séquences consensus, oriHERV-K113 correspond à un clone moléculaire « ressuscité » à partir du provirus HERV-K 113 dans lequel les mutations post-insertionnelles ont été révertées (Beimforde et al., 2008).

5.2.1.1 Deux provirus consensus : Phoenix et HERV-K_{CON}

Phoenix le premier consensus publié a été généré au laboratoire (Dewannieux et al., 2006) et l'étude de ses propriétés détaillées a été l'un des objectifs de cette thèse. Pour construire ce progéniteur infectieux putatif, l'ensemble des copies provirales complètes humaines (9 à l'époque de l'article -en excluant les provirus de type I qui possèdent une délétion de 292 nucléotides à la jonction *pol-env*-) ont été assemblées et alignées afin d'obtenir une séquence consensus *in silico*, en retenant, pour chaque position, le nucléotide le plus représenté. La séquence ainsi obtenue contient des ORF pour chacune des protéines codées par HERV-K(HML2) (Gag, Pro, Pol, Env, ainsi que la protéine accessoire Rec), *gag*, *pro* et *pol* étant séparés par un déphasage -1. Ce provirus consensus est distinct de chacune des séquences utilisées pour le générer, avec au moins 20 différences au niveau des acides aminés sur l'ensemble des séquences (Dewannieux et al., 2006) (Fig. 16A). A partir de cette reconstruction *in silico*, un clone moléculaire -Phoenix- a ensuite été généré, en utilisant les provirus clonés K108 et K109 comme matrice et en introduisant les mutations nécessaires à l'obtention de la séquence consensus. Les LTR de HERV-K(HML2) n'étant pas fonctionnels dans toutes les lignées cellulaires (Lavie et al., 2005; Ruda et al., 2004), la partie U3 du LTR 5' a été remplacée par le promoteur CMV. Un site de clonage a également été introduit après

le gène d'enveloppe dans la région U3 du LTR 3' afin de possiblement étiqueter (avec le gène *neo*) le transcrit rétroviral sans altérer ses capacités codantes.

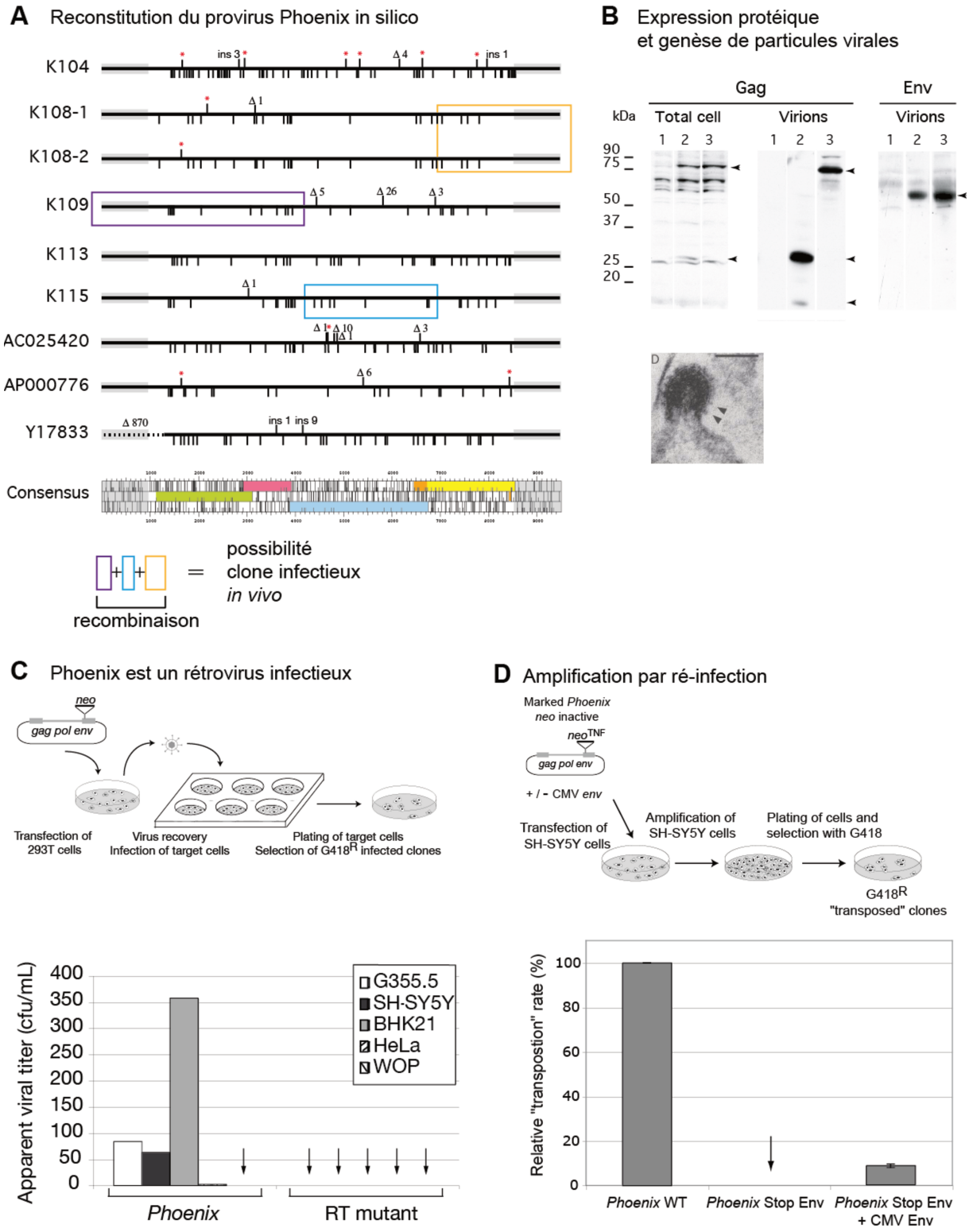


Figure 16. Reconstitution de Phoenix, progéniteur infectieux putatif de la famille HERV-K(HML2)
(A) Représentation des 9 provirus HERV-K(HML2) spécifiquement humains, utilisés pour générer la séquence consensus de Phoenix (« ORF map » représentée : *gag* en vert, *pro* en rouge, *pol* en bleu, *env* en orange et jaune, *rec* en orange et les deux LTR en gris). Les substitutions dans les séquences de *gag*, *pro*, *pol* et *env* sont

indiquées pour chacun des provirus endogènes, par comparaison avec la séquence du consensus. Les insertions et délétions (ins/Δ) ainsi que les codons stops prématurés (symbolisés par une étoile rouge) sont représentés. (B) (En haut). Expression du provirus Phoenix et genèse de particules rétrovirales. Le provirus Phoenix est transfecté dans des cellules 293T (piste 2 sur la figure) et la présence des protéines Gag et Env dans les lysats (« total cell ») et les surnageants de culture (« virions ») est détectée par western blot. La piste 1 correspond à une condition contrôle pour laquelle des cellules ont été transfectées par un plasmide vide. Dans la piste 3, les lysats et surnageants sont ceux de cellules transfectées par un provirus Phoenix inactivé dans la région pro. (En bas). Particule rétrovirale Phoenix en cours de bourgeonnement, observée à fort grossissement en microscopie électronique. Les têtes de flèches pointent les spicules correspondant aux glycoprotéines d'Env. (C) Etude de l'infectiosité des particules rétrovirales Phoenix. (En haut). Différents types de cellules sont infectées par le provirus Phoenix ou par un mutant défectif pour l'activité RT, portant tous deux un gène de résistance à la néomycine. Le nombre de clones résistants à la néomycine ($G418^R$) est ensuite déterminé et permet de calculer le titre viral apparent pour chaque condition. (D) Etude de la « rétrotransposition » de Phoenix. (En haut). Le provirus Phoenix a été marqué par un indicateur neo^{TNF} mis au point au laboratoire pour mettre en évidence la rétrotransposition d'un élément. Ce provirus a été transfecté dans des cellules SH-SY5Y, permissives à l'infection par Phoenix. Les cellules ont ensuite été amplifiées et soumises à une sélection par le G418, puis le nombre de clones résistants à l'antibiotique a été déterminé et a permis de calculer une fréquence de transposition, représentée sur le graphe. La « rétrotransposition » de Phoenix est dépendante de la présence d'un gène d'enveloppe fonctionnel, présent soit dans le provirus sauvage (« Phoenix WT ») soit apporté en trans (par co-transfection avec un vecteur d'expression de l'enveloppe) au provirus Phoenix présentant un codon stop prématuré dans son gène d'*env* (« Phoenix Stop Env »). L'ensemble des figure est tiré de (Dewannieux et al., 2006).

Le deuxième consensus a été établit en parallèle dans le laboratoire de Paul Bieniasz (Young and Bieniasz, 2007). Une recherche BLAST sur le génome humain, basée sur la séquence entière de HERV-K 113 a permis de sélectionner 9 provirus HML2 spécifiquement humains (quelques uns en commun avec ceux utilisés pour générer Phoenix). A partir de l'alignement de ces différentes séquences, un consensus, appelé HERV-K_{CON} a été généré *in silico*. En utilisant des 60-mers couvrant l'ensemble du dit consensus et une stratégie de PCR pour les liguer progressivement, un plasmide contenant l'ensemble du génome de HERV-K_{CON} a été construit.

5.2.1.2 Un clone moléculaire « ressuscité » à partir de HERV-K 113 : oriHERV-K113

En alignant la séquence du provirus HERV-K 113 complet avec dix autres éléments HERV-K(HML2) bien conservés et spécifiquement humains, un ensemble de mutations post-insertionnelles et non synonymes ont été identifiées dans les séquences des gènes *env*, *rec* et *gag-pro-pol* de l'élément HERV-K 113 décrit par Turner et coll. (Turner et al., 2001). Afin de générer un clone moléculaire HERV-K 113 « ressuscité », appelé oriHERV-K113, la séquence entière de l'élément a été clonée dans un vecteur d'expression et la technique de mutagenèse dirigée utilisée afin de « corriger » les 25 mutations post-insertionnelles non-synonymes mises en évidence (Beimforde et al., 2008; Chudak et al., 2013; George et al., 2011; Hanke et al., 2009). Trois modifications supplémentaires ont été introduites afin de rétablir l'identité totale des séquences des deux LTR. Les mutations silencieuses et altérations

présumées dans les régions non codantes ont par contre été laissées inchangées (Chudak et al., 2013).

5.2.1.3 Vérification de l'expression protéique des différents éléments ancestraux

L'observation au microscope électronique de cellules 293T exprimant le provirus reconstitué Phoenix montre la présence de particules virales bourgeonnantes à la membrane plasmique. Dans l'espace extracellulaire, deux types de particules sont observées : les immatures et les matures pour lesquelles le clivage protéolytique a eu lieu (avec un coeur condensé dense aux électrons). Les particules sont entourées par des spicules, reconnues spécifiquement par un anticorps dirigé contre la sous-unité SU de l'enveloppe HERV-K(HML2) (Fig. 16B). De même, dans le surnageant de cellules transfectées par un plasmide codant les protéines Gag et Pro du provirus consensus HERV-K_{CON} ou du provirus « ressuscité » oriHERV-K113, des observations au microscope électronique révèlent la présence de particules de type rétroviral (Chudak et al., 2013; Young and Bieniasz, 2007). Ces observations suggèrent que les provirus ancestraux sont capables de diriger la synthèse des différents composants d'une particule rétrovirale, ce qui a été confirmé par des expériences de western blot sur des cellules 293T transfectées par le provirus complet (Dewannieux et al., 2006) ou des vecteurs d'expression des différents gènes (Beimforde et al., 2008; Young and Bieniasz, 2007). Par exemple, à partir du provirus Phoenix, un précurseur Gag de 80 kDa ainsi que des produits de clivages de différentes tailles sont détectés dans les lysats cellulaires et dans les surnageants (où l'on ne détecte que les formes clivées, comme attendu). La protéine d'enveloppe embarquée sur les virions est détectable dans les surnageants de culture, mais à très faibles niveaux dans les lysats cellulaires (Fig. 16B).

5.2.2 Les enseignements tirés de ces reconstructions

5.2.2.1 Les provirus consensus sont infectieux mais avec des titres très bas

Le provirus consensus Phoenix est capable de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule cible, de procéder à la transcription inverse et de s'intégrer dans le génome selon un mécanisme canonique de duplication de cible (Dewannieux et al., 2006). En ce qui concerne le provirus consensus HERV-K_{CON}, les auteurs ne sont pas parvenus à générer des particules infectieuses qui contiennent à la fois un génome HERV-K_{CON} et l'enveloppe de ce même virus. Cependant, en travaillant à partir du cœur HERV-K_{CON} (Gag, Pro, Pol) pseudotypé par

l'enveloppe du virus VSV, ils ont réussi à montrer que le génome HERV-K_{CON} contient tous les composants fonctionnels nécessaires à la réalisation d'un cycle de réplication « exogène » (Young and Bieniasz, 2007). Bien que l'efficacité de la transcription inverse et de l'intégration des deux provirus consensus n'aient pas été étudiées en détails, Brady et coll., dans la continuité des travaux de Young et coll., ont analysé 1565 sites de néo-intégration après infection de lignées cellulaires humaines avec le consensus HERV-K_{CON} portant un gène rapporteur *gfp* et pseudotypé par l'envelope VSV-G (Brady et al., 2009). Ils ont ainsi montré que les néo-insertions se faisaient préférentiellement dans les unités transcriptionnelles actives. Par contre, la majorité des éléments HML2 fixés dans les génomes sont présents en dehors des gènes ou bien en orientation antisens quand c'est le cas. Cette apparente contradiction illustre l'action de la sélection purifiante qui élimine les insertions délétères (van de Lagemaat et al., 2006) et montrent bien que les éléments fossiles de notre génome ne reflètent pas complètement la dynamique ancienne de la famille rétrovirale. L'efficacité de ces premières étapes du cycle de réplication est relativement réduite, en témoignent les faibles titres infectieux obtenus *in vitro* (Fig. 16C). Plusieurs explications possibles ont été proposées (revue dans (Hanke et al., 2016)). (i) Tout d'abord, la faible infectiosité pourrait être une propriété intrinsèque du virus ancestral. (ii) Il est possible aussi que cette caractéristique soit un artefact de reconstruction. En effet, les méthodes utilisées et décrites plus haut sont basées sur des approches statistiques. (iii) De plus, l'infection peut être inhibée, au moins partiellement, par des facteurs cellulaires s'opposant à la réplication virale, comme certains facteurs de restriction. Nous reparlerons de ce point en détails dans le chapitre suivant mais il est intéressant de noter que la comparaison deux à deux des séquences de HERV-K_{CON} avec chacune des 10 séquences ayant contribué à la constuction du consensus *in silico* fait apparaître essentiellement des changements nucléotidiques de type G vers A ou C vers T ou vice-versa. Cette observation oriente vers un rôle important des cytidines désaminases dans l'évolution des séquences HERV-K(HML2) chez l'homme et dans l'inactivation des provirus contemporains (Young and Bieniasz, 2007). (iv) Enfin, des observations en microscopie électronique réalisées notamment avec Phoenix suggèrent que le mode de transmission de HERV-K(HML2) se rapprocherait de celui du deltarétrovirus HTLV-1, c'est à dire par contact cellule-cellule et formation d'une synapse virologique (voir chapitre 1, paragraphe 3.3.5) plutôt que par relargage de virions libres dans le milieu extracellulaire (Dewannieux et al., 2006), ce qui pourrait corréler avec les faibles titres viraux observés.

5.2.2.2 L'amplification de HERV-K(HML2) se fait par réinfection

Afin de rendre compte du mécanisme d'amplification de la famille HERV-K(HML2), Dewannieux et coll. ont analysé l'efficacité relative d'une rétrotransposition intracellulaire vs. une réinfection par Phoenix (Fig. 16D). En utilisant un provirus consensus, étiqueté par un gène indicateur *neo*, qui ne devient actif qu'une fois l'élément transcrit, réverse-transcrit et intégré (voir (Esnault et al., 2002) pour le système de marquage). L'élément ainsi marqué a été introduit par transfection dans différentes lignées cellulaires, identifiées au péalable (Fig. 16C) comme permissives ou non pour l'infection. Des clones résistants à la néomycine ont été obtenus uniquement avec les cellules permissives suggérant que le processus d'amplification mobilise l'enveloppe de l'élément ainsi que son récepteur et se fait donc par réinfection. La même expérience, réalisée sur des cellules permissives mais cette fois avec un élément défectif pour le gène d'enveloppe a permis de confirmer cette hypothèse : dans ces conditions, aucun clone résistant à la néomycin n'apparaît. Cette observation fait écho à des données d'évolution qui montrent que le gène *env* HERV-K(HML2) a été soumis à la même pression de sélection purifiante que les autres gènes rétroviraux lors de l'amplification de la famille (Belshaw et al., 2004).

5.2.2.3 Trois recombinaisons sont suffisantes pour générer un clone infectieux *in vivo*

En utilisant les provirus endogènes sélectionnés pour l'assemblage du consensus, Dewannieux et coll. ont généré différents éléments chimères qui pourraient émerger spontanément de la recombinaison entre différents allèles d'un même génome humain. Ils ont montré qu'une activité RT était détectable dans les surnageants de cellules 293T transfectées par la « double chimère » K109/K115, qui pourtant n'est pas infectieuse, probablement à cause de mutations accumulées dans le gène d'*env* de K115. Dans les mêmes conditions expérimentales, la « triple chimère » K108/K109/K115 (enveloppe K108, Fig. 16A) est infectieuse, ce qui suggère que des éléments HERV-K(HML2) totalement fonctionnels pourraient émerger du génome de certains individus soit via un événement de recombinaison impliquant 3 fragments, soit via une recombinaison entre deux copies (e.g., K109 et K115) et une complémentation en trans par une protéine d'enveloppe intacte (e.g. K108). Ce scénario est probable car des recombinaisons entre provirus HERV-K(HML2) ont fréquemment eu lieu dans le génome humain (Hughes and Coffin, 2005).

5.2.2.4 Les étapes tardives du cycle de réplication de HERV-K(HML2) présentent des particularités

Les provirus HERV-K(HML2) ancestraux (consensus et oriHERV-K 113) ont également permis d'étudier les étapes finales du cycle de réplication.

A partir de HERV-K_{CON}, une étude détaillée de l'incorporation des acides nucléiques viraux dans des particules HERV-K(HML2) a été récemment menée (Contreras-Galindo et al., 2015; Dube et al., 2014). De façon étonnante, Dube et coll. ont révélé qu'en plus du génome ARN encapsidé par les rétrovirus « canoniques », les éléments HERV-K(HML2) semblent capables de co-incorporer du matériel génétique sous forme d'ADN réverse-transcrit (Dube et al., 2014).

Une autre particularité du virus HERV-K(HML2) a été décelée à partir de l'observation de particules HML2 produites par des tératocarcinomes et des lignées cellulaires dérivées. Bien qu'issues d'une séquence bétarétrovirale, elles s'assemblent à la membrane plasmique comme le font les rétrovirus de type-C (e.g. (Bieda et al., 2001)). L'étude des 3 provirus ancestraux a permis de confirmer cette donnée (Dewannieux et al., 2006; Hohn et al., 2014; Young and Bieniasz, 2007). Récemment, Hohn et coll. ont montré que lorsque le provirus « ressuscité » oriHERV-K113 est exprimé à fort niveau (i.e. en utilisant une séquence optimisée pour l'usage des codons et un promoteur CMV), le type d'assemblage et la morphologie des particules se trouvent modifiés. La particule se forme alors selon les critères d'un virus de type A et des particules intracytoplasmiques immatures s'accumulent à des membranes vésiculaires et à la membrane plasmique (Hohn et al., 2014).

5.3 Etude des propriétés des protéines d'enveloppe HERV-K(HML2)

L'enveloppe consensus Phoenix et certaines copies endogènes ont été décrites au laboratoire et quelques unes de leurs propriétés originales constituent également l'objet de cette thèse.

5.3.1 Identification d'une enveloppe endogène fonctionnelle

En 2005, Dewannieux et coll. ont caractérisé les propriétés des 6 enveloppes HERV-K(HML2) complètes identifiées à l'époque dans le génome humain (Dewannieux et al., 2005). Comme nous l'avons souligné, la liste des provirus HERV-K(HML2) s'est allongée depuis, mais c'est cette première caractérisation qui a servi de point de départ pour différentes expériences réalisées durant cette thèse. La Fig. 17 met en évidence les caractéristiques des

différentes versions alléliques des enveloppes HERV-K(HML2). Il est frappant de noter que l'Env HERV-K(HML2) 108 est fonctionnelle : elle est en effet correctement exprimée, clivée et incorporée dans des particules virales. Elle est aussi seule capable de pseudotyper des particules SIV, même si les titres viraux observés sont faibles (Fig. 17C).

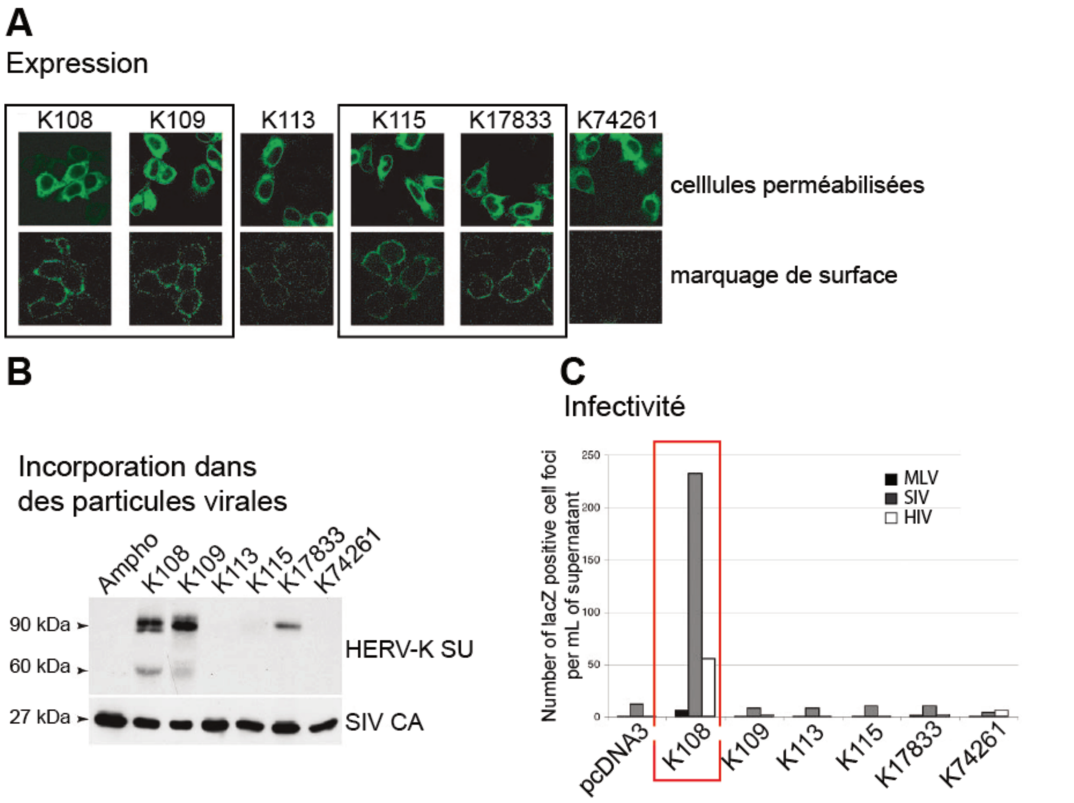


Figure 17. Etude des propriétés des protéines d'enveloppe HERV-K(HML2) endogènes spécifiquement humaines

(A) Analyse par immunofluorescence de cellules HeLa transfectées par différentes enveloppes endogènes spécifiquement humaines de la famille HERV-K(HML2). (En haut). Les cellules ont été fixées et perméabilisées avant d'être marquées par un anticorps dirigé contre l'enveloppe HERV-K(HML2). (En bas). Les cellules ont été observées directement après marquage sans fixation et perméabilisation préalables. Les quatre enveloppes encadrées en noir sont celles qui présentent une expression à la membrane plasmique. (B) Des cellules 293T ont été transfectées par un plasmide d'expression des protéines du cœur viral SIV, un vecteur rétroviral et les différentes enveloppes HERV-K(HML2) endogènes (ou un vecteur d'expression de la protéine d'enveloppe du virus MLV Ampho en contrôle). Les surnageant de culture de ces cellules ont été concentrés 48 heures après la transfection et la présence d'enveloppe a été testée par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la SU de l'Env HERV-K(HML2). (C) Des particules rétrovirales ou lentivirales (cœurs utilisés : MLV, SIV, HIV) pseudotypés par les différentes enveloppes HERV-K(HML2) endogènes ont été produites en 293T et utilisées pour infecter des cellules cibles (G355.5). Les titres viraux ont été calculés 60 heures après l'infection. L'enveloppe K108 (condition encadrée en rouge) est la seule qui a conservé ses propriétés infectieuses. D'après (Dewannieux et al., 2005).

5.3.2 Modulation des propriétés fonctionnelles de Env HERV-K(HML2) par troncation de sa queue cytoplasmique

L'enveloppe HERV-K113 reconstituée et optimisée pour l'usage des codons (appelée oricoHERV-K113 Env) a été étudiée en détails par Hanke et coll. (Hanke et al., 2009), en

particulier pour des mutants du domaine cytoplasmique. Comme évoqué en début de cette introduction, certains gammarétrovirus présentent un peptide R, situé au niveau C-terminal de l'enveloppe, dont le clivage par la protéase virale est nécessaire pour activer les propriétés fusiogènes de la protéine. Aucun domaine équivalent n'a été identifié pour HERV-K(HML2) mais des troncations de la queue cytoplasmique ont des conséquences importantes sur différentes propriétés de l'enveloppe. Le mutant ayant la délétion la plus courte (7 acides aminés) présente des défauts de maturation : il n'est ni clivé, ni incorporé dans des particules rétrovirales. La troncation intermédiaire, de 18 acides-aminés n'a pas d'impact significatif sur l'efficacité du clivage et de l'incorporation mais entraine une augmentation de l'infectivité d'un facteur 10. De façon surprenante, lorsque la quasi-totalité de la queue cytoplasmique est éliminée (mutant appelé HERV-K113 oricoEnv$\Delta_{659\text{-}699}$, seulement 3 acides aminés de celle-ci sont conservés), les particules virales incorporent environ 5 fois plus d'Env à leur surface et sont environ 100 fois plus infectieuses qu'avec l'enveloppe entière. Les mécanismes en jeu ne sont pas complètement élucidés, mais il est possible que la présence, sur les particules, d'enveloppe avec une queue cytoplasmique très courte réduise son interférence avec la protéine de matrice du cœur viral en formation. Il est probable aussi que la troncation de la queue cytoplasmique accroisse la mobilité de l'enveloppe dans la bicouche lipidique, favorisant ainsi sa concentration locale et l'interaction avec le/les récepteur(s) spécifique(s). Nous avons pu observer que la délétion de la quasi-totalité de la queue cytoplasmique de l'enveloppe consensus de Phoenix a le même type de conséquences sur l'infectivité des particules rétrovirales. Les travaux présentés dans cette thèse illustrerons l'importance de ce domaine cytoplasmique dans différentes situations physio-pathologiques.

5.3.3 Etude du tropisme de l'enveloppe HERV-K(HML2)

Les provirus HERV-K(HML2) consensus et reconstitués ont permis une étude extensive du tropisme de l'enveloppe HERV-K(HML2). En utilisant des particules lentivirales ou gammarétrovirales pseudotypées par l'Env HERV-K(HML2), différents groupes ont montré que de nombreuses lignées cellulaires, provenant d'espèce variées, peuvent être infectée, suggérant que le tropisme cellulaire de l'enveloppe est large (Contreras-Galindo et al., 2015; Dewannieux et al., 2006; Hanke et al., 2009; Young and Bieniasz, 2007). Cette observation a été confirmée récemment par deux études indépendantes utilisant des systèmes expérimentaux un peu différents (Kramer et al., 2016; Robinson and Whelan, 2016). Dans la première, les auteurs ont montré que des virus SHIV, pseudotypés par l'enveloppe HERV-K113

oricoEnv$\Delta_{659-699}$ (cf. paragraphe précédent) sont capables d'infecter un très large panel de cellules cibles, provenant d'espèces et de tissus différents. Seules les cellules humaines Hep-2, THP-1 ou de cochon d'Inde 104C1 semblent complètement réfractaires à l'infection (Fig. 18).

	Env HERV-K(HML2) (Phoenix), données labo	HERV-K 113 orico Env Δ659-699 (Kramer et al., 2015)	HERVK' Env (Robinson et al., 2016)
HOMME			
HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus)	+	+	ND
TE671 (rhabdomyosarcome)	+	ND	ND
293T (rein embryonnaire)	+	+	+
SH-SY5Y (neuroblastome)	++	ND	ND
NTera2D1 (tératocarcinome)	+	+	ND
2102Ep (tératocarcinome)	+	ND	ND
NCCIT (tératocarcinome)	+	ND	ND
Huh7 (hépatocarcinome)	++	++	++
LnCaP (cancer de la prostate)	ND	++	ND
A549 (adénocarcinome pulmonaire)	ND	++	ND
Caco-2 (adénocarcinome colorectal)	ND	++	ND
SK-Mel28 (mélanome)	ND	++	ND
SW 1783 (cerveau)	ND	+	ND
T24 (carcinome de la vessie)	ND	+/-	ND
THP1 (monocyte, dérivé de leucémie)	ND	-	ND
SINGE			
Cos-7 (rein)	+	++	ND
Vero (rein)	+	+	++
SOURIS			
WOP (fibroblaste embryonnaire)	+/-	ND	ND
NIH3T3 (fibroblaste embryonnaire)	++	+	ND
MCA205 (fibrosarcome)	+	ND	ND
LOK (rein)	++	ND	ND
LMTK- (fibroblaste)	-	ND	ND
L-929 (fibroblaste)	ND	++	ND
RAW (macrophage, dérivé de leucémie)	ND	+	ND
RAT			
208F (fibroblaste embryonnaire)	+	ND	ND
REF (fibroblaste embryonnaire)	ND	++	ND
HAMSTER			
BHK21 (rein)	+	++	ND
CHO (ovaire)	+	++	ND
A23 (fibroblaste pulmonaire)	+	ND	ND
RJK88 (peau)	+	ND	ND
BsrT7 (rein)	ND	ND	+
COCHON D'INDE			
JH4 (poumon)	ND	+	ND
104C1 (fibroblaste embryonnaire)	ND	-	ND
CHAT			
G355.5 (cerveau)	++	ND	ND
CrFK (rein)	ND	++	+
FEA (fibroblaste embryonnaire)	ND	++	ND
CHIEN			
MDCK (rein)	-	++	ND
Cf2Th (thymus)	ND	++	ND
PORC			
PK15 (rein)	ND	++	ND
LAPIN			
RK13 (rein)	ND	++	ND
POULET			
DF1 (fibroblaste embryonnaire)	+	ND	+
MARSUPIAUX			
SC 11 (rein)	++	ND	ND
OK (rein)	++	ND	ND
PtK1 (rein)	+	ND	ND
SERPENT			
VH2-NPC1 (coeur)	ND	ND	+
CHAUVE-SOURIS			
Tb1.Lu (poumon)	ND	ND	+

Figure 18. Le tropisme large de l'enveloppe HERV-K(HML2) consensus
L'ensemble des données obtenues au laboratoire (pour la plupart non publiées) concernant le tropisme de l'enveloppe consensus Phoenix sont résumées ici. Pour chaque lignée cellulaire, une indication du titre infectieux de pseudotypes (cœurs MLV, SIV ou HIV) Env HERV-K(HML2) est donnée : ++ : titres moyens, + : titres intermédiaires, +/- : titres faibles, - : pas d'infection, ND : non déterminé. Les résultats obtenus par Kramer et coll. (Kramer et al., 2016) avec des particules SHIV pseudotypées par une version tronquée de l'enveloppe oricoHERVK113 (pour plus de détails chapitre 2, paragraphe 5.3.2) sont présentées de la même façon. Robinson et coll. (Robinson and Whelan, 2016) ont également étudié le tropisme de l'enveloppe Phoenix, optimisée pour

l'usage des codons et dont la queue cytoplasmique a été remplacée par celle de VSV-G. Les données correspondantes sont également résumées dans le tableau.

Les données indiquent que le récepteur de HERV-K(HML2) ne présente pas de spécificité tissulaire *in vitro* (à moins qu'il n'existent plusieurs récepteurs différents dans différents tissus) et est conservé chez un grand nombre d'espèces (Kramer et al., 2016). Robinson et coll. ont également confirmé le large tropisme de l'enveloppe HERV-K(HML2) en utilisant des particules VSV -qui peuvent se répliquer dans toutes les cellules en culture- pseudotypées par l'enveloppe consensus de Phoenix dont la queue cytoplasmique a été remplacée par celle de VSV-G. Ils ont également étudié plus en détails l'étape d'entrée de HERV-K(HML2) dans la cellule et ont pu montrer que (i) la fusion membranaire médiée par l'enveloppe HERV-K(HML2) requiert son clivage protéolytique par des protéases cellulaires de type furine ; (ii) la fusion est déclenchée par une acidification dans la cellule cible ; (iii) les virions qui portent l'enveloppe HERV-K(HML2) sont endocytés selon un processus qui dépend de la dynamine mais qui est indépendant du cytosquelette d'actine.

5.4 Deux protéines originales produites à partir de la protéine Env HERV-K(HML2) : Rec et le peptide signal

5.4.1 La protéine accessoire Rec

Les trois provirus reconstitués décrits plus haut, comme l'ensemble des HERV-K(HML2) intacts de type II du génome sont dits complexes, car ils codent une protéine accessoire, Rec (anciennement appelée cORF), en plus des protéines canoniques Gag, Pol et Env. Rec est une protéine impliquée dans l'export des ARN viraux et joue également un rôle important dans le développement de carcinomes testiculaires *in situ* (pour plus de détails, voir chapitre 4 (Boese et al., 2000; Büscher et al., 2006; Galli et al., 2005)). Cette protéine accessoire de 14 kDa (105 acides aminés) n'est produite que par les provirus de type II (les provirus de type I codent une autre protéine accessoire, Np9) qui présentent, à la limite *pol*/*env*, un site donneur d'épissage alternatif impliqué dans la genèse d'un transcrit doublement épissé codant ses deux exons constitutifs (Fig. 15) (Löwer et al., 1995; Mayer et al., 2004). Rec est localisée majoritairement dans les nucléoles mais peut être retrouvée également dans le cytoplasme (Hanke et al., 2013a). Elle est l'homologue fonctionnelle de Rev pour HIV-1 ou Rex pour HTLV-1 et est responsable de l'export du noyau des ARN non-épissés ou mono-épissés (Magin et al., 1999). La protéine contient un signal de localisation nucléaire (NLS) riche en arginine, qui interagit avec l'Importine-β. La séquence du NLS est également responsable de

la reconnaissance de l'élément de réponse à Rec (ou Rec-responsive element, RcRE), très structuré et localisé dans le domaine U3 de la région non traduite des ARN viraux (Magin et al., 1999; Yang et al., 1999). Il a été récemment montré que Rec forme des tétramères, et que 3 tétramères se lient à une région riche en purine au sein du RcRE (Langner et al., 2012). L'action de Rec apparaît très spécifique, en effet, alors que Rev et Rex sont capables de favoriser l'export des RcRE, Rec ne peut utiliser ni les RRE (équivalent du RcRE pour HIV-1) ni les RxRE (id. pour HTLV-1) (Magin-lachmann et al., 2001). La protéine Rec contient également un signal d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) requis pour l'export des complexes Rec/ARN viraux.

Plusieurs ligands de Rec ont été identifiés, en particulier des protéines à doigts de zinc (dont nous reparlerons au chapitre 4) (Boese et al., 2000; Kaufmann et al., 2010). En plus de ces partenaires, Rec lie la protéine Staufen-1 (Hanke et al., 2013b) qui a des fonctions physiologiques lors du stress cellulaire (Brendel et al., 2004; Thomas et al., 2009, 2005). Les conséquences de cette interaction ne sont pas encore complètement comprises mais il semble qu'elle permette d'augmenter l'export nucléaire de façon significative. Le domaine de liaison à la tubuline présent dans la région C-terminale de Staufen-1 pourrait en effet créer un lien avec le réseau de microtubule périnucléaire. L'association de Staufen-1 à Rec jouerait également un rôle dans le transport des ARN viraux vers les sites d'assemblage de la protéine Gag, elle même capable d'interagir avec Staufen-1 (Hanke et al., 2013b).

5.4.2 Le peptide signal

Un peptide signal (PS) est une extension N-terminale d'une chaine polypeptidique naissante, dont l'unique fonction la plupart du temps, est l'adressage de la protéine à la voie de sécrétion cellulaire. En moyenne, il est composé de 16 à 30 acides aminés et présente une structure tripartite caractéristique : (1) une région N-terminale, hydrophile et chargée positivement, (2) une région centrale hydrophobe composée de 5 à 15 résidus et (3) une région C-terminale comprenant le site de clivage reconnu par les signal-peptidases. Le devenir du PS après son clivage de la protéine est complexe. La cinétique de dégradation et la longévité du peptide sont variables et souvent difficiles à estimer. Dans certains cas, la rapidité de la dégradation rend impossible sa détection *in vitro*, dans d'autres cas, le PS peut s'accumuler dans le cytosol où il exerce un rôle propre (e.g. participation à la signalisation intracellulaire, fonctions régulatrices, pour revue voir (Kapp et al., 2009)). Les PS des rétrovirus présentent une grande variabilité de taille : le plus petit, composé de 15 acides aminés est celui de l'Env HIV-2, le

plus long de 148 aa est celui de HFV. Le PS de HERV-K(HML2), comme celui de deux autres bétarétrovirus apparentés, JSRV et MMTV, est également anormalement long, 96 aa et 13kDa. Les 87 premiers acides aminés du PS correspondent au premier exon de Rec. A partir de là, les séquences de Rec et du PS divergent puisque le second exon de Rec est traduit dans une phase de lecture différente. Le site donneur d'épissage utilisé pour générer l'ARNm Rec étant situé en amont du site de clivage du PS par les signal-peptidases, Rec ne contient pas la séquence complète du peptide signal. Rugierri et coll. ont montré que le PS de l'Env HERV-K(HML2) fusionné au rapporteur GFP est localisé, comme Rec, dans le nucléole, plus précisément dans le compartiment granulaire (Ruggieri et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel, les deux protéines semblent se démarquer, malgré une proximité de séquences et une localisation commune. Le PS n'est en effet pas capable d'entrer en compétition avec Rec pour l'interaction avec les ARN viraux et sa fonction biologique est encore inconnue (Ruggieri et al., 2009).

En conclusion, la famille HERV-K(HML2) est celle qui présente la trace la plus récente d'une activité dans le génome humain. Un grand nombre de ses propriétés la rapproche des rétrovirus infectieux. Le tableau présenté en Fig. 11B fait ressortir la proximité de HERV-K(HML2) avec trois autres bétarétrovirus : MMTV (Mouse mammary tumor virus), JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus) et ENTV (Enzootic nasal tumour virus). De l'étude de différentes propriétés de ces virus émergent de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et structurales communes. Certaines seront présentées dans le paragraphe qui suit, d'autres dans les chapitres suivants. Le virus JSRV sera évoqué plus en détails car il a souvent été étudié en parallèle de la famille HERV-K(HML2) dans ces travaux de thèse.

5.5 Existence de trois autres bétarétrovirus : MMTV, JSRV et ENTV

5.5.1 Présentation de MMTV, JSRV et ENTV, trois rétrovirus oncogènes chez leurs hôtes respectifs

- Le virus MMTV a été caractérisé dans les années 30 comme un agent transmissible par le lait maternel associé au développement de tumeurs mammaires chez la souris (Bittner, 1936) et a longtemps été utilisé comme modèle, *in vivo,* du cancer du sein humain (Callahan and Smith, 2008). Les LTR de MMTV contiennent de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription qui déterminent la spécificité tissulaire de l'expression virale et la régulation par les glucocorticoïdes/progestérone dans les cellules de

l'épithélium mammaire (Ross et al., 1997; Zhu et al., 2004). MMTV infecte aussi les lymphocytes *in vivo* et les LTR contiennent également des éléments régulateurs de l'expression dans les cellules T et B (Choi et al., 1987; Reuss and Coffin, 2000). Ainsi, les souris transgéniques MMTV développent à la fois des tumeurs lymphoïde et mammaire (e.g. (Leder et al., 1986)). L'infection des lymphocytes est critique pour la propagation de l'infection à partir de l'intestin vers les tissus mammaires (revue dans (Ross, 2010, 2008)). En bref, le virus MMTV acquis par le lait infecte d'abord les cellules dendritiques et se propage ensuite aux lymphocytes T et B des plaques de Peyer de l'intestin pour finalement rejoindre d'autres ganglions lymphatiques et organes lymphoïdes. Les lymphocytes transitent naturellement par la glande mammaire où ils transportent le virus.

- Le virus JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus) est l'agent causal de l'adénocarcinome pulmonaire ovin (OPA, ovine pulmonary adenocarcinoma) (Palmarini et al., 1999). L'OPA est une maladie fréquente chez le mouton, représentant environ 70% de l'ensemble des cas tumeurs de l'animal (De las Heras et al., 2003a), bien que rare chez deux animaux proches, la chèvre et le mouflon sauvage (Caporale et al., 2013; De las Heras et al., 2003b). Elle partage plusieurs caractéristiques avec certaines formes d'adénocarcinome pulmonaire humain ce qui fait du mouton un possible modèle d'étude pour ce type de tumeurs (Liu and Miller, 2007; Palmarini and Fan, 2001). JSRV est unique parmi les rétrovirus oncogéniques car sa protéine d'enveloppe *per se* est suffisante pour transformer une grande variété de lignées cellulaires *in vitro* et induire un adénocarcinome pulmonaire chez la souris et chez le mouton immunocompétents (Caporale et al., 2006; Wootton et al., 2005). Jusqu'à présent, 3 isolats de JSRV ont été clonés à partir de moutons présentant un OPA : une souche Sud-Africaine, et deux souches Britanniques, JSRV-21 et $JSRV_{JS7}$. JSRV-21, la plus étudiée, a été utilisée pour ces travaux de thèse. *In vivo*, JSRV est capable d'infecter et de transformer les cellules épithéliales alvéolaires ainsi que les cellules Clara au niveau des bronchioles.

- Le virus ENTV (Enzootic Nasal Tumour Virus) est un virus très proche de JSRV qui peut infecter la chèvre et le mouton et conduire au développement d'un adénocarcinome nasal (Leroux et al., 1995) (revue dans (Leroux and Mornex, 2008)). La séquence du génome complet du virus ENTV dérivé du mouton (ENTV-1) a été déterminée (Cousens et al., 1999). La séquence d'un autre virus très proche, ENTV-2, dérivé de la chèvre, a été établie plus récemment (Ortín et al., 2003). Alors que ENTV-2 suscite une infection

lymphoïde disséminée, ENTV-1 reste majoritairement confiné au site tumoral (Ortín et al., 2003). Notons enfin que comme pour JSRV, l'enveloppe de ENTV est l'agent étiologique de la tumeur et les mécanismes cellulaires et moléculaires, bien que moins bien décrits, semblent se rapprocher de ceux employés par l'Env JSRV (Maeda and Fan, 2008).

5.5.2 Existence de copies endogènes de MMTV et JSRV

En plus de leur forme exogène, les virus MMTV et JSRV présentent aussi des copies endogènes. En ce qui concerne MMTV, toutes les souris congéniques et de nombreuses souris sauvages possèdent des copies endogènes du virus, entrées dans le génome murin il y a 10 à 20 millions d'années (Baillie et al., 2004). La plupart des MMTV endogènes ne produisent pas de virus infectieux du fait de l'accumulation de mutations dans le génome proviral. On recense au moins 10 souches de MMTV exogènes et plus de 30 copies endogènes (e.g. (Gallahan et al., 1987; Golovkina et al., 1997; Imai et al., 1994) (revue dans (Callahan and Smith, 2000)).

Le génome du mouton contient au moins 27 copies de JSRV endogènes (appelées enJSRV) (Arnaud et al., 2007a). Ces loci présentent la même structure génétique et organisation que leur équivalent exogène. En particulier, on retrouve 85-89% d'identité pour les gènes *gag* et *env*, lorsque l'on compare les séquences endogènes au clone moléculaire JSRV-21. La plupart des enJSRV ont des génomes défectifs avec des codons stops prématurés, des délétions importantes et/ou des recombinaisons. Seize loci possèdent des cadres ouverts de lecture pour l'*env* et deux d'entre eux (enJSRV-4 et enJSRV-24) n'ont quasiment aucun autre gène (Arnaud et al., 2007a; Palmarini et al., 2000). Cinq enJSRV (enJSRV-7, enJSRV-15, enJSRV-16, enJSRV-18 et enJSRV-26) ont des ORF intactes pour tous les gènes rétroviraux et montrent un polymorphisme insertionnel au sein de la population de moutons domestiques. Les LTR 5' et 3' des enJSRV-15, enJSRV-16, enJSRV-18 et enJSRV-26 sont identiques suggérant une intégration récente dans la lignée germinale de l'hôte. Cette hypothèse est renforcée par le fait que deux de ces loci (enJSRV-16 et enJSRV-18) ont 100% d'identité au niveau nucléotidique (Arnaud et al., 2007a). Des copies endogènes de JSRV sont présentes à la fois chez le mouton et la chèvre mais absentes des génomes bovins et autres mammifères. L'intégration des enJSRV a donc commencé avant la divergence entre les genres *Ovis* et *Capra*, il y a environ 5 à 7 millions d'années, et s'est poursuivie après la domestication du mouton (il y a environ 10000 ans) (Arnaud et al., 2007a; Chessa et al., 2009). Enfin, enJSRV-

26, le plus récente des copies endogènes du mouton identifiée jusqu'à présent (moins de 200 ans), pourrait même être le résultat d'un événement unique d'intégration au sein de la lignée germinale de l'hôte (sa séquence, identifiée chez un animal est absente de tous les autres moutons testés) (Arnaud et al., 2007a) ce qui suggère que l'extension de la famille JSRV est toujours en cours chez le mouton. Différents rôles décrits des copies endogènes de JSRV seront illustrés dans les chapitres 3 (interférence virale) et 4 (gestation).

5.5.3 MMTV et JSRV sont des rétrovirus complexes

Le génome de MMTV code au moins deux protéines accessoires : le superantigène (Sag) et la protéine Rem. Le Sag est codé à partir du LTR 3' ce qui explique l'exceptionnelle longueur des LTR de MMTV (1,3 kb). Cette protéine a un rôle crucial notamment dans la dissémination du virus *in vivo*. Lorsque MMTV infecte les DC, le superantigène est présenté aux lymphocytes T CD4+ par les molécules du CMH de classe II présentes à la surface de la cellule présentatrice d'antigène. Les cellules T, activées de façon polyclonale par le superantigène, prolifèrent, activent les lymphocytes B et produisent des cytokines qui stimulent et recrutent d'autres DC, cellules B et T, créant ainsi un réservoir de lymphocytes infectables (pour revue voir (Ross, 2010)). De plus, l'expression des Sag codés par les copies endogènes de MMTV, lors de la formation du répertoire immunitaire, entraîne la déplétion des clones T activés par la protéine accessoire (Ignatowicz et al., 1992). Les souris sont alors protégées contre l'infection par un MMTV exogène qui porte le même superantigène car elles ne possèdent pas la population de lymphocyte T correspondante (Golovkina et al., 1993). Il est intéressant de remarquer enfin que pour quasiment toutes les copies endogènes de MMTV décrites, la région Sag est intacte, ce qui suggère que la protection anti-virale confère un avantage sélectif aux souris qui présentent des versions endogènes de MMTV.

La protéine accessoire Rem de 301 acides aminés est l'équivalent fonctionnel de Rev pour HIV-1, Rex pour HTLV-1 et Rec pour HERV-K (Indik et al., 2005; Mertz et al., 2005). Organisée en différents domaines, comme précédemment décrit pour Rec (i.e. NLS, NES…) (Indik et al., 2005; Mertz et al., 2005), elle régule l'export des ARN viraux non épissés du noyau vers le cytoplasme. L'ARNm de Rem, produit à partir d'une version doublement épissée de l'ARNm de l'enveloppe (comme pour Rec), est traduit dans la même phase que ce dernier mais est délété des séquences codant la SU et la TM (pour rappel, Rec n'est pas entièrement dans la même phase que l'enveloppe) (Indik et al., 2005; Mertz et al., 2005). L'ensemble des motifs importants pour la fonction d'export de Rem sont contenus dans ses 98

premiers acides aminés qui correspondent aussi à la séquence du peptide signal de l'enveloppe (Indik et al., 2005; Mertz et al., 2005). Rem contient donc la séquence entière du PS, ce qui n'est pas le cas pour Rec. Dans la littérature, Rem est décrit comme un moyen supplémentaire de générer du peptide signal. Ce dernier, après son clivage par les signal peptidases dans la membrane du réticulum endoplasmique, est rétrotransloqué et adressé au nucléole (Byun et al., 2010; Hoch-Marchaim et al., 2003). Le domaine C-terminal de Rem qui est absent de la séquence du PS est glycosylé, replié et s'accumule dans la lumière du RE après son clivage. Il pourrait également être sécrété des cellules infectées par MMTV, et jouer un rôle immunomodulateur (Byun et al., 2010; Dultz et al., 2008).

Le génome de JSRV présente, en plus des gènes essentiels, une ORF exprimée à partir de deux ARNm sous-génomiques qui code une protéine de 179 acides aminés à la séquence confondue avec l'extrémité 3' de Pol et au rôle inconnu (d'où sa dénomination : Orf-x). En outre, un facteur agissant en trans nommé Rej a été identifié comme étant nécessaire pour la synthèse de protéines Gag à partir des ARN viraux non épissés (Caporale et al., 2009; Hofacre et al., 2009). Il présente de nombreuses analogies fonctionnelles et structurales avec les protéines Rem et Rec de MMTV et HERV-K(HML2) décrites précédemment. Tout d'abord, la séquence active de Rej correspond à celle du PS du précurseur de la protéine d'enveloppe (Hofacre et al., 2009). La protéine accessoire peut également être synthétisée à partir d'ARNm de l'enveloppe doublement épissés (Hofacre et al., 2009). De plus, le PS/Rej de JSRV se trouve localisé au noyau de la cellule après son clivage au niveau de la membrane du RE (Hofacre et al., 2009). Cependant, le mécanisme d'action de Rej présente certaines différences avec ceux de Rem et Rec. Ces dernières fonctionnent, comme Rev ou Rex, en facilitant l'export des ARN viraux non épissés, alors que Rej, dans la plupart des lignées cellulaires testées, semblent plutôt nécessaire à la traduction des ARN Gag et Gag-Pol. Un contre exemple est fourni par les cellules 293T dans lesquelles Rej augmente également le transport des ARN viraux non épissés (Hofacre et al., 2009).

5.5.4 L'entrée de MMTV, JSRV et ENTV dans les cellules cibles est dépendante du pH

MMTV entre dans les cellules après la liaison spécifique de sa SU avec le récepteur TfR1 (transferrin receptor 1) (Ross et al., 2002). Cette protéine, impliquée dans le métabolisme du fer, rejoint les compartiments acides endosomaux après sa liaison avec son ligand naturel. L'entrée de MMTV, i.e. la fusion membranaire, requiert un pH très bas (<5,2). Après la liaison Env-recepteur à la surface cellulaire, les deux partenaires rejoignent un compartiment

endosomal tardif (Ross et al., 2002; Wang et al., 2008). TfR1 est fortement exprimé au niveau des lymphocytes activés et des cellules de l'épithélium mammaires en division ce qui corrèle avec le tropisme cellulaire du virus.

JSRV et ENTV interagissent avec le même récepteur, HYAL-2 (hyaluronoglucosaminidase 2) (Dirks et al., 2002; Miller, 2003; Rai et al., 2001), une protéine membranaire ubiquitaire qui appartient à la famille des hyaluronidases. Ces dernières dégradent le hyaluronan, un composant polysaccharidique majeur de la matrice extracellulaire (Lepperdinger et al., 1998) et sont impliquées dans des processus biologiques variés, tels que le développement et la tumorigenèse. Il a été montré que l'activité hyaluronidase de HYAL-2 n'est pas requise pour sa fonction de récepteur (Vigdorovich et al., 2007). HYAL-2 est une protéine GPI-ancrée (Rai et al., 2001), contrairement à la plupart des récepteurs et corécepteurs des rétrovirus qui sont des protéines transmembranaires (Fig. 6) (Overbaugh et al., 2001). La fusion de l'enveloppe de JSRV est dépendante du pH et la queue cytoplasmique en est un régulateur négatif (Côté et al., 2011). On peut noter ici la proximité avec l'Env HERV-K(HML2) pour laquelle la troncation de la quasi-totalité du domaine cytoplasmique augmente significativement l'infectivité lorsqu'elle pseudotype certains cœurs viraux (cf. paragraphe 5.3.2 de ce chapitre (Hanke et al., 2009)). La fusion médiée par l'enveloppe ENTV est moins efficace que ce que l'on observe avec Env JSRV et elle requiert un pH très acide (Côté et al., 2008). Il est également intéressant de remarquer que le tropisme cellulaire de JSRV et ENTV n'est pas uniquement contrôlé par la liaison au récepteur HYAL-2 ubiquitaire. De nombreux régulateurs agissent en cis au niveau des LTR viraux (e.g. existence d'un site de liaison pour le facteur nucléaire 3β dans les LTR de JSRV mais pas dans ceux des ENTV), ce qui explique l'activité différentielle de ces virus au niveau des cellules de l'épithélium pulmonaire (McGee-Estrada and Fan, 2007; Mcgee-Estrada et al., 2005; McGee-Estrada et al., 2002).

Dans ce chapitre nous avons illustré la grande diversité des rétrovirus endogènes, présents dans les génomes de tous les vertébrés. Nous avons vu que certaines familles sont encore très dynamiques en particulier chez la souris, ce qui peut avoir des conséquences délétères comme la mutagenèse insertionnelle. L'expression des ERV est souvent réprimée dans les tissus sains, en particulier chez l'homme. En l'absence de sélection positive, les ORF des provirus accumulent des mutations au cours de l'évolution. En plus de cela, les cellules ont plusieurs moyens de défense actifs contre ces parasites du génome. C'est ce que nous allons évoquer dans le chapitre 3 de cette introduction. Le premier point de contrôle se situe aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, avec une régulation épigénétique (principalement :

méthylation, modification des histones) et l'intervention de petits ARN régulateurs ; le second point de contrôle intervient au niveau de la capacité réplicative des ERV, avec l'implication du système immunitaire, en particulier de protéines de l'hôte aux propriétés antirétrovirales, les facteurs de restriction.

CHAPITRE 3 : Les rétrovirus endogènes, des éléments sous le contrôle de leur hôte

1. Le contrôle de l'expression des ERV

1.1 Les modifications épigénétiques

Le contrôle des ERV est essentiellement médié par des modifications de la structure de la chromatine comme la méthylation de l'ADN et la méthylation/désacétylation des protéines histones. Ce sont des changements héritables qui bouleversent l'expression des gènes sans modifier leur séquence nucléotidique. Les mécanismes en jeu ont été beaucoup étudiés chez les plantes et la souris, notamment au cours du développement embryonnaire et sont totalement absents d'autres organismes modèles comme Caenorhabditis elegans (pour revue voir (Rowe and Trono, 2011)). Plusieurs arguments expérimentaux ont mis sur la voie de l'importance du statut de la méthylation de l'ADN génomique dans le contrôle de « parasites » comme les ERV. Le traitement de cellules avec des agents déméthylants comme la 5-azacytidine (Groudine et al., 1981) engendre une induction massive d'ERV. L'étude de l'infection d'embryons murins a également suggéré l'importance de la méthylation *de novo* dans la régulation de l'expression génique aux stades précoces du développement embryonnaire (Jähner et al., 1982). Il a même été proposé que l'interaction hôte/parasite ait pu être une force motrice dans l'évolution de la méthylation comme moyen de régulation de l'expression génique (Reik, 2007; Reiss and Mager, 2007; Yoder et al., 1997).

La méthylation de l'ADN des mammifères est généralement associée à l'addition d'un groupement méthyl sur le 5ème carbone de la cytosine présente au sein d'îlots CpG et met en jeu 3 enzymes ADN méthyltransférases (Dnmts) : Dnmt3a et Dnmt3b sont responsables du dépôt de nouvelles marques de méthylation sur l'ADN au cours du développement et Dnmt1 de leur maintien pendant la réplication de l'ADN (revue dans (Law and Jacobsen, 2010)). Une autre protéine Dnmt3L (Dnmt3-like protein), qui ne possède pas d'activité méthyltransférase, joue un rôle dans l'activation de Dnmt3a et Dnmt3b. L'importance de Dnmt3a et Dnmt3b durant le développement est illustrée par le phénotype des souris KO : les embryons Dnmt3b-/- meurent avant la naissance et les Dnmt3a-/- ne survivent que 4 semaines (Okano et al., 1999). Chez des embryons Dnmt1-/-, les éléments endogènes associés aux familles MLV et IAP sont déméthylés et les transcrits IAP sont exprimés jusqu'à 100 fois plus que chez les souris sauvages, illustrant l'importance du contrôle exercé par la machinerie de méthylation

(Walsh et al., 1998). Il existe un certain degré de spécificité de recrutement des différentes Dnmt (3a ou 3b) en fonction des familles d'ERV, mais les déterminants n'en sont pas encore bien compris. Pour être actives les ADN méthyltransférases dépendent de la présence d'une hélicase, Lsh, appartenant à la famille des facteurs de remodelage de la chromatine SNF2 (De La Fuente et al., 2006; Huang et al., 2004; Zhu et al., 2006). Lsh est cruciale pour le maintien de la stabilité du génome comme le démontrent les embryons KO qui souffrent d'une réactivation massive de rétroéléments et meurent très rapidement après la naissance. Pour autant, l'expression des gènes cellulaires n'est globalement pas affectée par la perte de Lsh (Yan et al., 2003), qui apparaît donc spécifique de la méthylation des ERV. D'autres cofacteurs essentiels des ADN méthyltrasnférases ont été identifiés : NP95 (nuclear protein of 95 kDa), qui participe au maintien des marques de méthylation sur l'ADN des ERV et G9a, une histone méthyltransférase qui contrôle la méthylation de l'ADN dans les cellules ES indépendamment de son activité enzymatique spécifique (Dong et al., 2008; Tachibana et al., 2008).

Certaines modifications des histones, comme leur méthylation au niveau de la queue N-terminale agissent de concert avec la méthylation de l'ADN. Des marques de type histone 3 lysine 9 (H3K9me) sont observées au niveau de certains LTR d'ERV dans les cellules ES et sont le résultat de l'action séquentielle de 6 histones méthyltransférases. L'une d'entre elles, ESET joue un rôle important dans la régulation de l'expression des ERV. Récemment un enrichissement en histone H3.3 a été noté au niveau de certaines séquences d'ERV de classe I et II, appartenant notamment aux familles ETn, MusD et IAP (Elsässer et al., 2015). Le dépôt de ces histones dépend de la formation d'un complexe contenant les protéines ATRX et DAXX. Le recrutement de DAXX, H3.3 et KAP1 au niveau de séquences d'ERV précède l'action de ESET (Elsässer et al., 2015). De façon générale, la méthylation de l'ADN et des histones entraînent la formation d'une chromatine plus compacte qui attire des effecteurs de l'extinction génique : les protéines de l'hétérochromatine (HP1), par exemple, reconnaissent une structure créée par la méthylation H3K9 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Pour finir, une autre modification clé est impliquée dans la répression de l'expression des gènes viraux. Il s'agit de la désacétylation au niveau de résidus lysine des queues des histones 3 et 4 (Chen and Townes, 2000; Lorincz et al., 2000; Schübeler et al., 2000).

Tous ces mécanismes sont assez généraux et n'expliquent qu'en partie le ciblage des séquences d'ERV. Plusieurs facteurs de spécificité ont été identifiés. Parmi eux, on peut citer KAP1 (également connue sous le nom de TRIM28) et ses partenaires à doigts de zinc, les facteurs de transcription KRAB (KRAB-ZF) (Huntley et al., 2006). Les protéines KRAB-ZF

reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques via leur doigt de zinc tout en recrutant KAP1/TRIM28. D'autres partenaires s'ajoutent pour former un complexe : l'histone méthyltransférase ESET, les protéines de l'hétérochromatine HP1 et le complexe d'histone désacétylase NuRD (détails dans (Rowe and Trono, 2011)). Plusieurs arguments et exemples illustrent le degré de spécificité des protéines KRAB-ZF et leur importance dans le contrôle de l'expression des ERV. Les gènes KRAB-ZF sont abondants dans les génomes des mammifères et leur abondance est corrélée avec le nombre de transposons à LTR (Corsinotti et al., 2013; Thomas and Schneider, 2011). Wolf et coll. (Wolf and Goff, 2009) ont identifié un membre de la famille, ZFP809, qui cible les séquences MLV (endogènes et infectieuses) via leur PBS, séquence conservée de 18 nucléotides. D'autres protéines KRAB-ZF ont été identifiées et étudiées depuis : par exemple, ZNF91 et ZNF93 répriment spécifiquement les familles SINE-VNTR-Alu (SVA) et L1 du génome humain (Jacobs et al., 2014); Ssm1b est exprimé au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte chez la souris et a un rôle important dans le contrôle d'éléments endogènes et exogènes (Ratnam et al., 2014).

1.2 Les ARN régulateurs

La plupart des ERV sont réprimés par méthylation. Cependant, deux grandes vagues de déméthylation du génome ont lieu pendant le développement embryonnaire des mammifères. De nombreux transcrits sont synthétisés à cette occasion et servent de base à la genèse de petits ARN aux propriétés régulatrices (revue dans (Rowe and Trono, 2011)). Parmi eux, une catégorie bien précise, les piRNA (piwi-interacting RNA), cible majoritairement l'activité des transposons et est indispensable à la préservation des fonctions de gamétogenèse et de reproduction (revue dans (Iwasaki et al., 2015)). Les piRNA, composés de 24 à 30 nucléotides, sont légèrement plus grands que les miRNA et siRNA. Ils sont dérivés de longs ARN simple brin non codants, exprimés à partir de régions intergéniques appelées « loci piRNA » via un mécanisme mettant en jeu les protéines Piwi et Aubergine et indépendant de la nucléase Dicer (Siomi et al., 2011; Vagin et al., 2006). Ces loci piRNA, souvent organisés sous forme d'hétérochromatine, contiennent un nombre important et des types variés de transposons. Par exemple, le locus *flamenco* (Zanni et al., 2013) de la drosophile est transcrit en un ARN d'environ 180 kb qui contient des séquences de transposons comme *gypsy*, *idefix* et ZAM en orientation antisens. Ainsi, les piRNA dérivés peuvent cibler directement les transcrits sens des transposons correspondants.

2. Le contrôle de la réplication des ERV par les facteurs de restriction cellulaires

Les rétrovirus endogènes, s'ils présentent des ORF intactes et échappent aux mécanismes de contrôle décrits précédemment, peuvent s'assembler sous forme de particules infectieuses. Afin de se répliquer efficacement, ils doivent parasiter un certain nombre de facteurs et voies de signalisation cellulaires. A l'inverse, les cellules de mammifères expriment un large panel de protéines antivirales, agissant de façon dominante et autonome, exprimées dans une grande diversité de types cellulaires. Ces protéines sont appelées facteurs de restriction (Fig. 19). Elles constituent la première ligne de défense contre l'infection virale et sont souvent rattachées à la composante intrinsèque de l'immunité. Pour déjouer cette restriction, les virus ont mis en place à leur tour des stratégies de contournement, souvent via des protéines codées par leur génome. La découverte des différents facteurs de restriction a souvent été associée au virus HIV-1 mais leur action à la plupart du temps été étendue à d'autres virus infectieux et endogènes. Nous présenterons donc les différents facteurs de restriction en insistant sur ceux qui ont un rôle caractérisé sur la réplication des ERV. Nous parlerons en détails de la Tetherin dont le champ d'action est très large et qui est le sujet d'un article de cette thèse. Nous donnerons également des exemples d'antagonistes d'origine virale de ces facteurs de restrictions.

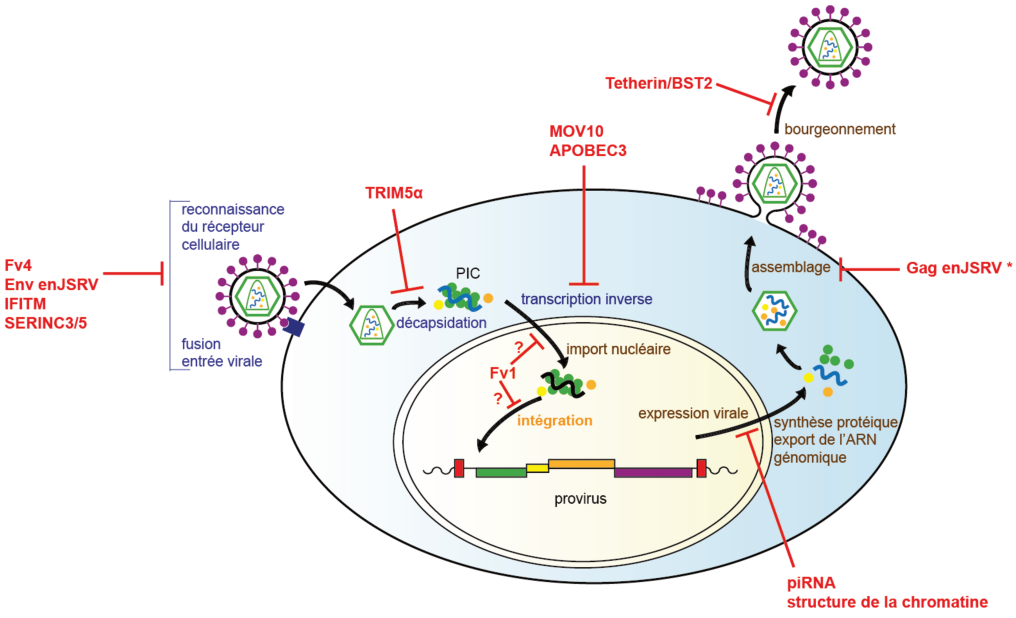


Figure 19. Les facteurs de restriction cellulaires dans le cycle de multiplication d'un rétrovirus
Des exemples de facteurs de restriction sont indiqués au niveau des étapes du cycle de réplication (cf. Fig.9) qu'ils ciblent. Certains bloquent la réplication d'un grand nombre d'éléments (e.g. APOBEC3, Tetherin, protéines intervenant sur la structure de la chromatine) alors que d'autres ont une action plus spécifique *in vivo* (e.g. le facteur Fv4 agit sur les rétrovirus MLV écotropes, Fv1 sur les MLV, Gag enJSRVet Env enJSRV sur certaines souches de rétrovirus JSRV exogènes). Gag enJSRV * désigne plusieurs variants endogènes de Gag JSRV, défectifs et qui bloquent d'autres éléments endogènes et exogènes de JSRV (voir chapitre 3, paragraphe 2.1.3 pour plus de détails).

2.1 Des facteurs de restriction d'origine virale

2.1.1 Fv1 : le prototype

Les premières définitions et conclusions concernant les facteurs de restriction ont été tirées de l'étude de Fv1 chez la souris. Il s'agit d'un gène murin, apparenté au gène *gag* de la famille de spumarétrovirus endogènes ERV-L, ciblant les MLV *in vivo*. Il contient de fait la séquence majeure d'homologie (MHR), très conservée parmi les capsides rétrovirales (Bénit et al., 1997; Best et al., 1996). Le mécanisme d'action associé n'est pas encore complètement élucidé : la protéine Fv1 bloque le cycle de réplication viral après la transcription inverse mais avant l'intégration de l'ADNc dans le génome de la cellule (Jolicoeur and Baltimore, 1976) (Fig. 19) probablement en interagissant directement avec les capsides rétrovirales via son domaine C-terminal. L'hypothèse privilégiée à l'heure actuelle est que Fv1 agisse soit en séquestrant le matériel génétique viral dans le cytoplasme soit en bloquant la signalisation nécessaire à l'entrée nucléaire (pour plus de détails voir revue (Sanz-Ramos and Stoye, 2013)). Ce blocage est saturable par un excès de virus cible (Duran-Troise et al., 1977), ce qui constitue une caractéristique du phénomène de restriction. Ce gène existe sous deux principales formes alléliques, $Fv1^n$ et $Fv1^b$, qui sont responsables des variations de sensibilité de souches de souris aux différents isolats de MLV infectieux. Ainsi, les animaux portant $Fv1^n$ sont sensibles à l'infection par les souches de MLV de tropisme N. L'opposé est vérifié pour les animaux portant $Fv1^b$ qui sont sensibles au virus B- plutôt que N-MLV. Les cellules hétérozygotes $Fv1^{n/b}$ sont résistantes aux deux types de virus ce qui illustre le principe général que les phénotypes de restriction sont dominants. L'émergence de rétrovirus infectieux à partir de la recombinaison de différents ERV est assez fréquente chez la souris. Une étape clé dans le succès du processus de recombinaison implique la région du gène gag ciblée par Fv1, qui peut transformer le virus initialement sensible en un virus résistant chez un hôte donné (Young et al., 2012). Ceci suggère fortement que la protéine Fv1 joue un rôle dans le contrôle des MLV endogènes et de leur réplication. La découverte de Fv1 a ouvert la voie à la recherche d'autres facteurs de restriction. A la même époque, l'étude d'hétérocaryons, résultants de la fusion *in vitro* d'une cellule permissive et d'une cellule non permissive à la réplication d'un virus, a mis en évidence des phénotypes de restriction et les co-facteurs associés ont été caractérisés (Cowan et al., 2002; Madani and Kabat, 1998; Simon et al., 1998; Varthakavi et al., 2003).

2.1.2 Protéines d'enveloppe interférentes

Fv4 est un gène murin dérivé de l'enveloppe d'un provirus MLV endogène écotrope (i.e. n'infectant que la souris). Ce facteur, capable d'interagir avec le récepteur mCAT1 des virus écotropes, protège les cellules d'une infection par un virus apparenté par le biais de l'interférence à l'infection (cf. chapitre 1) (Ikeda and Odaka, 1983; Ikeda et al., 2000). La protéine Fv4 peut également être associée dans les particules MLV écotropes à l'enveloppe « sauvage » (dominant négatif dans les trimères d'Env), rendant les virions formés inaptes à l'infection d'une nouvelle cellule cible (Taylor et al., 2001). Ce facteur de restriction intervient donc à la fois pour limiter l'amplification des provirus MLV écotropes endogènes et pour protéger l'hôte de leur équivalent infectieux.

Deux autres protéines murines, Rmcf et Rmcf-2 protègent les souris de l'infection provoquée par le MLV polytrope exogène par un même mécanisme d'interférence avec le récepteur cellulaire (Buller et al., 1988; Jung et al., 2002; Wu et al., 2005). L'interférence à l'infection existe également chez le mouton, pour lequel l'expression des glycoprotéines d'enveloppe des enJSRV peut bloquer *in vitro* l'entrée de virus JSRV exogènes (Spencer et al., 2003). Des études classiques sur l'entrée du virus dans les cellules cibles ont en effet révélé que les enJSRV, les souches exogènes de JSRV et le virus ENTV partagent le même récepteur d'entrée, HYAL-2 (Spencer et al., 2003). Des observations similaires sont faites chez le chat domestique dont le génome code des enveloppes rétrovirales entières qui confèrent une résistance vis à vis de virus exogènes apparentés. En plus de cela, deux enveloppes endogènes félines tronquées (ERV-DC7 et ERV-DC16) ont été identifiées. Elles codent pour le facteur de restriction Refrex-1 (Ito et al., 2013) qui n'est composé que de la partie N-terminale de la SU mais contient tous les déterminants nécessaires à la reconnaissance du récepteur. Refrex-1 est soluble et peut donc agir à la fois en cis (interférence à l'intérieur de la cellule) ou en trans (interférence par saturation des récepteurs à la membrane plasmique).

2.1.3 enJSRV

Entre autres rôles physiologiques, les copies endogènes de JSRV peuvent protéger leur hôte contre l'infection par leur équivalent exogène. Tout d'abord, par le mécanisme d'interférence à l'infection évoqué dans le paragraphe précédent. Un autre exemple de capture de protéines endogènes pour la défense de l'hôte est offert par la copie endogène enJS56A1 qui, *in vitro*, interfère avec les étapes tardives de la réplication du virus JSRV exogène par un mécanisme

de restriction unique qualifié de JLR (pour « JSRV late restriction ») (Mura et al., 2004). Le déterminant principal de cette restriction est un résidu tryptophane localisé en position 21 (W21) de la protéine Gag de enJS56A1, qui se substitue à une arginine (R), très conservée parmi les bétaretrovirus. La mutation R21W rend la protéine Gag enJS56A1 défectueuse et le phénotype est transdominant à la fois sur les copies exogènes et endogènes de JSRV (Arnaud et al., 2007b; Mura et al., 2004). En particulier, il a été démontré que les protéines Gag enJS56A1 et Gag JSRV forment des multimères chimériques qui ne sont pas correctement adressés dans la cellule et finissent par être dégradés par le protéasome, limitant ainsi le relargage de particules JSRV infectieuses (Arnaud et al., 2007b; Murcia et al., 2007). Des analyses de séquences ont révélé que la région du chromosome contenant le locus responsable de cette restriction a été amplifiée plusieurs fois chez le mouton domestique, ce qui suggère que cette activité transdominante confère un avantage sélectif à l'hôte. De plus, une autre copie endogène de JSRV, enJSRV-20, apparue probablement suite à une recombinaison impliquant enJS56A1, possède ce même phénotype de restriction ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de la sélection de cette activité chez le mouton domestique. Il est intéressant de noter enfin que la copie la plus récemment intégrée de enJSRV, enJSRV-26, présente une mutation au niveau du peptide signal de sa protéine d'enveloppe lui permettant d'échapper à la restriction de type JLR (Armezzani et al., 2011). Ces différentes études témoignent d'une certaine dualité : certains éléments JSRV endogènes protègent l'hôte contre l'infection rétrovirale et d'autres mettent en place des stratégies permettant d'échapper à ces mécanismes de restriction. Il s'agit d'une bonne illustration du concept de « surenchère » (« arms race » en anglais) entre les ERV actifs et leur hôte. Une étude suggère que des mécanismes similaires pourraient exister chez l'homme, en particulier avec la famille HERV-K(HML2). Heslin et coll. ont en effet étudié la protéine Gag du provirus HERV-K 113, polymorphe au sein de la population humaine (Heslin et al., 2009). Ils ont identifiés une mutation ponctuelle présente à l'extrémité C-terminale du domaine CA qui est la cause du faible niveau de particules produites et de l'absence d'infectivité. Lorsque cette protéine est mélangée à la protéine Gag fonctionnelle du consensus K CON (Young and Bieniasz, 2007), l'infectivité des particules produites est drastiquement réduite (Heslin et al., 2009) ce qui rappelle le phénotype transdominant de certaines protéines Gag endogènes de JSRV.

2.1.4 La suppressyn humaine, un candidat facteur de restriction

Bien qu'aucun facteur de restriction dérivé d'élément endogène n'ait été découvert chez les primates jusqu'à présent, la Suppressyn, enveloppe endogène humaine soluble, émerge comme un candidat potentiel (revue dans (Malfavon-Borja and Feschotte, 2015)). Cette protéine est codée par un élément de la famille HERV-F localisé sur le chromosome 21 et est exprimée à fort niveau dans le placenta où elle semble contribuer à la régulation de la Syncytin-1 (ou Env HERV-W, co-optée pour la placentation humaine voir chapitre 4) (Sugimoto et al., 2013). La Suppressyn est sécrétée et entre en compétion avec la Syncytin-1 pour la liaison au récepteur cellulaire de cette dernière, ASCT2. Ainsi, le génome humain code une enveloppe tronquée qui bloque une autre enveloppe endogène par un mécanisme de compétition pour la liaison au récepteur cellulaire. Cette observation suggère que la Suppressyn peut agir comme un facteur de restriction en empêchant la liaison de divers rétrovirus exogènes à leur récepteur ASCT2 au niveau des cellules placentaires. D'autres rétrovirus utilisent ASCT2 en tant que récepteur, comme les rétrovirus simiens 1 à 5 ou le rétrovirus félin RD114 (Sommerfelt and Weiss, 1990). L'activité de la Suppressyn en tant que facteur de restriction pourrait donc ne pas se limiter aux humains.

2.2 TRIM5alpha

Les cellules humaines ne possèdent pas d'orthologue de Fv1, mais présente une activité similaire attribuée à la protéine TRIM5alpha. Membre de la famille des motifs tripartites, elle inhibe la réplication rétrovirale après l'entrée dans la cellule mais avant la transcription inverse (revue dans (Fletcher and Towers, 2013)) (Fig 19). Ce facteur de restriction détermine la spécificité d'espèce des virus HIV et SIV. En effet, les protéines TRIM5alpha du rhésus macaque et de la plupart des Singes de l'Ancien monde bloquent efficacement la réplication du HIV-1 mais pas celle du SIV alors que les TRIM5alpha des Singes du Nouveau Monde et humains ne constituent que de très faibles barrières à la réplication du HIV-1 mais sont efficaces sur le virus SIV (revue dans (Sanz-Ramos and Stoye, 2013) (Stremlau et al., 2004)). Il existe 6 isoformes principales de TRIM5 chez l'homme, la forme alpha étant la plus exprimée dans les différentes lignées cellulaires testées, ainsi que dans les lymphocytes T CD4+ et les macrophages (Battivelli et al., 2011). Une forme un peu particulière de la protéine a été identifiée, TRIMCypA, dans laquelle la partie C-terminale de TRIM5alpha est remplacée par la cyclophilin A. Cette protéine présente une activité anti-rétrovirale et a été générée chez plusieurs espèces de singes indépendamment (Nisole et al., 2004; Sayah et al.,

2004; Stoye and Yap, 2008; Virgen et al., 2008; Wilson et al., 2008). Des études récentes, s'appuyant sur des techniques de biochimie et des observations de microscopie électronique, ont mis en évidence la liaison directe du facteur de restriction avec les capsides virales, qui entraîne la formation d'un réseau hexagonal de TRIM5alpha de forte avidité pour le virus (Ganser-Pornillos et al., 2011). La suite des événements n'est pas très bien connue : parmi les mécanismes possibles, il est proposé que TRIM5alpha accélère la décapsidation du rétrovirus par un mécanisme dépendant du protéasome et inhibe la transcription inverse (revue dans (Sanz-Ramos and Stoye, 2013)) (Perron et al., 2007; Stremlau et al., 2006). Une autre étude propose que TRIM5alpha agisse comme un PRR (pathogen recognition receptor), reconnaissant certaines capsides rétrovirales et déclenchant l'immunité innée via la kinase TAK1 et les facteurs de transcription NFkappaB et AP-1 (Pertel et al., 2011).

L'effet de TRIM5 alpha sur les ERV n'a pas été beaucoup étudié. Lee et coll., ont montré que le provirus HERV-K(HML2) reconstitué HERV-K_{CON} est insensible aux TRIM5alpha humain et macaque rhésus ainsi qu'au facteur TRIMCyp (Young and Bieniasz, 2007). Ces données sont en accord avec le fait que la famille HERV-K(HML2) est très probablement encore en cours d'amplification au sein de la population humaine (Belshaw et al., 2005), ce qui serait impossible si le provirus était la cible de TRIM5alpha. Enfin, CERV1/PtERV1, un ERV reconstitué à partir du génome du chimpanzé, est sensible au TRIM5alpha humain (Kaiser et al., 2007), ce qui pourrait être une des explications de son absence du génome humain. Cependant, ce résultat n'a pas pu être confirmé par un autre groupe (Perez-Caballero et al., 2008) et le débat reste ouvert.

2.3 Les protéines APOBEC3

Le rôle de restriction de l'infection exercée par les protéines APOBEC3 humaines a été mis en évidence à partir d'études visant à établir la fonction de la protéine accessoire Vif du virus HIV-1 (revue dans (Malim, 2009)). Cette protéine est requise pour la réplication du HIV-1 dans les cellules primaires, en particulier les lymphocytes T CD4+, ainsi que dans certaines lignées cellulaires, mais n'est pas indispensable dans d'autres. Son rôle principal est d'induire la dégradation par le protéasome de la protéine APOBEC3G (Sheehy et al., 2002).

APOBEC3G (A3G) est l'un des membres d'une famille de protéines -11 au total chez l'homme- possédant une activité polynucléotidique (ARN ou ADN) cytidine désaminase. Cette réaction se traduit par l'édition post-synthèse de résidus cytidines en uridines, altérant de fait la séquence nucléotidique et, dans le cas de substrats ADN, introduisant une base non

canonique. Les protéines APOBEC3 sont exprimées dans un large panel de tissus humains et lignées cellulaires, et à un niveau particulièrement élevé dans les cellules hématopoïétiques (Koning et al., 2009; Refsland et al., 2010). En l'absence de Vif, A3G est incorporée dans les virions HIV-1 en cours d'assemblage grâce à sa capacité de liaison à l'ARN et à la région nucléocapside de la protéine Gag du virus (Bogerd and Cullen, 2008). La protéine A3G, transférée aux cellules cibles lors de l'infection virale, s'associe au complexe de transcription inverse (RTC) et désamine les résidus cytidine majoritairement dans le brin négatif de l'ADNc en cours de synthèse (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2004; Zhang et al., 2003). Jusqu'à 10% des cytidines peuvent être éditées, ce qui entraîne une hypermutation et une perte subséquente de l'intégrité génétique. Toutes les cytidines ne sont pas des cibles équivalentes pour A3G, qui présente une préférence marquée pour la séquence 5'-CC<u>C</u>A (la cytidine désaminée est soulignée) (Harris et al., 2003).

L'hypermutation n'est pas la seule conséquence de l'action de A3G : une diminution de la quantité d'ADNc viraux qui s'accumulent au cours de l'infection par HIV-1 est également constatée. Un mécanisme possible, indépendant de l'activité désaminase du facteur de restriction, serait la liaison de A3G à l'ARN génomique viral, qui entraînerait un blocage stérique de la transcription inverse (Bishop et al., 2008; Iwatani et al., 2007).

Parmi les 10 autres protéines APOBEC humaines, un grand nombre ont été caractérisées comme inhibitrices de la réplication du HIV-1, dans des conditions de surexpression *in vitro*. Cependant, dans des niveaux d'expression physiologiques, seules APOBEC3F (A3F) et APOBEC3H (A3H) semblent conserver cette activité de blocage (revue dans (Albin and Harris, 2010)). D'ailleurs, ces deux protéines sont les seules (avec A3G) dont l'action est régulée par Vif. Leur mécanisme d'action est identique à celui de A3G, bien qu'elles apparaissent moins efficaces (Holmes et al., 2007; Miyagi et al., 2010), et désaminent préférentiellement les cytidines présentes au sein de motifs 5'-TC.

Des expériences menées *ex vivo* ont montré que tous les ERV testés jusqu'à présent sont retreints par au moins une protéine APOBEC (Bogerd et al., 2006; Chen et al., 2006; Dörrschuck et al., 2011; Esnault et al., 2008a, 2005). Par exemple, en utilisant le virus HERV-K_{CON} pseudotypé par l'enveloppe de VSV, Lee et coll. ont révélé que la présence de A3F dans les cellules productrices, réduit l'infectivité des VLP d'un facteur au moins 50, A3G n'ayant par ailleurs aucun effet (Young and Bieniasz, 2007). De plus, des analyses *in silico* de différentes familles d'ERV (e.g. IAP murins, HERV-K(HML2)) ont montré que certains provirus présentent des marques d'édition par les APOBEC – i.e. sur-représentation des substitutions de G vers A- indiquant que ces facteurs de restriction étaient actifs au moment

de leur amplification et ont certainement contribué à leur inactivation (Anwar et al., 2013; Carmi et al., 2011; Esnault et al., 2008a, 2005; Perez-Caballero et al., 2008). Cependant, certains ont mis en place des mécanismes de résistance, à l'instar de ce qui a déjà été décrit pour Vif et HIV-1. On peut citer l'exemple des virus MLV, résistants aux A3 murines par un mécanisme original reposant sur l'exclusion des protéines APOBEC des virions. Le déterminant viral responsable de ce phénomène est la protéine glyco-Gag, un précurseur Gag plus long que le précurseur canonique et présentant des glycosylations (Harris et al., 2015; Kolokithas et al., 2010; Stavrou et al., 2013).

2.4 MOV10

Chez l'homme, le rôle de MOV10 en tant que facteur de restriction a d'abord été mis en évidence sur le virus HIV-1 (Burdick et al., 2010; Furtak et al., 2010; Wang et al., 2010) avant d'être étendu en particulier aux éléments transposables. Il s'agit d'une ARN hélicase, incorporée dans les virions, qui, lorsqu'elle est surexprimée, réduit la production de particules virales infectieuses, en partie par interférence avec la transcription inverse (Arjan-Odedra et al., 2012; Burdick et al., 2010; Furtak et al., 2010). MOV10 est également impliquée dans la voie RNAi (Chendrimada et al., 2007; Meister et al., 2005) et forme de larges complexes avec les protéines APOBEC3G et APOBEC3F, localisés au niveau de granules cytoplasmiques (Furtak et al., 2010; Gallois-Montbrun et al., 2007; Kozak et al., 2006). La plupart des conclusions sur les rôles de MOV10 ont été tirées d'études réalisées en conditions de surexpression. Les effets de niveaux endogènes de MOV10 ne sont pas bien connus et représentent un sujet de controverse. Il semble que l'extinction du facteur de restriction n'ait aucune conséquence sur la production des particules HIV-1 et leur infectivité (Arjan-Odedra et al., 2012), ce qui nuance les résultats énoncés plus haut. Cependant, la transposition des éléments LTR et non-LTR augmente dans les conditions où l'expression de MOV10 est réprimée (Arjan-Odedra et al., 2012).

Même si le rôle de ce facteur de restriction n'a encore été étudié que sur un nombre limité d'éléments endogènes, l'ensemble des résultats cités indiquent que la facteur de restriction constitue un régulateur assez général de l'activité de rétrotransposition chez les mammifères et laissent présager une interférence avec la réplication de nombreux HERV.

2.5 Les protéines IFITM et SERINC3/5

Ces facteurs de restrictions ciblent l'étape d'entrée du virus dans la cellule cible.

SERINC3 et SERINC5 font partie d'une famille de protéines très conservées qui contiennent 10-12 domaines transmembranaires et facilitent l'incorporation de serine lors de la biosynthèse des sphigolipides et de la phosphatidylserine (Inuzuka et al., 2005). Les facteurs SERINC3 et 5 s'opposent à la réplication du HIV-1 et sont la cible de la protéine accessoire Nef (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). En l'absence de Nef, les particules virales HIV-1 incorporent une grande quantité de SERINC3/5 qui diminuent les capacités de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Cet effet sur la fusion n'est cependant pas suffisant pour expliquer le rôle antiviral des protéines SERINC3/5, qui ciblent donc probablement aussi certaines étapes post-entrée du cycle de réplication viral (Rosa et al., 2015). L'antagoniste Nef agit en induisant la relocalisation des protéines SERINC3/5 de la surface cellulaire vers des compartiments intracellulaires exprimant Rab7 (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015).

Les protéines IFITM 1, 2 et 3 inhibent la réplication de nombreux virus enveloppés en s'opposant à la fusion des membranes virale et cellulaire après la liaison enveloppe-récepteur et l'endocytose de la particule virale. Des données d'imagerie ont permis de montrer que les particules virales piégées par les IFITM sont ensuite dégradées par les lysosomes et autolysosomes de la cellule hôte. Récemment, il a été montré que la surexpression de la protéine accesoire Rec de HERV-K(HML2) dans une lignée cellulaire pluripotente est suffisante pour induire l'augmentation de la quantité de IFITM1 à la surface cellulaire et pour inhiber une infection virale exogène (Grow et al., 2015). Ces résultats suggèrent que HERV-K(HML2) peut induire une restriction virale dans des cellules embryonnaires.

3. La Tetherin : un facteur de restriction au spectre très large

3.1 Découverte

La Tetherin, également connue sous les noms de BST2 (bone marrow stromal antigen 2) et CD317, a été initialement décrite comme un marqueur surfacique de différenciation terminale de cellules B normales ou néoplasiques (Goto et al., 1994; Ishikawa et al., 1995). La protéine n'était que très peu étudiée avant qu'elle n'attire l'attention des virologistes. Plusieurs observations expérimentales ont contribué à la découverte de son activité antivirale. Tout d'abord, il était connu que des mutants du virus HIV-1, délétés de la protéine Vpu (HIV-1 ΔVpu) ne pouvaient être relargués de cellules T CD4+ et de macrophages sans que les raisons en soient comprises (Bour and Strebel, 2003). Dans ces conditions, les particules virales étaient observées s'accumulant à la surface cellulaire ou dans les endosomes (Göttlinger et al.,

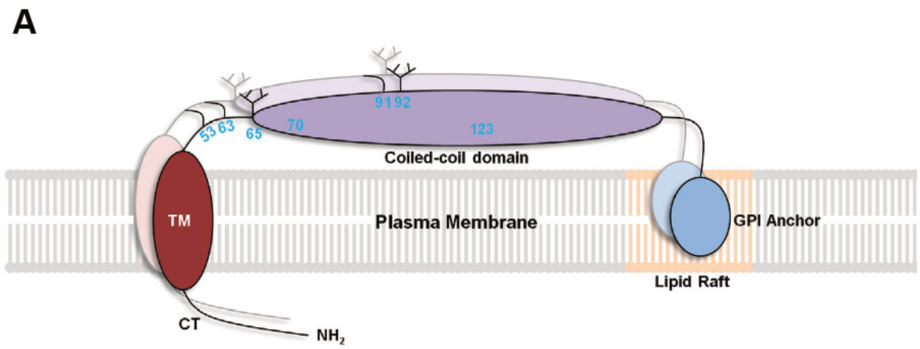
1993; Klimkait et al., 1990). Il était également clair que la nécessité de la présence de Vpu dépendait à la fois du type cellulaire et de l'espèce considérés (Neil et al., 2006; Varthakavi et al., 2003). L'étude des propriétés d'hétérocaryons, résultats de la fusion entre une cellule permissive et une cellule non permissive à la réplication du HIV-1 ΔVpu, ont mis sur la voie d'une restriction active (Varthakavi et al., 2003). Le phénotype de restriction pouvait également être induit par les interférons de type I (Neil et al., 2007). A l'échelle cellulaire, les particules HIV-1 ΔVpu étaient observées s'assemblant à la membrane plasmique des cellules infectées, subissant ensuite une maturation par clivage protéolytique pour être enfin endocytées et s'accumuler dans les endosomes (Neil et al., 2006). Ces virions pouvaient être relargués par un traitement à la protéase révélant qu'une « attache» protéique (nommée pour la première fois Tetherin par les auteurs de l'étude) était à l'origine de ce blocage (Neil et al., 2007). L'ensemble de ces observations a permis de mettre en évidence que l'activité tetherin reposait sur le facteur BST2, et ce grâce à une analyse différentielle des gènes codant des protéines membranaires dans les cellules permissives vs non-permissives à la réplication du virus HIV-1 ΔVpu (Neil et al., 2008). Indépendamment, Van Damme et coll. ont confirmé l'identité entre la Tetherin et BST2 en reprenant et étendant des travaux qui montraient que BST2 était ciblée à la fois par la protéine Vpu de HIV-1 et par l'ubiquitin ligase K5 du virus humain herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) (Bartee et al., 2006; Van Damme et al., 2008). Avec quelques années de recul, il apparaît que la Tetherin est un facteur de restriction au spectre d'action très large ciblant un grand nombre de virus enveloppés de diverses familles (Fig. 20B) : rhabdovirus (Sarojini et al., 2011), alphavirus (Jones et al., 2013; Ooi et al., 2015), arénavirus (Radoshitzky et al., 2010), filovirus (Kühl et al., 2011; Lopez et al., 2010), herpesvirus (Douglas et al., 2010), paramyxovirus (Radoshitzky et al., 2010), orthomyxovirus (Radoshitzky et al., 2010; Yondola et al., 2011), orthohepadnavirus (Miyakawa et al., 2015), flavivirus (Amet et al., 2014; Pan et al., 2013, 2012) et rétrovirus (Lim and Emerman, 2009; Neil et al., 2008; Xin Yin et al., 2014). La Tetherin est active également sur certains rétrovirus endogènes, en particulier la famille HERV-K(HML2) (Jouvenet et al., 2009).

A l'instar de HIV-1 et Vpu, la plupart des familles virales citées ci-dessus expriment un ou plusieurs antagonistes de la Tetherin dont nous donnerons des exemples. En plus de son activité antivirale, la Tetherin/BST2 joue un rôle crucial dans la régulation de la signalisation et le maintien de l'homéostasie cellulaires (revue dans (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016)). Nous illustrerons également cette diversité fonctionnelle de la protéine.

3.2 Structure et localisation

L'originalité et les fonctions de la Tetherin tiennent beaucoup à sa structure (Fig. 20A). Il s'agit d'une protéine membranaire de type II composée d'une courte queue cytoplasmique, d'une transmembrane ainsi que d'un domaine extracellulaire qui forme une structure de type coiled-coil (Hinz et al., 2010; Schubert et al., 2010; Swiecki et al., 2011; Yang et al., 2010). La partie C-terminale du domaine extracellulaire présente un motif GPI qui permet l'ancrage de la protéine au feuillet externe de la membrane plasmique (Kupzig et al., 2003). Cette topologie si particulière de la protéine, avec ses deux ancres membranaires, n'est partagée que par une isoforme de la protéine prion (Moore et al., 1999).

La Tetherin existe majoritairement sous forme de dimères. Ceux-ci s'assemblent grâce aux ponts disulfure créés au niveau de 3 résidus cystéine contenus dans l'ectodomaine (Andrew et al., 2009; Perez-Caballero et al., 2009). Une étude a suggéré que le domaine transmembranaire de la protéine pourrait être également impliqué dans l'homodimérisation (Cole et al., 2012). La Tetherin est glycosylée au niveau de deux résidus asparagine très conservés du domaine extracellulaire (Fig. 20A). Par conséquent, la protéine migre sous forme d'un « smear » en western blot et présente un poids moléculaire variant entre 30 et 40 kDa (Andrew et al., 2009; Perez-Caballero et al., 2009). Les structures cristallographiques des ectodomaines des Tetherin humaine et murine ont été résolues ce qui a permis de fournir encore plus de détails sur l'organisation, très voisine, de ces deux protéines (Hinz et al., 2010; Schubert et al., 2010; Swiecki et al., 2011; Yang et al., 2010). En particulier, le dimère d'ectodomaines est articulé en deux positions (A88 et G109 pour la Tetherin humaine) ce qui confère un certain degré de flexibilité rotationnelle à la protéine (Schubert et al., 2010; Yang et al., 2010), particulièrement utile pour résister à la courbure extrême des membranes induite lors du bourgeonnement viral. La mutation de ces deux résidus cause d'ailleurs une réduction de l'efficacité de la restriction médiée par la Tetherin (Yang et al., 2010).



B

Virus	Famille
HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, MLV, MMTV, JSRV, HERV-K(HML2)	Retroviridae
CHIKV, SFV	Togaviridae
Ebola, Marburg	Filoviridae
VSV	Rhabdoviridae
LASV, MACV	Arenaviridae
HSV-1, HSV-2, HHV-8	Herpesviridae
Dengue, HCV	Flaviviridae
HBV	Orthohepadnaviridae
Infleunza A virus	Orthomyxoviridae

Figure 20. La Tetherin/BST2, structure et fonction antivirale
(A) Représentation schématique d'un homodimère de Tetherin/BST2 ancré dans la membrane plasmique. BST2 est une protéine transmembranaire de type II à la topologie très particulière. Deux domaines la relient à la membrane plasmique, au niveau des radeaux lipidiques : une transmembrane ainsi qu'une ancre GPI localisée en C-terminal de la protéine. La protéine présente également une région cytoplasmique N-terminale et un domaine coiled-coil. Les glycosylations sont symbolisées par des ramifications. Les chiffres en bleu indiquent la position des acides aminés. (B) Exemples de virus appartenant à différentes familles virales ciblés par la Tetherin. D'après (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016).

La Tetherin est localisée à la membrane plasmique, au niveau des compartiments endocytiques et du réseau trans-Golgien (trans-Golgi network ou TGN) (Kupzig et al., 2003). Sa queue cytoplasmique contient un motif tyrosine impliqué dans la liaison avec les protéines adaptatrices de la clathrin, AP1 et AP2 qui permettent l'endocytose du facteur de restriction et son recyclage vers le TGN (Rollason et al., 2007). L'ancre GPI est indispensable pour l'adressage correct de la protéine du réticulum endoplasmique vers la membrane cellulaire. Ce domaine GPI est par ailleurs impliqué dans la localisation de la Tetherin au niveau des radeaux lipidiques (Kupzig et al., 2003), microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et également lieu de bourgeonnement préférentiel de nombreux virus enveloppés. Une étude a suggéré que la Tetherin joue un rôle dans l'organisation de la membrane lipidique en délimitant les fractions constituées par les radeaux lipidiques des autres domaines (Billcliff et al., 2013). Dans les cellules épithéliales polarisées, la Tetherin est majoritairement présente au

pôle apical où elle interagit en particulier avec ARHGAP44 (également appelé RICH2) qui permet sa liaison avec le cytosquelette d'actine sous-cortical (Rollason et al., 2009).

3.3 Expression et induction

La Tetherin est constitutivement exprimée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, certaines cellules cancéreuses, les cellules B au stade de différenciation terminale et dans les cellules stromales de la moelle osseuse (Blasius et al., 2006). Comme pour l'ensemble des facteurs de restriction décrits jusqu'à présent, son expression est fortement induite par les interférons de type I (Neil et al., 2007). Le profil d'expression *in vivo* du facteur de restriction a également été étudié (Erikson et al., 2011). A partir de 468 tissus et 25 organes collectés de plus de 210 patients sains, Erikson et coll. ont révélé une expression à des degrés divers dans tous les échantillons testés et une détection dans un grand nombre de types cellulaires spécialisés (e.g. hépatocytes, pneumocytes, pancréas, rein). Le caractère ubiquitaire de cette expression suggère que la Tetherin joue un rôle important dans les premières étapes de la réponse immunitaire innée ou qu'elle possède des fonctions indépendantes de la régulation par les interférons.

Concernant la régulation de l'expression de la Tetherin et en accord avec son induction par les IFN I, des motifs consensus de liaison de facteurs de transcription comme STAT3, IRF1 et ISG3 sont présents dans le promoteur du gène *bst2* (Ge et al., 2006; Kawai et al., 2008; Ohtomo et al., 1999). Le schéma classique lors d'une infection rétrovirale comporte donc une détection du pathogène par différents PRR comme les TLR, RIG-I ou bien IFI16, première étape de voies de signalisation qui aboutissent au relargage d'IFN I et à l'expression accrue de la Tetherin. Des mécanismes d'induction de la Tetherin, indépendants de la présence d'interférons ont également été décrits, impliquant par exemple la stimulation du TLR3 ou du TLR8 par différents agonistes (Bego et al., 2012) ou bien l'IL27 (Guzzo et al., 2012).

3.4 Rôle antiviral

La topologie de la Tetherin est la clé de sa fonction antivirale : la protéine grâce à ses deux ancres membranaires (l'une protéique, l'autre lipidique) forme un pont entre les membranes plasmique et virale (Perez-Caballero et al., 2009). La capacité de la protéine à s'homodimériser (Perez-Caballero et al., 2009), l'intégrité du domaine coiled-coil ainsi que la présence de l'ancre GPI et de la transmembrane sont indispensables à l'activité antivirale (Andrew et al., 2009; Hammonds et al., 2012; Neil et al., 2008; Perez-Caballero et al., 2009).

Le fait que la structure de la protéine plutôt que sa séquence primaire en acides aminés détermine sa fonction a été très clairement démontré par Perez-Caballero et coll., grâce à la construction d'une Tetherin artificielle (Perez-Caballero et al., 2009). Cette molécule, formée du domaine N-terminal du récepteur de la transferrin, du coiled-coil de la protéine DMPK, et de l'ancre GPI uPAR, possède la même topologie que la Tetherin native et est capable de s'opposer au relargage de virions HIV-1.

Des expériences de biochimie et de microscopie permettent de comprendre et de « visualiser » cette rétention virale à la membrane. Par exemple, lorsque des cellules infectées sont marquées, la Tetherin est détectée à l'interface entre les virions « piégés » et la membrane plasmique ou entre les particules virales elles-mêmes (Fitzpatrick et al., 2010; Hammonds et al., 2010). En ce qui concerne l'arrangement de la Tetherin dans les deux membranes (virale et plasmique) plusieurs modèles peuvent être proposés. L'équipe de Bieniasz (Venkatesh and Bieniasz, 2013), en utilisant différents variants du facteur de restriction, a pu montrer que les dimères de Tetherin s'orientent de façon parallèle avec une insertion préférentielle de l'ancre GPI dans la membrane du virion, le domaine transmembranaire de la protéine étant de fait plutôt associé à la membrane plasmique. Cette conclusion est en accord avec la présence de motifs spécifiques dans la queue cytoplasmique de la protéine qui initient la signalisation intracellulaire (Cocka and Bates, 2012; Galão et al., 2012; Tokarev et al., 2013). La microscopie à haute résolution a permis de donner une vision plus « quantitative » de la rétention des virions à la membrane : il apparaît que la majorité des particules en cours d'assemblage s'associent à 4-7 dimères de Tetherin (Habermann et al., 2010; Lehmann et al., 2011). Une approche par western blot a produit des résultats légèrement différents : il s'agit, selon les auteurs, plutôt de quelques douzaines de dimères de Tetherin par virion (Venkatesh and Bieniasz, 2013). Les signaux qui induisent le recrutement de la Tetherin au niveau du bourgeon viral ne sont par contre pas encore bien connus, mais il a été proposé que la courbure de la membrane cellulaire induite par l'assemblage du virus, soit un élément moteur (Grover et al., 2013). Après leur rétention à la surface cellulaire, les virions sont endocytés et s'accumulent au sein de compartiments endosomaux (Neil et al., 2008) où ils sont dégradés. L'endocytose, dépendante de la clathrine, repose sur la GTPase Rab5 (Harila et al., 2007; Neil et al., 2006) et est facilitée par le double motif tyrosine présent dans la queue cytoplasmique de la Tetherin (Galão et al., 2012). De plus, une étude a montré que la GTPase BCA/rabring 7, possédant une activité E3 ubiquitine ligase, interagit avec la Tetherin et favorise l'internalisation et la dégradation de virions HIV-1 retenus à la surface cellulaire (Miyakawa et al., 2009).

La plupart des études réalisées sur le rôle antiviral de la Tetherin se sont concentrées sur la transmission par virion libre or il est admis que dans le cas des rétrovirus, la transmission cellule-cellule est cruciale (cf. chapitre 1). Celle-ci implique un contact entre la cellule donneuse et la réceptrice, qualifié de synapse virologique. Le rôle de la Tetherin sur la transmission cellule-cellule du virus HIV-1 est controversé (Casartelli et al., 2010; Jolly et al., 2010; Kuhl et al., 2010). Une étude a montré que la Tetherin aurait un rôle positif sur la transmission du virus HIV-1 ΔVpu à travers des synapses virologiques formées de cellules Jurkat infectées et de T CD4+ primaires (Jolly et al., 2010). Dans deux autres études (Casartelli et al., 2010; Kuhl et al., 2010) il a par contre été mis en évidence que la Tetherin réduit le transfert cellule-cellule. Dans ce cas, les auteurs suggèrent que la présence de BST2 entraîne la transmission d'un matériel viral moins infectieux composé d'agglomérats de virus attachés par le facteur de restriction (Casartelli et al., 2010). Dans tous les cas, que la Tetherin affecte positivement ou négativement le passage du virus HIV-1 à la synapse, les effets observés sont relativement faibles. La situation semble plus claire pour HTLV-1 qui, quasi-exclusivement transmis par contact cellule-cellule, est insensible à la Tetherin. La protéine est alors recrutée à la synapse virologique et entre dans la composition du « biofilm viral », véritable manteau protecteur et adhésif qui permet la transmission efficace des virions (Pais-Correia et al., 2010).

3.5 Rôle de senseur et de régulateur des réponses immunes antivirales

En induisant une rétention des particules virales à la surface des cellules infectées, la Tetherin n'a pas simplement une action mécanique de blocage du relargage mais déclenche et amplifie également les réponses immunitaires innées à travers l'induction de cytokines/l'expression de chémokines. Il a en effet été montré que la surexpression de la Tetherin humaine par transfection transitoire ainsi que le cross-linking de la Tetherin de surface par des anticorps, activent efficacement la voie NFkB (Cocka and Bates, 2012; Galão et al., 2012; Tokarev et al., 2013). La même activation est observée lorsque des particules rétrovirales ou filovirales bourgeonnent de cellules exprimant la Tetherin, ce qui démontre que la rétention virale par le facteur de restriction est responsable de la transduction d'un signal. En d'autres termes, la Tetherin agit comme un PRR, un senseur inné de l'assemblage de virus enveloppés. Ainsi, l'infection de cellules CD4+ humaines par un virus HIV-1 ΔVpu induit l'accumulation de cytokines/chimiokines proinflammatoires telles que CXCL10 et IL-6, ainsi que de l'IFN I, et ce d'une manière dépendante de la Tetherin (Galão et al., 2012). D'un point de vue

mécanistique, cette transduction de signaux repose en grande partie sur la queue cytoplasmique de la Tetherin. Le double motif tyrosine qu'elle contient est impliqué dans l'activation de NFkB qui passe par un recrutement de TAK1, Ubc13, TRAF2 et TRAF6 (Galão et al., 2012; Tokarev et al., 2013). L'activation de NFkB dépend également de l'association de BST2 au cytosquelette d'actine via la protéine RICH2 (Galão et al., 2014). En effet, dans les cellules infectées, le réseau d'actine sous-corticale permet la phosphorylation de la Tetherin par la tyrosine kinase Syk, l'une des premières étapes menant à l'activation de NFkB (Galão et al., 2014).

Enfin, en plus de son rôle d'activateur de la voie NFkB, la Tetherin intervient dans la régulation de l'activité des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules constituent l'une des premières lignes de défense antivirale car après la détection d'un pathogène par les TLR7 et TLR9 endosomaux, elles synthétisent de grandes quantités d'interférons de type I. La Tetherin est un ligand et cofacteur de l'ILT7, récepteur inhibiteur exprimé en surface des pDC qui contrôle l'inflammation en modulant la production d'IFN I et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Cao et al., 2009). Il a été montré que l'interaction Tetherin-ILT7 inhibe l'activation des deux senseurs clé de l'infection virale, TLR7 et TLR9 et de fait contrôle négativement la sécrétion d'IFN I.

3.6 Diversité des Tetherin

Le gène humain de la *tetherin/bst2* est localisé sur le chromosome 19 (Ishikawa et al., 1995) (chromosome 8 chez la souris). Des orthologues ont été décrits chez de nombreuses espèces de mammifères : certains singes (Kobayashi et al., 2014; Takeuchi et al., 2015) le cheval et l'âne (X Yin et al., 2014), le chat domestique (Celestino et al., 2012), le mouton (Arnaud et al., 2010). Chez toutes les espèces citées (liste non exhaustive), la Tetherin présente une activité antivirale. Récemment des orthologues ont également été décrits en dehors des mammifères : chez le poisson, les reptiles et les oiseaux (Heusinger et al., 2015). De façon remarquable, la Tetherin d'alligator est efficace pour bloquer le relargage de particules rétrovirales dans un système hétérologue (293T transfectées par le provirus HIV-1 ΔVpu en présence de quantités croissantes de la Tetherin testée), ce qui suggère que l'activité de restriction associée à BST2 a émergé avant la divergence mammifère/reptile (Heusinger et al., 2015).

Comme la plupart des gènes antiviraux, celui de la Tetherin est l'objet d'une forte pression de sélection et plusieurs résidus sont sous sélection positive dans chacun des trois domaines

caractéristiques de la protéine (Ravindra K. Gupta et al., 2009; Lim et al., 2010; McNatt et al., 2009). La protéine humaine se distingue par la délétion de 5 acides aminés dans sa queue cytoplasmique. Ces acides aminés étant également absents des génomes de Denisova et Neanderthal, la délétion est apparue après la divergence entre les primates humains et non humains (Sauter et al., 2011).

Aucun variant d'épissage de la Tetherin n'a été identifié jusqu'à présent mais pourtant la protéine existe sous deux isoformes (Cocka and Bates, 2012). En plus de la première méthionine, toutes les Tetherin de mammifères séquencées ont une méthionine proche, située en position 13, en aval du motif très conservé d'endocytose. Les deux codons AUG correspondants présentent consenus Kozak faible et la traduction de l'ARN messager mène à l'expression d'une isoforme longue et d'une isoforme courte qui présentent toutes deux une activité antivirale. L'isoforme courte est plus efficace car elle est exprimée en plus grande quantité à la membrane plasmique du fait de l'absence du motif d'endocytose dans sa queue cytoplasmique. Elle est également insensible à Vpu et incapable d'initier la transduction de signaux. Certaines espèces, comme le chat domestique, n'expriment que la protéine la plus courte à cause d'une mutation au niveau du premier AUG (Celestino et al., 2012).

De façon surprenante, l'activité de senseur associée à la Tetherin n'est présente que chez l'homme, dans une moindre mesure chez le chimpanzé, alors que de nombreux mammifères expriment l'isoforme longue de la protéine, qui contient le double motif tyrosine requis pour cette fonction (Galão et al., 2012). Il a été suggéré que la délétion de 5 acides aminés dans la queue cytoplasmique de la Tetherin au cours de l'évolution ait mené à une augmentation de sa capacité à initier la transduction de signaux (Galão et al., 2012). Les Tetherin d'espèces qui ne possèdent pas cette activité peuvent néanmoins avoir d'autres rôles importants. Par exemple, l'orthologue de hamster code une protéine à localisation préférentiellement intracellulaire qui est impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi (Li et al., 2007).

Une autre illustration de la diversité du facteur de restriction vient de l'étude des ruminants (e.g. mouton, chèvre, vache) qui codent deux variants de la Tetherin, des paralogues résultants d'une duplication génique, oBST2A et oBST2B (o pour « ovine »). Des analyses phylogénétiques indiquent que cette duplication a eu lieu il y a environ 25 millions d'années (MA), avant le spéciation de la sous-famille des bovins (Bovinae), et donc aussi avant la première vague d'intégration des enJSRV dans le génome du mouton (Arnaud et al., 2010, 2007b; Murphy et al., 2015). Chez de nombreux ruminants, le conceptus en cours de développement sécrète de l'interféron tau (IFNT) qui promeut l'implantation utérine et, comme les autres IFN de type I, active des voies de transduction qui sont impliquées dans le

maintien de la tolérance materno-fœtale et dans la défense contre les infections virales (Bazer et al., 2008). Chez le mouton, l'IFNT et la progestérone stimulent l'expression de BST2/Tetherin et des enveloppes des enJSRV, respectivement dans le stroma et l'épithélium luminal de l'endomètre (Arnaud et al., 2010; Palmarini et al., 2001a). *In vitro*, il a été montré que oBST2A est plus efficace que oBST2B pour bloquer le relargage de particules de JSRV endogènes et agit par le mécanisme « classique » associé au facteur de restriction (Arnaud et al., 2010). oBST2B est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et interfère avec le trafic normal des enveloppes JSRV en les séquestrant dans cet organelle. Par conséquent, oBST2B cause la diminution de l'incorporation d'Env JSRV au sein de particules rétrovirales, induisant une baisse significative de l'infectivité (Murphy et al., 2015). Il est intéressant de souligner que les endogènes JSRV et BST2 sont exprimées de façon exclusive, au sein de compartiments cellulaires distincts de l'endomètre (stroma et épithélium luminal) (Arnaud et al., 2010). La duplication de oBST2 ayant eu lieu avant l'entrée des copies endogènes de JSRV dans le génome du mouton, il est très probable que oBST2A/B aient participé au « confinement » des virus JSRV exogènes, progéniteurs des copies endogènes, au niveau de ces zones très spécifiques du tractus reproductif (i.e. où les protéines BST2 ne sont pas ou très peu exprimées) (Arnaud et al., 2010).

3.7 Les antagonistes viraux de la Tetherin

Le large spectre d'action de la Tetherin est contrebalancé par le fait que de nombreux virus enveloppés présentent une activité antagoniste, souvent portée par une protéine virale accessoire ou par une protéine structurale comme la glycoprotéine d'enveloppe. Dans la plupart des cas, l'antagoniste interagit de façon directe avec le facteur de restriction et induit sa relocalisation/dégradation. Il existe cependant des exceptions et les mécanismes d'action ne sont pas encore tous élucidés (Fig. 21).

3.7.1 Des protéines accessoires en tant qu'antagonistes

3.7.1.1 Nef SIV

Le génome des lentivirus code plusieurs protéines accessoires comme Nef, Vif, Vpr, Vpx et Vpu en plus des protéines structurales et enzymatiques Gag, Pol et Env et des protéines régulatrices Tat et Rev (Malim and Emerman, 2008). Ces différentes protéines accessoires ne sont cependant pas communes à tous les lentivirus : Nef et Vpr sont spécifiques des lentivirus

de primates (HIV-1, HIV-2 et SIV), Vpx est exprimée par HIV-2 et les virus apparentés SIVsm et SIVmac, Vpu est quant à elle exprimée par HIV-1 et quelques souches de SIV (e.g. SIVcpz, SIVgsn, SIVmon, SIVmus, SIVden) (Roy et al., 2014).

Le SIV a été identifié dans plus de 40 espèces différentes de primates africains. La plupart de de ces virus utilisent la protéine Nef pour s'opposer à la restriction exercée par la Tetherin (Jia et al., 2009; Sauter et al., 2009; Schmokel et al., 2011; Zhang et al., 2009). Nef induit une relocalisation de la Tetherin de surface par un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrin, de AP2 et de la dynamin-2 (Götz et al., 2012; Serra-Moreno et al., 2013). Les niveaux de Tetherin dans les cellules ne sont par contre pas affectés par Nef ce qui indique qu'elle séquestre le facteur de restriction dans des compartiments intracellulaires plutôt qu'elle ne le dégrade. Des expériences de mutagenèse ont révélé que les résidus présents à l'intérieur ou à proximité du motif [D/E]xxxLL dans la boucle C de Nef sont critiques pour son activité anti-Tetherin (Götz et al., 2012; Serra-Moreno et al., 2011; Zhang et al., 2011). De plus, une interaction directe entre Nef et la Tetherin, mettant en jeu les domaines intra-cytoplasmiques des deux protéines, a été démontrée. Il est intéressant de noter que le motif DIWKK de BST2 détermine sa sensibilité à Nef et est absent de l'orthologue humain du facteur de restriction (Jia et al., 2009; Sauter et al., 2009; Zhang et al., 2009). Ainsi, la Tetherin humaine est résistante à l'action de Nef ce qui limite la possibilité d'une propagation du SIV au sein de l'espèce humaine, dans le cas où la barrière d'espèce serait franchie.

3.7.1.2 Vpu HIV-1

Vpu est une protéine membranaire qui possède deux fonctions majeures dans le cycle de réplication du HIV-1 : elle induit la dégradation du récepteur CD4 et s'oppose efficacement à l'action de la Tetherin. Il existe 4 groupes de HIV-1 : M, N, O et P qui sont le résultat de 4 transmissions interspécifiques indépendantes des Grands Singes aux humains (Sharp and Hahn, 2011). Les précurseurs directs du HIV-1, SIVcpz et SIVgor, utilisent leur protéine Nef pour s'opposer à l'action de la Tetherin chez leur hôte respectif. La Tetherin humaine est résistante à Nef mais la barrière d'espèce a tout de même été franchie par le virus HIV-1 du groupe M qui utilise la protéine accessoire Vpu comme antagoniste. Cette évolution de Nef vers Vpu représente d'ailleurs un des déterminants majeurs du caractère pandémique des virus HIV-1 du groupe M (Sauter et al., 2010). La Tetherin et Vpu interagissent via leur transmembrane et plusieurs résidus clé ont été identifiés (Kobayashi et al., 2011; McNatt et al., 2013). Vpu HIV-1 est certainement l'antagoniste le plus efficace de la Tetherin humaine,

à la fois *in vitro* et *in vivo* mais il est aussi l'un de ceux qui présente la spécificité d'espèce la plus restreinte (Goffinet et al., 2009; Ravindra K. Gupta et al., 2009; McNatt et al., 2009; Rong et al., 2009). En terme de mécanisme d'action, l'interaction a lieu au niveau du TGN et Vpu y séquestre la Tetherin en s'opposant à son transport antérograde vers la membrane plasmique. Dans certains types cellulaires cependant, comme les cellules T ou les macrophages, Vpu n'agit pas en diminuant la quantité de Tetherin surfacique (Chu et al., 2012; Miyagi et al., 2009) mais plutôt en excluant le facteur de restriction des sites de bourgeonnement viral à la membrane plasmique. En plus de cette activité de relocalisation, Vpu agit parfois en induisant la dégradation de la Tetherin. Ce processus repose sur la présence d'un motif di-serine (DSGxxS) au sein de la queue cytoplasmique de Vpu qui recrute le complexe SCF E3 ubiquitin ligase via l'adapteur SCFβ-TrCP et induit une ubiquitination de la Tetherin (Goffinet et al., 2009; Mangeat et al., 2009). Celle-ci entre alors dans la voie ESCRT qui organise le recyclage des protéines membranaires ubiquitinylées et leur dégradation lysosomale (Janvier et al., 2011). Vpu s'oppose également -via un mécanisme dépendant de β-TrCP- à l'induction de voies de signalisation par la Tetherin humaine évoquées plus haut (Tokarev et al., 2013).

3.7.2 Des glycoprotéines d'enveloppe en tant qu'antagonistes

Le virus HIV-2 ne code pas la protéine Vpu et utilise sa glycoprotéine d'enveloppe plutôt que Nef pour s'opposer à l'action de la Tetherin (Le Tortorec and Neil, 2009). Env HIV-2 interagit avec la Tetherin et la séquestre au niveau de compartiments périnucléaires mais sans entraîner sa dégradation (Hauser et al., 2010; Le Tortorec and Neil, 2009; Lopez et al., 2010). L'interaction directe de Env HIV-2 avec la Tetherin est essentielle pour sa fonction d'antagoniste et est médiée par le domaine extracellulaire des deux protéines (Exline et al., 2015; Le Tortorec and Neil, 2009). En effet, une chimère qui présente le domaine extracellulaire de l'Env HIV-2 relié aux domaines trasmembranaire et cytoplasmique de l'Env HIV-1 est toujours capable de s'opposer à la Tetherin (Abada et al., 2005). Réciproquement, l'Env HIV-2 conserve son activité sur une protéine dérivée de la Tetherin qui possède les domaines cytoplasmique et transmembranaire de la transferrin tout en conservant le domaine extracellulaire et l'ancre GPI du facteur de restriction natif (Lopez et al., 2010). L'activité anti-Tetherin de l'Env HIV-2 dépend également de la présence d'un motif d'endocytose de type GYXXΦ dans sa queue cytoplasmique qui permet l'internalisation, clathrine et AP2 dépendants, de la Tetherin surfacique (Le Tortorec and Neil, 2009). L'activité anti-Tetherin

de l'Env HIV-2 est moindre comparée à celle de Vpu HIV-1 mais présente un spectre plus large (Lopez et al., 2010; Weinelt and Neil, 2014). Notons que la plupart des expériences ont été menées avec des enveloppes de virus HIV-2 du groupe A. Par conséquent, l'action anti-Tetherin d'enveloppes d'autres groupes n'est pas encore élucidée ce qui empêche d'apprécier complètement l'impact de l'enveloppe HIV-2 sur la propagation du virus *in vivo*. L'Env du SIV tantale (SIVtan) est également un antagoniste de plusieurs Tetherin de primate (Ravindra K Gupta et al., 2009). Les caractéristiques de cette antagonisme sont très proches de ce qui vient d'être décrit pour Env HIV-2 : l'Env SIVtan et BST2 interagissent via les domaines extracellulaires et le domaine cytoplasmique de l'Env est indispensable à la relocalisation intracellulaire du facteur de restriction.

Contrairement aux différents antagonistes qui viennent d'être évoqués, la glycoprotéine du virus Ebola (Ebola GP) agit sur la Tetherin sans diminuer son expression à la membrane plasmique (Kühl et al., 2011; Lopez et al., 2010). Ebola GP n'entraîne pas non plus la dégradation du facteur de restriction ni son exclusion des radeaux lipidiques. Une interaction directe entre la sous-unité GP2 de Ebola GP et BST2 a été démontrée mais, contrairement à ce qui a été évoqué pour les autres antagonistes, pourrait ne pas être indispensable pour l'activité anti-Tetherin. En effet, Ebola GP est capable d'exercer ses effets sur une Tetherin complètement artificielle (Lopez et al., 2010). Une étude récente a montré que la queue cytoplasmique de Ebola GP et le peptide de fusion ne sont pas requis pour l'activité anti-Tetherin au contraire du domaine transmembranaire qui est lui essentiel à la fois pour la fusion virus-cellule et l'antagonisme de la Tetherin (Gnirß et al., 2014). Comme l'Env HIV-2, Ebola GP est capable d'agir sur des Tetherin d'espèces très différentes (Kühl et al., 2011).

L'enveloppe FIV est un autre antagoniste de la Tetherin au mécanisme d'action « non canonique ». Morrison et coll. ont en effet montré que l'incorporation de l'Env FIV au sein des particules virales est nécessaire pour bloquer l'action de la Tetherin féline mais n'induit ni relocalisation ni dégradation du facteur de restriction (Morrison et al., 2014). D'autre part, l'Env FIV, comme Ebola GP, n'agit que sur le relargage de ses propres particules, alors que les antagonistes décrits précédemment sont également efficaces dans des conditions hétérologues (Celestino et al., 2012; Morrison et al., 2014). L'effet de l'Env FIV sur la Tetherin est cependant à nuancer puisqu'une étude suggère que le virus ne code pas un antagoniste direct mais outrepasse la restriction par un mécanisme de transmission virale de type cellules-cellules (Dietrich et al., 2011).

Pour finir, les glycoprotéines des virus HSV-1 (Blondeau et al., 2013) et EIAV (Xin Yin et al., 2014) ont également été décrites comme des antagonistes de la Tetherin et agissent en diminuant l'expression surfacique du facteur de restriction.

3.7.3 Autres protéines virales antagonistes de la Tetherin

Comme évoqué au début de ce paragraphe, la mise en évidence de l'activité d'antagoniste portée par la protéine K5 du virus KSHV (aussi appelé HHV8) est associée à la découverte du facteur de restriction lui même (Bartee et al., 2006). La protéine K5 possède une activité ubiquitin ligase qui s'exerce sur la queue cytoplasmique de la Tetherin au niveau de la lysine 18 et entraîne l'adressage du facteur de restriction aux voies de dégradation protéasomale ou ESCRT-dépendante (Agromayor et al., 2012; Mansouri et al., 2009; Pardieu et al., 2010). K5 agit efficacement sur la Tetherin humaine mais n'est pas capable de bloquer les orthologues macaque ou murin (Pardieu et al., 2010). De nombreux autres antagonistes ont été identifiés : la protéine non structurale (Nsp1) du virus Chikungunya par exemple, qui réduit l'expression surfacique du facteur de restriction ; la neuraminidase (N1 et N2) des virus influenza (Leyva-Grado et al., 2014; Mangeat et al., 2012; Yondola et al., 2011) ainsi que le peptide de fusion (F) qui agit de concert avec les protéines hémagglutinine-neuraminidase (HN) du virus Sendaï pour induire la dégradation de la Tetherin (Bampi et al., 2013).

	spécificité	interaction antagoniste/BST2	domaines requis pour la fonction de l'antagoniste	mécanisme d'action		quelques références
				relocalisation de BST2	dégradation de BST2	
Nef SIV	restreinte	domaines intracytoplasmiques	boucle C	oui	non	Jia et al., 2009;Sauter et al., 2009;Götz et al., 2012; Zhang et al., 2009;Serra-Moreno et al., 2013
Vpu HIV-1	restreinte	transmembranes	queue cytoplasmique	oui	oui	Kobayashi et al., 2011;McNatt et al., 2013; Miyagi et al., 2009;Mangeat et al. ,2009;Neil et al., 2008
Env HIV-2	large	domaines extracellulaires	queue cytoplasmique	oui	non	Le Tortorec et al., 2009;Lopez et al., 2009 Hauser et al., 2010
Env SIVtan	?	domaines extracellulaires	queue cytoplasmique	oui	non	Gupta et al., 2009
GP Ebola	large	sous-unité GP2 de GP Ebola + interaction avec Tetherin «artificielle»	domaine transmembranaire	non	non	Lopez et al., 2010;Kühl et al., 2011 Gnirß et al., 2014
Env FIV	?	?	clivage protéolytique de l'Env et domaine cytoplasmique non requis	non	non	Morrison et al., 2014;Celestino et al., 2012
K5 HHV8	restreinte	pas clair	domaine ubiquitine-ligase	oui	oui	Bartee et al., 2006;Mansouri et al., 2009 Pardieu et al., 2010;Agromayor et al., 2012

Figure 21. Caractéristiques des principaux antagonistes de la Tetherin/BST2
Tableau récapitulant quelques caractéristiques des principaux antagonistes de la Tetherin/BST2 : la spécificité de reconnaissance de Tetherin de différentes espèces (qualifiée de large lorsque des Tetherin d'espèces très différentes sont ciblées, et de restreinte dans le cas contraire) ; le domaine d'interaction entre l'antagoniste considéré et la Tetherin (il est précisé que GP Ebola est capable d'interagir avec une Tetherin artificielle ce qui suggère que l'interaction spécifique entre cet antagoniste et la Tetherin n'est pas requise pour la fonction de

l'antagoniste) ; les domaines additionnels de l'antagoniste requis pour l'action anti-Tetherin ; le mécanisme d'action de l'antagoniste (en particulier les capacités à relocaliser la Tetherin surfacique et/ou à dégrader la «réserve» de Tetherin totale).

3.8 Autres rôles de la Tetherin

Contrairement à ce qui a été décrit pour la majorité des virus enveloppés, la Tetherin augmente l'infection par le virus HCMV (Human cytomégalovirus) en facilitant son entrée dans certaines cellules cibles où elle est exprimée à fort niveau. Le facteur de restriction ne joue pas ici un rôle essentiel mais plutôt celui d'un cofacteur en augmentant l'adsorption du virus aux cellules (Viswanathan et al., 2011). En présence de BST2 une plus large proportion de cellules est infectée mais la capacité réplicative du virus dans chacune des cellules n'est pas augmentée.

Depuis sa découverte en tant que facteur de restriction, la Tetherin a surtout été étudiée sous l'angle des interactions hôtes/pathogènes. Cependant, de plus en plus de travaux illustrent d'autres rôles de BST2 (cf. concept de « moonlight protein »). Nous avons déjà évoqué l'implication de la protéine dans l'organisation des microdomaines membranaires (séparation des fractions radeaux lipidiques et non radeaux lipidiques) (Billcliff et al., 2013) et également donné l'exemple de la Tetherin de hamster qui permet le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi (Li et al., 2007). Des découvertes récentes suggèrent que BST2 est également associée à la carcinogenèse (revue dans (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016) , évoqué avec plus de détails dans la discussion).

3.9 Importance de la Tetherin *in vivo*

Plusieurs études réalisées dans des modèles murins immunocompétents ont démontré le rôle crucial de la Tetherin dans le contrôle de l'infection *in vivo*. Les travaux réalisés par le groupe de Bieniasz (Liberatore and Bieniasz, 2011) ont montré une augmentation significative de la charge virale chez des souris KO pour la Tetherin, infectées par le virus MLV Moloney. Cette observation a été confirmée par une autre équipe (Swiecki et al., 2012). De façon paradoxale cependant, les titres viraux associés à une infection par le virus VSV diminuent dans les poumons de ces souris KO (Swiecki et al., 2012). Une troisième étude a tiré parti d'un polymorphisme dans l'ATG +1 de la Tetherin de souris NZW qui mène à la synthèse d'une isoforme courte de la protéine exprimée à plus forts niveaux à la membrane des cellules. En accord avec les deux autres études, l'augmentation de l'expression surfacique de Tetherin induit une diminution de la charge virale et une atténuation des effets pathogéniques associés

à l'infection par le virus Friend (Barrett et al., 2012). Il est important de souligner qu'aucune souris KO ne présente de défauts fonctionnels ou développementaux majeurs ce qui suggère que la Tetherin ne joue pas un rôle fondamental en dehors de l'immunité antivirale. Toutefois, certaines des propriétés de la protéine étant spécifiques d'une espèce donnée (e.g. l'induction de la signalisation NFkB semble relativement restreinte à l'homme), les modèles murins ne sont pas représentatifs de tous les effets de la Tetherin. Il est difficile d'obtenir des preuves inambigües chez l'homme, mais l'existence de plusieurs antagonistes viraux suggère indirectement que la Tetherin y joue un rôle important *in vivo,* notamment dans le contrôle de l'infection par HIV-1. Parmi les 4 groupes de HIV-1 (M, N, O et P), seule HIV-1 M est pandémique. Entre autres différences entre ces 4 groupes, la protéine Vpu des virus M est la seule à contrecarrer efficacement l'action de la Tetherin, ce qui a conduit Sauter et coll. à proposer que l'activité antagoniste de Vpu constitue un facteur majeur de transmission virale au sein des populations humaines (Sauter et al., 2009).

Chez les mammifères, les virus infectieux sont majoritairement contrôlés par la composante innée du système immunitaire. Compte-tenu de la grande proximité entre les rétrovirus infectieux et endogènes, il est très probable que la plupart des mécanismes de défense qui s'appliquent aux premiers soient transposables aux seconds.

4. Régulation de la réplication des ERV par les réponses immunitaires innées et adaptatives

4.1 La reconnaissance des ERV par le système immunitaire (SI) inné

Nous venons de décrire en détail les facteurs de restriction qui agissent sur la réplication de HIV-1 mais également sur celle de nombreux ERV. Ces protéines sont considérées comme constituant l'immunité intrinsèque car elles sont exprimées de façon constitutive mais le fait que leur expression soit régulée par les IFN I permet aussi de les inclure comme des acteurs précoces du système immunitaire inné. De plus, les exemples de TRIM5alpha et de la Tetherin montrent que les facteurs de restriction sont parfois aussi des PRR et peuvent intégrer des signaux de danger afin de mieux contrôler les ERV.

4.1.1 Les PRR (pathogen recognition receptor)

Plusieurs récepteurs innés et cascades de signalisation sont associés à la défense contre les rétrovirus exogènes. Ces voies sont activées en réponse à la détection d'acides nucléiques viraux, intermédiaires de réplication spécifiques des virus (e.g. ARN double brin) (revue dans

(Barbalat et al., 2009)). L'un des premiers indices que ces senseurs pouvaient également détecter des produits de la réplication d'éléments endogènes est venu de l'étude de souches de souris développant des syndromes auto-immuns. Le lien est en effet souvent établi entre les MLV endogènes et le développement du lupus érythémateux systémique (SLE) chez la souris (Santiago-Raber et al., 2009). L'étude de souris KO pour TLR7 ou l'une des molécules associées à sa voie de signalisation (e.g. MYD88, IFN regulatory factor 5, UNC93B1) a montré l'importance de ces différentes protéines dans le contrôle *in vivo* de la virémie associée au MLV (Young et al., 2012; Yu et al., 2012). Les TLR endosomaux, TLR3 et TLR9, qui sont respectivement des senseurs de l'ARN double brin et des îlots CpG non méthylés de l'ADN, jouent également un rôle, bien que secondaire par rapport à celui de TLR7, dans le contrôle de la réactivation des MLV endogènes (Yu et al., 2012). L'ARN de différents groupes de rétrovirus endogènes peut aussi stimuler d'autres types de PRR, comme l'ARN hélicase RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) et/ou la protéine MDA-5 (melanoma différentiation-associated protéin 5), l'un comme l'autre activant la protéine mitochondriale MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) (Zeng et al., 2014). Un autre acteur majeur de la reconnaissance d'acides nucléiques dérivés d'ERV est le senseur d'ADN cytosolique cGAS (cGMP-AMP synthase) qui, en catalysant la production du second messager cGMP-AMP (cGAMP), activateur direct de STING (Stimulator of IFN genes), déclenche la réponse interféron. Une étude a notamment montré que l'accumulation d'ARNm et de cDNA viraux dans des cellules B murines constitue un signal d'activation de cGAS. La voie de signalisation cGAS-STING participe ainsi à l'activation des lymphocytes B et à la production d'anticorps spécifiques de l'antigène (Zeng et al., 2014). Ce modèle illustre le lien entre l'induction transcriptionnelle des ERV et l'activation de senseurs d'acides nucléiques dans les cellules immunes (Zeng et al., 2014).

4.1.2 Les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques

L'étude de maladies autoimmunes telles que le syndrome Aicardi-Goutières (AGS) ou le lupus érythémateux systémique (SLE), toutes deux associées à des niveaux élevés de production d'interféron de type I, a mis en lumière quelques enzymes impliquées dans le contrôle de l'accumulation d'acides nucléiques dérivés de rétrovirus endogènes (revue dans (Volkman and Stetson, 2014)). TREX1 (three prime repair exonuclease 1), tout d'abord, mutée dans de nombreux cas d'AGS, a une activité ADN exonucléase et catalyse le clivage de fragments d'ADN simple brin (ADNss). Dans des cellules déficientes pour TREX1, de

l'ADNss dérivé d'ERV s'accumule et à l'inverse, la surexpression de TREX1 fait chuter l'efficacité de transposition d'ERV transfectés, probablement via la dégradation de l'ADN rétroviral endogène néo-synthétisé (Stetson et al., 2008). La RNase H2 est une autre enzyme associée à l'AGS, dont l'activité ribonucléase cible les ARN au sein des hétéroduplexes ARN-ADN. La dissociation de la matrice ARN par la RNAse virale est une étape importante de la transcription inverse (cf. chapitre 1). Cependant, une dégradation prématurée induite par la RNAse H2 empêche la synthèse correcte du double brin d'ADNc. Enfin, une autre enzyme mise en évidence par l'étude de l'AGS est SAMHD1 (stérile alpha motif and histidine-aspartic domain 1). Elle est la cible de la protéine accessoire Vpx de HIV-2 (et de certains SIV) qui induit sa dégradation (Berger et al., 2011; Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011). SAMHD1 contrôle la réplication rétrovirale dans les cellules myéloïdes en réduisant les dNTP intracellulaires, bloquant de fait la réplication au stade de la transcription inverse (Lahouassa et al., 2012). Une activité nucléase, ciblant les ARN simple brins, a également été associée à la protéine mais reste controversée (revue dans (Ballana and Esté, 2015)). Ces mécanismes anti-rétroviraux semblent assez généraux et il est donc probable que certains ERV en soient la cible. Ceci reste une hypothèse et on peut imaginer aussi, qu'à l'instar de Vpx pour HIV-2, quelques ERV codent des antagonistes de l'enzyme.

4.2 Le statut des ERV par rapport au système immunitaire adaptatif

Une preuve du contrôle des ERV par le système immunitaire adaptatif a été apportée par Young et coll. (Young et al., 2012) dans le modèle très utilisé de la souris C57BL/6. Chez les souris sauvage, aucun provirus MLV endogène réplicatif n'est détecté. En revanche, chez les souris Rag-/-, déficientes pour la production d'anticorps, l'expression de différents MLV endogènes n'est plus atténuée, ce qui permet la genèse d'éléments infectieux écotropes par recombinaison entre loci activés et *in fine* le développement de lymphomes.

Les protéines codées par les ERV font partie de l'ensemble des peptides du soi présentés au cellules T durant leur ontogenèse (Ebert et al., 2009; Lo et al., 2009). Comme pour les autres éléments du soi, la présentation au niveau du thymus d'antigènes dérivés d'ERV est supposée aboutir à l'élimination des TCR qui leur sont spécifiques et donc à un état de tolérance immunologique. Cependant, le statut des ERV par rapport au système immunitaire (SI) est complexe et la tolérance immunologique envers eux n'est que partielle. Ceci s'explique en partie par l'efficacité de la régulation épigénétique dans les tissus sains, en particulier au niveau thymique, qui empêche l'expression de protéines d'éléments endogènes à un niveau

suffisant pour déléter l'ensemble des clones T autoréactifs (revue dans (Young et al., 2013)). Ainsi, lorsque les ERV sont induits transcriptionnellement, l'hôte est en capacité de détecter leur présence et de nombreux exemples de réponses T et B visant des antigènes dérivés d'ERV existent aussi bien chez la souris que chez l'homme (Baudino et al., 2010; Ebert et al., 2009; Perl and Fernandez, 2010; Young et al., 2013). On peut citer, sans entrer dans les détails car ce sera en partie l'objet du chapitre 4, le contexte de certaines infections virales e.g. les provirus HERV-K(HML2) transactivés par la protéine accessoire Tat du virus HIV-1 (Gonzalez-Hernandez et al., 2014)) ou encore celui des maladies autoimmunes dans lesquelles l'immunité adaptative contre des éléments dérivés d'ERV pourrait jouer un rôle causal (revue dans (Kassiotis and Stoye, 2016)).

5. Réactivation des ERV

Bien que l'expression des ERV soit inhibée dans la plupart des situations physiologiques, certaines séquences sont exprimées dans des lignées cellulaires, des tissus et également associées à certaines pathologies. Des ARN, protéines et particules virales peuvent par exemple être détectés dans certaines tumeurs, en particulier lorsqu'elles sont dérivées de tissus régulés par des hormones. De façon surprenante compte tenu de l'efficacité de la méthylation, certains ERV sont transcrits au cours du développement comme les familles humaines HERV-H et HERV-K(HML2). Cette dernière est active au stade 8 cellules mais réprimée dans les cellules souches (Grow et al., 2015). La protéine Rec est en particulier détectée de façon transitoire dans l'embryon humain dans lequel elle pourrait participer à la création d'un état antiviral en activant certaines voies de l'immunité innée (Grow et al., 2015).

Les mécanismes qui contrôlent la réactivation des ERV sont variés, en voici quelques exemples :

- Hypométhylation : L'hypométhylation affecte le génome à grande échelle tandis que l'hyperméthylation est souvent restreinte à quelques régions promotrices de certaines régions génomiques. L'hypométhylation est généralement associée à un relâchement de la structure chromatinienne, une augmentation de l'accessibilité aux facteurs de transcription et en conséquence, une élévation du niveau de transcription. Elle induit également une certaine instabilité génétique en favorisant les phénomènes de recombinaison. L'hypométhylation des LTR de HERV-K(HML2) et l'activation subséquente de ces

éléments a été décrite dans les tumeurs de la prostate, de l'ovaire et dans certaines lignées cellulaire de mélanome (Goering et al., 2011; Iramaneerat et al., 2011; Stengel et al., 2010).

- Facteurs de transcription : Certains facteurs de transcription régulent spécifiquement l'activité des LTR d'éléments endogènes. Par exemple, des analyses *in silico* du LTR 5' de HERV-K(HML2) ont révélé la présence et la conservation de sites de liaison aux protéines à doigts de zinc Sp1 et Sp3 (Fuchs et al., 2011). Ces deux facteurs de transcription sont responsables de la régulation de gènes contrôlant des processus cellulaires variés (e.g. croissance cellulaire, différentiation, apoptose, remodelage de la chromatine). L'expression du provirus HERV-K(HML2) est également stimulée par le facteur de transcription MITF-M, isoforme spécifique de MITF dans les mélanocytes/mélanomes, qui participe au développement des premiers et contrôle la prolifération des seconds (Katoh et al., 2011).
- Hormones : L'expression préférentielle d'une majorité d'ERV, en particulier humains, dans le placenta ou certains tissus reproducteurs a suggéré une régulation potentielle par des hormones stéroïdiennes (Andersson et al., 1998, 1996; Urnovitz and Murphy, 1996). L'équipe de Miller A.D. a par exemple étudié le rétrovirus murin MDEV (*Mus dunni* endogenous virus) (Miller et al., 1996; Wolgamot and Miller, 1999), dont l'expression est normalement réprimée en cellules *M. dunni* mais qui peut être activé par traitement à l'hydrocortisone (HC) ou au 5-iodo-2'-désoxyuridine (IdU). Le provirus MDEV est un hybride dont la majorité des régions codantes proviennent du virus GaLV et les LTR dérivent des éléments VL30. La région U3 du LTR de MDEV présente la particularité de contenir plus de 6 répétitions de 80 bp, identiques à une mutation près. Cette expansion des LTR est due à une multimérisation des séquences « enhancer » et permet au virus de se multiplier plus efficacement.

  Des analyses *in silico* ont permis l'identification d'éléments de réponse aux récepteurs stéroïdiens dans les régions promotrices de HERV-K(HML2) : 3 ERE (responsive to estrogen), 2 PRE (responsive to progesterone), 1 ARE (responsive to androgen) et 1 GRE (responsive to glucocorticoids) (revue dans (Manghera and Douville, 2013)). L'acide rétinoïque, hormone dérivée de la vitamine A et impliquée dans le développement embryonnaire, la différenciation et la prolifération cellulaires, peut également activer ou réprimer la transcription de certains HERV (e.g. (Kannan et al., 1991; La Mantia et al., 1991)).

- Protéines virales : L'expression des ERV peut également être induite dans certains contextes d'infections virales (voir chapitre 4). Certains travaux rapportent que la transcription d'éléments de la famille HERV-W est stimulée par la protéine IE1 (Intermediate Early protéin 1) du virus herpes simplex 1 (Lee et al., 2003). Cette dernière semble favoriser la liaison du facteur de transcription Oct-1 aux régions U3 des LTR de HERV-W (Lee et al., 2003). Le LTR HERV-K peut également être activé par une autre protéine du virus HSV-1, ICP0 (Infected-Cell Protein 0), par un mécanisme similaire (Kwun et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que dans le contexte d'une infection par HIV-1, la protéine accessoire Tat active les LTR des provirus endogènes HML2 (Gonzalez-Hernandez et al., 2012) (plus de détails à la fin du chapitre 4).

A travers ce chapitre, nous avons vu que l'hôte possède de nombreux moyens de contrôle de l'expression et de la réplication des rétrovirus endogènes, lesquels ont parfois mis en place des « stratégies » pour déjouer ces régulations. Dans certaines situations, les ERV sont exprimés avec souvent des conséquences positives ou négatives sur les organismes. Dans le dernier chapitre de cette introduction nous étudierons les conséquences physiopathologiques de la présence et de l'expression des ERV au sein des cellules de l'hôte.

CHAPITRE 4 : Conséquences physiopathologiques de la présence et de l'expression des ERV au sein des cellules de l'hôte

1. Conséquences de la présence des séquences d'ERV dans les génomes

Les ERV qui ont conservé leur potentiel réplicatif sont responsables de néo-insertions avec, notamment chez la souris, des conséquences potentiellement néfastes pour l'hôte. Certains travaux mettent également en évidence l'assimilation par le génome des effets promoteurs des séquences LTR (exemples notamment chez la souris et l'homme). Les ERV auraient ainsi contribué à la diversité biologique en apportant de l'innovation dans la régulation de l'expression génique (Jern and Coffin, 2008).

1.1 Conséquences délétères de néo-insertions d'ERV (exemples chez la souris)

Chez la souris, les familles rétrovirales endogènes IAP et ETn sont à l'origine d'un grand nombre de mutants (Baust et al., 2002; Ostertag and Kazazian, 2001) dont l'étude a permis d'identifier les principales conséquences de la néo-insertion d'un ERV dans un génome :

- L'insertion d'un ERV peut conduire à l'inactivation génique lorsque la nouvelle copie du rétrovirus endogène s'insère à l'intérieur d'un exon. La traduction du gène peut alors être interrompue par la présence de codons stops précoces contenus dans l'ERV (Steinmeyer et al., 1991).
- L'ERV néo-inséré peut également altérer l'expression du gène ciblé, soit par diminution de la stabilité du transcrit cellulaire (Hamilton et al., 1997), soit par modification de sa structure. L'ERV, contenant des signaux d'arrêt de la transcription, peut par exemple entrainer la synthèse de transcrits trop courts (Adachi et al., 1993).
- La présence de séquences répétées dans un génome favorise l'apparition de recombinaisons illégitimes entre loci non homologues. Le cas le plus fréquent, déjà évoqué plus haut, est celui de la formation de LTR solos (recombinaison entre les deux LTR d'un même élément endogène). Si la recombinaison se fait entre deux éléments différents portés par un même chromosome, les séquences centrales peuvent être éliminées (si les deux éléments sont dans la même orientation) ou inversées (si les deux éléments sont dans des orientations opposées). Si les copies sont sur des chromosomes différents, les recombinaisons peuvent générer des translocations chromosomiques.

- L'insertion d'ERV dans le génome peut également modifier la structure de la chromatine. Les ERV peuvent en effet intervenir sur le niveau de méthylation des régions environnantes et servir de « centres initiateurs » pour la propagation de structures chromatiniennes défavorables à la transcription (Michaud et al., 1994).

1.2 Conséquences bénéfiques de la présence des ERV sur les gènes adjacents (exemples chez la souris et l'homme)

Les LTR des ERV constituent aussi un réservoir de promoteurs et de signaux de régulation transcriptionnelle potentiels (e.g. signaux de polyadénylation, sites d'épissage, voir revue (Suntsova et al., 2015)) pouvant affecter le profil d'expression des gènes cellulaires adjacents à la fois d'un point de vue « spatial » et « temporel » sans entraîner de modifications de la protéine codée par le gène.

Un premier exemple provient de la famille d'ERV de souris, les MuERV-L, ayant efficacement colonisé le génome murin (Bénit et al., 1997). La plupart de ces éléments possèdent des gènes *gag*, *pro* et *pol* intacts mais sont dépourvus de gène *env*. Leur expression, dans les premiers stades du développement embryonnaire (pic d'expression au stade 2 cellules), est associée à la production de particules virales qui sont séquestrées au niveau du réticulum endoplasmique (Ribet et al., 2008) et elle contribue à la plasticité des cellules souches embryonnaires murines. Des facteurs dérivés des éléments MuERV-L contrôlent notamment l'expression de gènes spécifiques du développement pré-implantatoire et de l'état pluripotent des cellules souches (revue dans (Schoorlemmer et al., 2014)).

Un second exemple, cette fois chez l'homme, illustre comment une capture d'ERV peut avoir lieu au bénéfice du système immunitaire. L'équipe de C. Feschotte a récemment étudié les réseaux de régulation du gène de l'immunité AIM2 (Absent in Melanoma 2) qui code un senseur d'ADN cytosolique (Chuong et al., 2016). Ils ont montré qu'un provirus particulier de la famille gammarétrovirale MER41, localisé en amont de ce gène, est indispensable pour permettre sa régulation par IFN gamma (IFNG). Plus précisément, la séquence de ce MER41 contient des sites de liaison au facteur de transcription STAT1 qui sont conservés parmi les primates anthropoïdes, et permettent, chez l'homme et des espèces proches (chimpanzé, rhésus macaque, marmoset), le contrôle de l'expression de AIM2 par la voie IFNG. Les auteurs ont démontré que ce provirus MER41 est nécessaire à la réponse inflammatoire à l'infection. En délétant l'élément par la technologie CRISPR/CAS9 dans des cellules HeLa, l'activité de l'inflammasome -plateforme moléculaire assemblée lorsque AIM2 reconnaît des éléments étrangers et qui initie la mort cellulaire- est en effet fortement réduite.

Ces quelques exemples illustrent les conséquences de la présence de séquences d'ERV dans le génome. Nous allons à présent nous intéresser aux conséquences de l'expression de différentes protéines d'ERV.

	R	W	FRD	T	K	F(e)1	F(e)2	Rb	H2	H1	H3
placenta	3302,81	10000,00	1599,61	3,24	7,71	0,12	-	6,20	0,49	0,80	-
testicule	340,28	304,97	62,70	4,21	46,77	100,48	10,02	5,26	6,19	3,01	3,00
thyroide	214,07	37,08	6,90	1600,48	3,77	0,01	-	-	-	-	-
prostate	290,74	24,04	10,90	126,60	11,17	-	-	0,09	-	1,17	-
sein	288,24	56,29	14,04	14,36	7,59	0,05	0,66	-	-	0,60	-
rein	107,85	45,19	20,47	22,31	49,94	-	0,38	0,17	-	0,04	-
colon	120,70	37,74	17,35	0,40	19,30	-	0,18	0,02	0,05	-	-
thymus	167,68	22,12	32,13	0,10	3,25	-	-	0,11	-	-	-
moelle ossense	154,47	29,08	10,25	1,60	2,79	-	0,07	0,18	-	0,02	-
ovaire	333,90	37,63	14,05	4,33	3,92	-	0,47	0,13	0,02	0,52	-
adrenal	848,30	32,01	27,65	3,14	6,49	-	0,28	-	-	0,15	-
peau	304,74	48,61	46,46	7,04	6,73	3,50	9,34	0,48	0,08	1,83	-
rate	163,19	38,28	11,24	0,31	3,22	0,01	0,05	-	-	-	-
poumon	117,95	1,82	5,91	0,33	0,15	0,01	-	-	1,13	0,03	-
trachée	93,08	33,10	12,63	7,11	7,89	2,82	1,10	0,29	0,30	0,05	-
cerveau	97,29	26,14	7,67	1,82	1,54	-	0,62	0,86	-	-	-
PBL	39,38	2,69	9,36	0,10	1,06	-	0,09	0,22	0,11	0,29	-
foie	4,34	3,07	0,68	-	0,82	-	-	-	-	-	-
cœur	3,35	0,26	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-

1.000 - 10.000
100 - 1.000
10 - 100
1 - 10
0,1 - 1

Figure 22. Transcriptome des gènes d'enveloppe endogènes codants du génome humain
L'échelle logarithmique des niveaux d'expression suit un code couleur. L'enveloppe R est aussi appelée enveloppe ERV-3 dans le texte. D'après (de Parseval et al., 2003).

2. Rôle physiologique fondamental des protéines d'enveloppe de différents ERV dans la placentation

2.1 Les syncytines

Le placenta est un organe autonome et transitoire destiné essentiellement à nourrir et oxygéner l'embryon puis le fœtus au cours de la vie intra-utérine. Il est également le siège d'une tolérance immunologique permettant le maintien du fœtus dans un organisme auquel il est partiellement étranger. Le placenta humain est composé de villosités chorioniques recouvertes par une double couche de cellules trophoblastiques. Le syncytiotrophoblaste, externe, est formé par fusion des cellules cytotrophoblastiques mononuclées sous-jacentes (les cytotrophoblastes villeux ou VT). A l'extrémité distale de la villosité chorionique certains VT traversent le syncytium pour former des colonnes de cytotrophoblastes extravilleux qui envahissent la decidua maternelle (Burrows et al., 1996) (Fig. 23B). Comme l'illustre la Fig. 22 le placenta humain est aussi un lieu privilégié d'expression de différents rétrovirus

endogènes. Les premières hypothèses d'une éventuelle implication fonctionnelle des rétrovirus endogènes dans la biologie du placenta des mammifères supérieurs proviennent, chez l'homme, essentiellement de l'étude du gène d'enveloppe du provirus ERV-3 (Venables et al., 1995). Celui-ci est conservé chez la plupart des Grands Singes et Singes de l'Ancien Monde et montre une expression placentaire spécifique. Des études de séquençage révèlent qu'environ 1% de la population humaine présente un codon stop prématuré –et non contre-sélectionné- dans la séquence du provirus (de Parseval and Heidmann, 1998). Cette observation suggère que Env ERV-3 jouerait plutôt un rôle accessoire à moins que la partie de la SU produite ne soit l'effecteur d'un rôle physiologique fondamental.

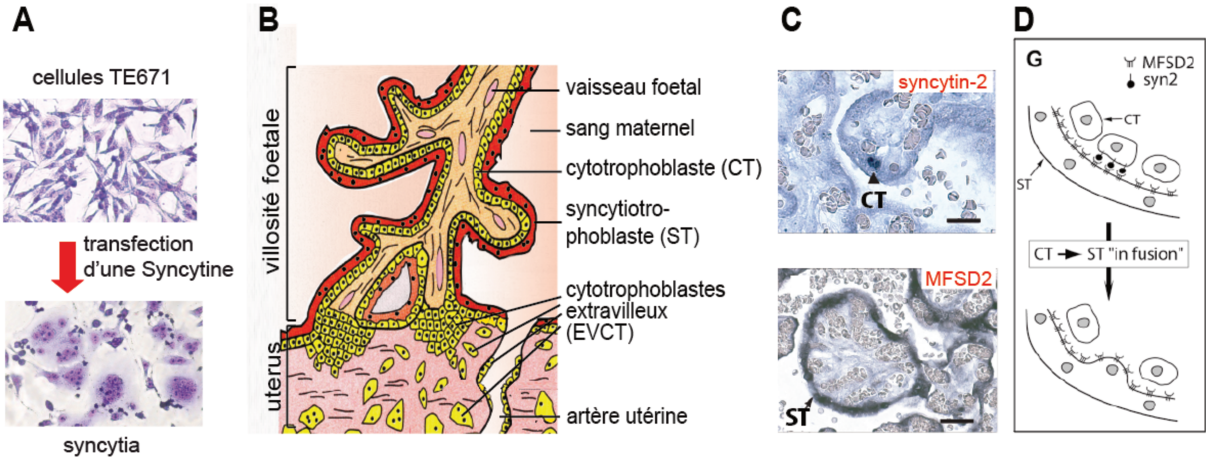


Figure 23. Les Syncytines humaines et leur implication dans le développement placentaire
(A) Induction de la fusion cellule-cellule et de la formation de syncytia multinucléés par la transfection de la syncytine-1 ou de la syncytine-2 dans des cellules humaines TE671 (coloration May-Grünwald-Giemsa). (B) Représentation schématique d'une villosité placentaire humaine. (C) Hybridation *in situ* sur une coupe de villosité placentaire, réalisée avec des sondes reconnaissants la Syncytine-2 et son récepteur, la protéine MFSD2. MFSD2 est localisé au niveau du syncytiotrophoblaste (ST) alors que la syncytine-2 est exprimée au niveau des cytotrophoblastes sous-jacents (CT). (D) Modèle de l' « in fusion », proposé pour expliquer la formation du syncytiotrophoblaste. L'interaction entre MFSD2 et la syncytine-2 conduit à la fusion des cytotrophoblastes au sein du syncytiotrophoblaste – et non des cytotrophoblastes entre eux. D'après (Esnault et al., 2008b).

Par la suite, deux autres protéines d'enveloppe, des familles HERV-W (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000) et HERV-FRD (Blaise et al., 2003) ont été mises en avant pour leur possible rôle dans la formation du placenta. Celles-ci y sont très exprimées, conservées chez l'ensemble des Primates Supérieurs, et induisent la formation de syncytia lorqu'elles sont introduites dans des cellules en culture, d'où leur désignation respective de Syncytin-1 et Syncytin-2 (Fig. 23A). Le très faible polymorphisme des gènes correspondants observé dans la population humaine indique que ces deux enveloppes jouent un rôle physiologique important. De par leurs propriétés fusiogènes, elles participeraient en effet à la formation du syncytiotrophoblaste, la couche de cellules fusionnées, assurant les échanges entre la mère et

le fœtus (Blaise et al., 2003; Blond et al., 1999; De Parseval and Heidmann, 2005; Frendo et al., 2003; Malassiné et al., 2007; Mi et al., 2000). Plusieurs caractéristiques distinguent ces deux protéines. Tout d'abord, seule la Syncytin 2 possède des propriétés immunosuppressives. Ensuite, la Syncytin-1 est détectée dans tous les types de cellules trophoblastiques (cyto-, syncytio et extravilleux) (Malassiné et al., 2005; Muir et al., 2006) alors que l'expression de la *syncytin-2* est limitée à une fraction de cytotrophoblastes villeux (Malassiné et al., 2007). Enfin, ces deux enveloppes endogènes utilisent des récepteurs différents. Il s'agit des transporteurs d'acides aminés RDR/ASCT-2/SLC1A5 et SLC1A4/ASCT-1 pour Env HERV-W (Syncytin-1) (Blond et al., 2000; Lavillette et al., 2002) et de la protéine MFSD2A pour Env-FRD (Syncytin-2) (Blaise et al., 2003). MFSD2A est localisé au niveau des syncytiotrophoblastes ce qui apporte une information mécanistique intéressante : le couple FRD-MFSD2A joue probablement un rôle majeur dans le renouvellement du syncytiotrophoblaste au cours de la grossesse en permettant l'incorporation de cellules cytotrophoblastiques mononucléées dans la couche fusionnée syncytiotrophoblastique (on parle de « in-fusion » pour illustrer ce phénomène, voir Fig. 23D) (Blaise et al., 2003).

La démonstration du rôle de protéines d'ERV dans la formation du placenta vient d'études réalisées au laboratoire chez la souris. Bien qu'il n'existe pas d'orthologue des *syncytin 1* et *2*, des analyses sur l'ADN génomique murin ont permis d'identifier deux enveloppes distinctes, appelées Syncytin-A et Syncytin-B. Elles sont toutes les deux fusiogènes, spécifiquement exprimées au niveau placentaire et conservées depuis plus de 25 millions d'années (Dupressoir et al., 2005). L'inactivation du gène de la *syncytin-A* chez la souris provoque des défauts majeurs dans l'organisation placentaire et la mort des embryons homozygotes *in utero*, à mi-gestation (Dupressoir et al., 2009). Le phénotype associé à la délétion de la syncytin-B est moins drastique, bien que la fusion des trophoblastes soit également affectée (Dupressoir et al., 2011). D'autres exemples de captures d'ERV pour la formation du placenta ont été décrits chez les mammifères (e.g. ruminants, carnivores, lagomorphes) (revue dans (Lavialle et al., 2013b)). Ces différentes captures sont indépendantes et pourraient être à l'origine de la variété des structures placentaires.

2.2 Autres enveloppes impliquées dans la placentation

L'implication des enveloppes rétrovirales endogènes dans la formation du placenta n'est pas limitée aux syncytines. Le gène *envV*, par exemple, est entré dans le génome des primates il y

a plus de 45 millions d'années, a perdu une partie de ses propriétés de syncytine chez l'homme (elle n'est plus fusiogène) mais reste spécifiquement exprimée dans le syncytiotrophoblaste où elle pourrait avoir conservé un rôle physiologique -non identifié à ce jour- (Esnault et al., 2013). La glycoprotéine d'enveloppe de HERV-K(HML2) est également exprimée dans le placenta humain, plus précisément au niveau des cellules trophoblastiques villeuses et extravilleuses (Kämmerer et al., 2011). Les conséquences de cette expression ne sont pas encore connues mais il est possible que l'enveloppe, grâce à ses propriétés immunosuppressives, participe à la tolérance materno-fœtale.

Les enveloppes endogènes de JSRV caractérisées à ce jour sont incapables d'induire la fusion cellule-cellule mais jouent un rôle essentiel dans le développement du placenta et du conceptus chez le mouton (Dunlap et al., 2006). Comme les Env JSRV endogènes présentent un fort degré de similarité avec leurs équivalents exogènes, il a été suggéré (Arnaud et al., 2008) que les mécanismes en jeu dans la transformation cellulaire médiée par Env JSRV pourraient également être responsables de la prolifération/différentiation des trophoblastes, même si seules les Env JSRV exogènes semblent vraiment oncogéniques. Il est décrit, par exemple que les voies MAP kinase et PI3K/Akt activées par l'Env JSRV exogène pour transformer les cellules ont aussi un rôle régulateur dans la croissance du trophoblaste et la différentiation des placentas humain et rongeur (revue dans (Pollheimer and Knöfler, 2005)).

Certains rétrovirus endogènes ou certaines de leurs protéines ont donc été sélectionnés positivement pour remplir des fonctions essentielles. Dans d'autres cas, l'expression des ERV se fait aux dépends de l'hôte qui les héberge. Dans le suite de ce chapitre nous illustrerons cette idée en prenant essentiellement l'exemple des HERV et leur implication potentielle dans certains cancers.

3. Expression des ERV et cancers

3.1 Rétrovirus exogènes/endogènes et cancers : le contexte

3.1.1 Rétrovirus exogènes et cancers

Les rétrovirus ont d'abord été identifiés comme les agents étiologiques de cancers chez le poulet et la souris et de fait qualifiés de « virus ARN causant des tumeurs » (RNA tumor viruses). Deux mécanismes principaux expliquent la tumorigenèse médiée par un rétrovirus : la capture d'oncogène et la mutagenèse insertionnelle (Rosenberg and Jolicoeur, 1997). Dans ce dernier cas, le rétrovirus induit la formation de tumeurs en s'intégrant, soit à proximité

d'un proto-oncogène cellulaire soit à l'intérieur d'un gène suppresseur de tumeurs, dérégulant ainsi leur expression. Les rétrovirus qui agissent de la sorte sont qualifiés de cis-activateurs. Ils sont tous réplicatifs et le processus de transformation associé est relativement lent. Au contraire, les rétrovirus portant un oncogène (*v-onc*, pour oncogène viral) induisent la formation très rapide de tumeurs chez l'hôte. Les *v-onc* sont en fait dérivés de gènes cellulaires, insérés dans le génome de certains rétrovirus par un processus de recombinaison au cours de la transcription inverse (d'où le qualificatif « capture d'oncogène »). Cette découverte a eu un impact très important sur la compréhension générale des mécanismes du cancer et a permis la caractérisation de nombreux *c-onc* ou proto-oncogènes, au rôle clé dans la croissance et la différentiation cellulaire. Notons que l'oncogène viral est souvent situé au sein d'une phase de lecture d'un gène essentiel ce qui implique la nécessité d'une complémentation par un virus sauvage (ou « helper virus » i.e. ne portant pas l'oncogène).
Un petit groupe de rétrovirus infectieux utilise un autre mécanisme d'oncogenèse. Les rétrovirus murin SFFV (spleen focus-forming virus) et MPLV (myeloproliferative leukemia virus), aviaire AHV (avian hemangioma virus) et les rétrovirus ovins JSRV (Jaagsiekte sheep retrovirus) et ENTV (enzootic nasal tumor virus) expriment en effet des protéines d'enveloppe oncogènes. Plus précisément :

- Le SFFV (voir revue (Moreau-Gachelin, 2008)), premier caractérisé pour ce type de mécanisme, est un rétrovirus défectif pour la réplication, complémenté par un virus helper, le F-MuLV (Friend murine leukemia virus) qui apporte les fonctions manquantes pour la multiplication dans les cellules cibles. La glycoprotéine d'enveloppe gp55 réarrangée du virus est capable d'interagir avec le récepteur de l'érythropoïetine (EpoR) via sa transmembrane, ce qui conduit à une prolifération et une différenciation accrues des progéniteurs érythroïdes, indépendamment de la présence du ligand naturel Epo (érythropoïétine). En plus du EpoR, la gp55 recrute la forme courte du récepteur tyrosine kinase sf-Stk (stem cell kinase receptor). Chez les souris infectées par le SFFV, la coopération entre gp55, EpoR et sf-Stk permet l'activation constitutive des voies de signalisation PI3K/Akt et MAP kinases (via ERK 1/2 et p38) ce qui induit une érythroleucémie aiguë. A ces événements moléculaires médiés par l'enveloppe du rétrovirus, s'ajoute une mutagenèse insertionnelle quasi-systématique qui permet une transformation complète des cellules. Le SFFV s'intègre préférentiellement au locus *spi-1* (SFFV proviral integration site 1) et induit la surexpression de la protéine correspondante ce qui cause l'arrêt de la différenciation des érythroblastes.

- Le MPLV a été isolé lors du passage du F-MuLV (Friend murine leukemia virus) chez la souris DBA/2 (Oliff et al., 1980; Penciolelli et al., 1987). Il s'agit d'un virus défectif pour la réplication qui induit un désordre myloprolifératif aigü chez la souris adulte. L'analyse de la séquence du gène d'enveloppe a révélé que cette région du genome est réarrangée et comprend un oncogène, v-mpl, présentant des analogies structurales avec la superfamille des récepteurs de l'hématopoïétine, en phase avec une partie de l'ORF de l'Env du F-MuLV (Souyri et al., 1990).

- Le AHV est au contraire un rétrovirus compétent pour la réplication et code une protéine d'enveloppe capable de déclencher *in vitro* la prolifération des cellules NIH3T3, par un mécanisme encore inconnu à ce jour (Alian et al., 2000).
- Les exemples des virus JSRV et ENTV seront détaillés dans le paragraphe 3.4 de ce chapitre.

L'identification de rétrovirus oncogéniques chez certains mammifères a stimulé, dans les années 70, la recherche d'équivalents chez l'homme. Le seul découvert jusqu'à présent est le rétrovirus HTLV-1, décrit pour la première fois dans les années 1980 et identifié comme l'agent étiologique de l'ATL, une leucémie des cellules T (adult T cell lymphoma/leukemia). Aucun des deux mécanismes cités précédemment n'explique l'oncogenèse médiée par HTLV-1. Le responsable de la transformation cellulaire est en fait la protéine non structurale et accessoire Tax qui interfère avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire (zur Hausen et al., 2006).

3.1.2 Rétrovirus endogènes et cancers : les leçons tirées de l'étude des modèles animaux

Les ERV présentent une structure voisine de celle des rétrovirus infectieux et ont donc très tôt été soupçonnés de jouer un rôle dans les maladies humaines, en particulier le cancer. Cependant, jusqu'à présent, les seules données établissant un lien de causalité entre expression d'un ERV et tumorigenèse ont été obtenues dans des modèles de souris congéniques. Deux exemples classiques pour illustrer ce propos : les leucémies induites par le rétrovirus endogène MLV chez la souris AKR et les tumeurs mammaires causées par le virus MMTV endogène. Notons que dans les deux cas la version exogène du virus induit également la formation de tumeurs. Le mécanisme de transformation médié par l'endogène repose sur la recombinaison entre plusieurs copies provirales donnant naissance à un rétrovirus infectieux

capable de réinfecter les cellules de l'hôte et de s'insérer dans des loci critiques. Par exemple, le virus MMTV endogène active des proto-oncogènes cellulaires comme Wnt1 ou Notch1 ou induit l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par mutagenèse insertionnelle (revue dans (Dudley et al., 2011))(Fan, 1997). Deux autres études, réalisées sur des modèles de mélanome et neuroblastome murins confirment l'intervention de rétrovirus endogènes dans le développement de tumeurs chez la souris. Les cellules de mélanomes B16 provenant de la souris C57BL/6 expriment spontanément le rétrovirus endogène écotrope MelARV. L'extinction de cet ERV par interférence ARN induit le rejet des tumeurs chez la souris immunocompétente, ce qui prouve que MelARV est directement responsable de la carcinogénèse (Mangeney et al., 2005). Les cellules B16 produisent des particules virales détectables dans les surnageants de culture, capables d'infecter des mélanocytes murins et d'induire leur transformation. L'analyse des sites d'intégration a permis de localiser l'une des insertions de MelARV à proximité du proto-oncogène cellulaire *c-maf* (Li et al., 1998) et d'aboutir à la conclusion que la transformation, au moins *ex vivo*, est le résultat d'une mutagenèse insertionnelle. La confirmation de l'importance de ce phénomène *in vivo* est venue de l'étude d'une lignée dérivée des mélanomes B16, appelée B16F10, isolée et sélectionnée chez la souris pour son pouvoir métastatique élevé chez la souris (Fidler, 1973). La comparaison des sites d'intégration du provirus MelARV dans les deux lignées cellulaires (i.e. B16 et B16F10) a mis en évidence des signatures différentes reflétant la mobilité de l'élément endogène. En particulier, des néo-insertions dans le gène *dok5*, conduisant à une augmentation importante du niveau d'expression de la protéine associée, ont été identifiées comme responsables des capacités métastatiques accrues du mélanome B16F10 (Pothlichet et al., 2006b). De même, la lignée cellulaire Neuro-2a, dérivée d'un neuroblastome murin A/J produit un rétrovirus endogène appelé NeRV responsable de mutagenèse insertionnelle (Pothlichet et al., 2006a). Enfin, que ce soit pour MelARV ou NeRV, l'immunosuppression médiée par l'enveloppe rétrovirale (cf chapitre 1, paragraphe 2.4.1) semble également être une composante importante du processus de tumorigenèse et sera discutée un peu plus bas.

3.1.3 Rétrovirus endogènes humains et cancers : quelques considérations évolutives

Les HERV ont co-évolué parfois pendant des millions d'années avec leur hôte. Tout en ayant gardé certains déterminants viraux ils se comportent comme des gènes cellulaires et sont donc soumis aux mêmes pressions évolutives que ces derniers. A ce titre, il apparaît difficilement concevable qu'un élément endogène, néfaste pour l'hôte, comme un HERV impliqué dans la

tumorigenèse, soit conservé dans les génomes. Deux arguments de génétique des populations atténuent cependant ce paradoxe : (1) un HERV « néfaste » pour l'hôte peut se fixer, si son pouvoir pathogène ne se développe qu'après la phase de reproduction des individus ; (2) les effets bénéfiques - s'ils existent - apportés par un HERV à l'échelle de la population peuvent contrebalancer les dommages collatéraux occasionnés à l'échelle individuelle. Ce rôle ambivalent des HERV est bien illustré par l'exemple de la Syncytin 1, capturée par l'hôte pour ses propriétés fusiogéniques nécessaires à la formation du placenta mais également impliquée dans les cancers du sein (Bjerregaard et al., 2006), de l'endomètre (Strick et al., 2007) et dans certaines inflammations chroniques du système nerveux central (Antony et al., 2004).

Parmi les HERV, la famille HML2 est celle qui présente le plus d'associations avec les cancers humains (Fig. 24). Aucun lien de causalité n'a encore été démontré. Il s'agit d'une famille s'étant amplifiée dans les génomes récemment et l'hypothèse de la circulation « à bas bruit » d'une copie infectieuse renforce la possiblité d'une implication dans la transformation cellulaire. Corrolaire de la dynamique de cette famille, quelques éléments existent à l'état polymorphe dans le génome humain (cf. chapitre 1), ce qui renforce la possibilité d'une association spécifique avec certaines pathologies (Moyes et al., 2007). Dans la suite nous parlerons donc essentiellement de la famille de virus HERV-K(HML2) en la comparant à l'exemple du virus JSRV dont la protéine d'Env est un oncogène caractérisé.

Cancer	Activité de HERV-K(HML2)	mécanisme(s) possible(s)	quelques références
TUMEUR GERMINALE	22 **loci** actifs **particules** virales **ARNm** et **protéines** Gag, Env, Np9, Rec **anticorps** anti-Gag/anti-Env	rôle oncogénique des protéines Rec et Np9 rôle immunosuppresseur de l'Env ?	Löwer et al., 1993;Boller et al., 1993; Kleiman et al., 2004;Flockerzi et al., 2008; Bhardwaj et al., 2015;Galli et al., 2005; Denne et al., 2007
MÉLANOME	23 **loci** actifs **particules** virales activité **RT** **ARNm** et **protéines** Env, Np9, Rec **anticorps** anti-Gag/anti-Env	rôle oncogénique de l'Env rôle immunosuppresseur de l'Env ? formation de syncitia induite par l'Env	Büscher et al., 2005;Büscher et al., 2006 Hahn et al., 2008;Schmitt et al., 2013; Serafino et al., 2009;Oricchio et al., 2007
CANCER DU SEIN	**particules** virales activité **RT** ARN viral **circulant** **LT cytotoxiques** spécifiques **ARNm** et **protéines** Env, Gag **anticorps** anti-Env/anti-Rec/anti-Gag	rôle immunosuppresseur de l'Env ?	Wang-Johanning et al., 2001, 2003, 2008, 2013; Rhyu et al., 2014;Wildschutte et al., 2014
CANCERS DE L'OVAIRE	**ARNm** Env, Rec **protéines** Gag et Env		Götzinger et al., 1996; Wang-Johanning et al., 2007; Iramaneerat et al., 2011
CANCER DE LA PROSTATE	**ARNm et protéines** Gag fusion de gènes entre l'oncogène ETV1 et certains provirus HERV-K		Tomlins et al., 2007;Ishida et al., 2008
LYMPHOME	ARN viral **circulant** activité **RT** détection de **VLP** **ARNm** Pol et Gag **protéines** Env, Np9	rôle oncogénique de la protéine Np9	Contreras-Galindo et al., 2008

Figure 24. Tableau récapitulatif des principales associations entre la famille HERV-K(HML2) et les cancers

Pour chaque type de cancer, le type d'éléments détectés du rétrovirus HERV-K(HML2) (ARN, protéines, particules virales, etc…) est précisé. Le mécanisme par lequel HERV-K(HML2) pourrait avoir un rôle oncogénique est indiqué lorsqu'il a été étudié ou proposé dans la littérature.

3.2 Les HERV comme marqueurs dans les cancers : illustration avec la famille HERV-K(HML2)

3.2.1 HERV-K(HML2) et tumeurs germinales (GCT)

Les GCT (pour germ cell tumor) sont des tumeurs solides qui dérivent de cellules de la lignée germinale.

La première association de HML2 avec une pathologie humaine est venue de l'observation au microscope électronique de cellules dérivées de GCT. Des particules rétrovirales y ont été détectées (Bronson et al., 1979; Löwer et al., 1987) et d'abord qualifiées de HTDV (pour human teratocarcinoma-derived virus) avant d'être renommées HTDV/HERV-K lorsque leur identité fut mise à jour (Boller et al., 1993; Löwer et al., 1993). Trois types de virions ont été détectés jusqu'à présent : (1) des particules virales immatures, sans spicule de surface (donc sans glycoprotéine d'enveloppe), présentes dans toutes les lignées cellulaires examinées ; (2) des particules virales immatures avec des spicules détectées dans la lignée 2102Ep ; et (3) des

particules matures sans spicule de surface retrouvées dans la lignée NCCIT. Il est important de noter que jusqu'à présent, aucune particule virale infectieuse n'a été identifiée et que le rôle de ces VLP dans le développement des GCT reste à élucider.

L'association GCT/HERV-K(HML2) est renforcée par la détection d'ARNm et de protéines de HML2 dans des lignées cellulaires et des tissus et par la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines Env et Gag du virus dans les sera de patients GCT mais pas dans ceux de patients sains (Boller et al., 1997; Kleiman et al., 2004). L'implication des protéines accessoires Rec et Np9 de HML2 dans les GCT a été clairement démontrée et sera exposée juste après.

L'une des difficultés associée à l'étude des effets de l'expression de HML2 est l'identification précise des copies actives au cours de la progression de la maladie. Deux études ont décrit le pattern d'expression des différents loci HERV-K(HML2) transcrits dans les GCT. La première (Flockerzi et al., 2008), basée sur des techniques de PCR, a mis en évidence 22 loci HML2 trancriptionnellement actifs avec une accumulation des transcrits associés aux provirus ERVK-20 (22q11.21), ERVK-23 (21q21.1), ERVK-20 (11q23.3). La seconde (Bhardwaj et al., 2015), mettant à profit la technique du RNAseq, a permis de quantifier l'expression des différents provirus HML2 dans la lignée humaine de tératocarcinome Tera-1 ainsi que dans les virions produits par cette dernière. Les cellules Tera-1 expriment divers éléments HML2, à la fois récents et anciens. Les transcrits les plus abondants correspondent à deux provirus présents sur le chromosome 22 (22q11.23 et 22q11.21), ce qui confirme la première étude. Seule l'une des deux copies (22q11.21), défective pour l'Env, est efficacement incorporée dans les particules virales. De manière générale, il existe un biais d'incorporation vers les copies provirales récentes, les plus préservées, ce qui implique l'existence d'un mécanisme de sélection. Les auteurs de l'étude ont également montré, en utilisant le rapporteur luciférase, que l'activité des LTR des différents éléments est corrélée à la quantité de transcrit qui s'accumulent dans les cellules.

3.2.2 HERV-K(HML2) et mélanome

Le mélanome, qui se développe à partir des mélanocytes (cellules produisant le pigment mélanine) de l'épiderme, représente le cancer de la peau le plus agressif.

Des études réalisées dans les années 70 ont mis en évidence la présence de particules virales dans certains mélanomes humains sans en identifier la nature précise (Balda et al., 1975; Birkmayer et al., 1972). Plus récemment Muster et coll. ont identifié des particules

rétrovirales HERV-K(HML2) à partir de différentes cellules dérivées de mélanomes. Ces particules expriment la glycoprotéine d'enveloppe à leur surface ainsi que des protéines Gag partiellement clivées et possèdent une activité RT (Muster et al., 2003) mais sont cependant défectives et non infectieuses (Büscher et al., 2005).

Des ARNm *env*, *rec* et *np9* ont été détectés dans des tissus et des lignées cellulaires de mélanomes. Des marquages par immunohistochimie et immunofluorescence ont révélé l'expression des protéines Rec et Env, respectivement dans le nucléole et à la membrane plasmique de cellules de mélanomes, aucun signal n'étant détecté dans les tissus lymphoïdes adjacents (Büscher et al., 2006, 2005; Reiche et al., 2010). En accord avec les niveaux élevés d'expression protéique, des anticorps spécifiques d'Env et Gag HERV-K(HML2) sont détectables dans les sera de 16-22% des patients atteints de mélanomes mais pas dans ceux des contrôles « sains » (Büscher et al., 2005; Hahn et al., 2008). Plus précisément, Hahn et coll. ont montré que le pourcentage de patients présentant des anticorps anti-HERV-K (dirigés contre Gag ou Env) augmente avec la progression de la maladie et que l'accumulation de tels anticorps est inversement corrélée à la survie des patients (Hahn et al., 2008). Deux études ont également mis en évidence que l'exposition aux UV, l'un des facteurs environnementaux les plus incriminés dans le développement du mélanome, entraîne l'expression de HERV-K(HML2) (Reiche et al., 2010; Schanab et al., 2011). Néanmoins, des données plus récentes montrent à l'inverse une diminution significative de la transcription de HML2 après exposition de cellules de mélanomes et mélanocytes aux UV (Schmitt et al., 2013).

Enfin, comme pour les GCT, un profil transcriptionnel des provirus HERV-K(HML2) exprimés dans des tissus et des lignées cellulaires de mélanome, ainsi que dans des métastases ganglionnaires et dans des mélanocytes, a été établi, basé sur des méthodes d'amplifications par PCR (Schmitt et al., 2013). Dans l'ensemble, 23 loci sont transcrits dans les différents échantillons étudiés, ce qui est très proche du nombre décrit dans le cas des GCT. Les profils transcriptionnels diffèrent par contre complètement : les loci très actifs dans le cas des GCT sont très peu transcrits ou indétectables dans les échantillons de mélanome. De plus, dans le cas du mélanome, aucune signature consensuelle ne semble émerger entre les différents échantillons. L'un des loci, ERVK-6 (chromosome 7p22.1), qui présente des ORF complètes pour Gag et Env, est transcrit de façon élevée dans 7 sur 9 des échantillons dérivés de mélanomes et est absent des lignées de mélanocytes, ce qui en fait un biomarqueur potentiellement intéressant. A contrario, des ARNm rec et np9 de 7 loci HML2 différents ont été retrouvés à la fois dans les mélanomes et les mélanocytes, ce qui est confirmé par une étude montrant la présence des deux types de transcrits dans un grand nombre de tissus sains

(Schmitt et al., 2015). Enfin, les auteurs remarquent que les différences dans les profils de transcription ne peuvent être expliquées par le polymorphisme interindividuel décrit pour la famille HML2. En effet, au moins une copie de la plupart des provirus polymorphes décrits est présente dans les différents échantillons, exception faite des deux provirus très récents HERV-K113 (absent de tous les échantillons) et HERV-K115 (identifié uniquement dans l'une des lignées de mélanocytes). De l'ensemble de ces études, il ressort que le provirus HERV-K(HML2) est fortement associé au mélanome (même si tous les mélanomes n'expriment pas le provirus). Il n'est cependant pas évident d'avoir une idée globale de la fréquence de cette association, les chiffres dépendant de l'étude et du type d'échantillons considérés.

3.2.3 HERV-K(HML2) et cancer du sein

Le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins. La majorité des cancers du sein se développent au niveau des canaux galactophores (cancer canalaire) ou des lobules (cancer lobulaire) et se classent en deux grandes catégories : non invasifs et invasifs.
Comme pour les deux autres cancers décrits précédemment, des particules virales HML2 présentant des transcrits non épissés encapsidés et une activité RT ont été détectées dans diverses lignées cellulaires dérivées de cancer du sein (Faff et al., 1992; Seifarth et al., 1998). Des transcrits de HERV-K(HML2), en particulier des ARNm de l'enveloppe sont spécifiquement détectés dans des lignées et des tissus de cancers du sein (Wang-Johanning et al., 2003, 2001) mais pas dans des tissus de seins sains. Un marquage immunohistochimique réalisé sur 119 échantillons de carcinomes canalaires invasifs, 56 tissus de seins normaux et 7 tissus hyperplasiques de sein a révélé que la protéine d'enveloppe d'HERV-K est exprimée dans plus de 85% des cancers du sein, avec plus de 50% des tumeurs présentant une très forte expression (Wang-Johanning et al., 2008). Wang-Johanning et coll. détectent également un nombre significativement plus élevé d'ARNm viraux dans le sang périphérique de femmes présentant un carcinome canalaire *in situ* ou un carcinome invasif de stade I que chez des femmes non malades (Wang-Johanning et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs suggèrent également que le nombre de copies d'ARNm *gag* de HERV-K(HML2) pourrait constituer un marqueur prédictif de métastases au moment du diagnostic. En effet, analysé au même stade, le niveau d'ARNm HERV-K(HML2) Gag est significativement plus élevé chez des patientes dont le cancer du sein a métastasé par la suite que chez des patientes pour lesquelles le carcinome est resté localisé (Wang-Johanning et al., 2013). En plus de confirmer des

observations sur HERV-K(HML2), un autre groupe a mis en évidence la présence significativement augmentée d'ARNm d'*env* des familles HERV-R (ou ERV-3), HERV-H et HERV-P dans le sang de patientes ayant un cancer du sein à un stade précoce (Rhyu et al., 2014). Ce taux d'ARNm diminue chez les patientes sous chimiothérapie et devient comparable à ce que l'on observe chez les patientes non malades. Comme pour les GCT et les mélanomes, des anticorps spécifiques dirigés contre Rec, l'enveloppe et dans une moindre mesure contre Gag de HERV-K(HML2) sont détectés de manière significative par ELISA dans les sera des patientes présentant un carcinome canalaire *in situ* comparé au groupe de patientes non malades (Wang-Johanning et al., 2013, 2008).

Enfin, le laboratoire de J. Coffin a récemment réalisé une comparaison de la distribution des provirus HML2 polymorphes dans une cohorte comprenant à la fois des patients ayant un cancer du sein et des patients « sains » (Wildschutte et al., 2014). Aucune différence significative dans la prévalence de provirus spécifiques entre les deux groupes n'a été mise en évidence. Ceci suggère que les provirus HML2 polymorphes ne sont pas associés au développement du cancer du sein dans la cohorte testée et confirme ce qui avait déjà été suggéré dans une étude du même genre réalisée sur le mélanome (Schmitt et al., 2013).

La famille HERV-K(HML2) est associée à d'autres types de tumeurs comme le cancer de l'ovaire, de la prostate et le lymphome (e.g. (Contreras-Galindo et al., 2008; Götzinger et al., 1996; Iramaneerat et al., 2011; Ishida et al., 2008; Tomlins et al., 2007; Wang-Johanning et al., 2007)) (Fig. 24) mais les études sont moins nombreuses et les données de corrélation moins étayées que celles présentées précédemment.

3.3 Les HERV dans les cancers : rôle causal possible

3.3.1 Mutagenèse insertionnelle

Comme présenté plus haut, les propriétés tumorigéniques des ERV dépendent, dans de nombreux modèles animaux, de leur mobilité, i.e. de leur capacité à former de nouvelles copies provirales infectieuses dans les cellules somatiques de l'organisme hôte. Bien qu'aucun HERV réplicatif n'ait été jusqu'à présent identifié chez l'homme, il est probable que des copies infectieuses de la famille HERV-K(HML2) soient présentes à très faible fréquence chez l'homme.

3.3.2 Protéines oncogéniques codées par les HERV

Les HERV peuvent également induire la transformation cellulaire par un mécanisme indépendant de la mobilité des provirus. Le rôle des deux protéines accessoires Rec et Np9 du rétrovirus HERV-K(HML2) a été particulièrement étudié dans les modèles de GCT. En 2005, Galli et coll. ont montré que des souris transgéniques exprimant Rec développent très tôt (à 12 semaines) un certain nombre de modifications morphologiques au niveau testiculaire qui traduisent d'une perturbation du développement des cellules germinales. A 19 mois, ces souris montrent des signes de carcinome *in situ*, lésion caractéristique précédant le développement de tumeurs germinales de type séminomes chez l'homme. Le rôle de Rec semble cantonné aux cellules de la lignée germinale car d'autres organes (e.g. foie ou rein) exprimant la protéine accessoire ne montrent aucune modification histopathologique. Dans le modèle des GCT, la protéine Rec joue donc un rôle direct dans la transformation en créant un état pré-cancéreux. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore complètement élucidés même si certains partenaires cellulaires de Rec ont déjà été identifiés. En particulier, Rec interagit avec la protéine PLZF (promyelocytic leukemia zinc-finger protein), essentielle à l'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales murines et potentiellement impliquée dans certaines leucémies humaines (Boese et al., 2000; Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004). Cette interaction lève l'inhibition qu'exerce PLZF sur le proto-oncogène c-myc (Denne et al., 2007). Plus récemment, Kaufmann et coll. (Kaufmann et al., 2010) ont montré que Rec forme un complexe trimérique en association avec le facteur TZFP (testicular zinc-finger protein) et AR (androgen receptor). TZFP est exprimé principalement dans les testicules, localisé dans le nucléoplasme et est actif à tous les stades de la spermatogenèse. Il agit entre autre en tant que co-répresseur de AR. Ce dernier peut dans certains cas se comporter comme un oncogène, en favorisant par exemple la prolifération cellulaire (Balk and Knudsen, 2008). Par conséquent les inhibiteurs s'associant à AR –ici TZFP- peuvent être considérés comme des suppresseurs de tumeurs et les antagonistes de cette interaction -comme Rec- comme des oncogènes potentiels (Kaufmann et al., 2010).

La protéine Np9, comme Rec, interagit avec le facteur PLZF et abroge son activité de répresseur de c-myc (Denne et al., 2007). Np9 peut intervenir également dans la voie de signalisation Notch, dont la dérégulation est impliquée en particulier dans le cancer du sein, les leucémies et les GCT (Adamah et al., 2006; Callahan and Smith, 2000; Hayashi et al., 2004, 2001). Il a été montré par ailleurs que Np9 favorise le développement et la croissance des cellules leucémiques chez l'homme en activant les voies de signalisation ERK, AKT et Notch 1 et en induisant l'expression de la béta-catenin (Chen et al., 2013).

Les modèles des cellules murines B16 et B16F10 (voir dans ce chapitre, paragraphe 3.1.2) montrent que l'expression de certains ERV est responsable du développement et de l'agressivité de mélanomes chez la souris. Chez l'homme, plusieurs études suggèrent que HERV-K(HML2) ait un rôle oncogénique dans ce type de tumeurs. Des cellules de mélanome A-375, exprimant spontanément certains éléments HERV-K(HML2), ne présentent aucune modification de leur capacité proliférative *in vitro* lorsqu'elles sont transduites par un shRNA ciblant *gag* HERV-K(HML2). Par contre, lorsque ces mêmes cellules sont injectées à une souris immunodéficiente, la croissance de la tumeur *in vivo* est significativement réduite comparé à ce qui est observé avec des cellules A-375 transduites par un shRNA contrôle (Oricchio et al., 2007). Une autre étude a également caractérisé l'implication des éléments HERV-K(HML2) dans le mélanome (Serafino et al., 2009) et montré que l'expression de HERV-K(HML2) n'altère pas la différentiation des cellules mais est requise pour la transition d'un phénotype adhérent à un phénotype non adhérent, pouvant conduire à l'apparition de métastases.

Quelques travaux suggèrent également que certaines Env rétrovirales endogènes ayant conservé leur propriété de fusion contribuent à la formation de syncytia observés dans les tumeurs. L'importance de ces phénomènes n'est cependant pas complètement caractérisée. La Syncytine 1 est par exemple exprimée dans les cancers du sein et participe à la fusion des cellules tumorales avec les cellules endothéliales (Bjerregaard et al., 2006). Elle est également significativement induite dans les cancers de l'endomètre où elle permet la prolifération cellulaire et la formation de cellules tumorales multinucléées (Strick et al., 2007). Dans le cas du mélanome, un lien potentiel entre l'expression de l'Env HERV-K(HML2) et la formation de structure syncytiales *in vitro* a également été démontré sans que les mécanismes moléculaires et l'impact fonctionnel soient compétemment élucidés (Huang et al., 2013).

3.3.3 Immunomodulation induite par les HERV

Chez l'hôte immunocompétent, le développement du cancer est contrôlé par le système immunitaire. L'échappement à cette surveillance immune (i.e. échappement tumoral) constitue un facteur important de la croissance et de l'agressivité tumorale. Un grand nombre d'enveloppes rétrovirales possèdent des propriétés immunosuppressives, via leur sous-unité TM (voir chapitre 1, paragraphe 3.4.1). Celles-ci pourraient jouer un rôle important dans les cancers où les Env sont spécifiquement induites.

3.3.4 HERV et exosomes

Les exosomes sont des vésicules membranaires sécrétées par les cellules, contenant des protéines, des lipides ainsi que des ARN et de l'ADN mitochondrial. Ces structures sont notamment impliquées dans les processus de communication intercellulaire et/ou permettent le relargage de protéines/ARN/ADN que la cellule veut éliminer. Il a été démontré ces dernières années que les exosomes pouvaient être aussi impliqués dans les cancers notamment dans le développement et la diffusion des métastases (revue dans (Théry et al., 2002)). Le contenu en acides nucléiques de ces microvésicules a été étudié récemment dans différents contexte tumoraux *in vivo* (e.g. glioblastome, médulloblastome, mélanome) et les ARN d'HERV y sont présents en abondance (Balaj et al., 2011). Gould et coll. proposent l'hypothèse du « cheval de Troie » (Gould et al., 2003) selon laquelle les ERV - plus ou moins défectifs - pourraient utiliser les exosomes comme moyen de se propager et dans le cas du cancer, transmettre leur potentiel tumorigénique aux cellules voisines.

3.4 Les propriétés oncogéniques de l'enveloppe JSRV : modèle possible pour l'étude des propriétés de l'enveloppe HERV-K(HML2)

3.4.1 L'enveloppe rétrovirale comme oncogène

Nous revenons ici aux trois bétarétrovirus infectieux MMTV, ENTV et JSRV apparentés à HERV-K(HML2). Nous allons évoquer en détails les propriétés oncogéniques de l'enveloppe JSRV car ces données sont le point de départ et de référence permanent pour le deuxième article présenté dans cette thèse.

Le virus MMTV est à l'origine de tumeurs mammaires, principalement du fait de son intégration à proximité de proto-oncogènes cellulaires (Callahan and Smith, 2008). Un mécanisme de transformation médié par la glycoprotéine d'enveloppe du virus a également été décrit (Katz et al., 2005; Ross et al., 2006). L'expression de l'enveloppe dans des cellules épithéliales mammaires murine ou humaine en culture conduit à leur transformation en culture (Katz et al., 2005). L'enveloppe présente, au niveau de la sous-unité SU, un motif ITAM (Immuno-tyrosine based activation motif), souvent associé aux récepteurs exprimés dans le compartiment hématopoïétique et lorsque ce motif est muté, la tumorigenèse est atténuée chez la souris infectée (Ross et al., 2006).

Les exemples du rétrovirus JSRV exogène et du ENTV (moins étudié) montrent que la protéine d'enveloppe, indispensable pour l'entrée dans les cellules cibles, peut être l'agent causal du développement de tumeurs (pulmonaires avec JSRV, nasales avec ENTV) (Fig. 25).

In vivo, les propriétés oncogéniques de l'enveloppe ont d'abord été mises en évidence chez la souris (Wootton et al., 2005). L'Env de JSRV, clonée dans un vecteur adénoviral AAV6 et injectée en intranasal conduit en effet au développement systématique d'un adénome pulmonaire (Fig. 25B). Elles ont ensuite été confirmées chez l'hôte naturel immunocompétent (Caporale et al., 2006). De nombreuses lignées cellulaires ont servi de modèle *in vitro* pour l'étude de la transformation médiée par l'Env JSRV : les cellules BEAS-2B de l'épithélium bronchique humain (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003), les fibroblastes de rat 208F (Hofacre and Fan, 2004), les cellules canines de l'épithélium de rein MDCK (Liu and Miller, 2005), les cellules RK3E de l'épithélium de rein du rat (Maeda et al., 2005), les fibroblastes embryonnaires aviaires DF-1 (Allen et al., 2002; Zavala et al., 2003) et les fibroblastes murins NIH3T3 (Maeda et al., 2001; Palmarini et al., 2001b). Dans ces différentes lignées, un test de transformation simple a la plupart du temps été utilisé : l'enveloppe JSRV est exprimée dans les cellules (souvent par transfection) et les foyers transformés sont dénombrés après plusieurs semaines de culture (Fig. 25A). Les mécanismes moléculaires, en particulier l'importance relative des différentes voies de signalisation impliquées, varient en fonction des conditions de culture et du modèle considéré, ce qui illustre les effets pléiotropes de l'enveloppe JSRV.

3.4.2 Les voies de signalisation impliquées dans la transformation cellulaire médiée par l'enveloppe JSRV

L'implication des différentes voies de transduction de signaux dans la transformation par l'Env JSRV a été évaluée en étudiant les effets d'inhibiteurs spécifiques et en détectant, par western blot ou immunohistochimie, les formes activées (i.e. phosphorylées) des protéines des différentes voies. Trois voies de signalisation principales se dégagent (Fig. 25E).

3.4.2.1 La voie PI3K-Akt

La voie PI3K-Akt est associée à la prolifération cellulaire, au contrôle de l'apoptose et à la transformation (revue dans (Cully et al., 2006)). Deux mécanismes principaux mènent à son activation. L'un dépend de la PI3K, l'autre non. Très schématiquement, dans le cas de la voie dépendante de la PI3K, la signalisation est déclenchée suite au recrutement de cette dernière. La PI3K catalyse alors la formation du phosphatidylinositol tris phosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol bis phosphate. Le PIP3 recrute ensuite la kinase PDK1 (phosphatidylinositol-dependant kinase 1) et Akt à la membrane plasmique, PDK1 y phosphoryle alors Akt. Akt peut également être activée sans l'intervention en amont de la

PI3K, l'un des mécanismes décrit fait intervenir le second messager AMPc et la kinase CaMKK (calcium/calmodulin dépendant kinase). Une fois activée, Akt phosphoryle un certain nombre de substrats impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. L'un d'entre eux, mTOR est un régulateur clé de la croissance cellulaire. L'activation (i.e. phosphorylation) de Akt est observée dans plusieurs lignées cellulaires (e.g. NIH3T3, MDCK) transformées par JSRV ainsi que dans des tumeurs OPA du mouton (Liu and Miller, 2005; S. L. Liu et al., 2003; Palmarini et al., 2001b; Zavala et al., 2003). La dépendance vis à vis de la PI3K n'a pas été vraiment tranchée et des variations entre les modèles cellulaires sont observées. Néanmoins, il semble que l'activation de Akt soit un trait caractéristique de la transformation induite par Env JSRV (Chow et al., 2003; Zavala et al., 2003). Le substrat de Akt, mTOR, est également impliqué, car dans le modèle des cellules NIH3T3, un inhibiteur de cette protéine amoindrit l'efficacité transformante de l'enveloppe (Maeda et al., 2005).

3.4.2.2 La voie des MAP kinases

La voie de signalisation des MAP kinases (ou MAPK, mitogen-activated protein kinase) est l'une des principales voies de contrôle de la prolifération cellulaire, très souvent décrite comme anormalement activée dans les cancers (revue dans (Kim and Choi, 2015)). Elle est située en aval de nombreux récepteurs, en particulier les récepteurs de la famille de l'EGFR, et aboutit à l'activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose. En plus de la voie classique qui passe par l'activation du module de MAP kinases ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2), existent deux voies en tous points parallèles, passant par les MAP kinases SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-jun amino terminal kinase) et p38. Les deux voies parallèles sont activées par d'autres stimuli, aboutissent à l'activation d'autres facteurs de transcription et sont davantage impliquées dans la réponse au stress que dans la prolifération. Dans les grandes lignes, l'activation de la protéine Ras stimule la phosphorylation de la MAPKK kinase (MAPKKK) Raf. Raf activée phosphoryle à son tour une MAPK kinase, MEK 1/2, qui entraîne l'activation d'une MAPK, ERK 1/2. L'utilisation de différents inhibiteurs de certaines de ces protéines a permis de montrer le rôle de cette voie dans la transformation cellulaire induite par l'enveloppe JSRV. En particulier, le fait d'inhiber MEK 1/2 (avec PD98059) ou H/N-Ras (avec FTI-277) réduit le nombre de foyers transformés dans des cellules NIH3T3 qui expriment l'Env JSRV, et ceci d'une manière dépendante de la dose d'inhibiteurs (Hull and Fan, 2006; Maeda et al., 2005). Dans les cellules RK3E, le PD98059

inhibe également fortement la transformation alors que l'effet du FTI-277 n'est que partiel. Ceci indique que la signalisation par MEK 1/2 peut aussi faire intervenir d'autres molécules que H/N Ras. En accord avec ces données, des marquages immunohistochimiques de tumeurs OPA indiquent la phosphorylation quasi systématique de ERK 1/2 (De las Heras et al., 2006; Maeda et al., 2005). L'expression de l'enveloppe JSRV dans la lignée A549 de cellules épithéliales pulmonaires humaines induit également l'expression de Sprouty 2, un régulateur négatif de la voie des MAPK passant par ERK 1/2, ce qui renforce l'importance de cette voie de signalisation dans la transformation médiée par l'Env (Chitra et al., 2010; Yusoff et al., 2002). Notons enfin que la MAPK p38, qui a un effet inhibiteur sur l'activation de ERK 1/2 par MEK 1/2, est activée par Env JSRV. Les mécanismes associés sont encore inconnus (Maeda et al., 2005), mais l'utilisation d'un inhibiteur de p38, SB203580, augmente le pouvoir transformant de l'Env JSRV.

3.4.2.3 Interaction de l'Env JSRV avec son récepteur HYAL-2

Un troisième mécanisme expliquant la transformation médiée par l'Env JSRV implique une transduction de signaux à partir du récepteur du virus, HYAL-2 et a été mis en évidence sur les cellules humaines BEAS-2B de l'épithélium de bronche. Dans ces cellules, HYAL-2 est complexé à RON, un récepteur tyrosine kinase, ce qui empêche l'activation de ce dernier. L'expression de l'Env JSRV entraîne la « séquestration » de HYAL-2 ce qui libère RON et mène à son activation (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003). Cependant, l'interaction HYAL-2-RON ne peut expliquer la transformation de tous les modèles cellulaires évoqués plus haut. En effet, ce mécanisme requiert la liaison de l'Env à son récepteur, ce qui ne se produit pas dans les cellules de rongeurs (S. L. Liu et al., 2003).

3.4.2.4 Autres voies de signalisation impliquées

En plus de ces trois mécanismes principaux, d'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la transformation via l'Env JSRV. La liaison de l'Env JSRV au TLR4 a été démontrée (Hofacre and Fan, 2004) et pourrait aboutir à l'activation du facteur de transcription NFkappaB. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique (PP2) de c-Src indique que cette tyrosine kinase pourrait également jouer un rôle (Hull and Fan, 2006).

3.4.3 Pertinence des modèles cellulaires pour l'étude de la transformation médiée par l'Env JSRV

La plupart des études sur le pouvoir transformant de l'Env JSRV menées *in vitro* ont été réalisées avec des modèles de fibroblastes ou des cellules épithéliales cultivées en monocouche alors que les cibles de JSRV *in vivo*, les pneumocytes de type II, sont des cellules polarisées. Pour s'approcher des conditions physiologiques, l'équipe de Fan a mis en place un système de culture 3D de cellules MDCK qui, lorsqu'elles poussent dans une matrice semi-solide de matrigel, forment des sphères de cellules polarisées (Johnson et al., 2010). Dans ce modèle, l'expression de l'Env JSRV induit un certain nombre de modifications morphologiques et phénotypiques comme la perturbation de la structure des acini et la prolifération accrue des cellules. La voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR est à nouveau importante pour les effets transformants de l'Env dans ces cellules, même si les mécanismes d'action diffèrent de ceux décrits dans les systèmes 2D. En effet, alors que la transduction du signal passe par la PI3K dans les conditions de culture classiques, elle en est majoritairement indépendante lorsque les mêmes cellules poussent en 3D. De façon surprenante, la voie H/N-Ras-MEK-MAPK a un effet inhibiteur sur la transformation des cellules MDCK cultivées en 3D alors que lorsque les mêmes cellules sont en monocouche, l'inhibition de MEK 1/2 induit une réversion du phénotype transformé. Cherchant à se rapprocher encore davantage des conditions *in vivo*, l'équipe de Fan a mis en place un autre système de culture 3D à partir de la lignée JS7 de pneumocytes de type II de mouton dérivés d'un OPA (Johnson and Fan, 2011). Dans les conditions classiques de culture 2D, ces cellules perdent leurs propriétés structurale et fonctionnelle ainsi que l'expression de JSRV. En revanche, le passage à la culture permet de faire rebasculer les cellules dans l'état proche de la différentiation observée dans les alvéoles du poumon *in vivo* : les cellules se polarisent, forment de petites sphères et ré-expriment les protéines du surfactant caractéristiques des pneumocytes de type II différenciés. Enfin, les cellules JS7 cultivées en 3D se remettent à exprimer le virus JSRV. Cette étude renforce l'idée de l'importance de l'environnement et des conditions de culture sur les propriétés cellulaires et la transformation induite par JSRV.

3.4.4 Les domaines de l'enveloppe JSRV impliqués dans la transformation cellulaire

3.4.4.1 Importance de la queue cytoplasmique

Comme illustré dans le paragraphe précédent, les mécanismes de la transformation médiée par l'Env JSRV diffèrent d'une lignée cellulaire à l'autre. Un point de convergence existe cependant : la queue cytoplasmique de l'enveloppe est essentielle dans la tumorigenèse (pour revue voir (Hofacre and Fan, 2010)). En particulier, le motif YXXM présent et conservé dans le domaine cytoplasmique de toutes les souches transformantes de JSRV et ENTV, est absent des copies endogènes, non transformantes, de JSRV (Palmarini et al., 2000) (Fig. 25D). Un modèle permet d'expliquer l'activation de la transduction du signal : la PI3K se fixe au niveau de la tyrosine phosphorylée du motif YXXM ce qui aboutit à la phosphorylation de Akt et l'activation de différentes cibles. De fait, la substitution du résidu tyrosine en une phénylalanine ou un acide aspartique ou la mutation de la méthionine abolissent complètement la transformation dans les cellules NIH3T3 et partiellement dans d'autres lignées (Hofacre and Fan, 2004; Palmarini et al., 2001b). Cependant, la phosphorylation de la tyrosine n'a jamais pu être détectée dans les cellules transformées par l'Env JSRV (S. L. Liu et al., 2003). Sans remettre en question l'importance de la voie PI3K/Akt, ces résultats suggèrent que la PI3K n'est probablement pas activée par la liaison au motif YXXM, ce qui est confirmé par des expériences d'immunoprécipitation qui ne montrent aucune interaction directe entre l'Env et la kinase (Liu and Miller, 2007; Maeda and Fan, 2008).

3.4.4.2 Rôle de la SU

Plusieurs groupes ont étudié le rôle de la sous-unité SU dans la transformation avec des résultats parfois contradictoires (Fig. 25C). Dans une étude, Chow et coll. (Chow et al., 2003) ont remplacé le domaine de liaison au récepteur ainsi que la région riche en proline de la SU JSRV par les domaines équivalents de l'enveloppe du virus Moloney et n'ont noté aucune modification sur la capacité de transformation des cellules 208F. Cependant, le groupe de Fan (Hofacre and Fan, 2004) montre que des délétions ou insertions dans la sous-unité SU se révèlent critiques pour la transformation par l'Env JSRV dans les lignées NIH3T3 et 208F. Des chimères ont également été réalisées entre Env endogène et exogène de JSRV, et bien que conservant leurs propriétés infectieuses, elles perdent pour certaines, leur capacité à transformer les cellules. C'est le cas par exemple d'une Env chimère présentant la queue cytoplasmique de la version exogène et la SU d'une séquence endogène (non transformante)

qui est alors incapable de transformer les cellules NIH3T3. Le remplacement de certains acides aminés dans la SU exogène, par leur équivalent de la SU endogène réduit également l'efficacité de transformation dans des fibroblastes de rongeurs. De façon intéressante, la co-transfection de deux mutants non transformants individuellement, l'un étant défectif pour la sous unité SU, l'autre pour la TM, induit un phénotype transformé dans les cellules 208F (Hofacre and Fan, 2004), ce qui montre une synergie entre deux domaines de l'Env qui fonctionnent indépendamment. Enfin, l'importance de la SU dans la transformation induite par Env JSRV est évidente dans le mécanisme impliquant son récepteur HYAL-2 et la kinase RON dans les cellules humaines de l'épithélium bronchique.

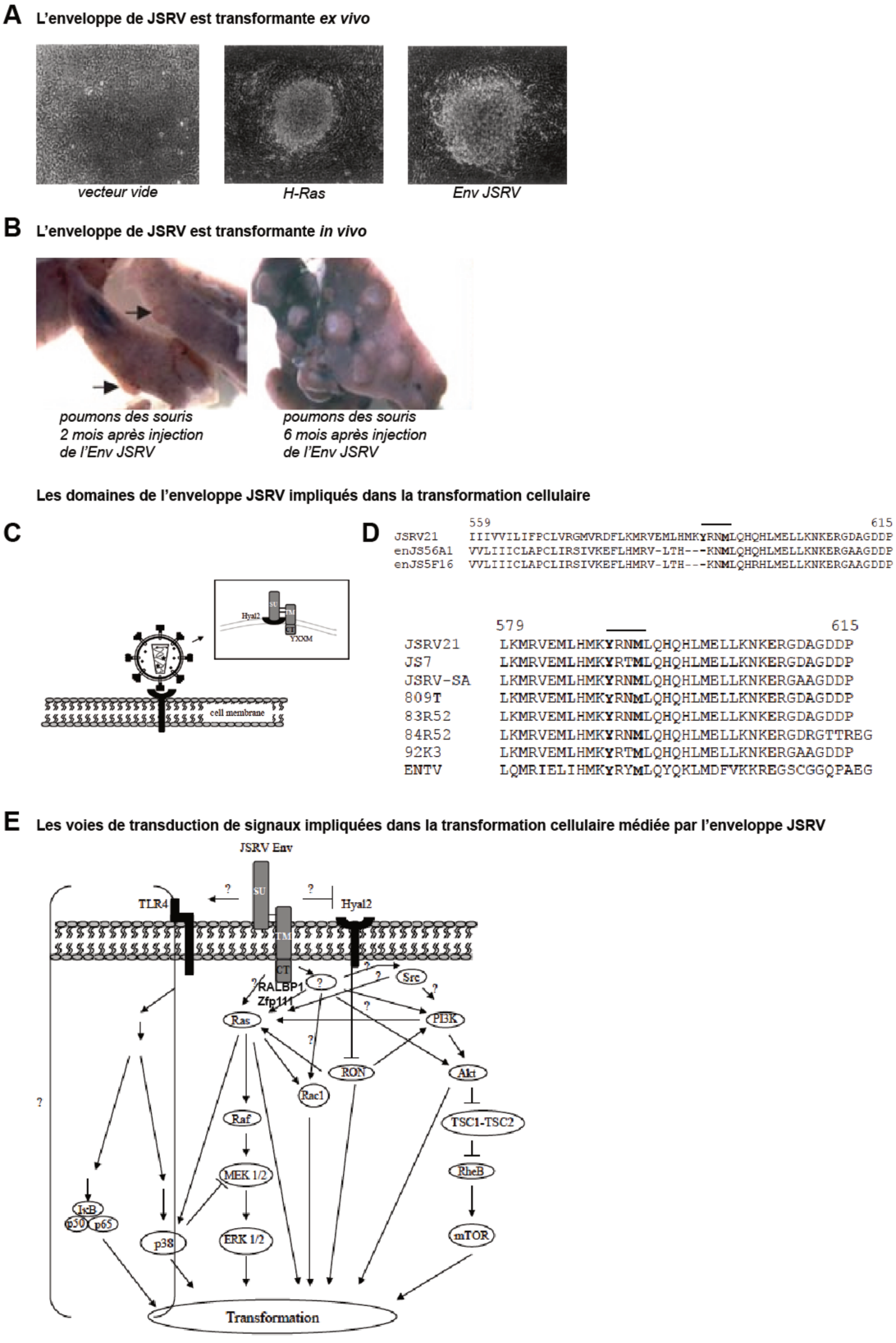


Figure 25. Activité oncogénique de l'enveloppe infectieuse JSRV

(A) Test de transformation des cellules épithéliales de rat RK3E réalisé avec un plasmide vide, l'oncogène caractérisé H-Ras et l'enveloppe infectieuse de JSRV. Les photos illustrent l'aspect des cellules 14 jours après la transfection par les différentes constructions indiquées. Dans les conditions « H-Ras » et « Env JSRV », la photo prise à fort grossissement fait apparaître un foyer de cellules transformées. (B) L'enveloppe JSRV est injectée directement dans les poumons de souris via un vecteur AAV. Les photos représentent les poumons de ces souris

2 et 6 mois après injection. (C) et (D) Différents domaines de l'enveloppe JSRV impliqués dans la transformation cellulaire. En (C), représentation schématique de l'Env JSRV à la membrane plasmique et de son interaction avec le récepteur cellulaire HYAL2. En (D, en haut), alignement des séquences en acides aminés des régions TM du virus JSRV exogène (JSRV-21) avec deux souches endogènes (enJS56A1 et enJS5F16). Le tiret (-) indique l'absence d'un acide aminé. Les acides aminés du motif putatif de liaison de la PI3K sont en gras. (D, en bas), alignement des séquences en acides aminés de la queue cytoplasmique de différentes souches de JSRV exogènes illustrant la conservation du motif YRNM, important pour la pathogenèse *in vivo*. (E) Voies de transduction de signaux impliquées dans la transformation cellulaire médiée par Env JSRV. En fonction de la lignée cellulaire étudiée, trois voies de signalisation principales sont activées dans les cellules transformées par l'Env JSRV : la voie PI3K/AKT, la voie HYAL2-Ron et la voie Ras-MEK-ERK. Les voies de signalisation mettant en jeu TLR4-NFkB ou Rac sont également représentées. Les partenaires directs de l'Env JSRV ne sont pas encore tous connus. Deux d'entres eux (RALBP1 et Zfp111), récemment identifiés, sont indiqués sur le schéma. Leur mécanisme d'action n'est pas encore complètement découvert. D'après (Hofacre and Fan, 2010; Maeda et al., 2005; Wootton et al., 2005).

3.4.5 Les cibles précoces de l'enveloppe JSRV

Plusieurs voies de signalisation sont activées par l'Env JSRV et ont été caractérisées dans différents modèles cellulaires. Peu de données existent cependant concernant la manière dont l'enveloppe oncogénique active ces différentes voies. Récemment, notamment grâce à des approches de double hybride, 2 partenaires de l'Env JSRV ont été identifiés.

- La protéine à doigt de zinc Zfp111 tout d'abord (Hsu et al., 2015a), dont l'interaction avec l'Env a été confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation. Le rôle de cette protéine semble crucial, au moins dans les cellules 208F, où son extinction réduit la transformation cellulaire induite par l'enveloppe et sa surexpression augmente le phénomène. De plus, la protéine Zfp111 se lie préférentiellement à une forme très particulière de l'Env : de plus faible poids moléculaire que la protéine standard, localisée, de façon peu commune pour une enveloppe, dans le noyau, et présentant un profil de glycosylation particulier (Hsu et al., 2015a).
- La protéine RALBP1 ensuite (RalA binding protein 1, connue également sous le nom de RLIP76 ou RIP), impliquée dans la voie de signalisation de Ras et décrite comme un effecteur de RalA (Ras-like protein A) (revue dans (Kashatus, 2013)). L'interaction de RALBP1 avec l'Env a été confirmée par co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères et des siRNA spécifiques de ce nouveau partenaire ont révélé son implication dans la transformation cellulaire (Monot et al., 2015).

3.5 Expression de protéines d'HERV dans les cancers et potentiel thérapeutique

Bien que le rôle causal des HERV dans le développement des cancers n'ait pas été complètement démontré, ces éléments endogènes peuvent, dans certains cas, être utilisés comme biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques et même comme agent

immunothérapeutique. Lors de la transformation cellulaire, le paysage épigénétique des cellules se trouve complètement modifié (Szpakowski et al., 2009). En conséquence, l'inhibition transcriptionnelle exercée sur les rétrovirus endogènes est partiellement levée et de nombreux épitopes, dérivés de ces éléments sont détectés dans les cancers (revue dans (Kassiotis and Stoye, 2016)). Les épitopes dérivés de rétrovirus endogènes font partie de l'ensemble des antigènes associés au cancer des testicules (TCA pour Testis Cancer antigens) qui représentent un groupe de protéines partagées par un grand nombre de tumeurs mais non exprimées dans les tissus sains à l'exception des cellules germinales et des testicules (Schmitz-Winnenthal et al., 2007).

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, plusieurs groupes ont démontré la présence d'anticorps circulants anti-HERV-K(HML2) chez certains patients atteints de cancer et ont corrélé cette réponse humorale aux manifestations cliniques ainsi qu'à la réponse thérapeutique. D'autre part, des peptides codés par les HERV et exprimés par les cellules tumorales sont également la cible de réponses T. L'exemple princeps vient de l'étude de deux patients atteints de mélanome chez lesquels un peptide de HERV-K(HML6), HLA-A2 restreint (appelé HERV-K MEL), est reconnu par des lymphocytes T cytotoxiques autologues (Schiavetti et al., 2002). Ce peptide est codé par une petite ORF présente au sein d'un provirus HML6 hautement défectif par ailleurs. Les ARN HERV-K MEL ne sont pas exprimés dans les tissus sains (sauf dans les testicules et dans certains échantillons de peau), mais s'accumulent dans la majorité des mélanomes cutanés et oculaires. Dans le cas du cancer du sein, des réponses T contre HERV-K(HML2) ont été détectées dans les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) de patients stimulés par des cellules dendritiques autologues exprimant la sous-unité SU de l'enveloppe du rétrovirus endogène (Wang-Johanning et al., 2008). Dans cet exemple, la stimulation et l'activation des lymphocytes T est complète, comme en témoignent l'induction de leur prolifération, la production accrue d'IFNγ, la sécrétion de cytokines de type T-helper 1 (e.g. IL2, IL6, IL8, IL10) et la détection de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de Env HERV-K(HML2) capables de lyser les cibles tumorales présentant l'épitope (Wang-Johanning et al., 2008). Ces exemples renforcent l'idée que certaines protéines de rétrovirus endogènes sont des marqueurs tumoraux ou TAA (tumor associated antigen) et suggèrent que les épitopes dérivés de rétrovirus endogènes constituent des cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers. Dans un modèle murin allogénique de tumeur du sein, l'injection en intraveineuse d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'enveloppe HERV-K induit une diminution significative de la masse tumorale (Wang-Johanning et al., 2012). Bien que cette étude soit réalisée chez la

souris, il s'agit d'une preuve de concept du potentiel immunothérapeutique d'anticorps dirigés contre une protéine rétrovirale endogène. Un groupe a d'ailleurs testé un candidat vaccin pour son efficacité à éliminer, en condition homologue, des cellules exprimant HERV-K(HML2) *in vivo*. Ce vaccin, basé sur une souche recombinante atténuée du virus de la vaccine exprimant l'antigène Gag HERV-K(HML2) a été testé dans un modèle de souris syngéniques qui développent des nodules exprimant la protéine Gag HERV-K. Ce candidat vaccin présente un potentiel thérapeutique intéressant : il induit le ralentissement de la croissance de tumeurs sous-cutanées et permet la réduction du nombre de métastases pulmonaires (Kraus et al., 2014). Enfin, deux études très récentes réalisées par le même groupe rapportent la mise au point de lymphocytes T transgéniques exprimant un récepteur chimérique de l'antigène spécifique de l'enveloppe HERV-K à leur surface. On parle de cellules CAR-T (CAR : chimeric antigen receptor), pour cellules T porteuses d'un récepteur chimérique. Ces cellules sont des lymphocytes T dérivés de PBMC du patient et modifiés *ex vivo* pour leur faire exprimer un récepteur chimérique. Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extracellulaire reconnaisse l'antigène tumoral le plus spécifiquement possible afin d'éviter les effets néfastes sur d'autres organes du patient. La partie intra-cellulaire se charge de l'activation des lymphocytes après fixation sur les cellules tumorales. Dans le cas du mélanome, les cellules CAR-T spécifiques de Env HERV-K(HML2) montrent des résultats prometteurs : *in vitro*, elles sont capables de lyser des cellules tumorales exprimant l'enveloppe HERV-K à leur surface ; *in vivo*, elles induisent une régression de la masse tumorale dans un modèle de mélanome métastatique chez la souris (Krishnamurthy et al., 2015). De la même façon, les auteurs démontrent l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de CAR-T spécifiques de Env HERV-K(HML2) générés à partir de PBMC de patients atteints de cancer du sein (Zhou et al., 2015). En particulier, diverses cytokines (e.g. IFNγ, TNF-α, IL-2) s'accumulent lorsque les cellules de cancers du sein sont co-cultivées avec les CAR-T Env HERV-K(HML2). La croissance tumorale ainsi que la métastase vers d'autres organes sont également réduites lorsque ces cellules CAR-T sont injectées dans des modèles de greffes de cellules de cancer du sein chez la souris immunodéficiente (Zhou et al., 2015).

Des corrélations fortes existent entre les HERV, en particulier la famille HERV-K(HML2), et le développement de certains cancers. Le modèle de l'enveloppe JSRV, très proche de celle de HERV-K(HML2) suggère que cette dernière pourrait également jouer un rôle causal. D'autres associations entre HERV et pathologies existent même si elles sont pour l'instant moins documentées.

4. Expression des HERV et autres pathologies

4.1 HERV et maladies auto-immunes

4.1.1 Expression des HERV en contexte auto-immun

On parle d'auto-immunité lorsque la composante adaptative du système immunitaire (i.e. lymphocytes B/anticorps et lymphocytes T) s'attaque au soi. Il peut en résulter une inflammation chronique qui entraîne la destruction de tissus et d'organes. Ces lésions sont généralement la conséquence de l'attaque directe de cellules porteuses d'antigènes du soi, de la formation de complexes immuns ou d'une réaction inflammatoire locale. Les désordres auto-immuns sont souvent multifactoriels, impliquant des facteurs héréditaires (notamment pour les gènes HLA), le genre, l'âge, des facteurs environnementaux et hormonaux, si bien qu'il est dans la plupart des cas très difficile d'en comprendre les causes et de traiter efficacement les patients. La présence d'éléments endogènes détectés par PCR dans les échantillons de patients, ou d'anticorps dirigés contre certains de ces éléments dans les sera ont conduit à considérer les HERV comme des agents potentiellement impliqués dans les maladies auto-immunes (revue dans (Löwer, 1999)). Les investigations ont surtout été menées chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (AR), de sclérose en plaque (SEP), du syndrôme de Sjögren (SS), de lupus érythémateux disséminé (LED) et de diabète sucré insulino-dépendant (IDDM). Plusieurs HERV sont souvent liés à chacune des pathologies citées. La complexité de la situation peut être illustrée par le LED. Les éléments endogènes HRES-1 (HTLV related endogenous sequence), ERV-3, HERV-E 4-1, HERV-K 10, HERV-K18 ont été corrélés positivement à la progression de la maladie (Nelson et al., 2014), bien qu'une étude montre la diminution de l'expression de la plupart des HERV sus-cités dans des monocytes purifiés de patients SLE (Shi et al., 2014). D'autres exemples sont décrits dans la littérature : chez les patients AR, une augmentation significative d'Ig spécifiques de la protéine Gag de HERV-K 10 a été observée. Des anticorps dirigés contre la syncytine 1 (HERV-W Env) ont également été détectés chez des patients SEP (Mameli et al., 2015).

4.1.2 Différents mécanismes possibles

En général, les phénomènes de tolérances centrale et périphérique, permettent d'éliminer les clones B et T autoréactifs. Dans le cas de l'autoimmunité, on observe une rupture de cette tolérance et différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'implication des HERV : (i) Le mimétisme moléculaire, bien décrit dans le cas de bactéries et virus infectieux, selon

lequel des épitopes d'HERV pourraient déclencher une réaction immunitaire croisée contre des antigènes du soi, de structure et conformation similaires ; (ii) la ré-expression éventuelle, à l'âge adulte, de copies d'HERV jusqu'alors « silencieuses », des événements de recombinaison entre séquences HERV et /ou l'existence d'un polymorphisme, qui pourraient conduire à l'émergence de néo-antigènes et expliquer la rupture de tolérance; (iii) la dérégulation de l'expression de gènes cellulaires par les ERV qui pourrait indirectement être une source d'auto antigènes ; (iv) l'action de protéines d'HERV en tant que superantigène (SAg). Ces protéines établissent une interaction forcée entre la cellule présentatrice d'antigène et les lymphocytes T et provoquent ainsi une stimulation polyclonale des cellules T, indépendamment de leur spécificité pour l'antigène présenté. Ceci s'accompagne d'une production d'anticorps (ici, potentiellement des auto-anticorps) et de cytokines pro-inflammatoires. Le provirus HERV-K18 code un SAg et est associé à l'IDDM (revue dans (Balada et al., 2010)) ainsi qu'à l'Arthrite Idiopathique Juvénile (Sicat et al., 2005) ce qui suggère que l'activité superantigène pourrait jouer un rôle dans le développement de ces pathologies.

La littérature apporte de nombreux exemples de corrélations entre HERV et désordres auto-immuns, mais aucun argument ne permet de dire que les éléments endogènes sont à l'origine de ces pathologies. Il est possible en effet que toutes ces associations soient le fait d'une rupture générale de la tolérance immunitaire. Pour finir, bien que les HERV aient été plutôt décrits comme des immunoactivateurs dans les exemples cités ci-dessus, Magiorkinis et coll, proposent que certains, via les propriétés immunosuppressives de leur enveloppe pourraient avoir un rôle globalement « protecteur » dans le cas de dérégulation autoimmunes (revue dans (Magiorkinis et al., 2013)).

4.2 HERV et maladies neurologiques

L'expression de protéines d'HERV a également été associée à des pathologies neurologiques et neuropsychiatriques aussi diverses que la sclérose en plaque (SEP), la maladie de Charcot ou ALS (pour amyotrophic lateral sclerosis), la schizophrénie ou les troubles bipolaires. A l'heure actuelle les HERV sont au mieux considérés comme de bons biomarqueurs de ces maladies (revue dans (Christensen, 2016)) mais leur rôle est débattu : aucun lien de causalité n'a encore été démontré et les conséquences moléculaires et cellulaires de l'expression de ces éléments endogènes sont à l'heure actuelle peu comprises.

4.2.1 Exemple de la sclérose en plaque (SEP ou MS)

La SEP (MS en anglais pour multiple sclerosis) est une maladie du système nerveux central à l'étiologie encore mal connue dans laquelle la myéline, gaine d'isolation des cellules du cerveau et de la moelle épinière, est endommagée. Des études épidémiologiques suggèrent l'intervention de facteurs génétiques et environnementaux, comme les infections virales. Deux familles d'HERV sont spécifiquement associées à la SEP, HERV-H/F et HERV-W/MSRV (pour MS-associated retrovirus) et constituent à la fois des facteurs de risque et d'aggravation de la maladie. Initialement, des éléments MSRV ont été détectés sous la forme de VLP présentant une activité RT et un génome ARN, dans des cultures de lymphocytes de patients atteints de SEP (Perron et al., 1997). De tels éléments sont retrouvés dans les sera de la plupart des patients SEP et chez quelques contrôles sains (Garson et al., 1998). Plusieurs études menées en Sardaigne (Serra et al., 2001; Sotgiu et al., 2002) ont fait émerger l'association particulièrement forte entre SEP et MSRV dans cette région où la présence d'ARN de MSRV dans le fluide cérébrospinal semble constituer un marqueur pronostic de la sévérité de la maladie (Sotgiu et al., 2002). Les loci responsables de la production de ces particules virales ne sont pas clairement identifiés (localisations possibles sur les chromosomes 3q23, Xq22.3, 15q21.3 ou bien recombinaison entre plusieurs loci sur les chromosomes 3p12.3 et 18q21.32, Xq22.3 et 5p12). Un autre locus distinct, appartenant également à la famille HERV-W est associé à la SEP. Il est situé sur le chromosome 7q21.22. L'élément correspondant présente des mutations inactivatrices dans les gènes gag et pol mais produit une protéine d'enveloppe fonctionnelle, la syncytine-1, dont nous avons vu l'importance par ailleurs pour la formation du placenta humain. Cet élément est très proche de MSRV, mais en générant des amorces de PCR spécifiques de la syncytine 1 et de l'Env de MSRV, Antony et coll (Antony et al., 2007) ont révélé que seule l'expression des ARN syncytine 1 était augmentée chez les patients SEP (autrement dit, pas d'accumulation spécifique des ARN env MSRV chez ces patients). Une étude récente rend le tableau encore plus complexe en montrant la grande hétérogénéité transcriptionnelle de la famille HERV-W dans les cerveaux de patients SEP : plus de 100 loci HERV-W exprimés ont été identifiés, avec 7 loci responsables de la majorité des transcrits (dont les loci précédemment cités, i.e. Xq22.3, 15q21.3, syncytin-1, 7q21.22) (Schmitt et al., 2013). Des données provenant d'études indépendantes ont démontré la présence systématique de protéines d'enveloppe associées aux éléments HERV-W/MSRV au niveau de macrophages et de cellules de la microglie infiltrant les lésions caractéristiques de cerveaux de patients SEP (Antony et al., 2004; Perron et al.,

2012). Plusieurs études ont par ailleurs montré *ex vivo* que les éléments de la famille HERV-W ont des effets pathogènes importants. En particulier, l'expression de la syncytine 1 dans des astrocytes induit le relargage de cytokines pro-inflammatoires et d'éléments redox qui sont cytotoxiques pour les oligodendrocytes (Antony et al., 2004). Env HERV-W/MSRV est également détectée dans des cerveaux de patients SEP au niveau de la microglie et des macrophages périvasculaires et cause l'induction de réponses pro-inflammatoires dans les macrophages humains à travers l'activation de la voie reliée au TLR4 (Perron et al., 2013). Dans cette même étude, les auteurs constatent que l'injection de la syncytine 1 (entière ou sous-unité SU uniquement) à des souris induit le développement d'une neuroinflammation caractéristique de la SEP (Perron et al., 2013).

4.2.2 Exemple de la schizophrénie (SCZ)

L'étiologie de la schizophrénie est mal comprise et repose sur l'interaction de facteurs environnementaux et génétiques. Les familles HERV-W et HERV-K(HML2) ont été associées à la maladie principalement via la détection de transcrits spécifiques dans le fluide cérébrospinal (plutôt au moment de l'apparition de crises chez le patient) ou dans des cerveaux analysés post mortem (Karlsson et al., 2001). Deux études (Huang et al., 2011; Perron et al., 2008), réalisées sur des échantillons de plasma ont montré une accumulation de transcrits HERV-W chez 36% des patients SCZ, ainsi que la présence de protéines Gag et Env de HERV-W chez 47-49% de patients SCZ (fréquence de seulement 3-4% chez les contrôles sains). Une nuance est apportée par les données de Frank et coll. (Frank et al., 2005) qui ne confirment pas la prévalence de transcrits HERV-W chez les patients SCZ. Ces contradictions peuvent en partie s'expliquer par des différences dans les protocoles des études considérées (variations dans le nombre d'échantillons étudiés, différences dans les séquences des oligos utilisés pour la détection des transcrits, influence du traitement éventuel du patient sur l'expression des HERV) et invitent à une grande prudence quant à l'association des HERV et ce type de pathologies.

4.2.3 Exemple de la maladie de Charcot (ou ALS)

L'ALS est une maladie neurodégénérative fatale qui se caractérise par la perte progressive des moto-neurones supérieurs et inférieurs. Les causes de l'ALS sont encore mal comprises, mais une possible implication virale a été proposée, sachant que certains rétrovirus, comme HIV-1

causent des symptômes neurodégénératifs voisins. Plusieurs études ont démontré l'existence d'une activité RT dans les sera de 50-60% atteints d'ALS, absente de la quasi totalité des contrôles sains testés (Andrews et al., 2000; McCormick et al., 2008). Indépendamment, des éléments de la famille HERV-W ont été détectés dans des biopsies de muscles de patients ALS ainsi que des éléments de la famille HERV-K(HML2) dans des échantillons post-portem de cerveaux de patients ALS (Li et al., 2015). Dans cette dernière étude, les auteurs ont identifié l'expression d'ARN gag, pol et env de HERV-K(HML2) dans les neurones corticaux et spinaux de patients et ont étudié les effets cytopathiques des protéines associées. *Ex vivo*, il apparaît que la transfection dans des neurones en culture, du génome entier de HERV-K(HML2) ou de l'enveloppe seule, induit une diminution du nombre de neurones et une rétraction des neurites, ce qui suggère que la glycoprotéine endogène contribue à la neurotoxicité. *In vivo*, chez des souris transgéniques exprimant le gène d'enveloppe HERV-K(HML2), des changements morphologiques similaires au niveau des neurones sont notés ainsi qu'une perturbation de la fonction nucléolaire. L'expression de la glycoprotéine d'enveloppe a également des conséquences sur le comportement des animaux qui développent progressivement des troubles moteurs (Li et al., 2015).

4.3 HERV et maladies infectieuses

La possible interaction de rétrovirus entre eux, en particulier de certains HERV avec HIV-1 a été mise en évidence par différents groupes ces 20 dernières années et est un sujet de débat. Plusieurs études ont démontré la présence d'ARN de HERV-K(HML2) dans le plasma de patients séropositifs (Contreras-Galindo et al., 2007, 2006; Laderoute et al., 2007) et même parfois de protéines ou de VLP de cette famille rétrovirale endogène (Contreras-Galindo et al., 2012). Des cellules infectées *in vitro* par HIV-1 présentent une accumulation d'ARN de HERV-K(HML2) (Contreras-Galindo et al., 2007; Gonzalez-Hernandez et al., 2012) et la même observation est faite pour des cellules de patients séropositifs (Ormsby et al., 2012). Ces différentes données sont cependant nuancées par d'autres études. Par exemple, le groupe de Coffin ne détecte ni accumulation d'ARN, ni présence de VLP associés à HERV-K(HML2) dans le plasma de patients séropositifs mais remarque par contre une augmentation significative d'ARN HML2 dans les PBMC de patients infectés par le lentivirus. Le niveau d'expression de HERV-K(HML2) ne semble cependant pas corrélé au traitement antirétroviral suivi par le malade ou à la quantité d'ARN plasmatique ou cellulaire de HIV-1, autrement dit à l'efficacité réplicative de ce dernier (Bhardwaj et al., 2014). Sur un plan

moléculaire, des études réalisées *in vitro* ont démontré l'activation des promoteurs LTR de HML2 par la protéine accessoire Tat du virus HIV-1 (Gonzalez-Hernandez et al., 2014, 2012). Les protéines Gag de HML2 peuvent également être co-assemblées avec celles du virus HIV-1 pour former une particule « chimère » qui est relarguée moins efficacement que les virions HIV-1 sauvages et est également moins infectieuse (Monde et al., 2012). Dans ce cas, l'expression de HML2 aurait un rôle protecteur contre une infection rétrovirale exogène même si la pertinence de ce phénomène *in vivo* n'a pas été démontrée (Monde et al., 2012). Comme dans certains exemples de cancers décrits précédemment, des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de HERV-K(HML2) sont détectés chez les patients HIV-1 (Garrison et al., 2007) et offrent de potentielles approches thérapeutiques.

Les virus herpes semblent également capables d'activer l'expression de certains HERV. Par exemple, l'infection de cellules B par le gamma herpesvirus EBV (Epstein-Barr virus) induit l'expression de l'enveloppe du rétrovirus endogène HERV-K18 qui possède une activité superantigène et mène donc à l'activation polyclonale de cellules T (Sutkowski et al., 2001, 1996). Un autre herpesvirus, HHV-6A, neurotrope et associé à la sclérose en plaque, a été identifié comme transactivateur de ce même superantigène (Tai et al., 2009; Turcanova et al., 2009).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'introduction qui précède a permis de situer la famille HERV-K(HML2) dans le contexte général des rétrovirus endogènes et infectieux. Plusieurs éléments marquants de la bibliographie ont constitué le point de départ de ce travail de thèse. Tout d'abord, nous avons évoqué le fait que le génome humain portait de nombreuses traces de l'amplification très récente de la famille HERV-K(HML2). Cette dynamique, en particulier la possibilité de l'existence d'un élément encore réplicatif dans nos génomes, suggère que ces éléments ne sont pas neutres pour l'hôte et pourraient contribuer au développement de certaines pathologies. A cet égard, de nombreuses associations entre HERV-K(HML2) et les cancers ont été rapportées ces dernières années sans que l'on sache déterminer précisément si le rétrovirus endogène joue un rôle causal. A mon arrivée au laboratoire, le provirus infectieux Phoenix, progéniteur putatif des HERV-K(HML2) spécifiquement humains, avait été généré et certaines de ses propriétés particulières mises en évidence. La recherche et la caractérisation systématiques des enveloppes endogènes de la famille dans le génome humain avaient également été entreprises et avaient notamment révélé l'existence d'un allèle encore fonctionnel et infectieux.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était de caractériser plus en détails le rétrovirus endogène humain fonctionnel HERV-K(HML2) d'un point de vue moléculaire et cellulaire afin de mieux comprendre son implication dans certaines pathologies, notamment les cancers.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'interaction du provirus Phoenix avec les facteurs de restriction cellulaires, en particulier la Tetherin. Nous avons cherché la présence d'un antagoniste dans le génome du rétrovirus, qui pourrait expliquer le succès tout à fait particulier de la dernière vague d'amplification de la famille HML2 dans les génomes.

Nous avons ensuite voulu mieux comprendre le rôle de HERV-K(HML2) dans le développement et l'agressivité de certaines tumeurs, en particulier le mélanome et le cancer du sein. Etant donnée la grande proximité avec le rétrovirus infectieux JSRV, nous nous sommes demandés si, comme c'est le cas pour le virus ovin, la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-K(HML2) pouvait jouer un rôle causal dans la tumorigenèse.

RÉSULTATS

CHAPITRE 1 : La protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) et ses propriétés d'antagoniste d'un facteur de restriction cellulaire

1. Résumé de l'article 1

La famille de provirus HERV-K(HML2), entrée il y a très longtemps dans les génomes primates, s'est amplifiée récemment, et ce malgré l'existence de nombreuses protéines cellulaires, appelées facteurs de restriction, qui s'opposent à la réplication du virus dans la cellule hôte. Nous avons fait l'hypothèse que le succès d'amplification de la famille pouvait être associé à une capacité de résistance aux facteurs de restriction « modernes ». La Tetherin, l'un d'entre eux, est une protéine membranaire capable de bloquer le relargage des virions dans le milieu extracellulaire et est active sur la plupart des virus enveloppés testés jusqu'à présent, en particulier HERV-K(HML2). Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si l'une des protéines codées par HERV-K(HML2) présentait une activité anti-Tetherin comme c'est le cas pour la plupart des virus ciblés par le facteur de restriction (revue dans (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016)).

Pour tester la présence d'un antagoniste de la Tetherin dans le génome de HERV-K(HML2), nous avons dans un premier temps utilisé deux plasmides qui codent l'ensemble des protéines du virus sous contrôle du promoteur CMV : d'une part, un vecteur d'expression du provirus consensus Phoenix délété de la glycoprotéine d'enveloppe (Env), mais conservant la capacité d'exprimer la protéine accessoire Rec, et d'autre part, un plasmide codant la protéine Env-Rec de Phoenix. Ces deux constructions ont été testées dans un système hétérologue afin de déterminer leur capacité à restaurer le relargage de VLP HIV-1 produite en présence de Tetherin. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées par : (i) les protéines structurales de HIV-1 (Gag, Pol, Tat, Rev, mais pas Vpu), (ii) la glycoprotéine d'Env du virus VSV, (iii) des doses croissantes de Tetherin humaine, et (iv) les antagonistes candidats. Le relargage de particules HIV-1 a été mesuré deux jours après la transfection par immunodétection de la protéine p24 de Gag HIV-1 dans les surnageants de culture. En présence du provirus HERV-K(HML2) défectif pour la protéine d'enveloppe ou d'un vecteur contrôle, la quantité de protéine p24 dans les surnageants diminue en même temps que la dose de Tetherin augmente, ce qui illustre l'action du facteur de restriction en l'absence d'antagoniste. Par contre, lorsque la protéine Env-Rec de HERV-K(HML2) est co-exprimée, la quantité de p24 reste constante quelle que soit la dose de Tetherin, ce qui suggère que la protéine Env-Rec joue le rôle d'antagoniste. Des observations au microscope électronique des

cellules dans les différentes conditions évoquées ont permis d'illustrer ces premières conclusions. Afin de caractériser plus en détails l'activité anti-Tetherin de HERV-K(HML2) Env-Rec nous avons ensuite étudié sa capacité à agir sur ses propres particules, i.e. dans un système homologue, ce que nous avons pu confirmer.

Nous avons ensuite mis en place un système expérimental plus quantitatif afin notamment de comparer l'effet du nouvel antagoniste avec celui de protéines aux effets anti-Tetherin déjà caractérisés. Pour cela, des cellules 293T ont été transfectées afin de produire des particules virales HIV-1, contenant un gène rapporteur gfp, en présence de dose croissante de Tetherin et de différents antagonistes viraux. Le relargage de virions infectieux dans les surnageants de culture a ensuite été quantifié indirectement en mesurant, par FACS, les titres viraux associés à l'infection de cellules cibles. Les données précédentes ont été confirmées et il est apparu que l'activité anti-Tetherin de Env-Rec était comparable en efficacité à celle de l'Env-HIV-2 mais par contre bien plus faible que celle de Vpu, confirmant des données de la littérature.

Par la suite, nous avons inclus dans le test les six allèles endogènes humains de HERV-K(HML2) Env-Rec caractérisés au laboratoire et montré que deux enveloppes, K108 et K109, ont conservé une activité anti-Tetherin. En terme de propriétés virologiques classiques, elles correspondent aux deux protéines les plus fonctionnelles, K108 étant par exemple capable de pseudotyper des particules virales. Ceci suggère que l'activité d'antagoniste de Env-Rec est liée à ses propriétés d'enveloppe infectieuse *bona fide*.

Afin d'avancer dans la caractérisation du nouvel antagoniste Env-Rec, nous avons ensuite cherché à identifier les domaines de la protéine effecteurs de l'activité anti-Tetherin par le test quantitatif décrit plus haut. Rec étant produite à partir d'un épissage alternatif de l'ARNm de l'enveloppe, nous avons d'abord voulu confirmer que la protéine porteuse de l'activité était bien l'Env *stricto sensu*. Nous avons pour cela générer à la fois un vecteur d'expression de Rec et également de l'enveloppe délétée des sites d'épissage cryptiques associés à la production d'ARNm de la protéine accessoire (appelée HERV-K(HML2) Env). Ces expériences ont fait clairement apparaître que la protéine Rec n'est pas responsable de l'effet anti-Tetherin. Nous avons ensuite généré une série de mutants tous dérivés de Env-Rec. Ces expériences ont révélé que : (i) la queue cytoplasmique de l'enveloppe n'est pas requise au contraire de ce qui a été décrit en particulier pour l'Env HIV-2, (ii) le domaine transmembranaire de l'enveloppe est indispensable, comme pour la glycoprotéine d'Ebola.

La plupart des antagonistes décrits de la Tetherin interagissent directement avec elle. Nous avons montré que cette caractéristique est partagée par l'Env-Rec grâce à des

expériences de co-immunoprécipitation sur des lysats de cellules 293T co-exprimant la Tetherin étiquetée HA et différents antagonistes. L'étude de différents mutants a révélé que le domaine minimal requis pour l'interaction avec le facteur de restriction était la sous-unité de surface de la protéine (domaines SU), ce qui rapproche Env-Rec du modèle de l'Env HIV-2 dont le domaine extracellulaire est également responsable de l'interaction avec la Tetherin.

Nous avons ensuite cherché à décortiquer les mécanismes sous-tendant cette activité anti-Tetherin, en regardant dans un premier temps l'effet de l'expression de l'Env-Rec sur la localisation cellulaire du facteur de restriction dans des cellules HeLa l'exprimant de façon constitutive. Il est apparu que contrairement à l'Env HIV-2 et Vpu HIV-1, également inclus dans le test, l'Env-Rec HERV-K(HML2) n'induit pas de diminution de la Tetherin surfacique. Nous avons ensuite testé un autre mécanisme classique associé à l'activité de certains antagonistes, à savoir la dégradation du facteur de restriction. Les résultats d'immunodétection de BST2, en présence des différents antagonistes et avant ou après traitement à la PNGase ont clairement démontré que Env-Rec n'agissait pas par ce biais. Comme c'est le cas pour la glycoprotéine d'Ebola, le mécanisme d'action associé à ce nouvel antagoniste est donc nouveau et reste à caractériser.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la spécificité d'espèce de Env-Rec en testant son effet sur une série d'orthologues primates de la Tetherin. De façon remarquable, l'antagoniste présente un tropisme très large, contrairement à la protéine Vpu HIV-1, certes très efficace, mais sur un tout petit nombre d'espèces proches de l'homme (Chimpanzée et gorille). Il est intéressant de remarquer également que les différentes Tetherin testées proviennent toutes d'espèces où la famille HERV-K(HML2) est présente, ce qui suggère que l'activité anti-Tetherin de l'enveloppe du provirus aurait pu être un facteur favorisant l'expansion de la famille dans la lignée des primates.

Ce premier article nous a donc permis de mettre en évidence le premier antagoniste de la Tetherin associé à un rétrovirus endogène et donc présent dans nos génomes. Etant donné le grand polymorphisme insertionnel de la famille HERV-K(HML2), il est très probable que cette activité anti-Tetherin endogène soit variable entre les individus, ce qui pourrait avoir des conséquences dans les pathologies où l'enveloppe HERV-K(HML2) est spécifiquement induite.

2. Article 1 : The HERV-K human endogenous retrovirus envelope protein antagonizes Tetherin antiviral activity

Journal of Virology

The HERV-K Human Endogenous Retrovirus Envelope Protein Antagonizes Tetherin Antiviral Activity

Cécile Lemaître, Francis Harper, Gérard Pierron, Thierry Heidmann and Marie Dewannieux

J. Virol. 2014, 88(23):13626. DOI: 10.1128/JVI.02234-14.
Published Ahead of Print 10 September 2014.

Updated information and services can be found at:
http://jvi.asm.org/content/88/23/13626

These include:

REFERENCES This article cites 72 articles, 38 of which can be accessed free at: http://jvi.asm.org/content/88/23/13626#ref-list-1

CONTENT ALERTS Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml
To subscribe to to another ASM Journal go to: http://journals.asm.org/site/subscriptions/

Journals.ASM.org

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

JVI
Journals.ASM.org

The HERV-K Human Endogenous Retrovirus Envelope Protein Antagonizes Tetherin Antiviral Activity

Cécile Lemaître,[a,b,c] Francis Harper,[a,b] Gérard Pierron,[a,b] Thierry Heidmann,[a,b] Marie Dewannieux[a,b]

CNRS, UMR 8122, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France[a]; Université Paris-Sud, Orsay, France[b]; Université Paris Denis Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France[c]

ABSTRACT

Endogenous retroviruses are the remnants of past retroviral infections that are scattered within mammalian genomes. In humans, most of these elements are old degenerate sequences that have lost their coding properties. The HERV-K(HML2) family is an exception: it recently amplified in the human genome and corresponds to the most active proviruses, with some intact open reading frames and the potential to encode viral particles. Here, using a reconstructed consensus element, we show that HERV-K(HML2) proviruses are able to inhibit Tetherin, a cellular restriction factor that is active against most enveloped viruses and acts by keeping the viral particles attached to the cell surface. More precisely, we identify the Envelope protein (Env) as the viral effector active against Tetherin. Through immunoprecipitation experiments, we show that the recognition of Tetherin is mediated by the surface subunit of Env. Similar to Ebola glycoprotein, HERV-K(HML2) Env does not mediate Tetherin degradation or cell surface removal; therefore, it uses a yet-undescribed mechanism to inactivate Tetherin. We also assessed all natural complete alleles of endogenous HERV-K(HML2) Env described to date for their ability to inhibit Tetherin and found that two of them (out of six) can block Tetherin restriction. However, due to their recent amplification, HERV-K(HML2) elements are extremely polymorphic in the human population, and it is likely that individuals will not all possess the same anti-Tetherin potential. Because of Tetherin's role as a restriction factor capable of inducing innate immune responses, this could have functional consequences for individual responses to infection.

IMPORTANCE

Tetherin, a cellular protein initially characterized for its role against HIV-1, has been proven to counteract numerous enveloped viruses. It blocks the release of viral particles from producer cells, keeping them tethered to the cell surface. Several viruses have developed strategies to inhibit Tetherin activity, allowing them to efficiently infect and replicate in their host. Here, we show that human HERV-K(HML2) elements, the remnants of an ancient retroviral infection, possess an anti-Tetherin activity which is mediated by the envelope protein. It is likely that this activity was an important factor that contributed to the recent, human-specific amplification of this family of elements. Also, due to their recent amplification, HERV-K(HML2) elements are highly polymorphic in the human population. Since Tetherin is a mediator of innate immunity, interindividual variations among HERV-K(HML2) Env genes may result in differences in immune responses to infection.

Remnants of past viral infections are scattered within mammalian genomes. Most of those, the endogenous retroviruses (ERVs), were generated after infectious elements inserted into the germ line of their host during the course of a retroviral infection and thereafter were transmitted vertically. In some cases, the newly inserted element undergoes further replication cycles in the germ line, increasing its copy number within the genome. Given time, in the absence of selective pressure, most of the endogenous proviruses degenerate and lose their coding capacity (reviewed in references 1–4). However, the human genome still contains some intact retroviral open reading frames (ORFs), some of which have been conserved and recruited to serve physiological functions (5–7), whereas others are simply too recent to have undergone degeneration. This is the case of HERV-K(HML2), the most active ERV family in the human genome, which is comprised of around 50 proviruses. Although this family initially integrated in the genome of primates a long time ago (approximately 40 million years ago [mya]), most of the proviruses present in the human genome are much younger, with several having inserted at their present location less than 3 mya (i.e., after the divergence between the human and chimpanzee lineages) (8, 9; reviewed in reference 10). Most of them are polymorphic among the human population, and some have been dated to less than 100,000 years (9, 11). There is speculation that the amplification process of this family is still ongoing in humans (12). HERV-K(HML2) elements belong to betaretroviruses, and full-length proviruses encode the canonical retroviral Gag, Pro (protease), Pol (polymerase), and Env (envelope) proteins, as well as Rec, an accessory protein whose functions are similar to those of Rem in mouse mammary tumor virus or Rev in human immunodeficiency virus (HIV) (13, 14). Some of these proviruses are expressed and produce viral particles in tumor-derived cell lines (15–18). Functional assays showed that among the six complete Env ORFs identified in the human databases, one corresponds to a functional protein able to confer infectivity to heterologous retroviral particles (19).

Tetherin (or BST2 or CD317) is an antiviral protein whose

Received 13 August 2014 Accepted 5 September 2014
Published ahead of print 10 September 2014
Editor: S. R. Ross
Address correspondence to Thierry Heidmann, heidmann@igr.fr, or Marie Dewannieux, marie.dewannieux@igr.fr.
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/JVI.02234-14

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

activity was initially identified on HIV-1 (20, 21). It has a broad activity, being able to restrict most enveloped viruses against which it has been tested, including HERV-K(HML2) elements (22; reviewed in reference 23). Tetherin is a type II integral protein composed of a short N-terminal cytoplasmic tail containing motifs that mediate clathrin-dependent endocytosis (24), a single-pass transmembrane domain, and an ectodomain attached to the cell membrane at the C-terminal end via a GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor (25). Tetherin is present at the cell membrane as a homodimer (26) and acts against viruses by blocking their egress, leading to the retention of viral particles at the surface of the cells (20, 27). Like other components of innate immunity, Tetherin expression can be induced by type I interferons (28, 29). In addition to its direct antiviral effect, Tetherin is also a sensor of virus assembly and induces NF-κB proinflammatory responses while blocking viral egress (30, 31).

Over time, viruses have developed strategies to evade Tetherin-mediated restriction. Numerous examples of independent viral proteins able to counteract Tetherin have been described in different viral families, suggesting it is important for viruses to escape its action. They include so-called accessory proteins, such as Vpu (from HIV-1 and some simian immunodeficiency virus [SIV] strains [20, 32, 33]) and Nef (in several SIV strains [33–36]), the ubiquitin ligase K5 from human herpesvirus 8 (HHV8) (37–39), and also glycoproteins, including retroviral Env proteins (e.g., in HIV-2 [40], some SIV strains [41], feline immunodeficiency virus [FIV] [42–44], and equine infectious anemia virus [EIAV] [45]) as well as Ebola glycoprotein (46). The mechanisms of action of these proteins are diverse and not always fully understood, but all result in restoring virus release. Since HERV-K(HML2) became endogenous in the primate lineage more than 40 mya, it has had time to evolve in response to its host and acquire beneficial mutations, which could be a reason why it efficiently reamplified very recently in the genome of our ancestors. We reasoned that this recent amplification burst might have been associated with an intrinsic resistance against modern human restriction factors. Indeed, it was previously shown that human TRIM5α has no effect on HERV-K(HML2) infection (47). Thus, we decided to test HERV-K(HML2) for the presence of inhibitory proteins active against Tetherin. Here, we show that this element indeed encodes an inhibitor of human Tetherin able to restore virus release in pseudotyping experiments. This property is embedded in the Env protein, as already observed for other viruses (described above). Through immunoprecipitation experiments, we mapped the interacting domain to the surface (SU) subunit. We also show that, like the Ebola glycoprotein, HERV-K(HML2) Env does not lead to degradation or cell surface removal of Tetherin (48, 49).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. HIV-1-derived particles were produced using plasmids 8.91 (50), pHR′SIN-cPPT-SEW (51), and phCMV VSV-G (GenBank accession no. AJ318514). The human Tetherin ORF (NM_004335.3) was cloned in a pcDNA3 plasmid. An internally HA-tagged version, cloned in pCR3.1, was kindly provided by S. Neil (52) and was transferred in a lentiviral vector for transduction experiments (BamHI-NotI green fluorescent protein [GFP]-containing fragment from pHR′SIN-cPPT-SEW replaced by the Tetherin-HA ORF). Other primate Tetherin genes all are cloned into pCR3.1 and were obtained from S. Neil.

pCMV-ß (Clontech) is an expression vector for beta-galactosidase. It was used as a control vector (i.e., not encoding a Tetherin inhibitor) and is designated "None" in the figures. It also was used to adjust total DNA content in transfection experiments. Murine leukemia virus amphotropic [MLV ampho] Env (4070A strain) was expressed from a previously described phCMV-based vector (53). HIV2 ROD10 Env ORF was a gift from F. Clavel; point mutations were introduced to match the sequence of HIV2 ROD10 FL Env (described in reference 54), and the modified ORF was cloned into the phCMV vector. pCR3.1 Vpu-HA was a gift from S. Neil (55); in this study, we used a modified version generated by replacing the HA tag with a myc tag.

The expression vector for the cytomegalovirus (CMV)-driven HERV-K(HML2) consensus provirus with the inactivated *env* gene is described in reference 56. phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec plasmid was constructed by replacing the G protein ORF in phCMV vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) with nucleotides (nt) 6434 to 9214 of the HERV-K consensus provirus (sequence provided in reference 56). Rec cDNA was generated by performing reverse transcription-PCR (RT-PCR) on RNA extracted from 293T cells transfected with phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec using primers surrounding the Rec ORF (FP, TTGC AGAATTCACATTTGAAGTTCTACAATGAAC; RP, TTGCAGAATTC GTGAACAAAGGTCTTTGCATC) and cloned in the phCMV vector. phCMV-HERV-K(HML2) Env is derived from phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec, with point mutations introduced to inactivate splice donor and acceptor sites (SD and SA, respectively) without modifying the Env amino acid sequence (6711, gtggtaagt to gtCgtCTCA; 8395, ttttgtctgttgttagtc to ttCtgCctgCtgCtCgtG; modified nucleotides are shown in uppercase, and positions are according to those of the HERV-K consensus provirus).

Derivatives of the HERV-K(HML2) Env-Rec expression vector were generated from phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec. Env mut1 has a premature stop codon inserted after amino acid (aa) 658 (numbered from the first methionine). Env mut2 has a sequence encoding a glycophospholipid-anchoring motif (GLA, CCAAATAAAGGAAGTGGAACC ACTTCAGGTACTACCCGTCTTCTATCTGGGCACACGTGTTTCAC GTTGACAGGTTTGCTTGGGACGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGA CT) (57, 58) inserted after aa 631 [nt 8344 of HERV-K(HML2) consensus provirus] and aa 632, 633, and 634 mutated into stop codons (8344, accattgga to TAATAATga). Env mut3 was derived from Env mut2 by deleting the region corresponding to aa 459 to 630 [nt 7825 to 8340 of HERV-K(HML2) consensus provirus]. Env mut4 was generated by point mutations in phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec, changing aa 462 and 463 into stop codons (7834, agatcc to TgatAA). In all of these plasmids, the Rec ORF is left unchanged.

All of these plasmids were constructed using standard molecular biology techniques, and their sequences were verified by sequencing before use.

Cell culture, transfections, and lentiviral vector production. 293T and HeLa cells were maintained at 37°C, 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (all reagents are from Life Technology). HeLa cells (50% confluence on the day of transfection) were transfected using 1 μg of DNA (500 ng of candidate inhibitor and 500 ng of pCMV-ß control plasmid) and 5 μl Fugene 6 (Promega) per 3.5-cm dish. Lentiviral vectors for the expression of HA-tagged Tetherin were produced by transfecting 293T cells (3×10^6 per 10-cm dish) with 2 μg 8.91, 3 μg pSIN Tetherin-HA, and 0.7 μg phCMV VSV-G using 11.4 μl JetPrime (PolyPlus Transfection). Cell media were replaced 24 h post-transfection. Day 3 supernatants were collected, filtered (0.45 μm), and used for transducing cells either directly or after freezing and storage at −80°C.

Antibodies, Western blot analysis, and cell staining. Human Tetherin was detected using a rabbit antiserum obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program (diluted 1/20,000 for Western blotting and 1/2,000 for cell staining; generated by Klaus Strebel and Amy Andrew). The HA-tagged version of human Tetherin was detected using anti-HA antibody (clone 3F10) from Roche (diluted 1/5,000). Vpu was detected using HIV-1_{NL4-3} Vpu rabbit antiserum from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (diluted 1/20,000; generated by

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

Klaus Strebel). HIV-1 Gag protein was detected using a p24 rabbit antiserum obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (dilution, 1/5,000). HERV-K(HML2) Gag protein was detected using a rabbit antiserum (1/1,000; described in reference 56). MLV ampho Env protein was detected using a goat antiserum directed against Rauscher leukemia virus gp70 (from the National Cancer Institute, Frederick, MD). HERV-K(HML2) Env protein was detected using a monoclonal antibody (19) (2 μg/ml). GFP was detected with a rabbit polyclonal antibody from Abcam (dilution, 1/20,000). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and ECL Plus reagent (GE Healthcare) were used for Western blotting, and an Alexa 488 goat anti-rabbit secondary antibody was used for cell staining (1/100; Molecular Probes).

For Western blot analysis, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed for 45 min at 4°C in PBS, 1% NP-40 containing protease inhibitors (cOmplete EDTA-free protease inhibitors cocktail tablets; Roche). Cell debris was removed by a 15-min centrifugation step (4°C, 12,000 rpm). Protein samples (cell lysates or cell supernatants) then were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions with a NuPAGE system (using precast Novex 4 to 12% Bis-Tris gels; Life Technology) and transferred onto nitrocellulose membranes with a semidry system. For Tetherin degradation assays, some samples were treated with peptide N-glycosidase F (PNGase F; NEB Biolabs) before SDS-PAGE.

To measure membrane Tetherin levels, HeLa cells were collected 48 h posttransfection in PBS, 5 mM EDTA, blocked for 30 min (PBS, 2% FCS, 0.1% sodium azide), and then incubated for 1 h with anti-Tetherin (or control) serum. Cells were washed thrice before a 45-min incubation with the secondary antibody, washed again 3 times, and finally resuspended in PBS–0.1% sodium azide for fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. All staining steps were performed at 4°C.

Viral release assays. In the first assays for Tetherin activity [HIV-1 or HERV-K(HML2)-Gag, measured by Western blotting] (Fig. 1), 293T cells (in 3.5-cm dishes) were transfected with 0.5 μg 8.91 [or 1 μg CMV-driven HERV-K(HML2) provirus with *env* inactivated], 100 ng phCMV VSV-G, 100 ng candidate inhibitor (or control), 0 to 50 ng pcDNA3-Tetherin, and pCMV-ß control plasmid (to adjust total DNA content up to 1.55 μg) using 8 μl Fugene 6 (Promega) or 3 μl JetPrime (PolyPlus Transfection). Cells were washed and their medium replaced 24 h posttransfection. At day 2, protein samples (cell lysates and supernatants) were collected for Western blot analysis or cells were fixed for electron microscopy (EM) studies.

In the quantitative assay using FACS, 293T cells (in 3.5-cm dishes) were transfected as described above, except 0.75 μg pHR′SIN-cPPT-SEW was added and pcDNA3-Tetherin varied between 0 and 100 ng. Functional assays of the primate Tetherin genes were performed using the same method but with a single Tetherin dose (25 ng). Naive 293T target cells were infected with serial dilutions of day 3 viral supernatants (filtered with 0.45-μm-pore-size filters). The percentage of GFP-positive cells was measured 72 h postinfection by FACS and used to calculate the viral titer of each supernatant. Only samples with 5 to 20% GFP-positive cells were used to calculate titers to ensure that results were in the linear zone of the infection where positive cells have theoretically been infected by only one particle.

Coimmunoprecipitation assay. 293T cells were transduced at a high multiplicity of infection with supernatants containing the Tetherin-HA-expressing lentiviral vector. The day after, the cells were reseeded in 10-cm dishes and transfected with 4 μg of candidate antagonists or control (total amount of DNA was adjusted to 6 μg by adding pCMV-ß control plasmid) using 30 μl Fugene 6 (Roche). Medium was replaced after transfection, and cell lysates were collected at day 2 and used immediately. Immunoprecipitation was performed using a commercial anti-HA immunoprecipitation kit (Sigma). The immunoprecipitates (IP; 20 μl/100 μl per well) and lysates (input; 5 μl/700 μl per well) then were analyzed by Western blotting.

Electron microscopy. For ultrastructural studies, monolayers of transfected cells were fixed for 1 h at 4°C in glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M Sörensen phosphate buffer, pH 7.3. Cells were scraped off following fixation and centrifuged. The fixed pellets were rinsed for 1 h in ice-cold phosphate buffer, postfixed with 1% aqueous osmium tetroxide for 2 h, and dehydrated in increasing concentrations of ethanol prior to Epon embedding. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Tecnai 12 Spirit transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) at 80 kV.

RESULTS

To assess the presence of anti-Tetherin activity within HERV-K(HML2) proviruses, we used 2 expression vectors that together encode all of the proteins that are expressed by the HERV-K(HML2) consensus genome (56), with one construct being a full-length CMV-driven provirus defective for Env and the other containing only the *env* region also placed under the control of a CMV promoter. The latter encodes both Env and Rec, since the *rec* ORF is fully contained within *env*. These two constructs were tested for Tetherin antagonist activity in an assay in which 293T cells were transfected with expression vectors for (i) HIV-1 structural proteins (Gag, Pol, Tat, and Rev but not Vpu), (ii) VSV-G, (iii) human Tetherin (in increasing amounts), and (iv) candidate antagonists (Fig. 1A). The release of HIV-1-derived particles then was measured 2 days posttransfection by Western blotting experiments. As shown in Fig. 1B, the 2 HERV-K(HML2)-derived plasmids gave different results in this assay. In the presence of the *env*-defective provirus, the amount of HIV-1 Gag in cell supernatants decreases when the Tetherin amount increases, in agreement with the described inhibitory effect of Tetherin on viral particle release, and also as observed with an unrelated retroviral Env protein (murine leukemia virus amphotropic [MLV ampho] Env protein) used as a negative control. However, in the presence of HERV-K(HML2) Env-Rec, the amount of particles secreted is unaffected by Tetherin expression, indicating Tetherin activity is abrogated by Env-Rec. In the same assay, HIV-1 Vpu and, to a lesser extent, HIV-2 Env also inhibit Tetherin activity, confirming previous results (for example, see references 20 and 40). Since Rec is expressed from the two HERV-K(HML2) constructs we used (the inactivation of *env* in the provirus does not alter the Rec ORF), these data indicate that HERV-K(HML2) Env possesses anti-Tetherin activity. Unrelated to this, in the HERV-K(HML2) Env-Rec samples, the migration profile of HIV-1 Gag in cell supernatants is modified compared to that of the other proteins we tested, whether Tetherin is expressed or not. This altered maturation profile is not observed with the HERV-K(HML2) provirus defective for Env. This suggests that HERV-K(HML2) Env, in addition to its effect on Tetherin, also modifies in an unknown way the maturation of HIV-1-derived particles.

Some of the cells transfected for the experiments described above were additionally analyzed by electron microscopy (Fig. 1C). Irrespective of the antagonist, in the absence of Tetherin, very few particles are observed at the cell surface, consistent with their being efficiently released in the supernatant. When Tetherin is expressed, however, cells coexpressing the control MLV ampho Env protein or the HERV-K Gag-Pro-Pol proteins, which display no anti-Tetherin activity, are surrounded by numerous particles that are trapped after budding, whereas no such effect is observed in cells coexpressing HERV-K(HML2) Env-Rec or HIV-1 Vpu. Of note, most of the particles we observed display an immature morphology. This might be a side effect of the overexpression of HIV-1 structural proteins due to transient transfection. However, we could detect in all samples a small amount of mature particles displaying the specific shape of HIV-1 particles.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

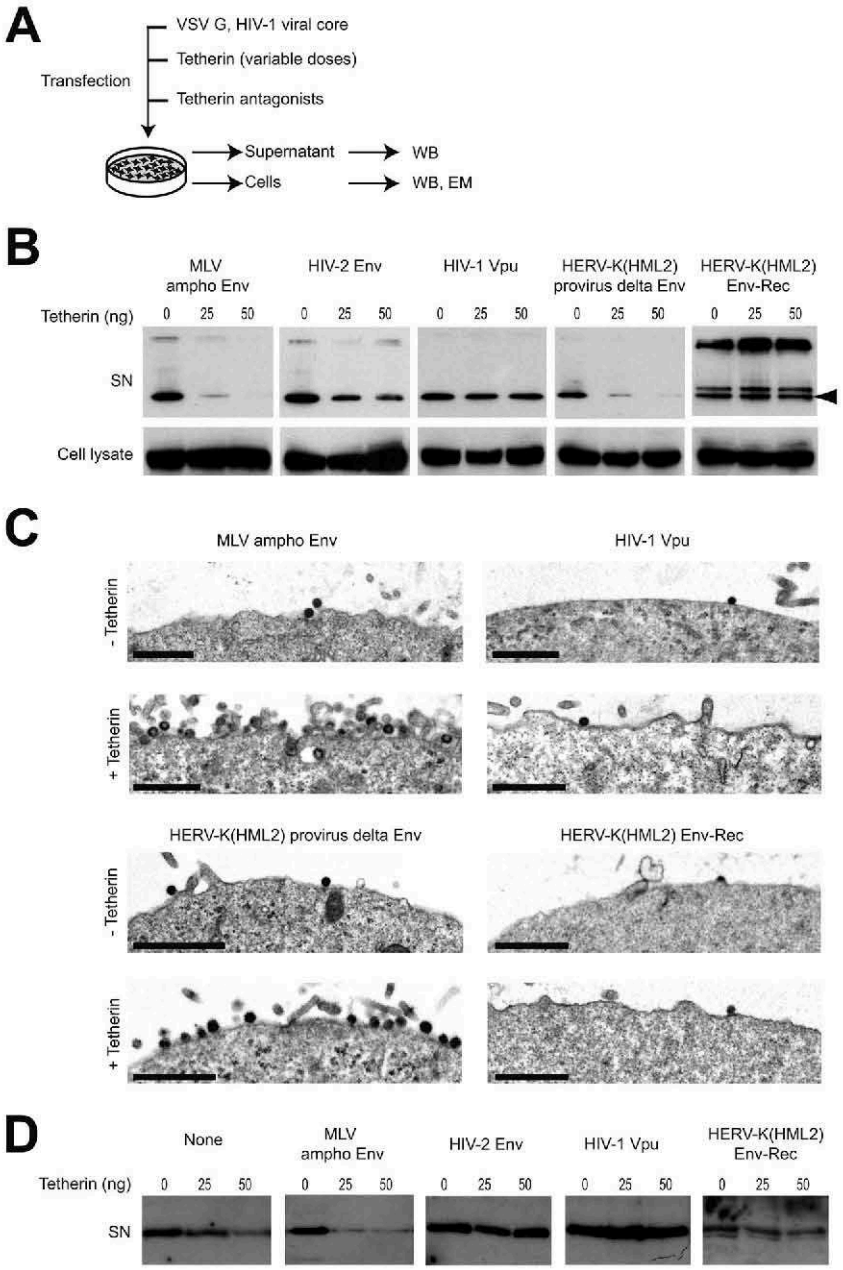


FIG 1 Tetherin restriction is antagonized by HERV-K(HML2) Env-Rec. (A) Scheme of the experimental procedure. 293T cells were transfected with the indicated plasmids. Two days after transfection, cell supernatants were harvested and cells were either lysed to perform Western blot analysis or prepared for electron microscopy observation. (B) HIV-1 Gag protein content in neat supernatants (SN) was analyzed by Western blotting; p55 levels in corresponding cell lysates are displayed below for comparison. The nature of the potential Tetherin antagonist transfected is indicated above each gel part, and the doses of Tetherin transfected are given above each well (0, 25, or 50 ng). HIV-1 Gag p24 protein is indicated with an arrowhead. The additional bands observed in some supernatant samples (approximately 26 and 35 to 40 kDa) correspond to partially processed Gag protein. (C) Electron microscopy of cells obtained as described for panel A. Shown is a low magnification of cell membranes with viral particles observed by electron microscopy after negative staining. Images obtained with HIV-2 Env (not displayed here) were similar to those observed with HIV-1 Vpu and HERV-K(HML2) Env-Rec. Scale bars correspond to 1 μm. (D) HERV-K Gag protein content in neat supernatant was analyzed by Western blotting. The experimental procedure used was the same as that described for panel A, except the CMV-driven HERV-K(HML2) provirus defective for the envelope gene (instead of HIV-1 viral core) was transfected. Only cell supernatants were analyzed, since the anti-HERV-K(HML2) Gag antibody does not allow its specific detection in cell lysates (the signal/noise ratio is too high).

To characterize further the HERV-K(HML2) Env anti-Tetherin activity, we then tested if it could antagonize the tethering of HERV-K(HML2)-encoded particles. To do so, we transfected 293T cells as described above, except that the expression vector for HIV-1 core proteins was replaced by the HERV-K(HML2) provirus defective for Env. As presented in Fig. 1D, the amount of HERV-K p30 in the supernatant of transfected cells decreased with the amount of Tetherin in the presence of the control protein or the ampho MLV envelope, confirming that the budding of HERV-K(HML2) particles is impeded by Tetherin (22). In this assay, all three previously tested

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

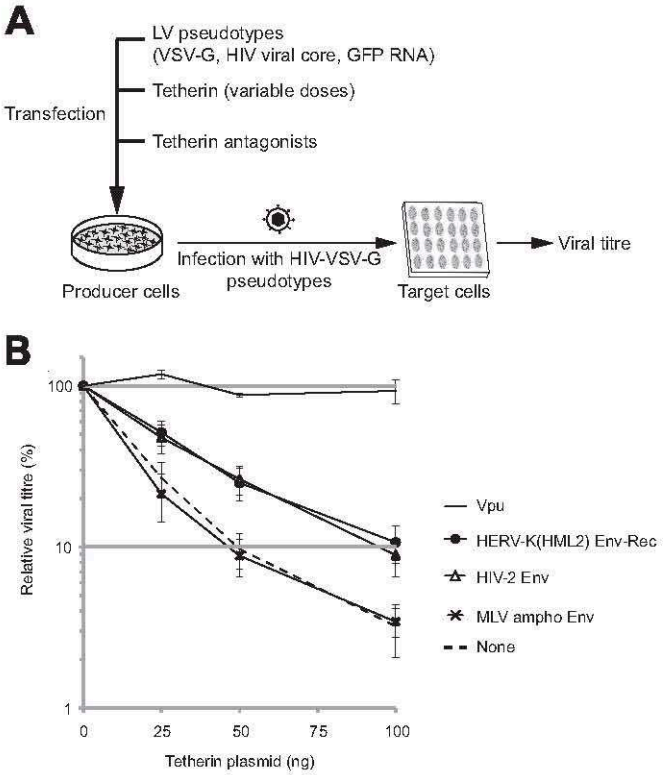


FIG 2 Quantitative assay of the HERV-K(HML2) Env-Rec-mediated inhibition of Tetherin activity. (A) Schematic description of the experimental procedure. 293T cells were transfected with the indicated plasmids. Three days posttransfection, the supernatants of producer cells were harvested to infect target cells. The percentage of infected cells was measured after 72 h by flow cytometry analysis, and viral titers were calculated for each condition. (B) The evolution of viral titers with the amount of transfected Tetherin (0 to 100 ng) is plotted for each potential inhibitor. The 100% value was set for each inhibitor using the titer measured without Tetherin. Error bars represent standard deviations of the means from 10 independent experiments, except for HIV-1 Vpu data (3 experiments).

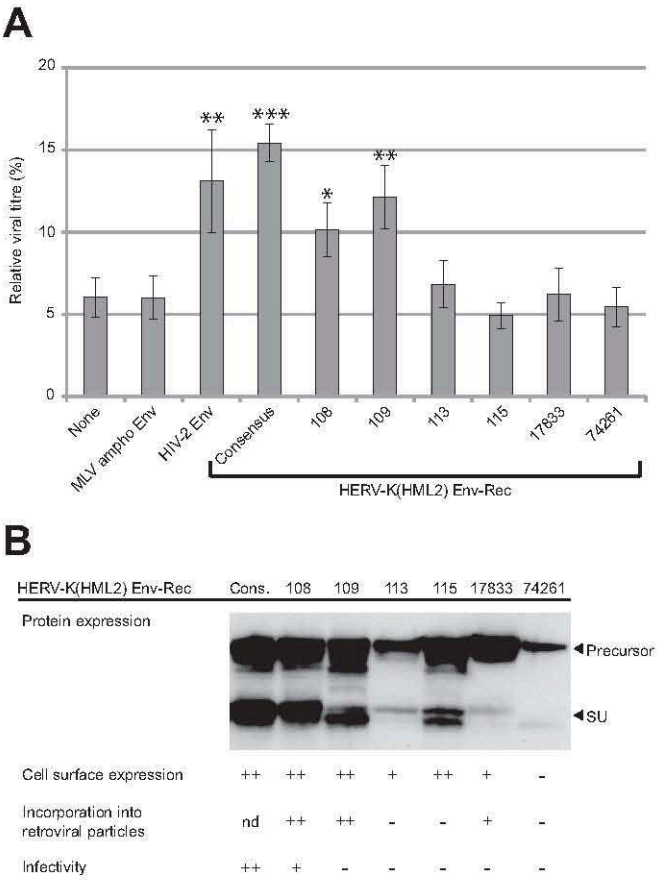


FIG 3 Effect of endogenous alleles of HERV-K(HML2) Env-Rec on Tetherin activity. (A) Previously described endogenous alleles of HERV-K(HML2) Env-Rec were tested for their ability to antagonize Tetherin as described in the legend to Fig. 2A. For each protein tested, the relative viral titer measured with 100 ng of Tetherin is represented (100% corresponds to the value measured in the absence of Tetherin). Under these conditions, HIV-1 Vpu restores the viral titer to 95.3% of the no-Tetherin condition (not shown). For statistical tests, all results were compared to the "None" condition. Asterisks indicate values significantly different from that obtained under the "None" condition (unpaired two-tailed *t* test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (B) Recapitulation of the functional properties of the 6 endogenous alleles of HERV-K(HML2) Env-Rec. Expression levels of the different HERV-K(HML2) Env-Rec alleles were analyzed by Western blotting on 293T cell lysates following transient transfection. Other functional properties of these alleles, which have been previously assessed (19), also are recapitulated. Cons., consensus HERV-K(HML2) element; nd, not determined.

inhibitors of Tetherin, namely, HIV-1 Vpu, HIV-2 Env, and HERV-K(HML2) Env-Rec, completely blocked Tetherin activity, indicating that HERV-K(HML2)-encoded anti-Tetherin activity is active on its own particles.

To characterize further the action of HERV-K(HML2) Env-Rec against Tetherin, we then used a quantitative assay based on HIV-1-derived particles in which the amount of infectious particles (containing a GFP reporter gene) released in the supernatant was determined by measuring their titers on target cells using FACS (Fig. 2A). In this assay, Tetherin expression leads to a decrease in viral production in a dose-dependent manner (Fig. 2B). However, the efficiency of viral particle release also depends on the antagonist tested and is lowest when HERV-K(HML2) Env-Rec is coexpressed (data not shown), in agreement with the limited maturation of HIV-1 Gag protein that we observed by Western blotting in Fig. 1B. To allow a direct comparison of the inhibitors and to circumvent the high variability in titers observed in independent experiments, all values were normalized relative to the no-Tetherin condition for each of the potential inhibitors before statistical analysis. As illustrated in Fig. 2B, coexpression of HIV-2 Env or HERV-K(HML2) Env-Rec partially restored the viral particle release at all 3 different Tetherin doses compared to the control proteins ("None" and MLV ampho Env). Under the same conditions, HIV-1 Vpu proved to be much more effective as a Tetherin antagonist, as previously observed. This might be due to its inherently different nature, or higher expression level, compared to those of retroviral envelope proteins. Using the same assay, we tested all of the described natural alleles known for HERV-K(HML2) Env-Rec. The results obtained for the highest Tetherin dose are presented in Fig. 3A. As indicated, 2 out of the 6 tested alleles, namely, K108 and K109, are active against Tetherin in this assay. They correspond to the 2 most functional alleles as tested for other classical virological properties (19), which are recapitulated in Fig. 3B, suggesting that anti-Tetherin activity is linked to the canonical infectious properties of the proteins.

We then used the same assay to ascertain which of the 2 HERV-

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

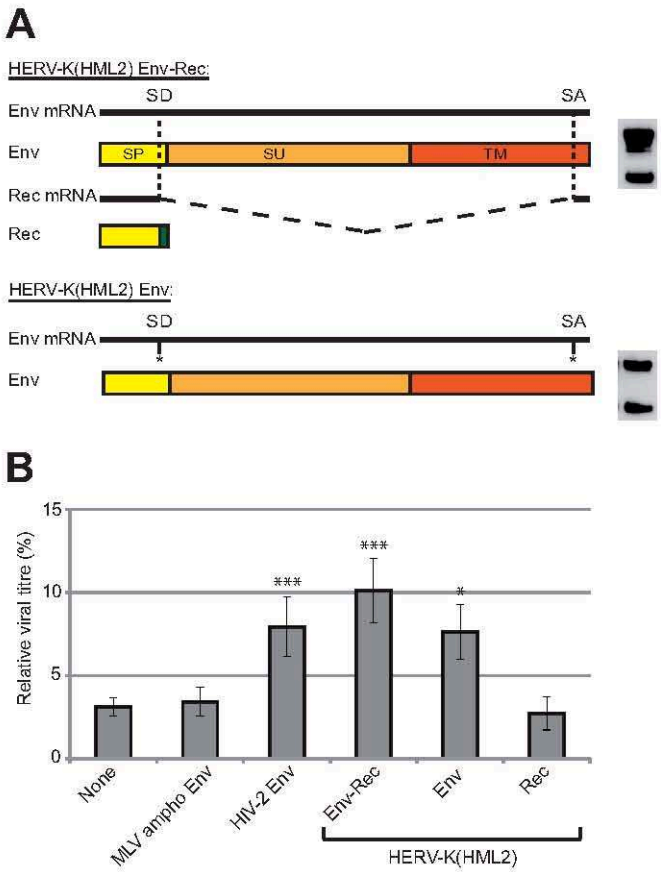


FIG 4 HERV-K(HML2) Env inhibits Tetherin activity. (A) The HERV-K(HML2) Env-Rec plasmid leads to the expression of 2 distinct proteins via alternative splicing: the full-length RNA encodes Env, a glycoprotein that is cleaved into 2 subunits during synthesis (surface subunit, SU, and transmembrane subunit, TM), while internal splicing sites (SD for splice donor and SA for splice acceptor) lead to the production of Rec, an accessory protein whose first exon (in yellow) is contained within the signal peptide (SP) of Env while the second exon (in green) is translated from a different reading frame. An expression vector leading to the production of Env but not Rec was generated by point mutations introduced in the splicing sites. Env expression levels obtained with each of the two constructs are shown on the right. (B) The ability of HERV-K(HML2) Env and Rec to antagonize Tetherin restriction was assayed as described in the legend to Fig. 2A. Results are given as described in the legend to Fig. 3A.

K(HML2) proteins contained in the Env-Rec expression vector is active against Tetherin. Indeed, the experiment shown in Fig. 1B suggests that Env, and not Rec, is the active effector. However, it is possible that its expression levels obtained from the two constructs were different. To test the effect of each protein individually, we generated expression vectors for each of them. The Rec ORF consists of 2 exons and is completely contained within the *env* gene (Fig. 4A). cDNA of HERV-K(HML2) Rec was generated using transfected cells and cloned into an expression vector. In parallel, we introduced single point mutations in the Env-Rec expression vector in such a way that the splicing sites normally used to generate the Rec transcript were abolished without altering the amino acid sequence of HERV-K(HML2) Env (see Materials and Methods for more details). We then tested these two proteins for their activity against Tetherin as described above. As shown in Fig. 4B, the expression of the Rec protein has no effect on the antiviral activity of Tetherin, whereas transfection of the cells with the expression vector for Env has an inhibitory effect. This effect observed with Env is not statistically different from that of Env-Rec in an unpaired *t* test but was consistently slightly lower in all experiments, which might be due to a reduced expression of Env protein alone compared to the Env-Rec expression vector (see the Western blotting profile for each construct under similar conditions in Fig. 4A, right), most probably because Rec is involved in the nuclear export of HERV-K transcripts.

To further characterize the anti-Tetherin activity carried out by HERV-K(HML2) Env protein, we generated a series of mutants presented in Fig. 5A (see Materials and Methods for details). In order to enhance the readout of the experiments, all constructs were derived from the Env-Rec expression vector, which had the strongest anti-Tetherin activity. As shown in Fig. 5B, all mutant proteins are expressed at a similar level in 293T cells, and those designed to have a cell-membrane localization could be detected at the cell surface by FACS. All of these mutants then were tested in the functional assay described above, and the results obtained with the highest Tetherin dose are presented in Fig. 5C. As indicated in the figure, only HERV-K(HML2) Env mut 1 still possesses anti-Tetherin activity, with an efficacy similar to that observed with the native form of the protein. This mutant is deleted for most of its cytoplasmic tail, which indicates that this domain is not involved in Tetherin recognition or inhibition. All of the other mutants, which are unable to counteract Tetherin activity, lack a proper transmembrane domain. This demonstrates that the transmembrane domain is required for the anti-Tetherin activity of HERV-K(HML2) envelope protein.

Most of the previously characterized Tetherin antagonists directly interact with it, as demonstrated through coimmunoprecipitation experiments. We tested if this is also the case for HERV-K(HML2) Env. 293T cells were transduced with a lentiviral vector expressing a HA-tagged version of Tetherin and then transfected with antagonists or control proteins. Two days posttransfection, cells were lysed and Tetherin was immunoprecipitated via the HA tag. The presence or absence of each antagonist in the immunoprecipitated fraction then was tested by Western blotting. As shown in Fig. 6A, the control MLV ampho Env protein, which has no anti-Tetherin activity, does not coimmunoprecipitate with it, unlike the well-characterized antagonist HIV-1 Vpu, in agreement with previous studies (55, 59–61). In this assay, HERV-K(HML2) Env also is immunoprecipitated very efficiently by Tetherin, suggesting that the two proteins interact *in vivo*. In all cases, the HA-tagged Tetherin was recovered in similar amounts in the immunoprecipitated fractions (Fig. 6A, lower), indicating that the nature of the tested antagonist did not bias the analysis. We then mapped the interacting domain within HERV-K(HML2) Env. We tested in coimmunoprecipitation experiments the mutants that we had previously assessed for their activity against Tetherin. As shown in Fig. 6B, all of them interact efficiently with Tetherin, even those unable to block its activity. Mutant 2 seems to be recovered less efficiently than other HERV-K(HML2) derivatives, but it was detected at a level similar to that of HIV-1 Vpu and clearly higher than that of the control ampho Env protein (not detected at all at the immunoprecipitated level despite a higher expression level in the raw input). This may be due to some misfolding in this mutant or even to a slightly different localization at the cell surface. Among this series of mutants, all of which interact with Tetherin, the shortest protein consists of only the SU subunit

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

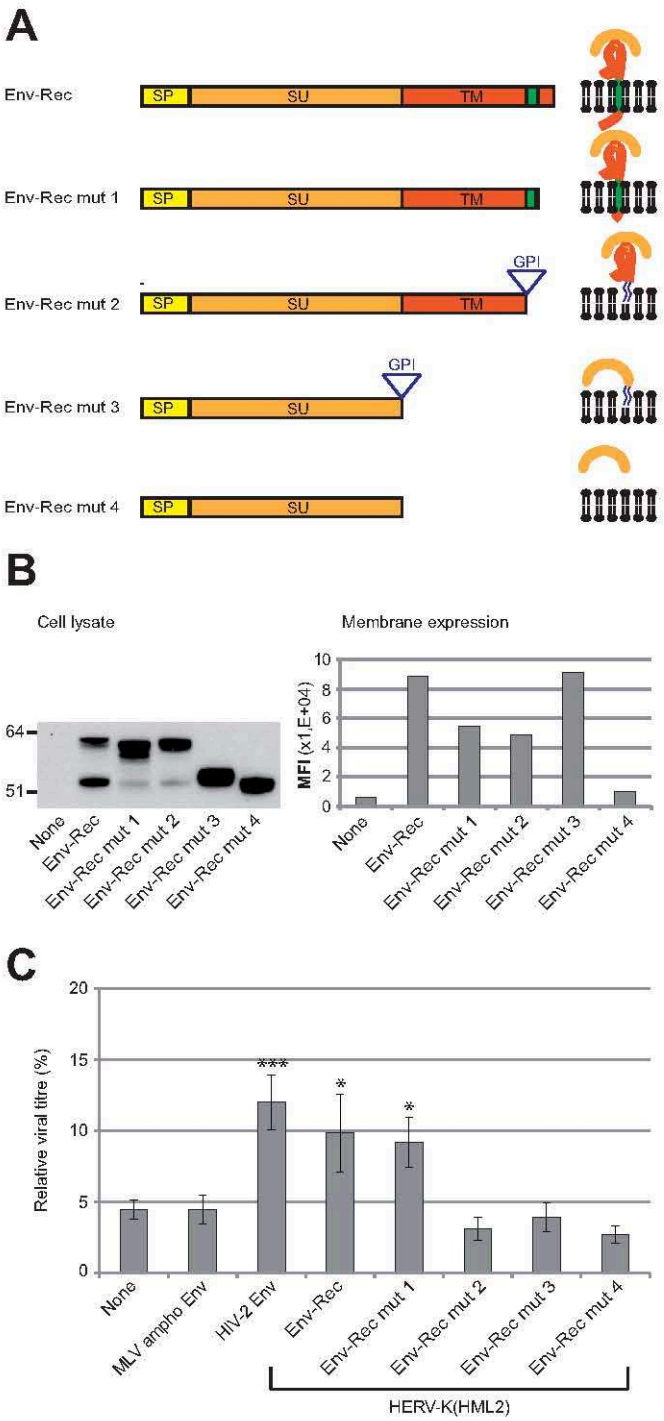


FIG 5 Characterization of HERV-K(HML2) Env domains necessary for inhibiting Tetherin activity. (A) Scheme of the different derivatives of HERV-K(HML2) Env-Rec. All modifications were designed to modify Env without altering the Rec ORF. The different domains of each construct are indicated: SP (signal peptide, yellow), SU (orange), and TM (red). HERV-K(HML2) Env-Rec mut1 corresponds to a C-terminal truncated version of the complete Env (41 aa deleted). HERV-K(HML2) Env-Rec mut2 has its membrane spanning (in green) and cytoplasmic domains replaced by a GPI anchor (the signal for the addition of the GPI anchor is depicted by a triangle in the scheme). HERV-K(HML2) Env-Rec mut3 consists of the SU subunit attached to the cell membrane by a GPI anchor. HERV-K(HML2) Env-Rec mut4 corresponds to the soluble surface subunit. For each construct, the expected protein structure is depicted on the right. (B) Expression levels of Env-Rec and derivatives were measured in transiently transfected 293T cells either by Western blotting on whole-cell lysates (left) or by FACS following cell surface staining (right). The histogram displays the median fluorescence intensities (MFI) of the whole population for each protein tested. (C) The efficiency of the different HERV-K(HML2) Env-Rec derivatives to antagonize Tetherin was assayed as described in the legend to Fig. 2A. The representation of results is the same as that described in the legend to Fig. 3A.

of the protein, which is responsible for the interaction observed with Tetherin.

We then investigated the mechanisms through which HERV-K(HML2) Env inhibits Tetherin activity. First, we tested its effect on the cellular localization of endogenous Tetherin in HeLa cells. As shown in Fig. 7A, the amount of Tetherin expressed at the cell surface was unaffected by HERV-K(HML2) Env-Rec expression. Therefore, the mechanism of action of HERV-K(HML2) Env protein is different from the one occurring with HIV-1 Vpu, which led to a clear downregulation of membrane Tetherin in our assay, in agreement with previous results (21). We then tested another described mechanism of action of known Tetherin antagonists, i.e., Tetherin degradation. For this experiment, 293T cells were transfected as described in the legend to Fig. 2 with all of the plasmids necessary to produce HIV-1-derived particles in the presence or absence of Tetherin inhibitors. The amount of Tetherin was analyzed by Western blotting 2 days posttransfection. As shown in Fig. 7B, confirming previous studies (62–64), the expression of Vpu by the cells results in a nearly complete loss of Tetherin expression, unlike control proteins ("None" and MLV ampho Env). The coexpression of HERV-K(HML2) Env modifies the migration pattern of Tetherin, with the lowest-molecular-weight form seemingly more abundant than when control proteins were expressed. To ensure that the total amount of Tetherin was not modified, we treated the samples with PNGase F, which removes N-linked glycosylations from proteins and renders the migration pattern of Tetherin, a normally heavily glycosylated protein, simpler. This confirmed that HERV-K(HML2) Env, unlike HIV-1 Vpu, does not lead to Tetherin degradation. However, it modifies its glycosylation pattern within the cells.

Finally, we investigated the species specificity of HERV-K(HML2) Env-Rec toward Tetherin. Using the same functional assay as that described above, we tested a series of Tetherin genes from primates. The results obtained are shown in Fig. 8, together with those for control proteins or other Tetherin antagonists, with statistical significance versus the "None" condition indicated. Quite remarkably, HERV-K(HML2) Env-Rec shows a broad tropism, being able to antagonize all primate Tetherin proteins that we tested with nearly the same efficiency (viral titer increased 2.6 to 4.5 times compared to that of the "None" condition). HIV-2 Env shows the same broad efficiency but with slightly lesser effect (1.5- to 2.2-fold increase compared to the "None" condition). In comparison, HIV-1 Vpu protein possesses a very high inhibitory effect against Tetherin from species closely related to humans (chimpanzee and gorilla) but is much less active against the Tetherin from Old World monkey species, confirming previous results (33, 35, 52, 65, 66).

DISCUSSION

In this paper, we have identified Tetherin antagonist activity in human endogenous HERV-K(HML2) elements and mapped it to the Env protein. Through immunoprecipitation experiments, we have shown that the interacting domain is fully contained within

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

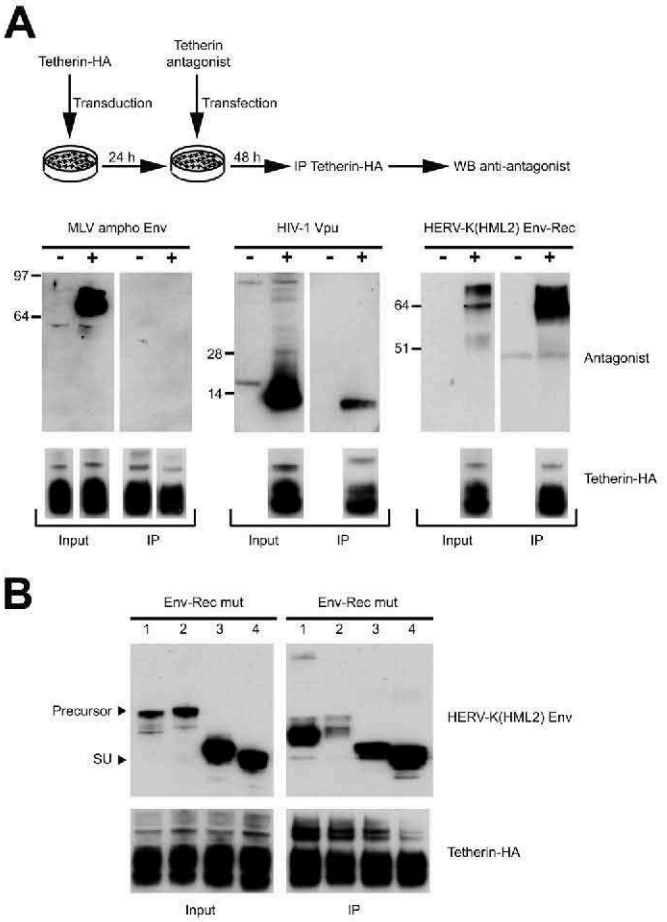


FIG 6 Assay for interaction between HERV-K(HML2) Env and Tetherin. (A) Scheme of the experimental procedure. 293T cells were transduced with an internally HA-tagged Tetherin lentiviral vector and then transfected with different Tetherin antagonists [MLV ampho Env, HIV-1 Vpu, and HERV-K(HML2) Env-Rec]. Cell lysates were harvested 48 h posttransfection and subjected to anti-HA immunoprecipitation. The presence of the Tetherin antagonists or control protein in the immunoprecipitated fraction (IP) was then assessed by Western blotting (top). A fraction of the cell lysates before immunoprecipitation (input) was included to ensure their efficient expression and detection. The presence of similar amounts of Tetherin in all samples (input and IP fractions) was checked by Western blotting in a separate gel run under the same conditions using an anti-HA antibody (lower). The minus antagonist sample was the same for each protein tested and was migrated only once to ensure Tetherin expression; it is presented below the MLV ampho panel. (B) In order to map the interaction domain between Tetherin and HERV-K(HML2) Env-Rec, HERV-K(HML2) Env-Rec derivatives (mut 1, mut 2, mut 3, and mut 4) were assayed for their ability to interact with Tetherin by following the protocol described for panel A. In the top panels, arrows point to the precursor form and SU subunit of HERV-K(HML2) Env-Rec derivatives. As described for panel A, Tetherin expression levels were measured for all samples by Western blotting and are presented below the Env panels.

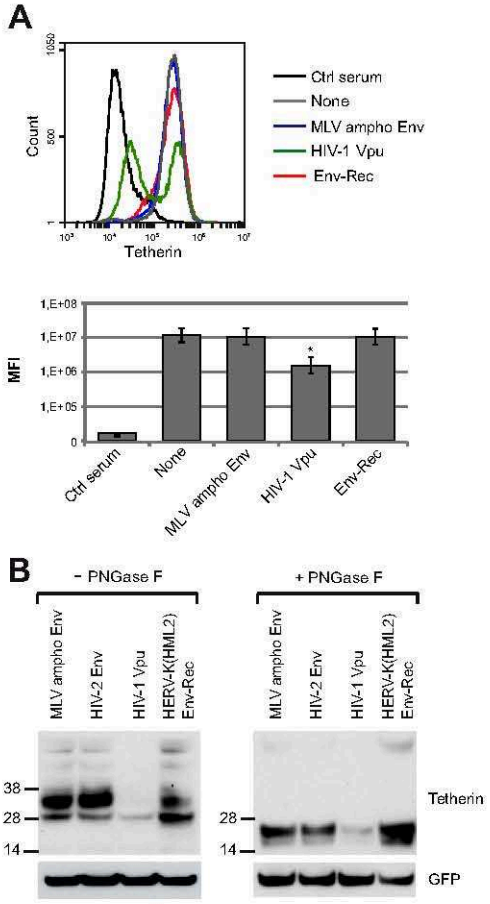


FIG 7 Mechanistic aspects of HERV-K(HML2) Env-Rec inhibition of Tetherin. (A) Assay for cell membrane downregulation of Tetherin by inhibitors. HeLa cells were transfected with expression vectors for Tetherin inhibitors or control proteins. Forty-eight hours posttransfection, cells were stained for cell surface Tetherin. A staining with a control rabbit serum (Ctrl) also was included in the experiment. The histogram on the top corresponds to 1 representative experiment out of 3. Below is displayed the median fluorescence intensities for each antagonist tested. Error bars represent standard deviations of the means from three independent experiments. All results are compared to the "None" condition. Asterisks indicate values significantly different (*, $P < 0.05$) from that obtained under "None" conditions (unpaired two-tailed t test). (B) Assay for Tetherin degradation by inhibitors. 293T cells were transfected with 8.91, pHR′SIN-cPPT-SEW, VSV-G, Tetherin expression vector, and a Tetherin inhibitor or control protein. Two days after transfection, cell lysates were prepared, treated with PNGase F (right), or left untreated (left). The membrane was stained for Tetherin (top) and then stripped and stained again for GFP (expressed from transfected pHR′SIN-cPPT-SEW) (bottom) to ensure that each well of the gel had been equally loaded.

the SU moiety. In previous years, numerous viral inhibitors of Tetherin were identified and characterized, showing a huge diversity in the way they interact with Tetherin. In some cases, recognition takes place in the cytoplasm, or within the cell membrane, between the transmembrane domains of the inhibitor and Tetherin. However, binding to Tetherin through its ectodomain is not unheard of: the interacting domain of HIV-2 Env has been localized to the extracellular domain of the protein, even if it has not been determined whether the interacting domain is contained within the SU subunit or the TM ectodomain (40). The functional assays we carried out with mutant proteins also indicate that the presence of the interacting domain is not enough to ensure anti-Tetherin activity, with the envelope transmembrane region being absolutely required. In particular, the GPI-anchored mutants that we generated are completely unable to counteract Tetherin, even though they both contain the SU subunit and are efficiently expressed on the surface of the cells, as shown by flow cytometry. However, it is possible that these GPI-anchored proteins are localized to specific cell surface microdomains where they would be unable to inhibit Tetherin activity. The interactions that we detected through immunoprecipitation experiments could happen

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

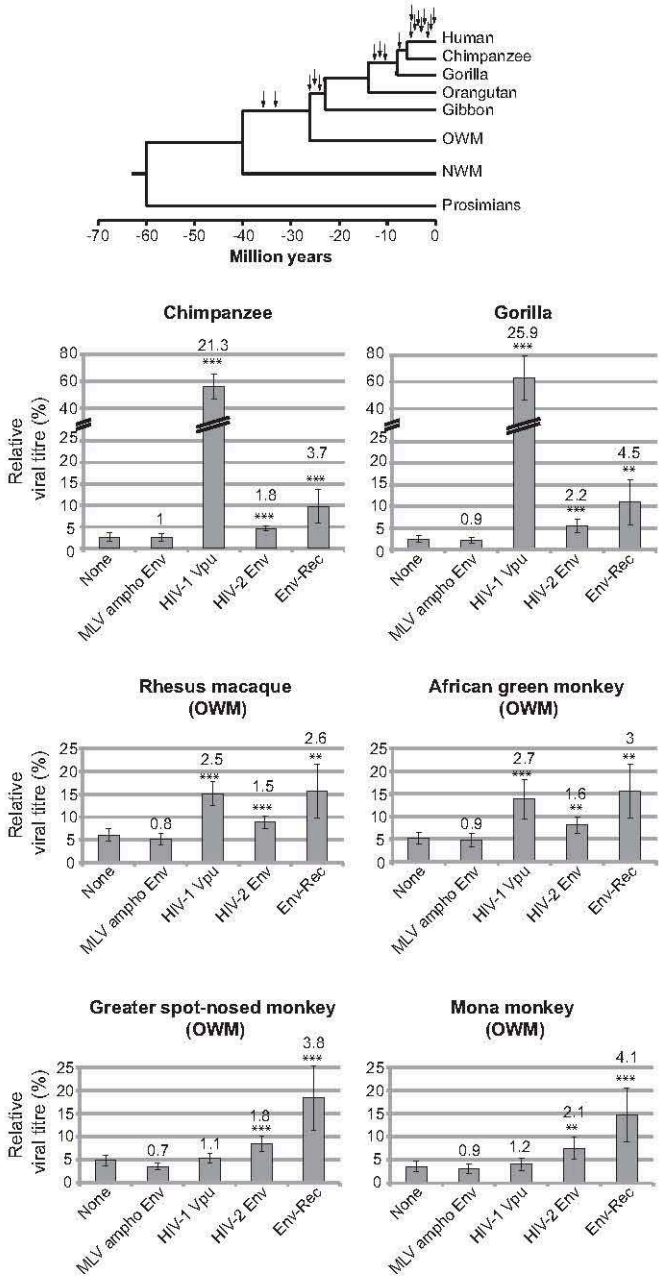


FIG 8 Effect of HERV-K(HML2) Env-Rec on several primate Tetherin proteins. HERV-K(HML2) Env-Rec was tested for its ability to antagonize several primate Tetherin proteins as described in the legend to Fig. 2A. For each Tetherin and antagonist tested, the relative viral titer measured with 25 ng of Tetherin is represented (100% corresponds to the value measured in the absence of Tetherin), with the average fold increase compared to the "None" condition indicated above each antagonist. Statistical tests were done as described in the legend to Fig. 3A using 9 independent experiments. A phylogenetic tree of primates is presented (top). The arrows indicate amplification bursts of HERV-K(HML2) elements during primate evolution (from reference 8) (OGM and NWM, Old and New World monkeys, respectively).

during the transport of both proteins within the cells, at a place where the interaction would have no functional consequence for Tetherin activity.

In addition, the functional assays indicated that the cytoplasmic tail of the HERV-K(HML2) Env protein plays no role in its anti-Tetherin activity. This is unlike HIV-2 Env protein, for which the corresponding domain has been shown to be required (40). However, this specific requirement has been more precisely linked to the presence of a GYxxθ motif (where θ is a hydrophobic residue) that plays a role in HIV-2 Env protein retrograde transport from the cell surface to *trans*-Golgi network (TGN)-associated compartments (40, 67). HERV-K(HML2) Env protein lacks such a motif in the corresponding domain, in good agreement with this region being dispensable for anti-Tetherin activity. These observations also are consistent with the differences observed in the mechanisms of action of these two Tetherin antagonists: HIV-2 Env acts at least partially through depleting Tetherin from the cell membrane, whereas we showed that HERV-K(HML2) Env protein expression has no effect on Tetherin cell surface expression.

Indeed, the mechanism through which HERV-K(HML2) Env protein inhibits Tetherin remains elusive. We tested another mechanism that was shown to play a role in HIV-1 Vpu inhibition, namely, Tetherin degradation (21), and showed that HERV-K(HML2) Env protein expression does not modify the total amount of cellular Tetherin. During these experiments, we repeatedly noticed a slight modification in the glycosylation pattern of Tetherin specifically associated with HERV-K(HML2) Env expression. This was not observed with the "None" control vector or with another retroviral envelope protein devoid of anti-Tetherin activity. However, the Tetherin glycosylation pattern has been shown to be different whether it is stably produced by the cell or expressed through transient transfection (26). Thus, the modification in the glycosylation pattern that we observe may be specific to the overexpression system used and not relevant to normal expression conditions. In addition, in a previous study it was shown that Tetherin remains fully able to block viral egress even in the complete absence of glycosylation (26). Therefore, the modification in the migration pattern that we noted is unlikely to account for the observed Tetherin inhibition. As is the case for other described Tetherin antagonists (e.g., Ebola GP [48, 49, 68]), more experiments will be required to understand the mechanism of action used by HERV-K(HML2) Env protein.

In another set of experiments, we measured the anti-Tetherin activity of HERV-K(HML2) Env-Rec and other antagonists against the Tetherin proteins present in several primate species. HERV-K(HML2) Env-Rec and HIV-2 Env both showed a similar broad spectrum of inhibition, being able to antagonize all 6 genes that we tested with the same efficiency, whereas HIV-1 Vpu is more active, but only on a subset of closely related Tetherin genes. Interestingly, all of the genes tested are from species where the HERV-K(HML2) family is present, suggesting that Tetherin inhibition could have been an ancestral property of this family that helped its amplification in the primate lineage. These data also suggest that the very high efficiency of HIV-1 Vpu comes at the cost of a reduced spectrum of action, unlike what is observed with HIV-2 and HERV-K(HML2) Env proteins. Of note, Ebola GP is another Tetherin antagonist that shows a very broad spectrum of action, being able to antagonize human, primate, and murine Tetherin proteins, as well as artificial constructs with no sequence similarity to Tetherin (48, 49), and also is less efficient than HIV-1 Vpu or HIV-2 Env at inhibiting human Tetherin (48).

Finally, we tested all described alleles of intact HERV-K(HML2) envelope proteins for their anti-Tetherin activity. These genes belong to recent proviruses, all of which integrated after the divergence between the human and chimpanzee lineages,

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

and the corresponding proteins are highly conserved (more than 97% sequence identity, i.e., less than 20 amino acid changes between any 2 sequences). We found that the only Env proteins active against Tetherin were the two that were previously shown to have retained their full or nearly complete set of viral properties. In particular, the results obtained for K115 Env (whose expression level and maturation are similar to those of K108 and K109 Env proteins) indicate that the amount and maturation of Env are not the only criteria required for anti-Tetherin activity. Of note, despite its proper expression, maturation, and localization to the membrane, K115 Env is unable to be incorporated onto HIV-1-derived particles, unlike K108 and K109. Thus, anti-Tetherin activity appears to depend on most of the classical properties of retroviral Env proteins. Interestingly, the HERV-K(HML2) consensus Env, which was reconstructed as the theoretical ancestor of human-specific HERV-K(HML2) provirus Env protein (56), seems to be the best protein for all of the properties we assessed, suggesting that the alleles we tested have been degenerating since their integration in the human genome less than 2 mya. However, because the HERV-K(HML2) family was active within the human genome until recently, it is still characterized by a strong polymorphism, both in the insertion sites and in the exact viral sequences present at specific loci. As a result, it is very likely that some people will possess alleles with a strong anti-Tetherin activity, whereas others may have no functional allele in their genome. This could have physiological consequences, as HERV-K(HML2) elements have been shown to be induced in some HIV-1-positive patients (69, 70; reviewed in reference 71). In this case, HERV-K(HML2)-encoded anti-Tetherin activity could add up to that of Vpu in some, but not all, individuals, provided it is expressed at a high enough level. Moreover, Tetherin has been shown to act as an innate immune activator through type I interferons while blocking viral egress, and at least some of its antagonists, as well as being able to restore viral budding, also inhibit Tetherin signaling activity (30, 31). If the latter property is shared by HERV-K(HML2) Env proteins, which will have to be tested, these Env proteins may modulate innate immune responses, and it should be assessed if their specific induction, observed in several pathologies (reviewed in references 71 and 72), could have a causal role.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Clavel (Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France) for the gift of HIV2 ROD10 Env and S. Neil (King's College, London, United Kingdom) for BST2 and Vpu plasmids and his advice concerning available Tetherin antibodies. We also thank G. Cornelis and J. Tsang for helpful discussions and critical readings of the manuscript and S. Souquere for help with the electron microscopy experiments.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée).

REFERENCES

1. Bannert N, Kurth R. 2004. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101(Suppl 2):S14572–S14579. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404838101.
2. Stoye JP. 2012. Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. Nat. Rev. Microbiol. 10:395–406. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2783.
3. Feschotte C, Gilbert C. 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. Nat. Rev. Genet. 13:283–296. http://dx.doi.org/10.1038/nrg3199.
4. Dewannieux M, Heidmann T. 2013. Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. Curr. Opin. Virol. 3:646–656. http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.005.
5. Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. J. Virol. 74:3321–3329. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.7.3321-3329.2000.
6. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, Jr, McCoy JM. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403:785–789. http://dx.doi.org/10.1038/35001608.
7. Blaise S, de Parseval N, Benit L, Heidmann T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:13013–13018. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2132646100.
8. Medstrand P, Mager DL. 1998. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. J. Virol. 72:9782–9787.
9. Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. 2011. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. Retrovirology 8:90. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-90.
10. Magiorkinis G, Belshaw R, Katzourakis A. 2013. "There and back again": revisiting the pathophysiological roles of human endogenous retroviruses in the post-genomic era. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 368:20120504. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0504.
11. Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. Curr. Biol. 11:1531–1535. http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00455-9.
12. Belshaw R, Dawson AL, Woolven-Allen J, Redding J, Burt A, Tristem M. 2005. Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2): implications for present-day activity. J. Virol. 79:12507–12514. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.19.12507-12514.2005.
13. Lower R, Tonjes RR, Korbmacher C, Kurth R, Lower J. 1995. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. J. Virol. 69:141–149.
14. Yang J, Bogerd HP, Peng S, Wiegand H, Truant R, Cullen BR. 1999. An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:13404–13408. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.23.13404.
15. Boller K, Konig H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Lower R, Lower J, Kurth R. 1993. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. Virology 196:349–353. http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1487.
16. Bieda K, Hoffmann A, Boller K. 2001. Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. J. Gen. Virol. 82:591–596.
17. Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Fodinger D, Seppele H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Lower R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K. 2003. An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. Cancer Res. 63:8735–8741.
18. Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. 2005. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. Cancer Res. 65:4172–4180. http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2983.
19. Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T. 2005. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. J. Virol. 79:15573–15577. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.24.15573-15577.2005.
20. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature 451:425–430. http://dx.doi.org/10.1038/nature06553.
21. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, 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. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001.
22. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y, McNatt M, Hatziioannou T, Bieniasz PD. 2009. Broad-spectrum inhibition of ret-

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

roviral and filoviral particle release by tetherin. J. Virol. 83:1837–1844. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02211-08.
23. Neil SJ. 2013. The antiviral activities of tetherin. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 371:67–104. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5_3.
24. Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Schu P, Banting G. 2007. Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. J. Cell Sci. 120:3850–3858. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.003343.
25. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. Traffic 4:694–709. http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00129.x.
26. Andrew AJ, Miyagi E, Kao S, Strebel K. 2009. The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. Retrovirology 6:80. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-6-80.
27. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD. 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. Cell 139:499–511. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.039.
28. Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD. 2007. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. Cell Host Microbe 2:193–203. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.08.001.
29. Liberatore RA, Bieniasz PD. 2011. Tetherin is a key effector of the antiretroviral activity of type I interferon in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108:18097–18101. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113694108.
30. Galao RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ. 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses. Cell Host Microbe 12:633–644. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.007.
31. Tokarev A, Suarez M, Kwan W, Fitzpatrick K, Singh R, Guatelli J. 2013. Stimulation of NF-kappaB activity by the HIV restriction factor BST2. J. Virol. 87:2046–2057. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02272-12.
32. Lim ES, Emerman M. 2009. Simian immunodeficiency virus SIVagm from African green monkeys does not antagonize endogenous levels of African green monkey tetherin/BST-2. J. Virol. 83:11673–11681. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00569-09.
33. Yang SJ, Lopez LA, Hauser H, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM. 2010. Anti-tetherin activities in Vpu-expressing primate lentiviruses. Retrovirology 7:13. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-13.
34. Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, Johnson MC, Munch J, Kirchhoff F, Bieniasz PD, Hatziioannou T. 2009. Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. Cell Host Microbe 6:54–67. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.008.
35. Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, Fofana IB, Johnson WE, Westmoreland S, Evans DT. 2009. Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. PLoS Pathog. 5:e1000429. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000429.
36. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. Cell Host Microbe 6:409–421. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.10.004.
37. Bartee E, McCormack A, Fruh K. 2006. Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators. PLoS Pathog. 2:e107. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020107.
38. Mansouri M, Viswanathan K, Douglas JL, Hines J, Gustin J, Moses AV, Fruh K. 2009. Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. J. Virol. 83:9672–9681. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00597-09.
39. Pardieu C, Vigan R, Wilson SJ, Calvi A, Zang T, Bieniasz P, Kellam P, Towers GJ, Neil SJ. 2010. The RING-CH ligase K5 antagonizes restriction of KSHV and HIV-1 particle release by mediating ubiquitin-dependent endosomal degradation of tetherin. PLoS Pathog. 6:e1000843. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000843.
40. Le Tortorec A, Neil SJ. 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. J. Virol. 83:11966–11978. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01515-09.
41. Gupta RK, Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, Petit SJ, Mattiuzzo G, Pillay D, Takeuchi Y, Marsh M, Towers GJ. 2009. Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:20889–20894. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907075106.
42. Celestino M, Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Chiuppesi F, Pistello M, Borsetti A, Palu G, Parolin C. 2012. Feline tetherin is characterized by a short N-terminal region and is counteracted by the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein. J. Virol. 86:6688–6700. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.07037-11.
43. Dietrich I, McMonagle EL, Petit SJ, Vijayakrishnan S, Logan N, Chan CN, Towers GJ, Hosie MJ, Willett BJ. 2011. Feline tetherin efficiently restricts release of feline immunodeficiency virus but not spreading of infection. J. Virol. 85:5840–5852. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00071-11.
44. Morrison JH, Guevara RB, Marcano A, Saenz DT, Fadel HJ, Rogstad DK, Poeschla EM. 2014. FIV envelope glycoproteins antagonize Tetherin through a distinctive mechanism that requires virion incorporation. J. Virol. 88:3255–3272. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03814-13.
45. Yin X, Hu Z, Gu Q, Wu X, Zheng YH, Wei P, Wang X. 2014. Equine tetherin blocks retrovirus release and its activity is antagonized by equine infectious anemia virus envelope protein. J. Virol. 88:1259–1270. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03148-13.
46. Kaletsky RL, Francica JR, Agrawal-Gamse C, Bates P. 2009. Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:2886–2891. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811014106.
47. Lee YN, Bieniasz PD. 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. PLoS Pathog. 3:e10. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030010.
48. Lopez LA, Yang SJ, Hauser H, Exline CM, Haworth KG, Oldenburg J, Cannon PM. 2010. Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal. J. Virol. 84:7243–7255. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02636-09.
49. Kuhl A, Banning C, Marzi A, Votteler J, Steffen I, Bertram S, Glowacka I, Konrad A, Sturzl M, Guo JT, Schubert U, Feldmann H, Behrens G, Schindler M, Pohlmann S. 2011. The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin. J. Infect. Dis. 204(Suppl 3):S850–S860. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir378.
50. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat. Biotechnol. 15:871–875. http://dx.doi.org/10.1038/nbt0997-871.
51. Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ. 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. Hum. Gene Ther. 13:803–813. http://dx.doi.org/10.1089/10430340252898984.
52. McNatt MW, Zang T, Hatziioannou T, Bartlett M, Fofana IB, Johnson WE, Neil SJ, Bieniasz PD. 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. PLoS Pathog. 5:e1000300. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000300.
53. Sandrin V, Muriaux D, Darlix JL, Cosset FL. 2004. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. J. Virol. 78:7153–7164. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.13.7153-7164.2004.
54. Bour SP, Aberham C, Perrin C, Strebel K. 1999. Lack of effect of cytoplasmic tail truncations on human immunodeficiency virus type 2 ROD env particle release activity. J. Virol. 73:778–782.
55. Vigan R, Neil SJ. 2010. Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. J. Virol. 84:12958–12970. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01699-10.
56. Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. 2006. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. Genome Res. 16:1548–1556. http://dx.doi.org/10.1101/gr.5565706.
57. Lee SW, Kahn ML, Dichek DA. 1992. Expression of an anchored urokinase in the apical endothelial cell membrane. Preservation of enzymatic

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

activity and enhancement of cell surface plasminogen activation. J. Biol. Chem. 267:13020–13027.
58. Ragheb JA, Anderson WF. 1994. Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. J. Virol. 68:3207–3219.
59. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, Cohen EA. 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. PLoS Pathog. 6:e1000856. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000856.
60. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. PLoS Pathog. 5:e1000574. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000574.
61. Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K. 2009. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. J. Biol. Chem. 284:35060–35072. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.058305.
62. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Fruh K, Moses AV. 2009. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. J. Virol. 83:7931–7947. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00242-09.
63. Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC. 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. PLoS Pathog. 5:e1000450. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000450.
64. Andrew AJ, Miyagi E, Strebel K. 2011. Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 Vpu on the stability of BST-2/tetherin. J. Virol. 85:2611–2619. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02080-10.
65. Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, Rupp D, Oberbremer L, Kern C, Tibroni N, Welsch S, Krijnse-Locker J, Banting G, Krausslich HG, Fackler OT, Keppler OT. 2009. HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. Cell Host Microbe 5:285–297. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.009.
66. Gupta RK, Hue S, Schaller T, Verschoor E, Pillay D, Towers GJ. 2009. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. PLoS Pathog. 5:e1000443. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000443.
67. Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli JC, Cannon PM. 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. Retrovirology 7:51. http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-51.
68. Lopez LA, Yang SJ, Exline CM, Rengarajan S, Haworth KG, Cannon PM. 2012. Anti-tetherin activities of HIV-1 Vpu and Ebola virus glycoprotein do not involve removal of tetherin from lipid rafts. J. Virol. 86:5467–5480. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06280-11.
69. Bhardwaj N, Maldarelli F, Mellors J, Coffin JM. 2014. HIV-1 infection leads to increased transcription of HERV-K(HML-2) proviruses in vivo but not to increased virion production. J. Virol. 23:01623–01614. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01623-14.
70. Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Markovitz DM, Lorenzo E, Yamamura Y. 2006. Detection of HERV-K(HML-2) viral RNA in plasma of HIV type 1-infected individuals. AIDS Res. Hum. Retrovir. 22:979–984. http://dx.doi.org/10.1089/aid.2006.22.979.
71. Hohn O, Hanke K, Bannert N. 2013. HERV-K(HML-2), the best preserved family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease. Front. Oncol. 3:246. http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00246.
72. Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. 2008. Endogenous retroviruses and cancer. Cell. Mol. Life Sci. 65:3366–3382. http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8496-1.

Downloaded from http://jvi.asm.org/ on October 31, 2014 by INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

CHAPITRE 2 : La protéine d'enveloppe et ses propriétés oncogéniques

1. Résumé de l'article 2

Le bétarétrovirus HERV-K(HML2) est phylogénétiquement très proche de deux autres bétarétrovirus infectieux, qui présentent également des copies endogènes : JSRV et MMTV, tous deux responsables de tumeurs chez leur hôte (resp. tumeur du poumon chez le mouton et tumeur des glandes mammaires chez la souris). Il a été montré que la protéine d'enveloppe du virus MMTV possède un motif ITAM impliqué dans la pathogénèse *in vivo* du virus (Katz et al., 2005; Ross et al., 2006). Plusieurs études moléculaires ont également révélé que la protéine d'enveloppe de JSRV est directement responsable du développement des tumeurs observées chez le mouton. En particulier, l'expression ectopique de cette protéine induit la transformation de plusieurs lignées cellulaires modèles (e.g. 208F, NIH 3T3, MDCK, cellules épithéliales des bronches BEAS-2B), et de cellules pulmonaires chez la souris *in vivo* (e.g. (Chow et al., 2003; Danilkovitch-Miagkova et al., 2003; Liu and Miller, 2005)). Les voies de transduction du signal impliquées sont diverses et dépendent du modèle cellulaire considéré, mais impliquent à chaque fois la protéine d'enveloppe (revue dans (Hofacre and Fan, 2010)). Dans ce contexte, nous avons décidé de tester l'hypothèse selon laquelle la protéine Env HERV-K(HML2) pouvait elle aussi posséder des propriétés oncogéniques *per se.*

Nous avons dans un premier temps étudié les effets de l'expression de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans un modèle de cellules épithéliales humaines de sein, les cellules MCF10A. Par des tests de migration et d'invasion (tests « Transwell ») à travers une matrice semi-solide (matrigel), nous avons pu montrer que la protéine rétrovirale endogène confère aux cellules une capacité de migration accrue sans les rendre pour autant plus invasives. Les cellules exprimant HERV-K(HML2) Env présentent également des changements morphologiques (leur organisation caractéristique sous forme d'acini est perturbée) qui sont associés à une induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Le programme EMT conduit à la perte de l'identité épithéliale d'une cellule qui prend alors la forme d'une cellule mésenchymateuse. Ce processus comprend différentes caractéristiques, dont la régression des jonctions cellule-cellule, la perte de la polarité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette, le gain de propriétés migratoires et/ou invasives (revue dans (Nieto et al., 2016)). Ces bouleversements phénotypiques se traduisent par des modifications cruciales à l'échelle moléculaires qui sont observées dans les cellules MCF10A exprimant l'enveloppe HERV-K(HML2). En particulier, l'enveloppe rétrovirale induit la diminution du niveau de

cadherin de type E (pour Epithéliale, E-cadh), protéine impliquée dans la formation des jonctions cellules-cellules ; l'augmentation de l'expression de cadherin de type N (N-cadh) ainsi que de protéines du cytosquelette comme la vimentine ou la fibronectine. Quelques facteurs de transcription clé sont également induits ce qui montre que l'EMT est largement activée. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) possède des propriétés oncogéniques.

Pour aller plus loin dans la caractérisation moléculaire des effets de l'Env HERV-K(HML2), nous avons choisi un autre modèle cellulaire non transformé, les 293T, dans lesquelles l'expression par transfection transitoire est aisée. Nous avons dans un premier temps cherché à identifier les effets de l'enveloppe endogène sur le transcriptome des cellules, en réalisant une analyse par puces. Pour cela, nous avons transfecté en duplicat l'enveloppe HERV-K(HML2) (la forme n'exprimant pas la protéine accessoire Rec) ou un contrôle correspondant à un variant de l'enveloppe stoppé juste après la fin du peptide signal, puis extrait les ARN 24 et 48 heures plus tard. A 24h post-transfection, aucun différentiel significatif entre les deux conditions n'est observé, ce qui peut s'expliquer par un faible niveau d'expression protéique à cette date. En revanche, 48 heures après la transfection, la protéine Env HERV-K(HML2) induit fortement plusieurs facteurs de transcription, en particulier EGR1 (Early Growth Response 1) et deux membres de la famille Ets, ETV4 et ETV5 (Ets variant 4/5), dont l'accumulation a été confirmée par RT-PCR quantitative. Ces trois gènes sont particulièrement intéressants car ils sont fréquemment associés à la transformation cellulaire et à la transition épithélio-mésenchymateuse (voir par exemple : (Colas et al., 2012; Pellecchia et al., 2012; Pratilas et al., 2009)). Ils sont également induits transcriptionnellement et activés par la MAP kinase ERK 1/2. Notons que la signature obtenue met également en avant l'activation du transcrit DUSP6 (une MAP kinase phosphatase) qui est un régulateur négatif de la voie des MAP kinases. L'ensemble des données pointent donc vers une activation de la voie des MAP kinases par l'enveloppe HERV-K(HML2), ce que nous avons confirmé, dans notre modèle expérimental (i.e. extractions protéiques à partir de cellules 293T transfectées par différentes enveloppes/protéine contrôle). Il est intéressant de noter que cette voie est décrite comme anormalement induite dans un grand nombre de cancers et en particulier dans la plupart des adénocarcinomes pulmonaires associés à l'enveloppe oncogénique JSRV (De las Heras et al., 2006). Les résultats obtenus renforcent donc la proximité entre les deux bétarétrovirus HERV-K(HML2) et JSRV et indiquent que l'enveloppe humaine pourrait jouer un rôle important dans la carcinogenèse.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la spécificité du phénomène observé et avons pour cela testé un panel d'enveloppe, endogènes et exogènes, appartenant à différents genres rétroviraux (béta-, delta-, gamma- rétrovirus), à la fois pour leur capacité à activer les trois facteurs de transcription EGR1, ETV4 et 5 et à conduire à la phosphorylation de ERK 1/2. De façon intéressante, il apparaît que ces propriétés ne sont partagées que par les deux enveloppes bêtarétrovirales JSRV et HERV-K(HML2). L'expression de l'Env HTLV-1 induit également fortement EGR1 mais il semble que ce soit plutôt le fait de la protéine accessoire Tax - exprimée à partir du vecteur d'expression utilisé – comme le suggèrent certaines données bibliographiques (Fujii et al., 1992).

HERV-K(HML2) est une famille de rétrovirus endogènes ayant la particularité de s'être amplifiée très récemment dans les génomes. Nous avons donc testé les 6 allèles d'enveloppe endogènes spécifiquement humains de la famille, décrits et caractérisés en partie au laboratoire. Parmi ces protéines, quatre (K108, 109, 115, 17833) sont toujours capables d'activer les facteurs de transcription et le module ERK 1/2, à des niveaux néanmoins un peu plus faibles que l'enveloppe consensus. Ces protéines sont toutes correctement exprimées. Certaines sont mêmes fonctionnelles (e.g. K108 est capable de pseudotyper des particules hétérologues) ou quasi-fonctionnelles (e.g. K109).

Afin de mieux comprendre le rôle de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans ces phénomènes de transduction de signaux, nous avons ensuite cherché à identifier les différents domaines de la protéines impliqués. Tout d'abord, la protéine accessoire Rec étant produite à partir d'un épissage alternatif de l'ARNm de l'enveloppe, nous avons voulu déterminer clairement laquelle des deux protéines (Env ou Rec) était responsable des effets observés. Par les mêmes expériences que celles décrites plus haut et en utilisant à la fois un plasmide codant Rec et un plamide permettant l'expression de l'enveloppe *stricto sensu*, nous avons montré que Rec seul ne joue aucun rôle dans l'activation des facteurs de transcription et de la voie des MAP kinases. Ensuite, nous avons étudié les effets de différents mutants de l'enveloppe HERV-K(HML2) : une version délétée de la quasi-totalité de la queue cytoplasmique (mut 1) ainsi que la sous-unité soluble SU (mut 4). Nous avons ainsi pu montrer que la queue cytoplasmique est nécessaire pour médier les effets d'activation décrits plus haut. Aucun motif spécifique (comme par exemple le motif de liaison à la PI3K présent dans la queue cytoplasmique de l'enveloppe JSRV) n'a pour autant été identifié *in silic*o dans ce domaine intra-cytoplasmique, ce qui suggère que l'enveloppe interagit avec un partenaire cellulaire qui permet l'initiation de la transduction du signal et dont l'identité est toujours inconnue à ce jour.

Afin d'avoir une vision plus complète du rôle de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans la signalisation cellulaire nous avons testé sa capacité à activer d'autres grandes voies de signalisation « classiques », en cellules 293T et HeLa. Env HERV-K(HML2), comme Env JSRV activent faiblement la MAP kinase p38, qui a un effet inhibiteur sur la kinase ERK 1/2. Par contre, aucune des deux enveloppes n'induit la voie NF-kB dans ces conditions. Dans de nombreux adénocarcinomes pulmonaires associés à l'Env JSRV, la kinase AKT est activée, en plus de la voie MAPK ERK 1/2. Nous avons confirmé cette donnée dans les cellules HeLa, mais n'avons pu l'étendre à l'enveloppe HERV-K(HML2). Ceci renforce l'importance de la voie des MAP kinase dans les effets cellulaires médiés par l'enveloppe HERV-K(HML2) et confirme aussi que malgré leur très grande proximité, Env HERV-K(HML2) a des propriétés oncogéniques moins larges que l'enveloppe infectieuse JSRV.

Pour préciser les rôle des enveloppes HERV-K(HML2) et JSRV dans l'activation de ERK 1/2, nous avons ensuite cherché à déterminer leur « point d'entrée » dans la voie des MAP kinases. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques, spécifiques de Ras, Raf et MEK 1/2 et mesurer dans ces conditions la capacité des deux enveloppes à activer les facteurs de transcription et la phosphorylation de ERK 1/2. Ces expériences ont mené à la conclusion que Env HERV-K(HML2) et Env JSRV agissent très probablement en aval de Ras mais en amont de la kinase Raf. De façon intéressante, nous avons également mis en évidence l'existence d'une voie d'activation parallèle, spécifique de l'Env HERV-K(HML2) et non décrite à notre connaissance dans la littérature. L'enveloppe endogène humaine est en effet capable d'activer ERK 1/2 par un mécanisme indépendant de MEK 1/2 mais impliquant la kinase Raf.

En conclusion, ces différents résultats nous ont permis de mettre en évidence un rôle oncogénique de l'enveloppe HERV-K(HML2), dont l'association avec certains cancers (e.g. mélanomes, tératocarcinomes, tumeurs du sein) est par ailleurs bien documentée. Nous avons montré que l'enveloppe endogène est capable, comme l'oncogène Env JSRV, d'activer les kinases ERK 1/2 et d'induire plusieurs facteurs de transcription aux effets variés dans les cellules. Les premières étapes qui mènent à l'activation de la transduction de signal ne sont pas encore complètement élucidées mais la mise en œuvre d'un crible double hybride devrait permettre d'identifier des partenaires de l'enveloppe HERV-K(HML2), interagissant spécifiquement avec sa queue cytoplasmique.

2. Article 2 : The HERV-K(HML2) envelope protein possesses oncogenic properties

The HERV-K (HML2) envelope protein possesses oncogenic properties

Cécile Lemaître[1,2,3], Jhen Tsang[1,2], Caroline Bireau[1,2], Thierry Heidmann[1,2] and Marie Dewannieux[1,2]#

[1] CNRS, UMR 9196, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France

[2] Université Paris-Sud, Orsay, 91405, France

[3] Université Paris Denis Diderot, Sorbonne Paris-Cité, 75013 Paris, France

Address correspondence to Marie DEWANNIEUX (marie.dewannieux@igr.fr) or Thierry HEIDMANN (heidmann@igr.fr)

Abstract (250 words)

Endogenous retroviruses (ERVs) are cellular genes of retroviral origin captured by their host during the course of evolution. They represent up to 8% of the human genome. Although most of them are defective and transcriptionally silenced, some are still able to generate viral particles and retroviral proteins. Among those, the human HERV-K(HML2) family is remarkable, since its members have amplified recently and many of them still have full length coding genes. Furthermore, they are induced in cancers, especially in breast, germ cell tumours and melanoma, where viral particles can be detected, as well as their envelope protein (Env). Here, using a consensus element, we show that HERV-K(HML2) Env *per se* displays oncogenic properties. Its expression in an epithelial human breast cancer cell line induces the so-called EMT (epithelial to mesenchymal transition), often associated with tumour aggressiveness and metastasis and typified in our model by enhanced cell migration, changes in cell morphology and key modifications in a set of molecular markers. Remarkably, microarrays performed in 293T cells, reveal that HERV-K(HML2) envelope is a strong inducer of several transcription factors, namely ETV4, ETV5 and EGR1, which are associated with cellular transformation and act downstream of the MAP kinases ERK 1/2. We prove that HERV-K(HML2) envelope effectively induces the MAP kinase pathway in our experimental settings and acts upstream of Raf, via its cytoplasmic tail. In addition, this phenomenon is very specific, being absent with every other Env tested, except for JSRV Env, which is already known to have transforming properties *in vivo*.

Introduction

Retroviruses are responsible for a broad range of diseases in animals and humans, the most common of which is the development of cancers. The mechanisms by which they contribute to the development of these cancers are diverse and include: (i) insertional mutagenesis, due to the activation of cellular proto-oncogenes by newly inserted proviruses, (ii) immunosuppression, linked to the presence of an immunosuppressive domain conserved in most retroviral envelope proteins and (iii) oncogenic activity, with some retroviruses encoding proteins with direct transforming activities that lead to the formation of tumours. Among the latter, Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) is particularly well studied. It is responsible for the development of contagious lung tumours in sheep (reviewed in (1)). The viral envelope protein (Env) has been shown to be responsible for the pathogenesis (2). It is able to transform cell lines (e.g. (3–8)) and induce lung tumour formation in mice (9). The transforming pathways involved are many, and depend on the direct action of Env itself, as well as on the Env-receptor interaction (reviewed in (1)).

Endogenous retroviruses (ERVs) are the remnants of past retroviral infections, which have been captured by the host during the course of evolution. They occupy 8% of the human genome. ERVs are similar to the proviral forms of integrated retroviruses from which they derive, and thus are expected to have similar properties. Whilst most ERVs are defective and have degenerated over time, others have retained some or all of their open reading frames (ORFs) and can encode potentially pathogenic viral proteins (reviewed in (10–14)). These elements are normally suppressed in healthy tissues but expression of ERVs has been reported in animal and human cancers (reviewed in (15–18)). In humans, the HERV-K (HML2) family (thereafter shortened to HERV-K) is remarkable in that it has recently amplified in the genome and many of its ORFs are intact, making it the largest contributor of retroviral-derived proteins of the genome (reviewed in (19)). The expression of the associated proteins and viral particles has been detected in cell lines. Several groups have reported the expression of HERV-K in human cancers, including melanomas, breast and ovarian cancers (e.g. (20–23)). This association has been mostly investigated in melanoma and melanoma derived cell lines. For example it has been shown that downregulation of HERV-K envelope glycoprotein by siRNA decreases the tumorigenic potential of the A-375 cell line (24) and that HERV-K Env expression in the TVMA-12 cell line is necessary for the transition from a adherent to a non-adherent phenotype (25).

In this study, we characterise further the mechanisms of HERV-K envelope glycoprotein involvement in human cancers. We demonstrate that it is an inducer of epithelial to mesenchymal transition (EMT) and that its expression leads to an increase in cell

migration and substrate-independent growth. We also show that HERV-K envelope is an activator of the MAP kinase pathway and promotes the expression of a subset of transcription factors involved in oncogenesis.

Material and methods

Plasmids

HIV-1 derived particles were produced using plasmids 8.91 (26), phCMV-VSV-G (GenBank accession no AJ318514) and a modified CSGW (27) expressing HERV-K envelope or control proteins and the hygromycin resistance gene under a second promoter.

pBabe-H-Ras^{G12V} was kindly gifted by A. Puisieux and expresses a constitutively activated form of H-Ras.

CMV-driven mammalian expression vectors for Ampho, IAPE, RD114, GaLV and FeLV envelope proteins have been described previously (resp. in (28–32)). phCMV-JSRV Env was constructed by replacing the G protein ORF in phCMV-VSV-G with the JSRV Env ORF (followed by the 3' viral LTR) present in the pCMV3JS21ΔGP (gift from M. Palmarini, described in (6)). Similarly, phCMV-MMTV Env was generated by extracting the MMTV Env ORF (with the 3' viral LTR) from the pEnv vector (gift from S. Ross, described in (33)) and inserting it into the phCMV vector. HTLV-1 Env was expressed from a previously described CMV-based vector (gift from C. Pique, described in (34)). phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec, phCMV-HERV-K(HML2) Env, phCMV-Rec, phCMV-HERV-K(HML2) Env-Rec mut1 and mut4 and the expression vectors for the endogenous alleles K108, K109, K113, K115, K17833, K74261 have been described elsewhere (28,35). For microarray experiments, the control plasmid, phCMV-HERV-K(HML2) Env-LP was derived from phCMV-HERV-K(HML2) Env by changing aa 103 and 104 into stop codons (from nucleotide 6757 of the HERV-K consensus provirus sequence provided in (36), modified nucleotides are shown in uppercase : tactgg to taAtgA). pCMV-ß (Clontech) is an expression vector for beta-galactosidase. It was used as a control vector and designated "None" in the figures. It was also used to adjust total DNA content in transfection experiments. All plasmids were sequence verified before use.

Cell culture, lentiviral vector production and generation of stable populations

293T and HeLa cells were maintained at 37°C, 8% CO2, in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 u/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all reagents are from Life Technology). MCF10A cells (ATCC, CRL-10317) were cultured at 37°C, 10% CO2, in DMEM:F12 medium (Life technology) supplemented with 5% horse serum (Gibco), 5 ng/mL EGF (Peprotech), 10 µg/mL insulin (Sigma), 1 ng/mL cholera toxin (Sigma), 100 µg/mL hydrocortisone (Sigma), 100 u/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

Lentiviral vectors for expression of HERV-K(HML2) envelope glycoprotein were produced by transfecting 293T cells ($3x10^6$ per 10 cm dish) with 2 µg 8.91, 3 µg lentiviral vector, 0.7 µg

phCMV-VSV-G using 11.4 µL JetPrime (PolyPlus Transfection). Cell media were replaced 18h post transfection. Day 3, supernatants were collected, filtered (0.45 µm) and used for transducing cells. Target cells (MCF10A) were infected with supernatants for 12 h after which medium was changed. Two days after transduction, cells were re-plated to obtain 50% confluency the day after, when Hygromycin B (from Calbiochem) was added (46 u/mL for MCF10A). The selection media were changed every 2-3 days until populations of resistant cells were obtained, and cells were passaged and maintained in selection media thereafter.

Signalling experiments

Cells (80% confluence on the day of transfection) were transfected using 250 ng total DNA per well of 12-well plate (50 or 30 ng of Env or control plasmids in 293T and HeLa cells respectively, supplemented with 200 ng of pCMV-ß control plasmid) and 1.25 µL of Fugene 6 (Promega). Cell media was replaced 18 hours post-transfection with fresh complete DMEM for 293T and serum-free media for HeLa cells to minimize background. For some experiments inhibitors (FTI-277 (5 µM, Sigma), TAK-632 (10 µM, Selleckchem), U0126 (5 µM, Cell Signaling) and PD98059 (10 µM, Sigma)) were added when the medium was changed after transfection and maintained until the samples were processed. TNFalpha (100 ng/µL, RD System) was used as a positive control. 48 hours post-transfection cells were either prepared for protein or RNA extraction (described in the following section). For Western blot analysis, cells were lysed 45 min at 4°C in PBS, 1% NP40 or RIPA (Life Technology) containing phosphatase and protease inhibitors (Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail 100X, ThermoScientific). Cell debris was removed by a 15 min centrifugation step (4°C, 12,000 rpm). Cell lysates were then subjected to SDS-PAGE under reducing conditions with NuPAGE system (Life Technology, using precast Novex 4–12% Bis-Tris gels) and transferred onto nitrocellulose membranes with a semi-dry system. Phosphorylated and non-phosphorylated proteins were detected using rabbit monoclonal antibodies from Cell Signalling according to manufacturer instructions: p44/42 MAPK (4695S), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (4370S), p38 MAPK (8690S), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (4511S), Akt (pan) (4691S) and phospho-Akt (S473) (4060S). Other primary antibodies were used to detect IKBalpha (Cell Signalling, 4814S), HERV-K(HML2) envelope protein (2 µg/mL, (35)) or Tubulin (Sigma, T5326). HRP-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare) and ECL Plus Reagent (GE Healthcare) were used for Western blots. In some cases, membranes were stripped with the ReBlot Plus reagent from Merck Millipore to reprobe with other primary antibodies.

RNA isolation, qRT-PCR, gene expression profiling

Total RNA were extracted with the RNeasy extraction kit (Qiagen) and treated with DNase I (Ambion). For microarray experiments, we compared duplicates of RNA recovered 24 and 48 hours post transfection of 293T with either HERV-K(HML2) Env or the control plasmid, HERV-K(HML2) Env-LP. Gene expression analysis was performed with Agilent® SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies, AMADID 39494) according to the manufacturer's protocol. Data were then extracted from scanned images using Feature Extraction software (v10.5.1.1; Agilent technologies) and normalized using an empirical Bayes method. The top-ranked genes were selected with the following criteria: an absolute fold-change ≥ 2 and an adjusted p-value (FDR) < 0.05.

For real-time quantitative RT-PCR, RT was performed with 1 µg of DNase-treated RNA using the MLV reverse-transcriptase (Applied Biosystems). Quantitative PCR was done with 5 µL of a 1/15 dilution of the cDNA in a final volume of 25 µL, by using SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). PCR was carried out with an ABI PRISM 7000 sequence detection system. The efficacy of the PCR reaction was checked for each primer pair (see Table 1 for sequence of the primers) preparing serial dilutions of a reference sample, and found to be more than 90%. The transcript levels were normalized relative to the amount of RPLO transcripts employing the ΔΔCt method. Samples were assayed in duplicate.

Transwell migration and invasion assays

For the migration assay, MCF10A cells were trypsinised, washed and resuspended in DMEM:F12 media without serum or additional additives. $5x10^4$ cells in 500 µL were seeded into the top of each transwell insert (Corning, 24 well inserts, 8 µm pore), and 750 µL of normal culture medium was added to the bottom of each chamber to act as a chemoattractant.

The plates were incubated for 22 hours before the non-migratory cells in the top of the insert were removed and the membrane fixed with methanol. The membranes were removed from the inserts and stained with DAPI and the migrated cells were observed under a fluorescent microscope and counted.

Invasion assays were performed in the same way except transwell inserts were precoated with 16 µg of Matrigel (Corning).

Results

HERV-K(HML2) Env induces EMT in MCF10A breast cell line

As mentioned in the introduction, HERV-K envelope glycoprotein specific expression has been reported in several human cancers, most often in melanoma and breast cancer patients. Breast cancer is the most common cancer in females worldwide, corresponding to approximately 25% of total cases in this population. In order to investigate the consequences of HERV-K Env expression in a model relevant to human health, we decided to use the MCF10A cell line that is derived from non-transformed breast epithelium and is widely used as a model cell line allowing to study the process of oncogenesis (e.g. (37,38)). These cells were transduced with lentiviral vectors to allow stable long-term expression of the HERV-K Env. In parallel, control populations were generated using an empty vector, as well as one encoding the retroviral envelope of the amphotropic murine leukemia virus (MLV Ampho env), devoid of any described oncogenic properties. After selection for the presence of the lentiviral vector, the populations were tested by quantitative RT-PCR using primers placed in a region common to all 3 vectors (ie WPRE), and were found to express similar levels of lentiviral transcripts. The HERV-K Env population alone was also found to express HERV-K env transcripts at high level, and as expected, we also detected expression of rec transcripts that are produced from the Env construct through internal splicing (not shown). HERV-K Env protein was also detected specifically in the expected cell population both by Western blot and immunofluorescence (not shown). Interestingly, the HERV-K Env cell populations displayed an altered morphology as compared with the controls, and lost their typical acinus organisation, becoming more rounded and dispersed in the plate, a phenotype reminiscent of that observed on cells treated with TGF-ß (not shown). TGF-ß is known as an inducer of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in MCF10A cells. EMT is a process during which cells change their identity, and is important both in normal development and in metastasis and cancer progression in epithelial cells. EMT includes loss of cell polarity and cell-cell adhesion. It is characterized, at molecular levels, by a decrease of E-cadherin (E-cadh) and an increase of N-cadherin (N-cadh) expressions associated with an upregulation of extracellular matrix components (fibronectin) and a dysregulation of a few key transcription factors (mainly Snail, Snai2, Zeb1, Zeb2) (reviewed in (39)). We performed a molecular characterisation of these markers in the different cell populations by qRT-PCR. As expected, MCF10A cells treated 48 hours with TGF-ß showed an increase of the expression of the mesenchymal markers vimentin, fibronectin, and N-cadh (Fig. 1A). Some EMT-associated transcription factors were also induced, in particular Snail. Interestingly, HERV-K(HML2) Env,

but not the control proteins, also promoted modifications of the expression of EMT-associated genes. In particular, vimentin, fibronectin, and N-cadh levels were increased and E-cadh level was strongly diminished. Concerning the EMT-related transcription factors, the observed pattern was different from that observed with the TGF-ß treated cells, with Zeb2 and to a lesser extent Zeb1 being the genes mostly induced. We also tested the different populations for changes in their motility properties using Transwell assays. As shown in Fig. 1B, the HERV-K Env expressing populations displayed an increase in cell migration as compared to the control, whereas cell invasion capacity was left unchanged, unlike the TGF-ß treated cells which showed an increase in both migration and invasion. Altogether the data obtained with the MCF10A cells indicate that HERV-K Env possesses oncogenic properties, and modifies the cell physiology to induce a process related to, but not identical to TGF-ß induced EMT.

HERV-K(HML2) Env induces the expression of oncogenic transcription factors

In order to go further in the characterisation of HERV-K Env effects on cell physiology, we decided to use another cell line, namely the embryonic kidney 293T cells, which are also of human epithelial origin but are easier to handle and more suitable for short term experiments. First, we searched for genes whose expression is modified by HERV-K Env expression using a non-biaised transcriptomic approach using microarrays. 293T cells were transiently transfected in duplicates with either a vector expressing the HERV-K Env or a control plasmid (HERV-K Env-LP), under conditions adjusted to minimise cell toxicity (Fig. 2A). Of note, the two expression vectors are identical except for 6759 and 6762 nt that introduce premature stop codons (cf. plasmids section in material and methods), leading to the production of a much shorter protein (102 aa instead of 699) with the control vector. This was done to rule out any effect that could have been mediated by the Env RNA instead of the protein. The expression profile of the cells transfected with HERV-K Env or control plasmids were compared 24h and 48h post transfection. Only those genes with statistically significant changes in expression (2-fold or greater, increase or decrease) were selected for further analysis. At 24 hours post-transfection, no variation between the 2 conditions was observed, probably due to very low protein expression levels at this time point. At 48 hours, 86 genes with modified expression levels were found (69 down-regulated, 17 up-regulated by HERV-K Env expression). After manual checking, the seemingly down-regulated genes correspond in fact to genes induced by the transfection itself (increased for both cell populations between 24h and 48h), but that were, for unknown reasons, less induced in the HERV-K Env cells than in the control cells. For this reason, the expression change of these genes was thought to be likely artifactual and they were dismissed from further investigation.

Within the limited number of upregulated genes we identified (Fig. 2B), there was a strong excess of transcription factors (7 of of 17, with 5 in the top 6 most upregulated genes). Interestingly, among those, EGR1, ETV4, ETV5 and FosB have been associated with EMT and tumour aggressiveness in several cancers (see (40–44)), whereas ZCCHC12 is poorly documented (45). We designed primers specific for the top 5 genes of the list in order to verify the microarray data on the same samples. As shown in Fig. 2C, qRT-PCR confirmed the increased expression of the 4 transcription factors (EGR1, ZCCHC12, ETV4 and ETV5) by HERV-K Env, with fold induction slightly higher than measured with the microarray (6-10 fold induction vs 3-7 fold). Concerning the only non transcription factor gene, cytochrome b5 reductase, the qRT-PCR (not shown) confirmed the induction but also indicated that the basal expression level was negligible, questioning the relevance of the observed limited induction.

HERV-K(HML2) Env activates the MAP kinases ERK 1/2, like the oncogene JSRV Env

Looking into more details, we noticed that the majority of genes activated by HERV-K Env are involved in the MAP kinase pathway (Fig. 3A). Indeed, EGR1, ETV4, ETV5 and FosB are direct targets of the MAP kinase ERK 1/2. DUSP6, also present in the list of the induced genes but with a lesser induction fold, is a secondary target involved in the negative retrocontrol of the pathway, being a negative regulator of ERK 1/2. This strongly suggested that HERV-K Env is an inducer of the ERK 1/2 pathway. We tested this hypothesis by assessing the phosphorylation (i.e. activation) of the MAPK ERK 1/2 following transient transfection of 293T cells (Fig. 3B). As shown in the figure, cells transfected with the expression vector for HERV-K Env show a marked signal for phospho-ERK 1/2, unlike cells transfected with control plasmids (encoding ß-galadosidase or the non-transforming MLV ampho Env), while total amounts of ERK 1/2 (i.e. phosphorylated and non-phosphorylated forms) are similar with all plasmids.

We then investigated the specificity of this phenomenon. We transfected a panel of retroviral Env encompassing several genera (Fig 4A). deltaretroviruses in yellow, betaretroviruses in red and gammaretroviruses in blue) in 293T cells and tested both the expression of the transcription factors EGR1, ETV4 and ETV5 and the phosphorylation of ERK 1/2. As shown in Fig. 4B and 4C, no other retroviral Env proved to be able to induce both ERK 1/2 phosphorylation and transcription factors expression, except JSRV Env (whose effect is in fact stronger than that of HERV-K Env). Quite remarkably, JSRV Env ability to activate ERK 1/2 has been described in other cellular models and has been linked to its strong oncogenic effect (46–48). This similarity is suggestive of oncogenic properties carried by HERV-K Env. Of note, the closely related MMTV Env was unable to activate the MAPK pathway even when

higher doses of expression vector were transfected (same negative result with 10 times more plasmid, data not shown), indicating that the ability to activate the ERK 1/2 pathway is not a general property of betaretroviral Env proteins. Finally, EGR1 -but not ETV4 and ETV5- was also induced by the deltaretroviral HTLV-1 Env, which is consistent with previous data reporting the transactivation of EGR1 promoter by the accessory protein Tax (49) (also produced from the HTLV-1 Env expression vector, see material and methods). Accordingly, HTLV-1 Env does not induce the phosphorylation of ERK 1/2.

Several present-day alleles of HERV-K(HML2) Env induce signal transduction

All the experiments described above have been performed with a consensus HERV-K Env, which corresponds to the protein present in the progenitor virus responsible for the insertion of all modern HERV-K proviruses. This protein is commonly used to investigate the properties of HERV-K Env since it represents the ancestral, fully functional form of the protein, before mutations could accumulate. In order to assess the relevance of our observations to modern-day people, we decided to test the six previously described natural "alleles" for HERV-K(HML2) Env present in human genomes for the same properties. As shown in Fig. 5A and 5B, four out of these six "alleles", namely K108, K109, K115, K17833, were able to induce the three transcription factors and the phosphorylation of ERK 1/2. K108, K109 and K17833 correspond to the 3 most functional HERV-K Env proteins when tested for other classical virological properties (Fig. 5C) and were also the most active in our assay, suggesting that the ability of the endogenous envelopes to activate the signalling pathway is linked to the canonical properties of the infectious retrovirus.

Identification of the domains in HERV-K(HML2) Env required to mediate signal transduction

As mentioned earlier and presented on Fig. 6A, two proteins are produced from the HERV-K Env plasmid: the envelope glycoprotein and the accessory protein Rec. The latter consists of 2 exons and is completely contained within the env gene. We thus wanted to ascertain which of these two proteins mediates the effects seen in the first figures. For that purpose, we used two previously described vectors (28): one containing the Rec ORF alone, and the other driving the expression of HERV-K Env without Rec (through silent point mutations targeting the splicing sites). As shown in Fig. 6B and 6C, the expression of the Rec protein had no effect on the induction of the transcription factors or on the phosphorylation of ERK 1/2, whereas the envelope alone was as efficient as the consensus Env to activate signal transduction.

We then set about mapping the domains in HERV-K Env that are required for triggering cell signalling. These mutants (Fig. 7A) were previously described (28) and were tested as described above. As shown in Fig. 7B and 7C, the soluble SU (mut 4) has completely lost the ability to induce the expression of the transcription factors or the phosphorylation of ERK 1/2, indicating that the TM moiety of Env is required for these effects. Concerning the HERV-K Env deleted of its cytoplasmic tail (mut 1), it shows some activity, but with a markedly decreased efficiency. The cytoplasmic tail is therefore important for the activation of the ERK 1/2 pathway, either directly or through modification of the intracellular localisation of HERV-K Env, but other domains are also involved.

HERV-K(HML2) Env and other important cell signalling pathways

HERV-K Env being unambiguously able to activate ERK 1/2, we also tested it for potential effects on other cell signalling networks (Fig. 8A). As shown in Fig. 8B, HERV-K Env induces a weak phosphorylation of p38. p38 is another MAP kinase, often involved in the negative regulation of the ERK 1/2 pathway (reviewed in (50)). Its phosphorylation, observed for both HERV-K Env and JSRV Env, is therefore likely to be part of the secondary responses of the ERK 1/2 phosphorylation, and not a direct effect. Of note, this activation has been already documented for JSRV Env in other systems and showed to have an inhibitory effect on the MAPK kinase MEK 1/2 (and therefore ERK 1/2) (46). We also tested the transfected cells for activation of NFkB, often implicated in transformation and response to inflammation, using the degradation of IkBalpha as a sign of activation of the pathway. None of the plasmids that we tested had any effect on IkBalpha levels, whereas treatment of the cells with TNFalpha caused a rapid degradation of of IkBalpha. HERV-K Env therefore does not modify cell physiology through the NFkB pathway. Finally, we also tested the ability of HERV-K Env to activate the PI3K/AKT pathway, previously shown to be important for JSRV Env mediated transformation in several cellular models (e.g. (5,7,51–54)). For this, we measured the phosphorylation level of the kinase AKT. Preliminary experiments having shown that AKT is constitutively phosphorylated in 293T cells, whatever the culture conditions, we therefore transfected the different Env expression vectors to be tested into HeLa cells. As shown in Fig. 8C, HERV-K Env has no effect on the phosphorylation state of AKT, whereas JSRV activated it strongly, in agreement with previously published results.

Mechanistic aspects of the activation of the MAP kinase pathway mediated by HERV-K(HML2) Env

Finally, we used a series of specific inhibitors in order to further characterise where HERV-K Env acts in the MAPK pathway. Briefly, 293T cells were transfected with expression vectors

for HERV-K Env, JRSV Env or control proteins, and treated with each inhibitor individually before the expression of the proteins started (Fig. 9A). Cell lysates were collected 48h post transfection to measure the expression levels of the transcription factors and ERK 1/2 phosphorylation state. First, we used FTI-277 that targets H and N Ras (but not K Ras) (Fig. 9A). As showed in Fig. 9B and 9C, its presence did not affect the activation of ERK 1/2 mediated by HERV-K Env or JSRV Env, as measured by Western blot, and the transcript levels of the transcription factors. This inhibitor efficiently suppressed the phosphorylation of ERK 1/2 induced by the transfection of a mutated constitutively active H-Ras, indicating that it worked as expected in our system. This suggests that either the two betaretroviral envelope proteins act downstream of Ras or that they activate another form of Ras (e.g. K-Ras). Using TAK632, a recently described potent pan-Raf inhibitor, the situation was different. When added to the cells (Fig. 9B and 9C), it completely abolished signal transduction through both JSRV and HERV-K Envs, indicating that the two glycoproteins act upstream of the kinase Raf. Finally, U0126 impaired the activation of signal transduction mediated by JSRV env (Fig. 9B and 9C). Surprisingly, when this inhibitor was added to HERV-K Env expressing cells, we obtained an intermediate phenotype. A residual phosphorylation of ERK 1/2 remained and the 3 transcription factors accumulated at a level lower than in the absence of inhibitor, but significantly higher than in cells transfected with a control protein. Of note, we obtained nearly identical results for both JSRV and HERV-K Envs using PD98059, another independent inhibitor that also targets MEK 1/2 (not shown).

Discussion

In this paper, we report pro-oncogenic properties possessed by the envelope protein of the HERV-K (HML2) family of endogenous retroviruses and initiate the characterisation of their mechanism of action. Using the MCF10A model cell line, we demonstrated that the stable expression of the Env protein, at a high but physiologically relevant level, induces clear changes in the pattern of the EMT-associated genes towards a more mesenchymal phenotype, with the cell morphology altered accordingly. Remarkably, these changes are accompanied by an increase in the motility of the cells expressing HERV-K Env as measured using a Transwell assay. The modification of the attachment proteins we observed is similar to that obtained after treatment with TGFß, but the transcription factors that are induced are different. A number of different transcription factors have been associated with EMT, and this generic term in fact covers several processes that can occur in different circumstances, either in normal development or in the course of disease (reviewed in (39)). Accordingly, the phenotypic consequences of HERV-K Env expression and TGFß treatment are also different, with the latter inducing an increase in both migration and invasion whereas HERV-K Env only enhances cell migration in our conditions. Previous studies had already hinted at oncogenic properties for HERV-K Env, but it had only been shown that this Env protein can alter the phenotype of pre- transformed, cancer-derived cell lines (24,25) whereas we demonstrate here that it can also direct non-malignant cells in the path towards transformation. Given the change of the EMT markers and cell motility observed, it seems very likely that HERV-K Env expression by a tumour or a pre-tumour could trigger further changes and favour metastasis.

We then switched model to tentatively characterise the molecular mechanisms affected by HERV-K Env ectopic expression. Using microarrays, we identified a very limited number of genes whose expression is induced following HERV-K Env transfection. We showed that the induction of these genes is the consequence of an activation of the ERK 1/2 pathway in cells following HERV-K Env expression. Most of the identified genes are transcription factors that have already been associated with cell transformation and cancer. In fact, the list of the induced genes is remarkably similar to that observed in tumours mutated in BRAF (55). Activating mutations in BRAF have been reported in several tumours, but are particularly common in melanomas (reviewed in (56)). Specific inhibitors of the mutated BRAF have been developed and used to treat patients. They cause a dramatic improvement in the conditions of the patients for up to 6 months, until a relapse when tumours develope resistance to the treatment (reviewed in (57)). HERV-K Env expression in melanomas has been reported by several independent groups (21,58–62). It is possible that HERV-K Env

induced ERK 1/2 activation could be part of the escape mechanisms used by the tumours to escape the treatment against mutated BRAF and re-activate the ERK 1/2 pathway.

We demonstrated activation of the ERK 1/2 pathway using a consensus HERV-K Env that displays higher efficiency than present-day alleles for most canonical virological properties. However, when tested under the same conditions, we found that 4 out of the 6 full-length classically characterised “alleles” of HERV-K are nearly as strong inducers of the ERK 1/2 pathway as the consensus Env, giving credence to a possible role of the endogenous HERV-K proviruses in the development of tumours. It is also noteworthy that the effect of these alleles could be additive when HERV-K expression is due to a general regulation through the LTRs (eg the reported induction by MITF in melanoma), and all proviruses are expressed simultaneously, instead of a locus-specific expression. Remarkably, none of the other retroviral Env proteins that we tested has the capacity to activate ERK 1/2 except for JSRV Env, which is known to be a strong oncogene in several models. Furthermore, the oncogenic activity of JSRV Env has been linked to ERK 1/2 activation in at least some of the models (46,48), supporting once again a role for HERV-K Env in tumour development. The effects observed with JSRV Env (fold induction of the transcription factors, intensity of ERK 1/2 phosphorylation) are admittedly stronger than that observed with HERV-K Env. However, it should be noted that the JSRV Env used in this study is that encoded by the infectious strain of the virus, whereas no transforming effect has ever been reported for the endogenous copies of Env. It is not surprising that a gene showing such deleterious effects to the host should be lost very quickly following endogeneisation. Indeed it is quite remarkable that the HERV-K family, which entered the primate lineage more than 40 million years ago, could have conserved some oncogenic properties for so long, even if these properties are slightly subdued. It is possible that the last amplification of HERV-K elements in the human genomes is the product of a horizontal transmission of an infectious virus that would have remained active in other primate species, instead of the re-activation of previously dormant proviruses. Indeed it would be less unexpected for an exogenous, infectious virus to conserve such oncogenic properties that could play an important role in its propagation (e.g. JSRV).

Finally, we used previously generated mutant forms of HERV-K Env to map the domains responsible for ERK 1/2 activation. These experiments indicate that the TM subunit of Env is required for this activity, and the cytoplasmic tail plays an important role, even if there is still some ERK 1/2 activation when it is deleted. It is therefore likely that several domains of HERV-K Env cooperate for its oncogenic properties, as demonstrated for JSRV Env for which both SU and TM are involved in the transformation process, the relative importance of each subunit depending on the model studied (reviewed in (63)). Concerning JSRV Env, several intracellular interacting proteins expected to be involved in the transformation have been reported recently (64,65). In particular, RALPB1 is potentially linked to the ERK 1/2

pathway in the literature. However it is probably not relevant to HERV-K Env effect since, in this study (64), it was shown to be involved in activation of the Akt pathway by JSRV Env, a property that HERV-K Env does not possess. In addition, the interacting domain is the cytoplasmic tail of the Env, a region of the protein where JSRV and HERV-K Envs show no homology at all. We failed to identify any functional motif in the sequence of HERV-K Env cytoplasmic tail, and cannot therefore propose a likely mechanism of action. A possibility is that this domain may act by directly interacting with intracellular proteins, leading to ERK 1/2 activation. It could instead simply modify the intracellular localisation of the Env, placing it in a compartment where its co-effectors are present. If so, the elucidation of the cellular proteins interacting with HERV-K Env cytoplasmic tail could lead to the development of specific inhibitors able to block its oncogenic properties, and could be of therapeutic interest in tumours where HERV-K Env is expressed, providing alternative treatments when standard chemotherapy fails.

Acknowledgements

We would like to thank A. Puisieux, M. Palmarini, C. Pique, S. Ross for their gift of plasmids. We also thank P. Dessen and the bioinformatics core facility and J. Raingeaud for helpful discussions. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée) and Fondation pour la Rercherche Scientifique (FRM).

References

1. Hofacre A, Fan H. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. Viruses. 2010. page 2618–48.
2. Caporale M, Cousens C, Centorame P, Pinoni C, De las Heras M, Palmarini M. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. J Virol. 2006;80:8030–7.
3. Danilkovitch-Miagkova A, Duh F-M, Kuzmin I, Angeloni D, Liu S-L, Miller a D, et al. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003;100:4580–5. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
4. Hofacre A, Fan H. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. J Virol [Internet]. 2004;78:10479–89. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=516437&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
5. Liu S-L, Miller AD. Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. J. Virol. 2005. page 927–33.
6. Maeda N, Palmarini M, Murgia C, Fan H. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2001;98:4449–54. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=31855&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
7. Zavala G, Pretto C, Chow YHJ, Jones L, Alberti A, Grego E, et al. Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology. 2003;312:95–105.
8. Allen TE, Sherrill KJ, Crispell SM, Perrott MR, Carlson JO, DeMartini JC. The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. J Gen Virol. 2002;83:2733–42.
9. Wootton SK, Halbert CL, Miller AD. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. Nature [Internet]. 2005;434:904–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829964
10. Mager DL, Stoye JP. Mammalian Endogenous Retroviruses. Microbiol Spectr [Internet]. 2015;3:MDNA3–0009 – 2014. Available from: http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014
11. Dewannieux M, Heidmann T. Endogenous retroviruses: Acquisition, amplification and taming of genome invaders. Curr Opin Virol [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;3:646–56. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.005
12. Stoye JP. Endogenous retroviruses: Still active after all these years? Curr. Biol. 2001.
13. Stoye JP. Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2012;10:395–406. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2783
14. Feschotte C, Gilbert C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. Nat Rev Genet [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;13:283–96. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrg3199
15. Young GR, Stoye JP, Kassiotis G. Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis. Bioessays [Internet]. 2013;35:794–803. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864388
16. Weiss RA. Human endogenous retroviruses: friend or foe? Apmis [Internet]. 2016;124:4–10. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12476

17. Magiorkinis G, Belshaw R, Katzourakis A. “There and back again”: revisiting the pathophysiological roles of human endogenous retroviruses in the post-genomic era. Philos Trans R Soc B Biol Sci [Internet]. 2013;368:20120504–20120504. Available from: http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1626/20120504.short\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3758188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract\nhttp://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2012.0504
18. Dudley JP, Mertz JA, Bhadra S, Palmarini M, Kozak CA. Endogenous retroviruses and cancer. Retroviruses Insights into Cancer. 2011. page 119–62.
19. Hanke K, Hohn O, Bannert N. HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep. Apmis [Internet]. 2016;124:67–87. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12475
20. Buscher K. Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. Cancer Res. 2005;65:4172–80.
21. Büscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Ozel M, Sterry W, et al. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. Melanoma Res [Internet]. 2006;16:223–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16718269\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16718269?dopt=AbstractPlus
22. Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycaj K, Plummer JB, Yan P, Sastry KJ, et al. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. Cancer Res. 2008;68:5869–77.
23. Wang-Johanning F, Liu J, Rycaj K, Huang M, Tsai K, Rosen DG, et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. Int J Cancer. 2007;120:81–90.
24. Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog G V, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. Oncogene. 2007;26:4226–33.
25. Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Moroni G, Oricchio E, et al. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. Exp Cell Res. 2009;315:849–62.
26. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat Biotechnol [Internet]. 1997;15:871–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nbt0997-871
27. Perro M, Tsang J, Xue S, Escors D, Cesco-Gaspere M, Pospori C, et al. Generation of multi-functional antigen-specific human T-cells by lentiviral TCR gene transfer. Gene Ther [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;17:721–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164855
28. Lemaître C, Harper F, Pierron G, Heidmann T, Dewannieux M. The HERV-K human endogenous retrovirus envelope protein antagonizes Tetherin antiviral activity. J Virol [Internet]. 2014;88:13626–37. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4248984&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
29. Ribet D, Harper F, Dupressoir A, Dewannieux M, Pierron G, Heidmann T. An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: Emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus. Genome Res. 2008;18:597–609.
30. Sandrin V, Muriaux D, Darlix J-L, Cosset F-L. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. J Virol. 2004;78:7153–64.
31. Dewannieux M, Collins MK. Spontaneous heteromerization of gammaretrovirus envelope proteins: a possible novel mechanism of retrovirus restriction. J Virol [Internet]. 2008;82:9789–94. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2546955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

32. Schlecht-Louf G, Renard M, Mangeney M, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, et al. Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:3782–7.
33. Golovkina TVT V., Dzuris J, Van Den Hoogen B, Jaffe ABAB, Wright PCPC, Cofer SMSM, et al. A novel membrane protein is a mouse mammary tumor virus receptor. JVirol. 1998;72:3066–71.
34. Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Dokhelar MC. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. J Virol. 1997;71:259–66.
35. Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. J Virol [Internet]. 2005;79:15573–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306628\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1315997
36. Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, et al. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. Genome Res. 2006;16:1548–56.
37. Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, Muthuswamy SK, et al. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:1257–62.
38. Xian W, Pappas L, Pandya D, Selfors LM, Derksen PW, De Bruin M, et al. Fibroblast growth factor receptor 1-Transformed mammary epithelial cells are dependent on RSK activity for growth and survival. Cancer Res. 2009;69:2244–51.
39. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. Cell [Internet]. 2016;166:21–45. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416307966
40. Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2012;1826:1–12.
41. Colas E, Colas E, Muinelo-Romay L, Muinelo-Romay L, alonso-Alconada L, alonso-Alconada L, et al. ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. Oncogene [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;31:4778–88. Available from: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22266854&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers2://publication/doi/10.1038/onc.2011.632
42. Abal M. ETV5 transcription program links BDNF and promotion of EMT at invasive front of endometrial carcinomas. Carcinogenesis. 2014;35:2679–86.
43. Pellecchia A, Pescucci C, De Lorenzo E, Luceri C, Passaro N, Sica M, et al. Overexpression of ETV4 is oncogenic in prostate cells through promotion of both cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition. Oncogenesis [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;1:e20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23552736
44. Adamson ED, Mercola D. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. Tumour Biol. 2002;23:93–102.
45. Li H, Liu Q, Hu X, Feng D, Xiang S, He Z, et al. Human ZCCHC12 activates AP-1 and CREB signaling as a transcriptional co-activator. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2009;41:535–44.
46. Maeda N, Fu W, Ortin A, de Las Heras M, Fan H. Roles of the Ras-MEK-mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. J Virol [Internet]. 2005;79:4440–50. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1061532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
47. Hull S, Fan H. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. J Virol [Internet]. 2006;80:8069–80. Available from:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1563818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
48. De las Heras M, Ortín A, Benito A, Summers C, Ferrer LM, Sharp JM. In-situ Demonstration of Mitogen-activated Protein Kinase Erk 1/2 Signalling Pathway in Contagious Respiratory Tumours of Sheep and Goats. J Comp Pathol. 2006;135:1–10.
49. Fujii M, Tsuchiya H, Chuhjo T, Akizawa T, Seiki M. Interaction of HTLV-1 Tax1 with p67SRF causes the aberrant induction of cellular immediate early genes through CArG boxes. Genes Dev. 1992;6:2066–76.
50. Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN. Crosstalk and signalling switches in mitogen-activated protein kinase cascades.
51. Palmarini M, Maeda N, Murgia C, De-Fraja C, Hofacre a, Fan H. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. J Virol. 2001;75:11002–9.
52. Maeda N, Inoshima Y, Fruman DA, Brachmann SM, Fan H. Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. J Virol [Internet]. 2003;77:9951–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941905
53. Liu SL, Lerman MI, Miller AD. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. J Virol [Internet]. 2003;77:7924–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12829832
54. Chow Y-HJ, Alberti A, Mura M, Pretto C, Murcia P, Albritton LM, et al. Transformation of rodent fibroblasts by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope is receptor independent and does not require the surface domain. J Virol. 2003;77:6341–50.
55. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009;106:4519–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251651
56. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene [Internet]. 2007;26:3279–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496922
57. Maik-Rachline G, Seger R. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. Drug Resist Updat [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;25:1–12. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764615000667
58. Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, et al. An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells. Cancer Res. 2003;63:8735–41.
59. Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. Cancer Res. 2005;65:4172–80.
60. Reiche J, Pauli G, Ellerbrok H. Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. Melanoma Res [Internet]. 2010;20:435–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539243
61. Hahn S, Ugurel S, Hanschmann K-M, Strobel H, Tondera C, Schadendorf D, et al. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008;24:717–23.
62. Schmitt K, Reichrath J, Roesch A, Meese E, Mayer J. Transcriptional profiling of human endogenous retrovirus group HERV-K(HML-2) loci in melanoma. Genome Biol Evol. 2013;5:307–28.
63. Liu S-L, Miller a D. Oncogenic transformation by the jaagsiekte sheep retrovirus

envelope protein. Oncogene. 2007;26:789–801.
64. Monot M, Erny A, Gineys B, Desloire S, Dolmazon C, Aublin-Gex A, et al. Early Steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Mediated Cell Transformation Involve the Interaction between Env and the RALBP1 Cellular Protein. J Virol [Internet]. 2015;89:8462–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26041289
65. Hsu T, Phung A, Choe K, Kim JW, Fan H. A role for a zinc finger protein (Zfp111) in transformation of 208F rat fibroblasts by Jaagsiekte Sheep Retrovirus envelope protein. J Virol [Internet]. 2015;JVI.01631–15 – . Available from: http://jvi.asm.org/content/early/2015/07/30/JVI.01631-15.abstract

Figure legends

Figure 1. HERV-K(HML2) envelope protein induces EMT in MCF10A human breast cell line

(A) Expression of EMT related genes. Levels of EMT related transcripts were evaluated in MCF10A cells, stably expressing HERV-K(HML2) Env, Ampho Env or incubated for 48 hours with TGF-β. The mRNA levels were normalized using the RPLO gene as a reference and expressed relative to cells transduced with an empty vector control. (B) Migration and invasion capacities. A Transwell assay was performed with MCF10A cells stably expressing HERV-K Env, Ampho Env or incubated for 72h hours with TGF-β. The cells were allowed to migrate (no Matrigel) and invade (with Matrigel) for 22 hours. DAPI staining was then performed and migrated cells were observed under a fluorescent microscope and counted. The value obtained for MCF10A transduced with an empty vector was set at 1. Error bars represent standard deviation of 6 data points from 2 independent experiments.

Figure 2. HERV-K(HML2) envelope protein induces several transcription factors

(A) Scheme of the experimental procedure. 293T cells were transfected with the indicated plasmids, in duplicate for each condition, using Fugene 6 reagents and low doses of DNA. 24 and 48 hours post transfection, cells were harvested to proceed to RNA extraction. Gene expression analysis was performed with Agilent® SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (for more details see material and methods). Candidate genes were then validated by qRT-PCR. (B) Data from microarrays were processed and normalized as described in material and methods section in order to assess differentially expressed genes between control and HERV-K Env expressing samples. The genes listed here were selected with the following criteria: a fold-change superior or equal to 2 and an adjusted p-value (FDR) inferior to 0.05. (C) RT reactions were performed from total RNAs extracted from Ampho Env (i.e. control Env) or HERV-K(HML2) Env-Rec expressing cells at 48 hours post-transfection. The amount of mRNAs of the indicated transcription factors (EGR1: Early Growth Response 1; ETV4 and ETV5: Ets variant 4/5) was evaluated by qPCR using specific primer pairs. The mRNA levels were normalized using the RPLO gene as a reference and non-transfected 293T cell line level was set at 1 for all genes. Error bars represent standard deviation of the mean of 5 independent experiments.

Figure 3. HERV-K(HML2) envelope protein activates the MAPK pathway through ERK 1/2 kinases

(A) Overview of the MAPK pathway. A broad range of extracellular stimuli including mitogens, cytokines and growth factors can bind to membrane receptors. This triggers conformational changes in the GTPase Ras which swaps its GDP for a GTP. The protein is relocalized to the plasma membrane and activates Raf, the first kinase of the pathway (a MAP3K : MAP kinase kinase kinase). Raf induces the phosphorylation (i.e. activation, "+ P" on the scheme) of the MAP2K MEK 1/2, which, in turn phosphorylates the MAPK ERK 1/2. The activated ERK 1/2 translocates to the cell nucleus where it phosphorylates early response targets (e.g. EGR1, ETV4 and ETV5). These targets act as transcriptional activators of several genes. Among them, DUSP6, a MAPK phosphatase (MKP) is present in the microarray signature presented in Fig. 2. (B) Activation of the MAPK ERK 1/2 following HERV-K(HML2) Env-Rec (or indicated control protein) expression was analysed by Western Blot. 293T were transfected with the indicated plasmids. Cell lysates were harvested 48 hours post transfection and membrane was stained for phosphorylated ERK 1/2, stripped and stained again for the total form of the kinases.

Figure 4. Transcription factor and MAPK pathway inductions are shared only by the oncogenic JSRV Env and HERV-K(HML2) Env

(A) Dendogram of a panel of retroviral envelopes. The Env tested for the induction of the transcription factors (EGR1, ETV4 and ETV5) and the activation of the MAPK pathway are highlighted in bold and the retroviral family they belong to is indicated (in red: betaretroviruses : in blue : gammaretrovirus : in yellow : deltaretrovirus). (B) The mRNA levels of the transcription factors EGR1, ETV4 and ETV5 following expression of the indicated retroviral envelopes was measured as described in Fig. 2C. Error bars represent standard deviation of the mean of 3 independent experiments. (C) Phosphorylation of ERK 1/2 in 293T expressing the indicated envelopes was assayed as described in Fig. 3B.

Figure 5. Several functional HERV-K(HML2) Env-Rec endogenous alleles activate the transcription factors and the MAPK pathway

Previously described endogenous alleles of HERV-K(HML2) Env-Rec were tested for their ability to activate the transcription factors EGR1, ETV4 and ETV5 (error bars represent standard deviation of the mean of 3 independent experiments) (A) and phosphorylate ERK 1/2 (B) as explained in Fig. 2C. and Fig 3B respectively. Expression levels of the different HERV-K(HML2) Env-Rec alleles were analysed by Western blot on 293T cell lysates following transient transfection. (C) Other functional properties of the 6 endogenous alleles of

HERV-K(HML2) Env-Rec which have been previously assessed (28,35) are recapitulated (nd: not determined).

Figure 6. The Env of HERV-K(HML2) but not the Rec accessory protein is responsible for both the induction of the transcription factors and the activation of the MAPK pathway

(A) The HERV-K(HML2) Env-Rec plasmid leads to the expression of 2 distinct proteins via alternative splicing : the full-length RNA encodes Env, a glycoprotein that is cleaved into 2 subunits during synthesis (surface subunit, SU, and transmembrane subunit, TM), while internal splicing sites (SD for splice donor and SA for splice acceptor) lead to the production of Rec, an accessory protein (see (28) for more details). An expression vector leading to the production of Env alone was generated by introducing silent point mutations in the splicing sites. The different contructs were assayed for their capacity to induce the transcription factors (error bars represent standard deviation of the mean of 3 independent experiments) (B) and activate the MAPK pathway via ERK 1/2 (C) as described in Fig. 2C. and Fig 3B respectively. The levels of expression of the different HERV-K(HML2) Env-Rec derivatives presented in (A) were also measured by Western Blot using a monoclonal antibody directed against the SU of HERV-K(HML2) envelope protein.

Figure 7. Mapping of HERV-K(HML2) Env-Rec domains necessary for inducing the transcription factors and the activation of ERK 1/2

(A) Scheme of the different derivatives of HERV-K(HML2) Env-Rec. All modifications were designed to modify Env without altering the Rec ORF and keeping the global structure of the env-rec RNA. The different domains of each construct are indicated: SP (signal peptide, yellow), SU (orange), TM (red). Env-Rec mut1 corresponds to a C-terminal truncated version of the complete envelope protein (41 aa deleted). Env-Rec mut4 is the soluble surface subunit. For each construct, the expected protein structure is depicted on the right. The efficiency of the different HERV-K(HML2) Env-Rec derivatives to induce the transcription factors (error bars represent standard deviation of the mean of 3 independent experiments) (B) and the phosphorylation of ERK 1/2 (C) were assayed as previoulsy described in Fig. 2C. and Fig 3B respectively. Expression levels of Env-Rec and derivatives were also measured in transiently transfected 293T cells by Western blot on whole cell lysates.

Figure 8. HERV-K(HML2) Env-Rec and other important cell signalling pathways

(A) Simplified view of different cell signalling pathways (NF-kB, PI3K/AKT, MAPK ERK 1/2 and p38). The proteins detected in Western Blot (in B) are highlighted in red. “+ P” indicates the addition of a phosphate, “U” symbolizes a polyubiquitin chain. (B) (upper panel) 293T

cells were transfected by the indicated plasmids. Short incubation of cells with TNFalpha (100 ng/µL for 10 and 20 minutes here) is known to activate the kinase p38 and to induce the degradation of the IKBα protein and thus constitutes a positive control in our experiments. Lysates were prepared in RIPA buffer 48 hours post-transfection. Membranes were blotted with phosphorylated and total (after membrane stripping) forms of the kinases ERK 1/2 and p38 or with anti-IKBα antibodies (in this latter case, tubulin level is assessed for controlling homogenous loading). (bottom panel) HeLa cells were transiently transfected as described in material and methods section. Cell lysates were harvested 48 hours post transfection and the phosphorylated and total (after membrane stripping) levels of AKT were assessed by western blotting.

Figure 9. HERV-K(HML2) Env-Rec and the activation of the MAPK pathway

(A) MAPK pathway was targeted by different chemicals: FTI-277, a H/N Ras inhibitor, TAK 632 described, a pan Raf inhibitor, and two broadly used antagonists of MEK 1/2 kinases, U0126 and PD98059. The experimental procedure is illustrated on the scheme. Briefly, 293T cells were transfected with the indicated plasmids. Inhibitors (or control vehicles) were added to fresh complete medium 18 hours post-transfection. Lysates and total RNA were harvested 48 hours post transfection and processed as previously described in the figures. Induction of the transcription factors (error bars represent standard deviation of the mean of 3 independent experiments). (B) and activation of ERK 1/2 (C) in the presence (+) or absence (-) of FTI-277, TAK 632 or U0126 were assayed as described in Fig. 2C. and Fig 3B respectively. PD08059 gave similar results than U0126 (not shown).

Table 1. List of the primers

Sequence of the primers used for qRT-PCR experiments.

Figure 1

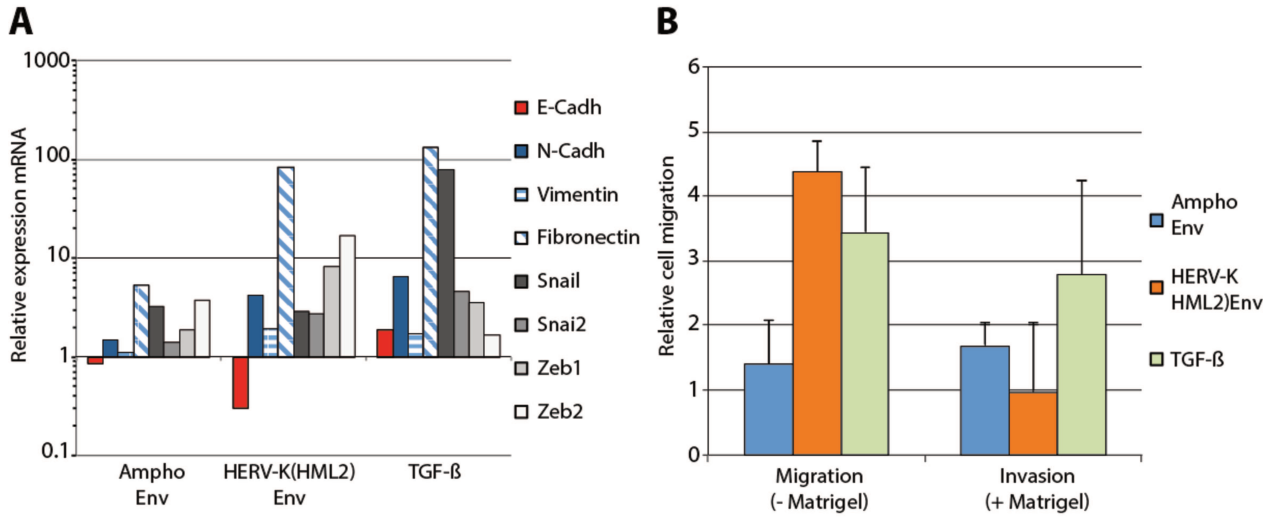
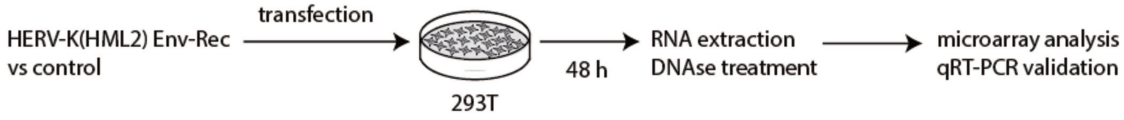

A
1000
100
10
1
0.1
Relative expression mRNA
E-Cadh
N-Cadh
Vimentin
Fibronectin
Snail
Snai2
Zeb1
Zeb2
Ampho Env
HERV-K(HML2) Env
TGF-ß
B
6
5
4
3
2
1
0
Relative cell migration
Ampho Env
HERV-K HML2)Env
TGF-ß
Migration (- Matrigel)
Invasion (+ Matrigel)

Figure 2

A



B

UPREGULATED GENES	FOLD CHANGE
Early growth response 1 (EGR1)	7.1
Zinc finger, CCHC domain containing 12 (ZCCHC12)	5.8
Cytochrome b5 reductase 1 (CYB5R2)	3.6
Ets variant 4 (ETV4)	3.4
Ets variant 5 (ETV5)	3.3
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FosB)	2.9
Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2)	2.6
Early growth response 2 (EGR2)	2.2
Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6)	2.2
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC)	2.2
Heat shock 70kDa protein 6 (HSPA6)	2.2
Fucosyltransferase 3 (FUT3)	2.1
Early growth response 4 (EGR4)	2.1
Annexin A1 (ANXA1)	2.1
VGF nerve growth factor inducible (VGF)	2

C

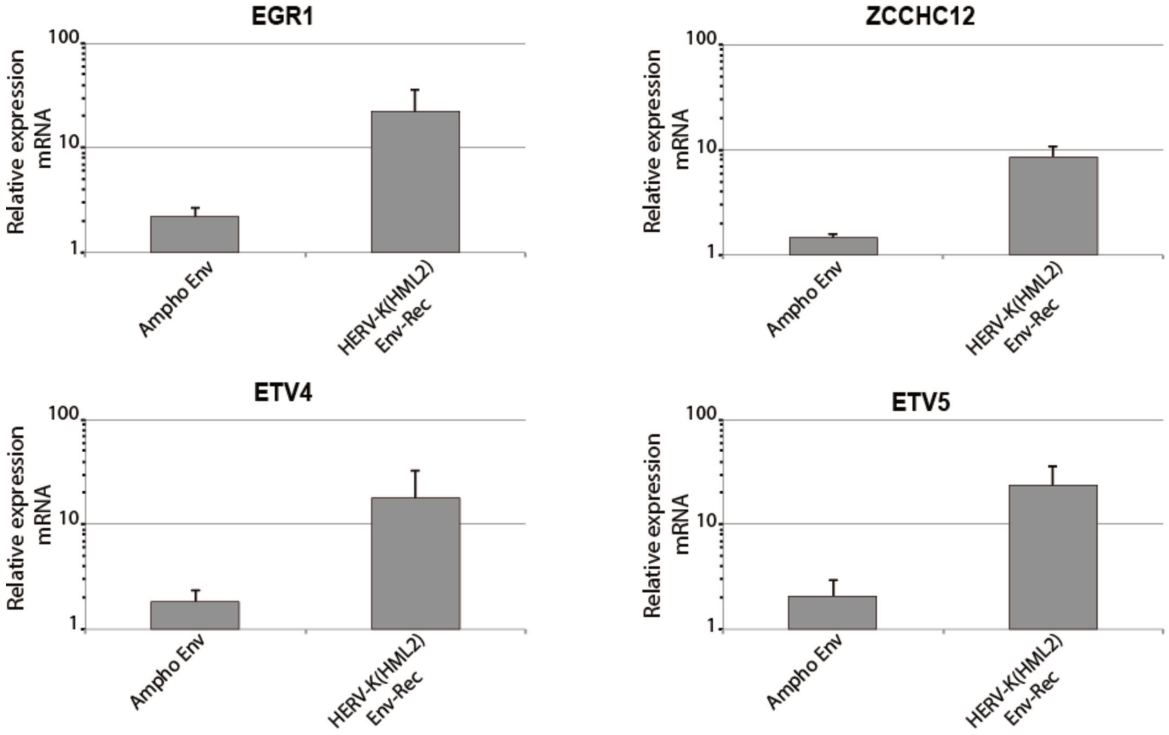


Figure 3

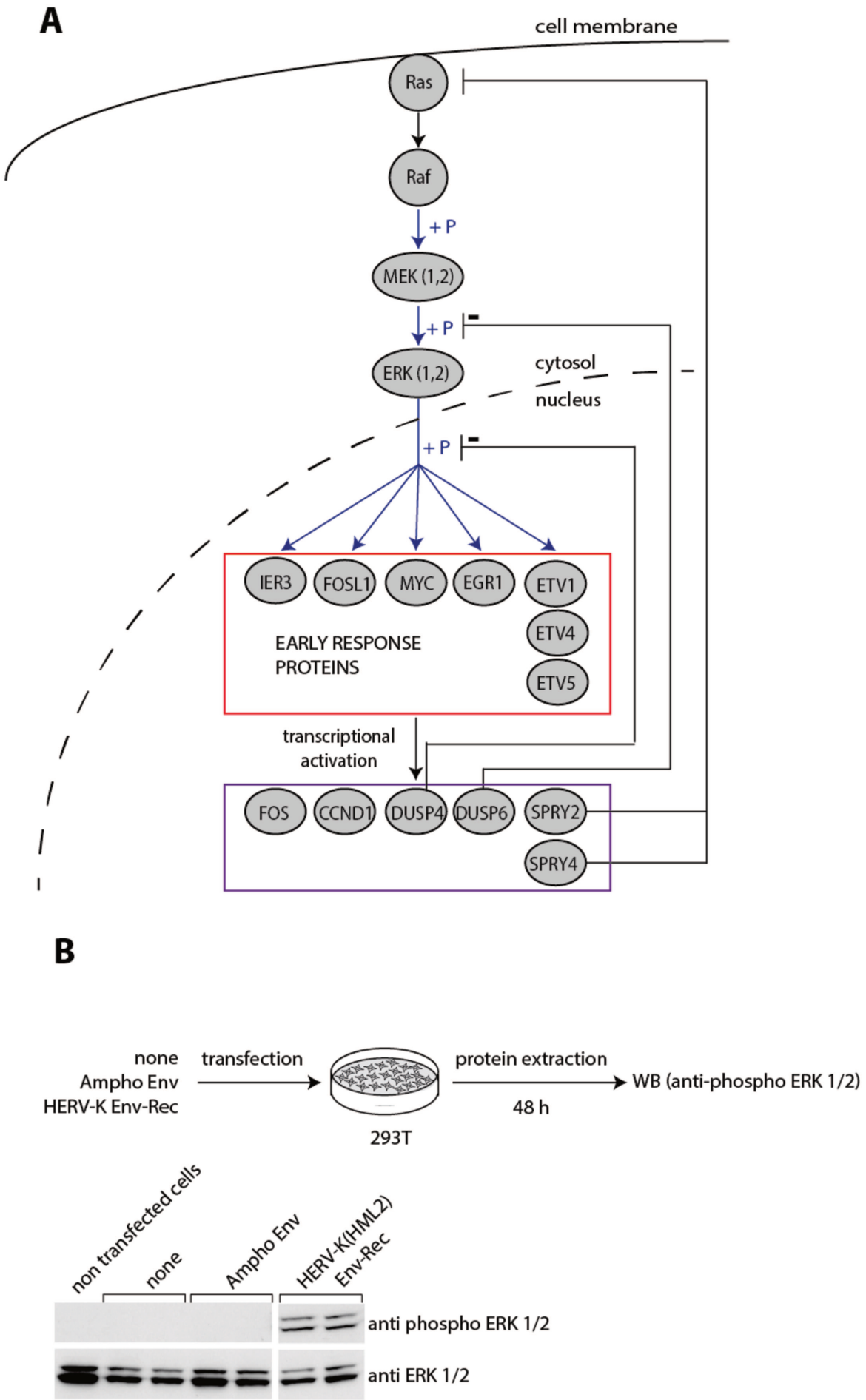

A
cell membrane
Ras
Raf
+ P
MEK (1,2)
+ P
ERK (1,2)
cytosol
nucleus
+ P
IER3
FOSL1
MYC
EGR1
ETV1
ETV4
ETV5
EARLY RESPONSE PROTEINS
transcriptional activation
FOS
CCND1
DUSP4
DUSP6
SPRY2
SPRY4
B
none
Ampho Env
HERV-K Env-Rec
transfection
293T
protein extraction
48 h
WB (anti-phospho ERK 1/2)
non transfected cells
none
Ampho Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2

Figure 4

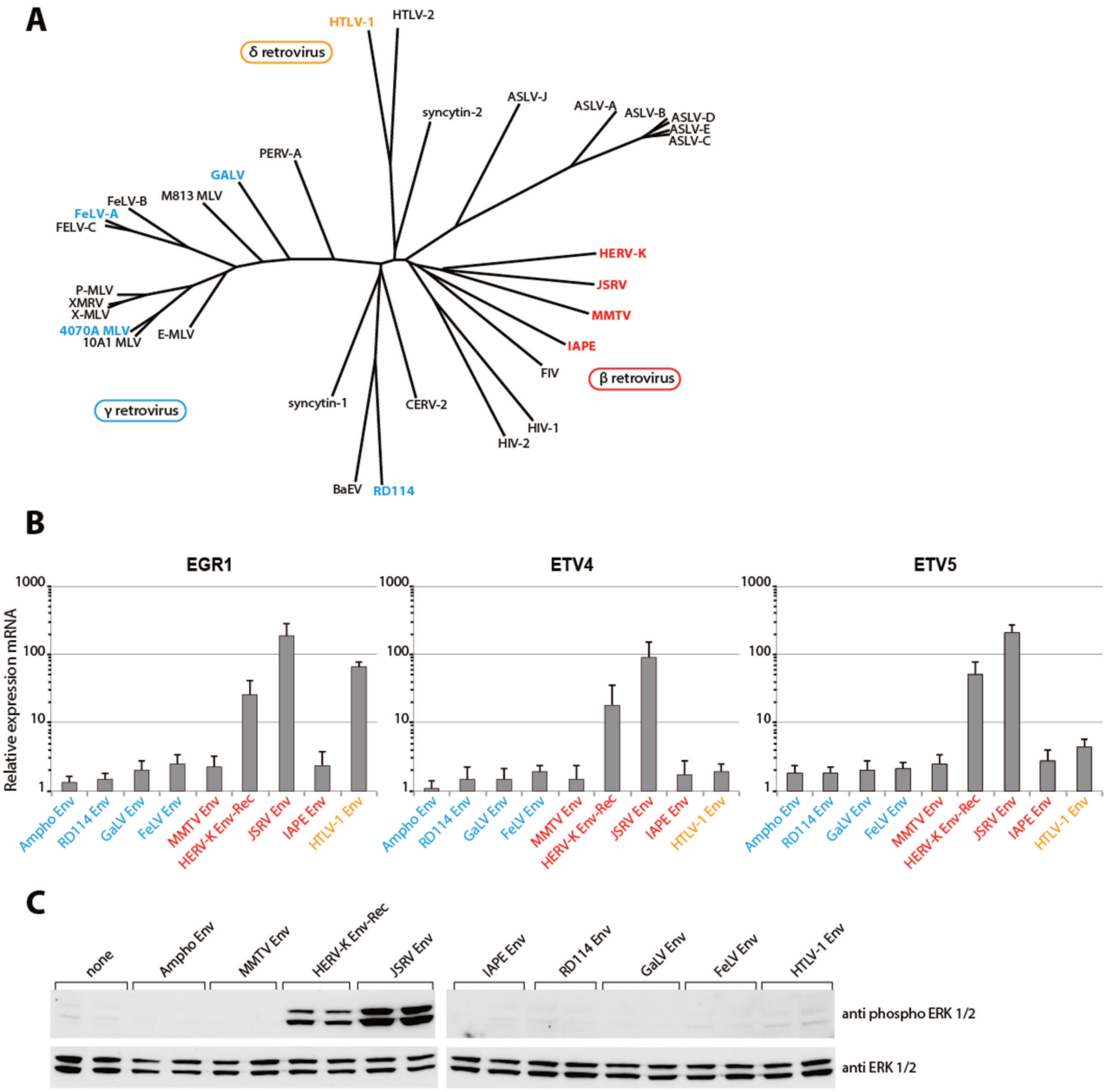
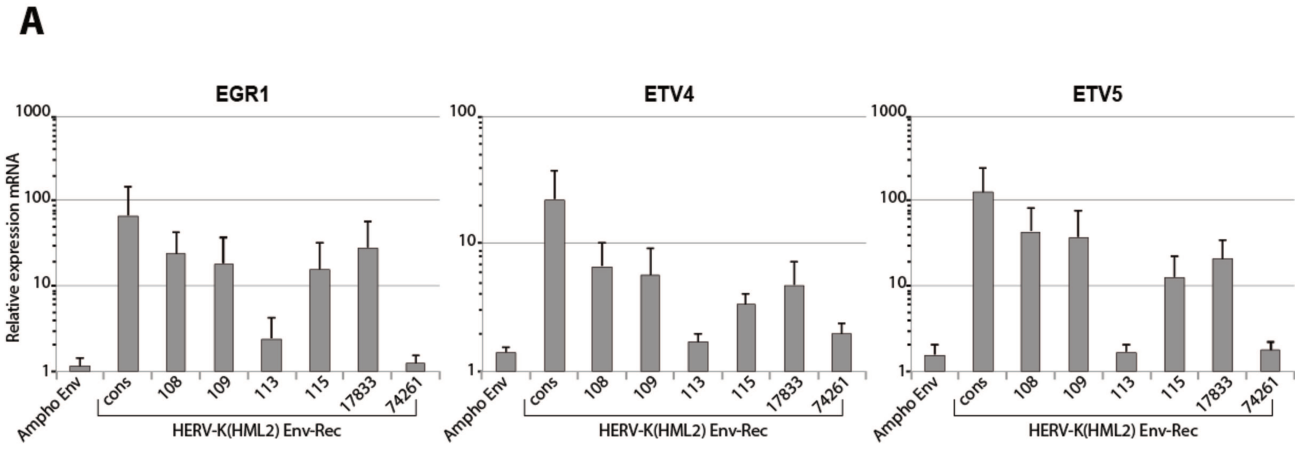
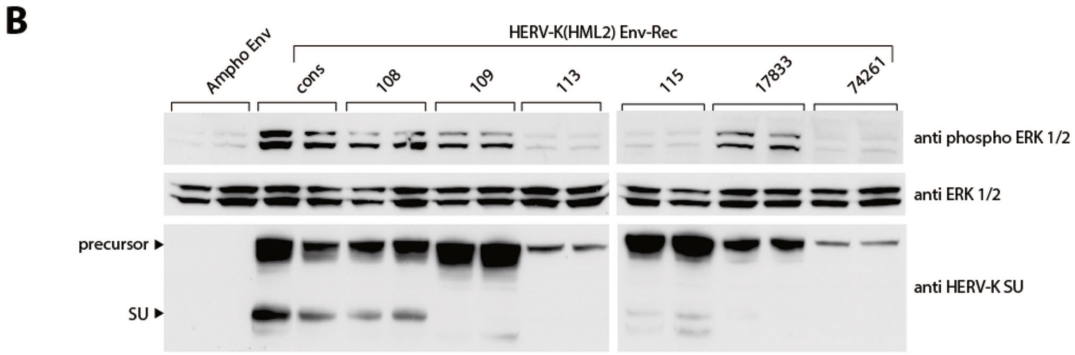

A
HTLV-1
HTLV-2
δ retrovirus
syncytin-2
ASLV-J
ASLV-A
ASLV-B
ASLV-D
ASLV-E
ASLV-C
PERV-A
GALV
FeLV-B
M813 MLV
FeLV-A
FELV-C
HERV-K
JSRV
MMTV
IAPE
FIV
β retrovirus
P-MLV
XMRV
X-MLV
4070A MLV
10A1 MLV
E-MLV
γ retrovirus
syncytin-1
CERV-2
HIV-1
HIV-2
BaEV
RD114
B
EGR1
ETV4
ETV5
Relative expression mRNA
1000
100
10
1
Ampho Env
RD114 Env
GaLV Env
FeLV Env
MMTV Env
HERV-K Env-Rec
JSRV Env
IAPE Env
HTLV-1 Env
C
none
Ampho Env
MMTV Env
HERV-K Env-Rec
JSRV Env
IAPE Env
RD114 Env
GaLV Env
FeLV Env
HTLV-1 Env
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2

Figure 5





C

HERV-K(HML2) Env-Rec	Cons.	108	109	113	115	17833	74261
cell surface expression	++	++	++	+	++	+	-
incorporation into retroviral particles	nd	++	++	-	-	+	-
infectivity	++	+	-	-	-	-	-
Tetherin antagonism	++	+	+	-	-	-	-

Figure 6

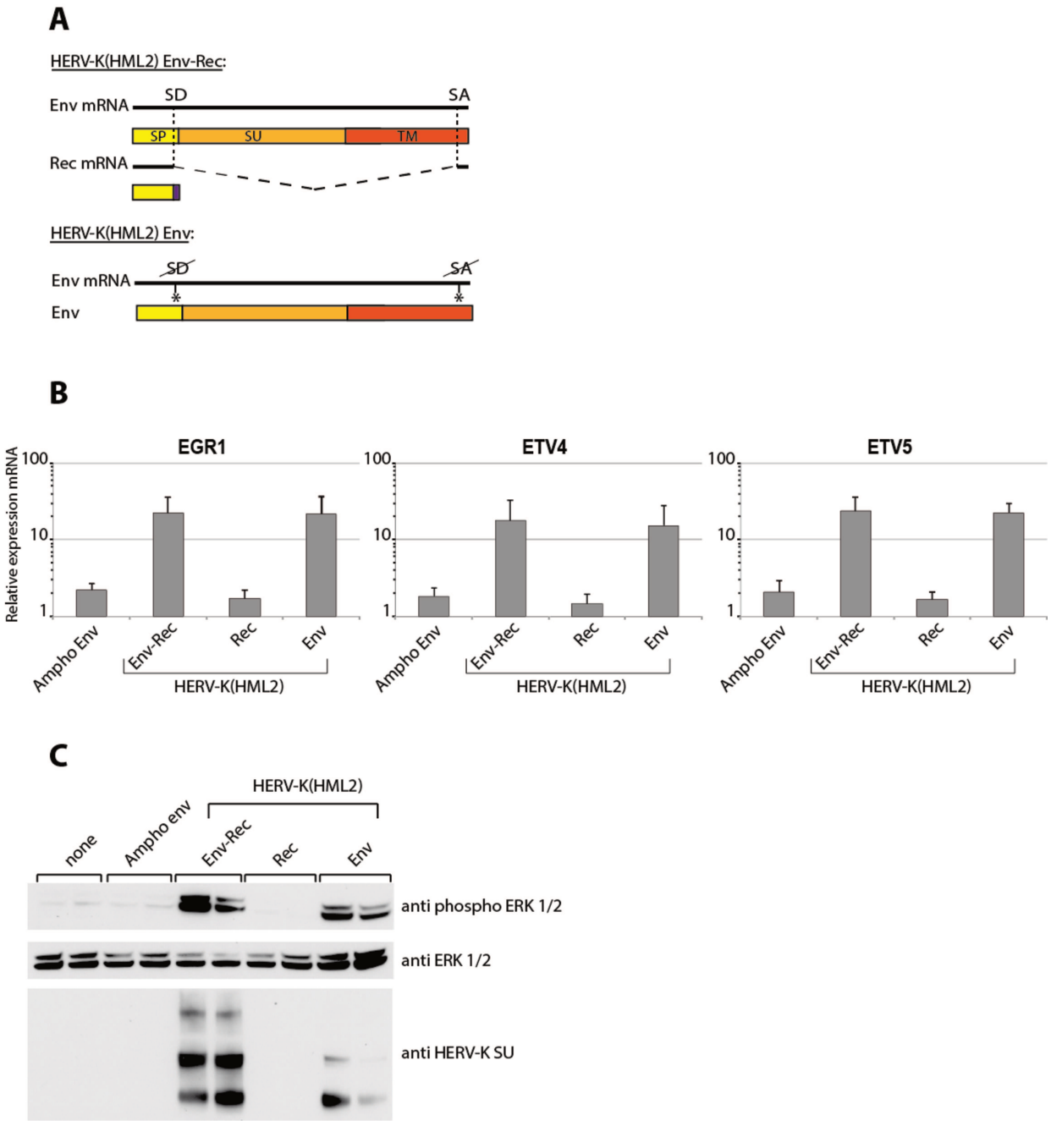

A
HERV-K(HML2) Env-Rec:
Env mRNA
SD
SA
SP
SU
TM
Rec mRNA
HERV-K(HML2) Env:
Env mRNA
SD
SA
Env
B
EGR1
ETV4
ETV5
Relative expression mRNA
100
10
1
Ampho Env
Env-Rec
Rec
Env
HERV-K(HML2)
C
HERV-K(HML2)
none
Ampho env
Env-Rec
Rec
Env
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2
anti HERV-K SU

Figure 7

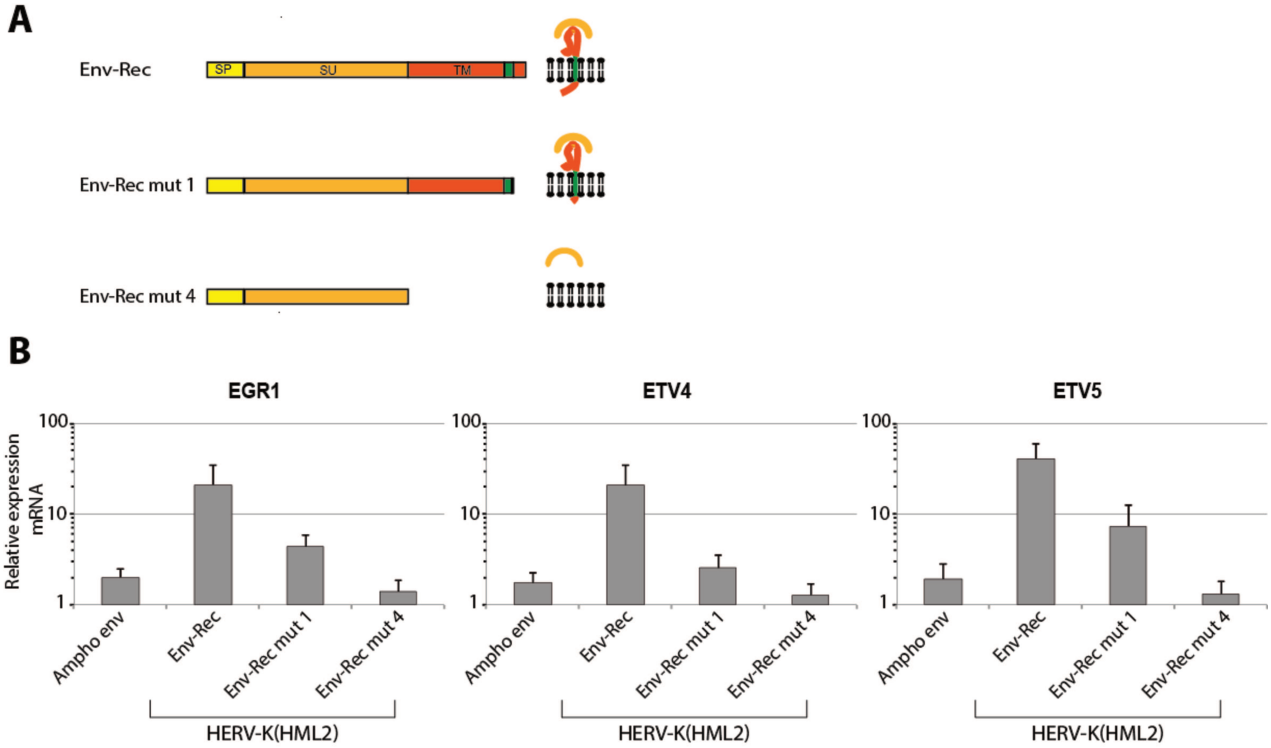

A
Env-Rec
SP
SU
TM
Env-Rec mut 1
Env-Rec mut 4
B
EGR1
ETV4
ETV5
Relative expression mRNA
100
10
1
Ampho env
Env-Rec
Env-Rec mut 1
Env-Rec mut 4
HERV-K(HML2)
C
HERV-K(HML2)
none
Ampho env
Env-Rec
Env-Rec mut 1
Env-Rec mut 4
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2
anti HERV-K SU

Figure 8

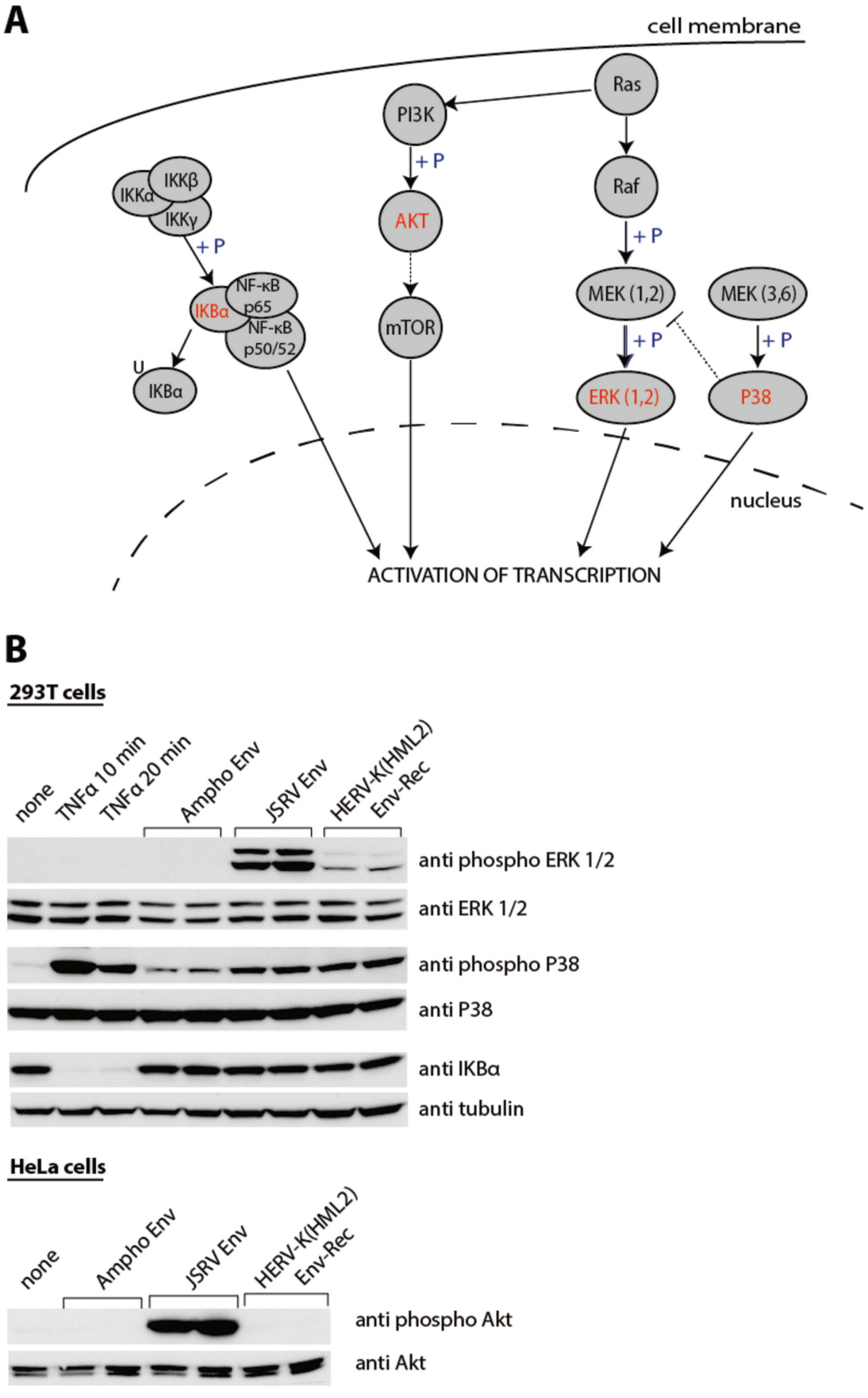

A
cell membrane
Ras
PI3K
+ P
Raf
AKT
+ P
IKKβ
IKKα
IKKγ
+ P
NF-κB p65
IKBα
NF-κB p50/52
mTOR
MEK (1,2)
MEK (3,6)
+ P
+ P
U
IKBα
ERK (1,2)
P38
nucleus
ACTIVATION OF TRANSCRIPTION
B
293T cells
none
TNFα 10 min
TNFα 20 min
Ampho Env
JSRV Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2
anti phospho P38
anti P38
anti IKBα
anti tubulin
HeLa cells
none
Ampho Env
JSRV Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
anti phospho Akt
anti Akt

Figure 9

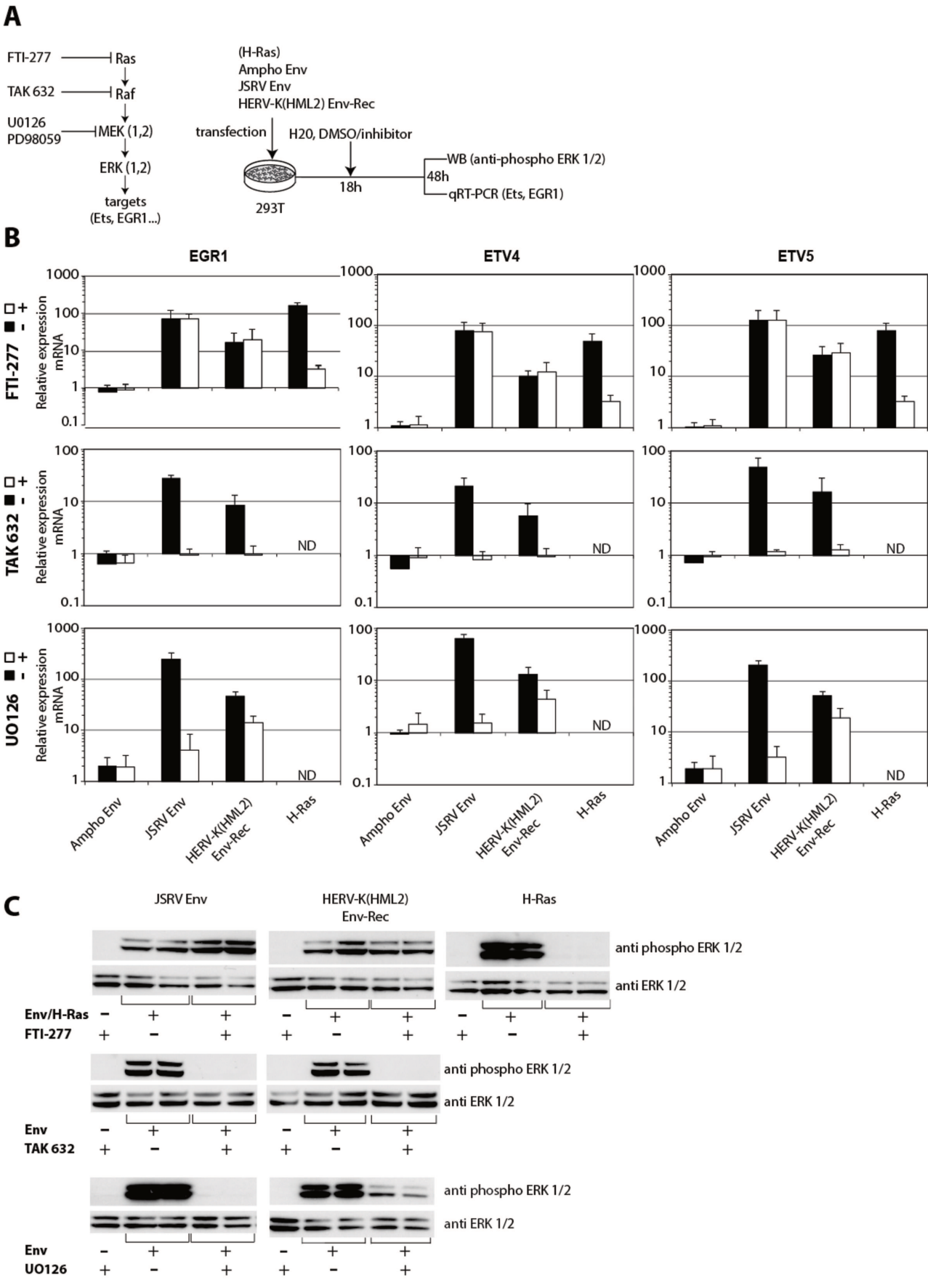

A
FTI-277
Ras
TAK 632
Raf
U0126
PD98059
MEK (1,2)
ERK (1,2)
targets
(Ets, EGR1...)
(H-Ras)
Ampho Env
JSRV Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
transfection
H20, DMSO/inhibitor
293T
18h
48h
WB (anti-phospho ERK 1/2)
qRT-PCR (Ets, EGR1)
B
EGR1
ETV4
ETV5
FTI-277 - +
TAK 632 - +
UO126 - +
Relative expression mRNA
ND
Ampho Env
JSRV Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
H-Ras
C
JSRV Env
HERV-K(HML2) Env-Rec
H-Ras
anti phospho ERK 1/2
anti ERK 1/2
Env/H-Ras
FTI-277
Env
TAK 632
Env
UO126

Table 1

	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
RPLO	GGCGACCTGGAAGTCCAACTA	CCATCAGCACCACAGCCTTC
HERV-K(HML2) Env	CACAACTAAAGAAGCTGACG	CATAGGCCCAGTTGGTATAG
EGR1	AGCAGCACCTTCAACCCTCAGG	GAGTGGTTTGGCTGGGGTAACT
ETV4	GGATCAAGAAGGAGCCCC	AATTCCGTTGCTCTGCCC
ETV5	TCCCCGATTATACTTTGACG	AAGAAGGGTGACCAGGAACT
ZCCHC12	AGTGCTGGTCATTGATTCCC	GGCCTTGTCACTCTCGTTGT
E-cadherin	GAGGATTTTGAGCACGTGAAG	GTGTGTTAGTTCTGCTGTG
N-cadherin	GAAGAAGGTGGAGGAGAAGAAG	GAGTCATATGGTGGAGCTG
Vimentin	GATTGCCACCTACAGGAAG	AGAAAGGCACTTGAAAGCTG
Fibronectin	CAACAAACTTGCATCTGGAGG	CTCTGATCAGCATGGACCAC
Beta Catenin	CTAAAATGGCAGTGCGTTTAG	TTTGAAGGCAGTCTGTCGTA
ZO-1	AAGAGAAAGGTGAAACACTGCTGA	AAGAGAAAGGTGAAACACTGC
Snai1	CAAGATGCACATCCGAAGC	CTTGACATCTGAGTGGGTCTG
Snai2	GGC TGG CCA AAC ATA AGC	TGCTCTGTTGCAGTGAGG
Zeb1	CTGAAGCTCAGGCAGATGAAGC	TGCCTCTGGTCCTCTTCAGG
Zeb2	ACAAGACTACATGTCAGGCC	CGTATTTATGTCGCAGAAGGG

DISCUSSION

DISCUSSION

Les glycoprotéines d'enveloppes rétrovirales sont souvent présentées comme des protéines structurales. Elles s'insèrent en effet dans l'enveloppe lipidique du virus et permettent, après la reconnaissance avec un récepteur spécifique, la fusion entre les membranes cellulaire et virale, point de départ du cycle de réplication du virus. Plusieurs exemples récents évoqués dans l'introduction révèlent que ces protéines ont un rôle assez large dans la pathogenèse (e.g. propriétés immunosuppressives ou oncogéniques) *in vivo*, au delà des aspects purement structuraux et mécaniques. Les enveloppes rétrovirales peuvent aussi contribuer à la physiologie de l'hôte, comme l'illustre le cas des syncytines, « capturées » indépendamment par différentes espèces pour permettre la formation du placenta.

L'étude de l'interaction entre la famille rétrovirale endogène HERV-K(HML2) et son hôte humain a permis de mettre en évidence deux propriétés originales associées à l'enveloppe : d'une part sa capacité à s'opposer à l'action d'un facteur de restriction cellulaire, et d'autre part, son rôle oncogénique. Ces résultats illustrent la diversité des fonctions de l'enveloppe rétrovirale. Ils attestent également la particularité de la famille HERV-K(HML2) : son endogénéisation est ancienne (40 millions d'années) mais elle présente des propriétés et une dynamique proche de celles d'un rétrovirus infectieux. Les résultats apportent également de nouveaux arguments en faveur de l'intervention de la famille HERV-K(HML2) dans les pathologies humaines et permettent d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous argumenterons autour de ces différents aspects dans la discussion qui suit.

1. La protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) et ses propriétés d'antagoniste d'un facteur de restriction cellulaire

1.1 Un antagoniste d'origine endogène

Le virus HERV-K(HML2) est entré il y a des millions d'années dans les génomes et cohabite de fait depuis longtemps avec les facteurs de restriction cellulaires. Plusieurs études indiquent par exemple que les protéines de la famille APOBEC3 ont joué un rôle important dans le contrôle de l'amplification du rétrovirus endogène (Esnault et al., 2008a; Young and Bieniasz, 2007). Il a été également démontré que la Tetherin s'oppose au relargage de VLP HERV-K(HML2) après leur bourgeonnement (Jouvenet et al., 2009). Cette activité antivirale repose essentiellement sur les 2 ancres membranaires du facteur de restriction qui créent un pontage entre la cellule infectée et le virion. Le premier article présenté dans la thèse montre que

l'enveloppe HERV-K(HML2) possède des propriétés anti-Tetherin. D'autres exemples d'enveloppe ayant un rôle d'antagoniste de BST2 ont été décrits. Par exemple, l'enveloppe rétrovirale HIV-2, intégrée à la plupart des expériences rapportées dans l'article, présente une efficacité voisine de celle de l'Env HERV-K(HML2). L'enveloppe HERV-K(HML2) est par contre le seul cas d'antagoniste endogène de la Tetherin rapporté dans la littérature, et dans nos conditions expérimentales, aucune autre enveloppe d'ERV ne présente de tels effets (résultats non présentés ici). Cette propriété unique pourrait expliquer pourquoi la famille HERV-K(HML2) a continué à s'amplifier efficacement dans les génomes jusqu'à très récemment alors que toutes les familles d'HERV sont éteintes depuis longtemps. Les résultats obtenus avec les Tetherin d'autres espèces de primates (Chimpanzé, Gorille ainsi que 4 singes du Nouveau Monde) sont intéressants à cet égard. En effet, l'enveloppe HERV-K(HML2) présente un spectre d'action très large et est capable d'agir sur chacune des protéines testées avec la même efficacité. De plus, les 6 Tetherin proviennent d'espèces dans lesquelles la famille HERV-K(HML2) est présente, ce qui suggère que la capacité à inhiber la Tetherin pourrait être une propriété ancestrale de la famille.

Nos expériences ont été menées avec l'enveloppe HERV-K(HML2) de Phoenix, le consensus représentant le progéniteur infectieux putatif de la dernière grande vague d'amplification de la famille virale chez l'homme. Les propriétés d'antagonisme des enveloppes des familles HERV-K(HML2) des différentes espèces pourraient aussi être étudiées. Pour cela, il s'agirait de « reconstituer » des enveloppes ancestrales spécifiques de chacune des espèces et de réaliser le même type d'étude sur les Tetherin correspondantes. Ceci nécessiterait un travail important d'analyse des génomes en amont mais apporterait un éclairage intéressant sur l'importance de la propriété d'antagoniste dans l'évolution et la dynamique de la famille HERV-K(HML2). Ce large tropisme est partagé par plusieurs enveloppes infectieuses, en particulier par l'Env HIV-2 (Le Tortorec and Neil, 2009; Lopez et al., 2010; Weinelt and Neil, 2014) et la GP de Ebola (Radoshitzky et al., 2010), cette dernière étant capable d'agir sur la Tetherin murine et même sur une Tetherin artificielle (Lopez et al., 2010). D'autres antagonistes, comme Vpu HIV-1, sont beaucoup plus spécifiques. Dans nos conditions expérimentales, la protéine accessoire s'oppose fortement aux Tetherin humaine, chimpanzé et gorille (avec une efficacité plus élevée que celle des enveloppes HERV-K(HML2) et HIV-2) mais a une efficacité restreinte voire nulle sur les 4 autres Tetherin primates testées. La grande efficacité de Vpu HIV-1 pour antagoniser les Tetherin humaine, chimpanzé et gorille, se fait donc au détriment de la variété de ses cibles.

Après avoir révélé l'activité anti-Tetherin du consensus Phoenix, nous avons étudié le statut de quelques allèles endogènes humains de l'enveloppe HERV-K(HML2) vis à vis du facteur de restriction. Ces gènes sont présents au sein de provirus récents, tous intégrés dans les génomes après la divergence entre l'homme et le chimpanzé. Les protéines correspondantes sont très conservées, avec plus de 97% d'identité de séquence, c'est à dire moins de 20 acides aminés de différence quelles que soient les comparaisons deux à deux effectuées. Les résultats de nos expériences indiquent que, de façon remarquable, deux de ces protéines présentent une activité anti-Tetherin. Celles-ci avaient été décrites par des travaux précédents du laboratoire (Dewannieux et al., 2005), comme les deux seules ayant conservé l'ensemble (ou presque) des propriétés virales canoniques. En particulier, K108 est infectieuse et capable de pseudotyper efficacement des particules HIV ou SIV (Dewannieux et al., 2005). Les résultats obtenus avec l'enveloppe K115 – exprimée et clivée de façon comparable aux Env K108 et K109 - indiquent que les niveaux d'expression et de maturation ne sont pas les seuls critères requis pour l'activité d'antagoniste de la Tetherin. Bien que localisée à la membrane plasmique des cellules, l'enveloppe K115 n'est pas incorporée dans les particules virales HIV-1, contrairement à K108 et K109, ce qui renforce le lien entre activité anti-Tetherin et propriétés infectieuse de l'enveloppe. Nos expériences ont aussi révélé que l'enveloppe HERV-K(HML2) du consensus Phoenix est plus efficace pour s'opposer à la Tetherin que les Env K108 et K109. Ceci reflète que les allèles endogènes testés dégénèrent progressivement depuis leur intégration dans les génomes humains, du fait de l'accumulation stochastique de mutations. Il s'agit d'une tendance partagée par l'ensemble des familles rétrovirales endogènes, qui alternent entre de courtes périodes d'amplification, suivies d'une lente extinction, jusqu'à ce qu'un élément encore actif ou généré par recombinaison, initie une nouvelle vague d'amplification. Compte-tenu des différences dans la capacité à s'opposer à la Tetherin des 6 allèles endogènes, nous avons cherché à identifier, à partir de l'alignement de leur séquence et de celle de la consensus, des résidus impliqués dans l'activité d'antagonisme. Aucune conclusion évidente n'a pu être tirée, probablement parce que la perte de l'activité anti-Tetherin est due à une combinaison de mutations qui ont des conséquences sur les propriétés générales de l'enveloppe et pas simplement sur l'interaction avec la Tetherin.

Depuis les travaux de Dewannieux et coll., d'autres allèles d'enveloppe HERV-K(HML2) ont été identifiés. Très récemment, le groupe de J. Coffin a mis à jour le « catalogue » des provirus HERV-K(HML2) et révélé l'existence de nombreuses copies non fixées dans les génomes humains (Wildschutte et al., 2016), renforçant l'idée d'une famille polymorphe. L'une des copies (provirus Xq21.33) est décrite comme intacte et encore potentiellement

infectieuse. L'étude des propriétés d'antagoniste de l'enveloppe de ce nouvel élément, comparées à celle du consensus pourrait renseigner sur l'importance de l'activité anti-Tetherin dans la dynamique « actuelle » de la famille virale.

Le haut degré de polymorphisme de la famille HERV-K(HML2) pourrait par ailleurs avoir des conséquences physiopathologiques au sein de la population humaine, notamment dans les pathologies où le virus est réexprimé. Il a été démontré par plusieurs équipes que l'infection par le virus HIV-1 active la transcription de HERV-K(HML2) (Contreras-Galindo et al., 2007; Gonzalez-Hernandez et al., 2014, 2012). On peut imaginer que dans ce contexte, l'action de l'Env HERV-K(HML2) s'ajoute à celle de Vpu HIV-1 et donc que les individus qui présentent des allèles Env HERV-K(HML2) « efficaces » (e.g. K108, K109) contre la Tetherin seraient d'autant plus vulnérables à une infection par le virus HIV-1. Rappelons que l'enveloppe HERV-K(HML2), en plus d'être active sur le relargage de ses propres particules, est également efficace en conditions hétérologues, en particulier sur des particules dérivées de HIV-1, ce qui renforce l'hypothèse d'une « coopération » entre antagonistes.

1.2 Les domaines de l'enveloppe impliqués dans l'action anti-Tetherin

1.2.1 Le domaine d'interaction avec la Tetherin

Les expériences d'immunoprécipitation que nous avons menées ont permis de montrer que l'enveloppe HERV-K(HML2) interagit avec la Tetherin via la sous-unité de surface SU. On peut supposer que cette interaction a lieu au cours de la synthèse des deux protéines plutôt qu'en surface cellulaire car la version soluble de l'Env HERV-K(HML2) (mut 4) co-immunoprécipite avec le facteur de restriction. De nombreux antagonistes ont été décrits et caractérisés ces dernières années et révèlent une grande diversité dans les modalités d'interaction avec BST2. Dans certains cas, la reconnaissance se fait dans le cytoplasme, ou bien à la membrane plasmique et peut mettre en jeu les domaines transmembranaires (e.g. Vpu HIV-1, (Vigan and Neil, 2010)) ou intracellulaires (e.g. Nef SIV, (Serra-Moreno et al., 2013)) des deux protéines. L'interaction entre les ectodomaines extracellulaires a déjà été décrite pour l'enveloppe HIV-2, sans que l'on sache précisément si la région responsable est la SU ou la TM de la glycoprotéine rétrovirale (Le Tortorec and Neil, 2009). Dans la plupart des cas, y compris celui de Env HERV-K(HML2), l'interaction avec la Tetherin est nécessaire pour la fonction d'antagoniste, mais n'est pas suffisante.

1.2.2 Les domaines de l'enveloppe HERV-K(HML2) impliqués spécifiquement dans l'effet anti-Tetherin

La sous-unité SU de HERV-K(HML2), transfectée seule dans les cellules ne suffit donc pas à bloquer l'action de la Tetherin. Les tests fonctionnels que nous avons réalisés avec différents mutants de l'Env HERV-K(HML2) ont permis de montrer que la région transmembranaire est requise pour l'effet de blocage du facteur de restriction. En particulier, les mutants GPI-ancrés de l'enveloppe, bien qu'exprimés à la membrane plasmique, et interagissant avec le facteur de restriction, sont inaptes à s'opposer à la restriction de BST2. Il est possible que l'ajout d'une ancre GPI à la protéine change son trafic intracellulaire ou l'oriente vers des compartiments où elle ne peut exercer son activité d'antagoniste. On peut imaginer également que l'ancre GPI modifie la conformation de la protéine et inhibe soit directement son activité anti-Tetherin, soit la reconnaissance avec des partenaires cellulaires de l'Env qui sont indispensables au blocage du facteur de restriction. Ces données, comme celles obtenues pour les allèles endogènes, illustrent l'importance de la conservation des propriétés virologiques canoniques associées à l'enveloppe dans le maintien du blocage du facteur de restriction, et suggèrent que certaines modifications structurales peuvent être rédhibitoires.

Le deuxième enseignement important que nous avons tiré de l'étude des mutants est que la queue cytoplasmique de l'enveloppe HERV-K(HML2) n'a pas d'effet sur l'activité anti-Tetherin. En effet, la protéine mut1, délétée de la quasi-totalité de son domaine intra-cytoplasmique, conserve une activité d'antagoniste comparable à celle de la protéine native. Ce résultat met en évidence une première différence entre les enveloppes HERV-K(HML2) et HIV-2 puisque l'activité d'antagoniste de cette dernière repose sur sa queue cytoplasmique et sur le motif GYxxθ en particulier (où θ représente un résidu hydrophobe) (Le Tortorec and Neil, 2009). Cette séquence joue un rôle important dans le transport rétrograde (i.e. de la surface cellulaire vers le réseau trans-Golgien ou TGN) de la protéine d'enveloppe. L'enveloppe HERV-K(HML2) ne possède aucun motif équivalent, en accord avec le caractère non indispensable du domaine intracellulaire pour l'activité anti-Tetherin de cet antagoniste. Il est intéressant de noter que la protéine mut1, dans notre expérience, est aussi bien produite mais moins exprimée à la membrane plasmique que la protéine sauvage, ce qui suggère que la queue cytoplasmique joue un rôle dans la localisation subcellulaire de l'enveloppe HERV-K(HML2).

1.2.3 Le rôle de la protéine accessoire Rec

A partir de l'ARNm de l'enveloppe HERV-K(HML2), deux protéines sont produites : l'enveloppe *stricto sensu* et la protéine accessoire Rec, nécessaire à l'export des ARN viraux non épissés. Comme évoqué dans l'introduction, Rec est l'homologue fonctionnel de Rev pour HIV-1, Rex pour HTLV-1 et Rem pour MMTV. Aucune de ces trois protéines accessoires ne possède d'activité anti-Tetherin. C'est également ce que nous avons observé pour Rec, qui n'a aucun effet sur l'efficacité du relargage de particules virales en présence du facteur de restriction. Afin de confirmer le rôle d'antagoniste porté par l'enveloppe, un variant ne produisant pas Rec a été généré. Pour cela, des mutations silencieuses ont été introduites dans les sites donneurs et accepteurs utilisés pour générer la protéine Rec. Nous avons pu confirmer que cette enveloppe ne produisait pas de protéine Rec complète, qu'elle était localisée à la membrane plasmique et parfaitement fonctionnelle dans les tests de pseudotypage (données non présentées dans la thèse mais obtenues de manière reproductible). Les expériences réalisées dans l'article ont montré que l'enveloppe HERV-K(HML2) *stricto sensu* est également capable de s'opposer à l'action de la Tetherin, bien qu'elle constitue un moins bon antagoniste que l'enveloppe produisant Rec. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette légère différence d'efficacité. Tout d'abord, nous avons pu observer que l'enveloppe HERV-K(HML2) *stricto sensu* est produite en moins grande quantité que la version produisant Rec, comme l'illustre le western blot présenté en figure 4A de l'article. Il est très probable que, Rec étant impliqué dans l'export des ARN viraux, son absence réduise la quantité d'ARN messager servant de matrice pour la traduction de la protéine d'enveloppe. Ensuite, dans nos expériences, l'enveloppe HERV-K(HML2) *stricto sensu* semble mieux maturée (on distingue clairement la bande correspondant au précurseur SU+TM et la bande correspondant à la sous-unité SU) que l'enveloppe produisant Rec, pour laquelle la forme très majoritaire est le précurseur. Il est possible que cette forme « précurseur » soit la plus active pour bloquer l'action de la Tetherin, ce qui expliquerait que l'enveloppe produisant Rec soit légèrement plus efficace. Il est enfin envisageable que Rec, bien que n'ayant aucun effet *per se*, participe à l'action anti-Tetherin. La protéine accessoire pourrait par exemple être présente dans un complexe impliquant l'Env et la Tetherin, permettre le recrutement d'autres facteurs cellulaires et/ou jouer sur la localisation de l'enveloppe dans la cellule.

1.3 Un mécanisme d'action original

Les antagonistes caractérisés jusqu'à présent n'agissent pas de la même façon sur la Tetherin et leur mécanisme d'action peut aussi dépendre du type cellulaire considéré. Une constante cependant est qu'ils semblent tous interférer avec le trafic intracellulaire du facteur de restriction. Schématiquement, deux mécanismes principaux ont été décrits dans la littérature (cf Fig. 21 de l'introduction) : la relocalisation de la Tetherin de la surface cellulaire vers des compartiments intracellulaires où elle ne peut exercer son action mécanique de rétention, et la dégradation du facteur de restriction. Par exemple, l'enveloppe HIV-2 induit, grâce à son motif d'endocytose (motif GYxxθ évoqué plus haut), l'internalisation de la Tetherin de surface qui se concentre au TGN (Le Tortorec and Neil, 2009). Aucune dégradation du facteur de restriction n'est par contre observée dans ce cas. D'autres points de blocage de la Tetherin ont été identifiés et complexifient cette vision binaire. Vpu HIV-1 bloque par exemple la Tetherin par différents mécanismes non exclusifs (Dubé et al., 2010; Lewinski et al., 2015; McNatt et al., 2013; Pujol et al., 2016) : (i) en induisant le déplacement latéral de la Tetherin au sein de la membrane plasmique pour l'exclure des sites de bourgeonnement viral ; (ii) en bloquant le transport antérograde de la Tetherin nouvellement synthétisée ; (iii) en inhibant le recyclage de la Tetherin (de l'intérieur de la cellule vers la membrane plasmique) ; (iv) en interagissant avec le facteur βTRCP et favorisant ainsi l'adressage du facteur de restriction à la voie de dégradation lysosomale. La situation est encore plus complexe pour d'autres antagonistes comme la GP d'Ebola ou l'Env HERV-K(HML2) qui agissent selon un mécanisme encore inconnu à ce jour. Aucune des deux enveloppes n'est capable d'induire l'internalisation ou la dégradation du facteur de restriction. Ebola GP n'entraîne pas non plus d'exclusion de la Tetherin des sites de bourgeonnement du virus, ce que l'on ne peut pas exclure à l'heure actuelle pour l'enveloppe HERV-K(HML2).

Au cours de plusieurs expériences réalisées pour l'article, il est apparu que la co-transfection de l'enveloppe HERV-K(HML2) avec la protéine BST2 induisait une modification systématique du profil de glycosylation de cette dernière. Cependant les travaux de Andrew et coll., montrant d'une part que l'expression de la Tetherin en condition transitoire modifie ses glycosylations, et d'autre part qu'une Tetherin non glycosylée garde ses propriétés antivirale (Andrew et al., 2009), suggéraient que cette observation était sans conséquence fonctionnelle. Récemment, une équipe a identifié et caractérisé un nouvel antagoniste de la Tetherin, la protéine ORF7a du coronavirus SARS dont le mécanisme d'action original donne un éclairage nouveau aux résultats que nous avons obtenus (Taylor et al., 2015). En effet, dans

des conditions de surexpression proches de celles décrites dans notre article, la protéine ORF7a n'induit ni internalisation, ni dégradation de la Tetherin mais interfère avec la glycosylation du facteur de restriction. Selon les auteurs –et en désaccord avec les données de Andrew et coll.- la forme non glycosylée de la Tetherin, avec laquelle ORF7a interagit préférentiellement, perd sa capacité de rétention des particules virales à la surface cellulaire. L'étude plus approfondie des conséquences fonctionnelles des modifications du profil de glycosylation de la Tetherin associées à l'expression de l'Env HERV-K(HML2) pourrait faire l'objet d'une nouvelle étude.

1.4 Autres rôles de la Tetherin et potentielles implications physiopathologiques de l'interaction Env HERV-K(HML2) /Tetherin

1.4.1 Le rôle immunomodulateur de la Tetherin

En plus de son action mécanique de blocage des virions à la surface cellulaire, la Tetherin intervient dans la régulation et la coordination de l'immunité antivirale. Tout d'abord, en l'absence d'antagoniste, les virions retenus à la surface cellulaire peuvent être reconnus par des anticorps neutralisants ce qui conduit à l'opsonisation des cellules infectées. Celles-ci peuvent ensuite être éliminées, par exemple par la voie du complément, ou par un mécanisme d'ADCC (pour antibody-dependant cellular cytotoxicity) (Alvarez et al., 2014). Ensuite, les particules virales endocytées après leur rétention à la membrane sont dégradées et peuvent ainsi fournir des antigènes qui sont présentés sur les CMH de classe I ou II. A titre d'illustration, les souris B6 KO pour la Tetherin présente des niveaux significativement réduits de cellules NK, T CD4 + et T CD8 + par rapport aux souris sauvages, en réponse à une infection par le virus Friend (Li et al., 2014). Enfin, la Tetherin, comme d'autres facteurs de restriction se comporte comme un PRR (pathogen recognition receptor), à la fois senseur de l'infection virale et élément initiateur de l'activation de la voie NFkB (Cocka and Bates, 2012; Galão et al., 2012; Tokarev et al., 2013). Cette propriété repose sur le motif (YxY) présent dans la queue cytoplasmique de la Tetherin et semble être une acquisition très récente du facteur de restriction, présente chez l'homme mais absente chez la plupart des singes. L'antagoniste Vpu est capable d'inhiber l'activation de cette voie de signalisation induite par le Tetherin. Cela n'a pas encore été démontré pour d'autres antagonistes et pourrait être testé pour l'enveloppe HERV-K(HML2). Son statut d'antagoniste endogène laisse présager qu'elle pourrait moduler les réponses innées induites en cas d'infection et potentialiser la propagation de virus exogène.

1.4.2 Tetherin, Env HERV-K(HML2) et cancers

La Tetherin a été beaucoup étudiée dans le contexte de l'infection virale mais un nombre croissant d'études suggèrent que la protéine intervient dans une multitude de situations physiopathologiques, notamment les cancers. Plusieurs études corrélatives montrent en effet que les niveaux d'expression de BST2 sont proportionnels à l'agressivité de différentes tumeurs, en particulier celles du sein (Cai et al., 2009; Sayeed et al., 2013), du cerveau (Wainwright et al., 2011) et des cavités orales (Fang et al., 2014). *In vitro*, la surexpression de BST2 dans des cellules de cancer du sein augmente leur capacité de migration, d'invasion, de prolifération et de croissance en agar (i.e. indépendamment d'un ancrage à la matrice extracellulaire, propriétés associée à la transformation cellulaire) (Cai et al., 2009; Mahauad-Fernandez et al., 2015; Sayeed et al., 2013) Néanmoins ces conclusions semblent dépendantes du type cellulaire : dans d'autres lignées, l'expression de BST2 induit plutôt une diminution de la croissance et de la migration des cellules (Gu et al., 2012). *In vivo*, le groupe de Okeoma, en utilisant deux modèles syngéniques de métastase de cancer du sein, a montré que BST2 joue un rôle fonctionnel dans la tumorigenèse (revue dans (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016)). Les mécanismes moléculaires associés ne sont pas encore très bien compris. Il est possible que la protéine « attache » les cellules comme elle le fait lorsqu'il s'agit d'un virus et d'une cellule. A titre d'illustration, la suppression de BST2 dans des cellules d'adénocarcinome mammaires de souris entraîne une diminution significative des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire (revue dans (Mahauad-Fernandez and Okeoma, 2016)). Cette implication du facteur de restriction dans les cancers est intéressante pour notre étude. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, certains provirus HERV-K(HML2) sont induits au cours du processus de tumorigenèse, en particulier dans les cancers du sein où la Tetherin semble exprimée à des niveaux élevés. Nous avons de plus montré dans l'article 2 que l'enveloppe HERV-K(HML2) augmente le pouvoir migratoire des cellules épithéliales de sein MCF10A et induit une transition de type EMT dans ce modèle. On peut imaginer que l'interaction de la Tetherin et de l'enveloppe ait des conséquences fonctionnelles dans ce type de modèle et puisse jouer un rôle dans l'agressivité des tumeurs.

2. La protéine d'enveloppe et ses propriétés oncogéniques

2.1 L'enveloppe HERV-K(HML2) active la voie des MAP kinases, comme l'oncogène Env JSRV

2.1.1 Induction de la phosphorylation de ERK 1/2 et de p38

L'une des conclusions majeures de l'article 2 de la thèse est que l'enveloppe HERV-K(HML2), comme l'enveloppe du rétrovirus infectieux oncogénique JSRV, active la MAP kinase ERK 1/2 et pourrait par ce biais avoir un rôle important dans la transformation cellulaire. Il est connu en effet que la voie de signalisation des MAP kinases est cruciale dans le contrôle de la prolifération des cellules, et sa dérégulation est observée dans un grand nombre de cancers (voir Fig. 26 et revue (Dhillon et al., 2007)). Le tableau montre que dans la majorité des cas, l'activation incontrôlée de la voie des MAP kinases est due à une mutation dans la protéine Ras. Pour les mélanomes, c'est cependant plutôt la kinase BRAF qui est mutée, et dans 90% des cas de mutations, la valine est remplacée par un acide glutamique (mutation V600E).

surexpression de EGFR	▪ la plupart des carcinomes (>50%)
surexpression de ERBB2	▪ sein (30%)
mutation de Ras	▪ pancréas (90%) ▪ adénocarcinome pulmonaire (35%) (pas à petites cellules) ▪ thyroïde, folliculaire (55%) ▪ thyroïde, papillaire (60%) ▪ séminome (45%) ▪ mélanome (15%) ▪ vessie (10%) ▪ foie (30%) ▪ rein (10%) ▪ syndrome myélodysplasique (40%) ▪ leucémie myéloïde aigue (30%)
mutation de BRAF	▪ mélanome (66%) ▪ cancer colorectal (12%)

Figure 26. Cancers et mutations dans la voie de signalisation ERK
D'après (Dhillon et al., 2007).

Compte tenu de l'importance physiopathologique de ce résultat, nous avons voulu identifier le niveau auquel agissent les enveloppes HERV-K(HML2) et JSRV dans la cascade de signalisation des MAP kinases. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs inhibiteurs de différents acteurs de la voie de signalisation, en commençant par le FTI-277 qui cible Ras. Cet inhibiteur n'a aucun effet sur la phosphorylation de ERK 1/2 induite par les enveloppes JSRV ou HERV-K(HML2). Il est donc probable que les deux Env virales activent la voie en aval de Ras. Une nuance est cependant à apporter concernant la spécificité du FTI-277.

L'inhibiteur est souvent décrit comme ciblant les formes H- et N- de Ras et étant inactif sur K-Ras (e.g. (Johnson et al., 2010; Maeda et al., 2005)), mais les données de certains fournisseurs indiquent parfois d'autres spécificités. Dans notre système expérimental, nous avons pu confirmer que le FTI-277 est actif sur H-Ras mais nous ne pouvons affirmer son statut par rapport aux deux autres formes de la protéine. Une autre interprétation possible de cette 1ère expérience serait donc par exemple que les deux enveloppes activent K-Ras, exprimée en 293T. D'autres inhibiteurs de la protéine Ras existent et pourraient nous permettre de préciser ces premières conclusions. Certains agissent selon un mécanisme d'action différent du FTI-277. C'est le cas en particulier du FTS ou Salirasib qui est mentionné dans une étude sur la transformation par l'enveloppe JSRV (Johnson et al., 2010). Cette molécule est décrite comme active sur les trois formes de Ras, mais cible également la protéine m-TOR qui intervient dans la voie de signalisation PI3K/AKT, ce qui rend l'interprétation des résultats un peu plus complexe (pour une revue voir (Rotblat et al., 2008)). Les données bibliographiques concernant l'utilisation du FTI-277 dans les tests de transformation par l'enveloppe JSRV montrent que l'inhibiteur a des effets variables en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Par exemple, dans les NIH3T3, la transformation cellulaire induite par l'enveloppe JSRV est réduite en présence de FTI-277 (Hull and Fan, 2006; Maeda et al., 2005) alors que l'effet inverse (i.e. augmentation du nombre de foyers transformés) est observé dans les cellules MDCK, qu'elles soient cultivées en 3D ou en conditions de culture « classiques » (Johnson et al., 2010). Ces résultats suggèrent que l'enveloppe JSRV interagit avec des partenaires et des co-facteurs différents selon le type de cellule considéré et montre également que les résultats obtenus dans un modèle cellulaire ne sont pas toujours extrapolables à d'autres systèmes expérimentaux.

Nous avons également utilisé un inhibiteur de Raf, TAK-632, qui est décrit comme actif sur toutes les formes de la kinase, qu'elles soient sauvages ou mutées, et avons montré que les deux enveloppes agissent en amont de cette protéine. Comme attendu, l'ajout d'inhibiteurs de MEK 1/2 (U0126 et PD98059) sur des cellules exprimant l'enveloppe JSRV bloque la phosphorylation de ERK 1/2. Cette observation corrèle avec les données publiées montrant l'inhibition de la transformation induite par l'enveloppe JSRV dans différentes lignées cellulaires en présence de l'un de ces deux inhibiteurs (e.g. (Hull and Fan, 2006; Maeda et al., 2005)).

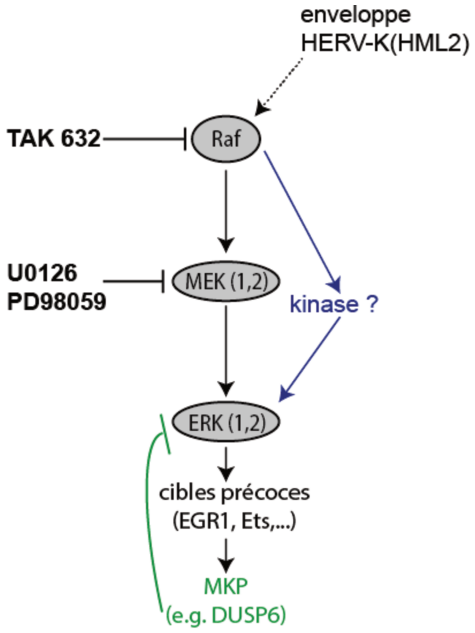


Figure 27. Hypothèses sur les voies d'activation parallèles de ERK par l'enveloppe HERV-K(HML2)
La voie classique MEK-ERK est représentée en noir et gris. Les deux hypothèses concernant l'activation d'une voie d'activation parallèle par l'enveloppe HERV-K(HML2) sont indiquées en bleu et vert**.**

Par contre, de façon tout à fait remarquable, U0126 et PD98059 ont un effet modéré sur l'activation de ERK 1/2 médiée par Env HERV-K(HML2). Deux hypothèses peuvent être proposées (Fig. 27) :

- La première fait intervenir le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation MEK-ERK par les MAP kinases phosphatases (ou MKP). Rappelons que, après leur activation dans le cytoplasme, les MAP kinases sont transloquées au noyau où elles catalysent la phosphorylation de facteurs de transcription qui mènent, entre autres, à la synthèse de phosphatases. Dans notre modèle, les résultats de transcriptomique révèlent que l'enveloppe HERV-K(HML2) induit la MKP DUSP6 à 48 heures post-transfection, ce qui traduit la mise en place d'une régulation négative de la voie des MAPK. Une étude cinétique de l'induction de ERK 1/2 (non présentée dans le manuscrit) a montré que, dans nos conditions expérimentales, l'enveloppe JSRV active la phosphorylation de la MAP kinase plus tôt et à des niveaux plus élevés que l'enveloppe HERV-K(HML2). Dans ce contexte, il est très probable que les rétrocontrôles négatifs soient mis en place plus précocement dans le cas de la transfection par l'enveloppe JSRV, ce qui permettrait d'expliquer les différences observées entre les deux enveloppes rétrovirales.
- La seconde hypothèse fait intervenir une kinase qui serait activée par l'enveloppe HERV-K(HML2) et phosphorylerait directement ERK 1/2, sans passer par MEK 1/2. La phosphorylation d'une MAP kinase indépendamment de l'activation d'une MAP kinase

kinase a été décrite pour p38 mais pas pour ERK 1/2. Ce mécanisme d'activation alternatif repose sur la protéine TAB-1 qui interagit avec la MAP kinase p38 et induit son autophosphorylation (Ge, 2014).

En plus de ERK 1/2, deux autres MAPK ont été largement étudiées dans la littérature : p38 et JNK. Ces protéines sont activées par d'autres stimuli (le stress cellulaire en particulier), et entraînent des réponses différentes (l'apoptose des cellules, par exemple). Nous avons prouvé, dans le modèle des cellules 293T, que les enveloppes HERV-K(HML2) et JSRV induisent la phosphorylation de p38. Ce résultat est en accord avec ce qui a déjà été observé pour l'enveloppe JSRV dans des cellules de rongeurs. Maeda et coll. ont en effet montré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de p38, dans des tests de transformation de cellules NIH3T3 et RK3E, induit une augmentation du nombre de foyers transformés (Maeda et al., 2005), prouvant à la fois l'activation de la kinase et son effet inhibiteur sur la transformation cellulaire. Les mécanismes sous-jacents n'ont jamais été étudiés dans le cas de JSRV mais des données de la littérature font état d'un dialogue entre les voies p38 et ERK 1/2 (pour revue voir (Fey et al., n.d.). En particulier, la kinase p38 dans son état phosphorylée, active la phosphatase PP2a qui déphosphoryle la MAPKK MEK 1/2, ce qui peut expliquer que les inhibiteurs utilisés par Maeda et coll. potentialisent les effets de la transformation induite par l'Env JSRV.

2.1.2 Induction de facteurs de transcription impliqués dans la transformation cellulaire

Un autre point majeur de l'étude que nous avons réalisée est l'obtention d'une signature transcriptomique de l'enveloppe HERV-K(HML2) en 293T, qui est très proche de celle de mélanomes présentant une mutation V600E dans BRAF (e.g. (Pratilas et al., 2009)). La petite liste de gènes activés par l'Env HERV-K(HML2) à 48 heures post-transfection démontre une activation générale de la voie ERK 1/2 et révèle l'induction de quelques facteurs de transcription aux effets variés. Parmi les plus fortement induits on retrouve : EGR1 (Early Growth Response 1), ZCCHC12 et deux membres de la famille Ets (ETV4 et ETV5, pour Ets variant 4/5). EGR1 et les Ets sont classiquement décrits dans la littérature comme des cibles directes de ERK 1/2. Les Ets sont associés au développement et à l'agressivité de plusieurs tumeurs (e.g. sein, prostate, ovaire) et jouent un rôle en particulier dans la transition épithélio-mésenchymateuse (voir (Abal, 2014; Colas et al., 2012; Oh et al., 2012; Pellecchia et al., 2012)). EGR1 intervient dans des processus cellulaires très variés et est impliqué dans les cancers, en particulier celui de la prostate. Ce facteur de transcription a des propriétés anti-

apoptotiques, pro-angiogéniques et permet la survie cellulaire dans le contexte tumoral (revue dans (Adamson and Mercola, 2002)). Le transcrit ZCCHC12, également fortement induit dans nos expériences, n'a été que très peu décrit jusqu'à présent. Il semble qu'il soit majoritairement exprimé dans le cerveau ainsi que dans quelques lignées cellulaires transformées de types variés (lignées de neuroblastomes, glioblasomes, cellules HeLa, 293T, cellules de cancers de sein MCF7, fibrosarcomes HT1080) (Li et al., 2009). ZCCHC12 a également été décrit comme un co-activateur transcriptionnel des deux facteurs de transcription AP-1 et CREB, impliqués dans une grande variété de processus cellulaires. Il interagit avec le proto-oncogène c-Jun (Li et al., 2009). Ces données suggèrent qu'il pourrait donc jouer un rôle direct dans la transformation cellulaire.

Afin d'identifier les cibles de cette première vague de facteurs de transcription, nous avons réalisé une autre étude transcriptomique, cette fois-ci 72 heures après la transfection de l'enveloppe HERV-K(HML2) et du contrôle, en espérant que les protéines correspondants aux premiers transcrits identifiés soient synthétisées et activent la transcription d'autres éléments effecteurs (données non présentées dans la thèse). Parmi les transcrits les plus fortement induits on retrouve ID1 et ID3, qui sont impliqués dans un grand nombre de cancers via des mécanismes variés et sont en l'occurrence des régulateurs négatifs de ETV4 et ETV5 (voir revue (Perk et al., 2005)).

Un point important de l'article 2 est également d'illustrer et de renforcer la grande proximité entre HERV-K(HML2) et JSRV. Les phénomènes d'induction de la voie ERK 1/2 et d'accumulation de différents facteurs de transcription sont partagés par l'enveloppe JSRV mais par aucune autre enveloppe rétrovirale (endogène ou exogène) présente dans le large panel testé. En particulier, l'enveloppe de MMTV, un autre bétarétrovirus, n'a aucun effet sur les voies de signalisation identifiées. Ceci s'explique peut être par le fait que la transformation induite par ce virus passe essentiellement par un mécanisme de mutagenèse insertionnelle, ou bien, dans une moindre mesure, par une transduction de signal associée au motif ITAM présent dans la SU de l'Env (Katz et al., 2005; Ross et al., 2006). Notons aussi que dans nos expériences, l'enveloppe du rétrovirus oncogène HTLV-1, active fortement le facteur de transcription EGR1, ce qui a déjà été décrit dans la bibliographie mais semble être plutôt le fait de la protéine accessoire Tax du virus (Fujii et al., 1992), mais n'induit par contre ni ETV4, ni ETV5.

En prenant un angle de vue plus large, il est intéressant de remarquer que différents types de virus – rétro ou non, enveloppés ou non – activent ERK 1/2, par divers mécanismes et pour remplir des fonctions variées. On peut citer plusieurs exemples : la protéine HBx du virus de

l'hépatite B (hépadnavirus), qui induit l'expression de la métalloprotéinase MMP9 notamment grâce à l'activation de ERK 1/2 (Chung et al., 2004) ; la protéine d'enveloppe hémagglutinine du virus Influenza (orthomyxovirus) qui active la voie des MAP kinase, indispensable à la multiplication virale (Marjuki et al., 2006) ou le cas de la protéine core du virus de l'hépatite C qui active ERK 1/2, p38 et JNK (Erhardt et al., 2002).

2.2 Les domaines de l'enveloppe HERV-K(HML2) impliqués dans l'activation de la transduction du signal

2.2.1 Importance de la queue cytoplasmique de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans la transduction du signal

Une partie importante de notre étude a été consacrée à l'identification des domaines de la protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) requis pour activer la MAP kinase ERK 1/2 et induire les différents facteurs de transcription identifiés. Nous avons pu montrer que la queue cytoplasmique de l'enveloppe est nécessaire pour expliquer ces phénomènes. Le domaine cytoplasmique de l'enveloppe JSRV contient un motif YXXM de fixation de la PI3K qui est indispensable à la transformation de certaines lignées cellulaires comme les NIH3T3 mais non requis dans d'autres modèles (Fig. 28). La recherche d'un tel motif dans le domaine intra-cytoplasmique de l'enveloppe HERV-K(HML2) s'est révélée infructueuse (Fig. 28).

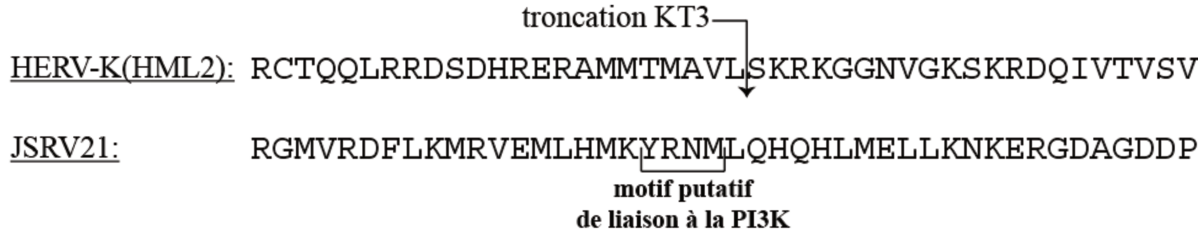


Figure 28. Les queues cytoplasmiques des enveloppes HERV-K(HML2) et JSRV

L'hypothèse que nous privilégions est que le domaine cytoplasmique de l'enveloppe interagit avec un ou des partenaire(s) spécifique(s) qui participe(nt) à l'initiation de la voie de signalisation et que nous souhaitons à présent identifier. Pour cela, nous avons généré une série de troncations intermédiaires de la queue cytoplasmique (résultats non présentés dans la thèse) ce qui nous a permis de caractériser le domaine minimal requis pour médier les effets d'activation de la transduction du signal. Les expériences que nous avons réalisées suggèrent que la partie C-terminale de la queue cytoplasmique n'est pas indispensable. En effet, le mutant KT3 (Fig. 28) induit la transduction du signal au même niveau, voire mieux que l'enveloppe sauvage. Afin d'identifier les résidus importants pour l'induction de la

transduction du signal, nous avons entrepris de muter l'ensemble des acides aminés de la queue cytoplasmique du variant KT3. Les premiers résultats que nous avons obtenus (non présentés ici) révèlent que la plupart des mutations n'ont aucun impact négatif sur l'activation de la transduction du signal. Quelques mutants perdent cependant totalement la capacité à activer la voie des MAPK, mais ce phénotype semble davantage lié à une mauvaise production de la protéine. L'un des mutants ponctuels est en revanche particulièrement intéressant car il est bien exprimé et infectieux mais présente une capacité très réduite de phosphorylation de la kinase ERK 1/2. Ce mutant a un double intérêt pour la poursuite de notre étude : il renseigne sur les résidus potentiellement impliqués dans la liaison avec un/des partenaire(s) cellulaire(s) et constitue un contrôle négatif pour les expériences de crible double hybride que nous allons mettre en œuvre. Cette technique a été utilisée par le groupe de C. Leroux et a permis d'identifier 7 interactants directs de la queue cytoplasmique de JSRV (Monot et al., 2015). Parmi ces protéines, RALBP1 représente le partenaire le plus fréquemment détecté et a donc fait l'objet d'une étude détaillée. Les auteurs ont montré que cette protéine, impliquée dans la transduction de signal via Ras et effecteur de RalA (Ras-like protein A), joue un rôle important dans l'activation de la cascade de signalisation PI3K médiée par l'enveloppe JSRV. Cependant, sachant que Env HERV-K(HML2) n'active pas cette voie de transduction, RALBP1 est probablement un partenaire spécifique de l'enveloppe ovine.

2.2.2 Le rôle de Rec dans la transduction du signal

Comme décrit précédemment pour l'étude sur l'interaction HERV-K(HML2)/Tetherin, les effets de Rec ont été testés afin de les dissocier de ceux de la protéine d'enveloppe. La protéine accessoire n'avait aucun effet direct sur le blocage de l'activité de la Tetherin et n'est pas non plus responsable de l'activation de ERK 1/2 et des facteurs de transcription. L'effet de l'enveloppe HERV-K(HML2) *stricto sensu* est similaire à celui de l'enveloppe consensus exprimant Rec. Rappelons néanmoins que Rec possède des propriétés oncogéniques. Des souris transgéniques exprimant la protéine accessoire développent par exemple très tôt un certain nombre de modifications morphologiques au niveau testiculaire et montrent des signes de carcinome *in situ*, lésion caractéristique précédant le développement de tumeurs germinales de type séminomes chez l'homme (Galli et al., 2005). Les mécanismes moléculaires associés ne font pas intervenir la voie de signalisation des MAP kinases mais reposent plutôt sur une levée d'inhibition du proto-oncogène c-myc ou du récepteur aux

androgènes (AR) (Denne et al., 2007; Kaufmann et al., 2010). Les protéines Env et Rec étant co-exprimées dans certains types de tumeurs, il serait intéressant de déterminer si leurs propriétés oncogéniques respectives peuvent être additives.

2.2.3 Le rôle du récepteur de l'enveloppe HERV-K(HML2)

L'interaction de l'enveloppe JSRV avec la protéine HYAL2 humaine, la localisation du gène *hyal2* humain au locus 3p21.3 suppresseur de tumeur et le rôle de HYAL2 dans le métabolisme de la matrice extracellulaire sont autant d'arguments convergeant vers un rôle potentiel du récepteur dans la transformation induite par l'enveloppe JSRV. La preuve de ce rôle a été apportée par des études réalisées dans les cellules BEAS-2B de l'épithélium humain des bronches (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003). Dans ces cellules, HYAL2 interagit avec le récepteur tyrosine kinase RON, le rendant inactif. Lorsque l'Env JSRV interagit avec son récepteur, RON est libéré, ce qui permet l'activation des voies PI3K/AKT et MAP kinase et la transformation des cellules. Plusieurs arguments viennent néanmoins relativiser l'importance de ce mécanisme de transformation. Tout d'abord, l'enveloppe JSRV est incapable d'interagir avec le récepteur HYAL2 murin et donc de médier l'entrée dans les cellules de souris alors qu'elle transforme très efficacement les fibroblastes murins NIH3T3 (S.-L. Liu et al., 2003). De plus, l'expression de l'enveloppe JSRV dans des poumons de souris induit un adénome pulmonaire similaire à celui observé chez des moutons infectés par des provirus JSRV réplicatifs (Wootton et al., 2006, 2005). Ces résultats indiquent que la protéine HYAL2 humaine ne joue aucun rôle oncogénique dans la transformation induite par l'Env JSRV chez la souris. L'interaction Env JSRV/récepteur chez l'hôte naturel (i.e. le mouton) n'a pas été étudiée en détails mais il semble peu probable que son intervention soit majeure dans le processus de transformation.

Le récepteur du virus HERV-K(HML2) n'est pas connu. Comme évoqué dans l'introduction, des données de notre laboratoire et d'autres équipes montrent que l'enveloppe HERV-K(HML2) est *pan* tropique (voir Fig. 18 de l'introduction). Le récepteur est donc une protéine très conservée et exprimée de façon ubiquitaire, en particulier sur les cellules 293T qui sont susceptibles à l'infection. Cependant, en cellules 293T, le variant mut 1, délété de sa queue cytoplasmique, présente une capacité d'activation de ERK 1/2 et des facteurs de transcription très réduite par rapport à l'enveloppe sauvage alors qu'il infecte beaucoup plus efficacement les cellules que cette dernière. Ceci suggère que le récepteur n'est pas impliqué dans la

transduction du signal médiée par l'enveloppe HERV-K(HML2), ou bien intervient de façon marginale. Il n'est pour autant pas exclu qu'il joue un rôle dans d'autres lignées cellulaires.

2.3 L'enveloppe HERV-K(HML2) induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans le modèle des cellules MCF10A

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus physiologique fondamental qui a lieu au cours du développement embryonnaire. Il a également été décrit comme important dans la formation de métastases dans le cas de tumeurs épithéliales. Le déclenchement d'un programme EMT conduit à la perte de l'identité épithéliale d'une cellule qui prend alors la forme d'une cellule mésenchymateuse. Ce processus comprend différentes caractéristiques, dont, la régression des jonctions cellule-cellule, la perte de la polarité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et le gain de propriétés migratoires et/ou invasives. Plusieurs protéines de virus oncogènes humains ont été impliquées dans le processus d'EMT (revue dans (Chen et al., 2016)). C'est le cas par exemple des protéines E6 et E7 du virus HPV, de la molécule LMP2A de EBV ou de l'antigène HBx de HBV. Dans notre étude, nous avons cherché à déterminer si l'enveloppe HERV-K(HML2) peut induire l'EMT. Pour cela, nous avons choisi le modèle des cellules épithéliales humaines de sein, les MCF10A. Cette lignée a été utilisée pour plusieurs raisons : d'une part car il s'agit d'une lignée humaine classique pour étudier l'EMT et d'autre part parce que l'expression de l'enveloppe HERV-K(HML2) est fréquemment associée aux tumeurs du sein (e.g. (Seton-Rogers et al., 2004; Xian et al., 2009)). Nous avons pu observer que l'expression de l'enveloppe HERV-K(HML2) induit des changements caractéristiques du profil d'expression de certains marqueurs de « l'état épithélial » (e.g. réduction de l'expression de la E-cadhérine, surexpression de plusieurs protéines du cytosquelette, induction des facteurs de transcription clé). Ces altérations moléculaires sont associées à un changement morphologique des cellules qui perdent leur organisation classique en acini et deviennent plus individualisées et allongées. De plus, les tests de transwell révèlent que l'enveloppe HERV-K(HML2) augmente la capacité migratoire des cellules sans toutefois leur conférer de propriétés invasives. Nous avons par ailleurs obtenu des données de transcriptomique sur des cellules MCF10A exprimant l'enveloppe HERV-K(HML2). La signature est moins nette qu'en cellules 293T mais l'analyse globale de données à l'aide d'un logiciel basé sur l'ontologie moléculaire (logiciel DAVID) révèle une sur représentation des transcrits liés à la migration cellulaire, à l'interaction avec la matrice extracellulaire ou à la prolifération (données en cours d'analyse, non présentées dans la thèse). Nous avons également réalisé un test de « soft

agar », moins quantitatif que l'étude des marqueurs moléculaires de l'EMT, mais qui permet aussi d'évaluer la transformation cellulaire. Les premiers résultats obtenus indiquent que les cellules exprimant l'enveloppe HERV-K(HML2) présentent une capacité accrue à croître sans ancrage à la matrice extracellulaire, sans toutefois rejoindre les niveaux de transformation observés avec l'oncogène H-ras, utilisé en contrôle positif dans l'expérience (données préliminaires non présentées dans la thèse). L'ensemble de ces données renforcent l'implication de l'enveloppe dans le processus de tumorigenèse et suggèrent qu'elle pourrait participer à la formation de métastases dans les cancers du sein *in vivo*.

D'autre part, plusieurs études révèlent une association forte entre l'expression de protéines de HERV-K(HML2) et le développement/l'agressivité des mélanomes. Serafino et coll. ont montré que l'expression du provirus HERV-K(HML2) dans plusieurs lignée de mélanomes est liée à la transition d'un phénotype adhérent vers un phénotype non adhérent (Serafino et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier plus en détails l'évolution des différents marqueurs cités plus haut dans le contexte de mélanocytes/mélanomes exprimant naturellement ou surexprimant l'enveloppe HERV-K(HML2). Bien que le terme d'EMT ne puisse être formellement employé dans ce cas, les mélanocytes différenciés expriment la E-cadherin et une perte de l'expression de ce marqueur épithélial est observée dans les stades avancés de mélanome avant l'apparition de métastases ((Caramel et al., 2013) et revue dans (Richard et al., 2014)). L'un des régulateurs clé des changements phénotypiques associés à l'agressivité des mélanomes est MITF, un facteur de transcription contrôlant, en conditions physiologiques, le développement des mélanocytes. Selon le modèle du « rhéostat » proposé par C. Goding (Goding, 2011) (Fig. 29), des niveaux élevés de MITF maintiennent le statut différencié des mélanocytes, une expression intermédiaire du facteur accompagne la prolifération cellulaire, alors que des niveaux faibles sont associés à un phénotype invasif des cellules.

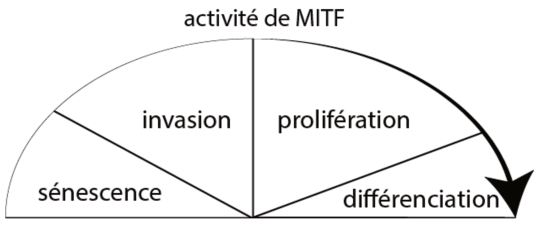


Figure 29. Le modèle du rhéostat
D'après (Goding, 2011).

Les LTR du provirus HERV-K(HML2) étant régulés par MITF dans les mélanocytes/mélanomes (Katoh et al., 2011), il est tentant de faire l'hypothèse que

l'enveloppe du virus endogène, exprimée dans les mélanocytes, pourrait être l'un des facteurs de la plasticité et de l'agressivité des mélanomes.

2.4 Les propriétés oncogéniques de l'enveloppe HERV-K(HML2) et son statut d'endogène

Les résultats que nous avons obtenus en 293T et en MCF10A montrent que l'enveloppe HERV-K(HML2) participe au processus d'oncogenèse et révèlent une grande proximité avec l'enveloppe JSRV. Cependant, dans toutes nos expériences, il apparaît que les effets de JSRV sont plus forts et plus variés. Tout d'abord, l'activation de ERK 1/2 ou des facteurs de transcription est toujours de plus grande amplitude avec l'enveloppe du rétrovirus de mouton. De plus, contrairement à l'Env HERV-K(HML2), l'Env JSRV est capable d'activer la voie PI3K/Akt, impliquée dans les processus de prolifération cellulaire et de carcinogenèse. Même si dans les modèles cellulaires étudiés la transformation repose en grande partie sur une seule voie de signalisation (e.g. 208F et NIH3T3 sur la voie PI3K, MEK-ERK en R3EK), on peut supposer que, *in vivo*, le développement de tumeurs est potentialisé par l'activation simultanée de plusieurs voies. Précisons également que l'enveloppe JSRV incluse dans l'ensemble des expériences est celle d'un rétrovirus infectieux circulant chez le mouton alors que l'enveloppe HERV-K(HML2) de Phoenix correspond au progéniteur putatif de la dernière amplification de la famille endogène dans les génomes humains. Les différentes copies endogènes de JSRV n'ont pour l'instant aucun rôle pro-tumoral décrit, ce qui va dans le sens de l'observation générale qu'une endogénéisation s'accompagne d'une atténuation de la pathogénicité. Dans ce contexte, il est remarquable que la plupart des allèles endogènes de l'enveloppe HERV-K(HML2) conservent une activité d'induction de la voie des MAP kinases et des facteurs de transcription y compris les allèles 17833 et 115 qui ont perdu un grand nombre de leur propriétés virologiques canoniques et qui sont par ailleurs inactives sur la Tetherin. Il est donc probable que l'enveloppe HERV-K(HML2) ait eu un statut d'oncogène comparable à celui de l'Env JSRV infectieuse, qui s'atténue progressivement du fait de la cohabitation avec l'hôte mais dont il subsiste certaines propriétés.

2.5 Enveloppe HERV-K(HML2) et pathogenèse *in vivo*

2.5.1 Cancers et résistance aux traitements

L'ensemble des données présentées dans la thèse suggèrent fortement que l'enveloppe HERV-K(HML2), sans être la cause majeure du processus de carcinogénèse, apporterait un

avantage aux cellules qui l'expriment dans le contexte tumoral. L'une des hypothèses que nous privilégions est que l'Env HERV-K(HML2) pourrait participer à la résistance au traitement, observée dans plusieurs type de cancers, en particulier les mélanomes. Environ un mélanome sur deux présente une mutation sur le codon 600 (normalement une valine) du gène BRAF. Les patients dont la tumeur est mutée V600 ont une réponse aux traitements par des inhibiteurs sélectifs de la forme mutée de BRAF (e.g. vemurafenib ou dabrafenib) le plus souvent rapide et spectaculaire. Cependant, une résistance se développe dans la plupart des cas dans un délai médian de 6 mois et est très souvent associée à une réactivation de la voie des MAP kinases. Dans ce contexte, le fait que l'enveloppe HERV-K(HML2) soit capable d'induire la phosphorylation de ERK 1/2, indépendamment de la mutation V600E dans BRAF, suggère qu'elle pourrait participer à l'hétérogénéité tumorale et contribuer à l'échec des traitements de type vemurafenib. Des résultats très préliminaires (non présentés dans la thèse), obtenus avec un couple de cellules de mélanome Malme3M sensible au vemurafenib (Malme3M S)/ Malme3M résistante au vemurafenib (Malme3M R) appuient cette hypothèse. Sans établir pour l'instant de relation de cause à effet, nous avons observé une corrélation entre la résistance acquise au vemurafenib et l'expression de la protéine d'enveloppe HERV-K(HML2) (non exprimée dans les Malme3M S et fortement induite dans les Malme3M R). L'étude de l'expression de l'enveloppe HERV-K(HML2) dans des biopsies de patient en cours de traitement par le vemurafenib pourrait permettre de renforcer cette corrélation et de mieux comprendre la contribution du rétrovirus endogène dans l'agressivité des mélanomes.

2.5.2 Perspectives thérapeutiques

Pour déterminer la pertinence physio-pathologique des mécanismes que nous avons identifiés *ex vivo*, il serait tout d'abord intéressant d'étudier l'expression de l'enveloppe HERV-K(HML2), le statut de la voie MEK-ERK 1/2 et l'activation des facteurs de transcription (EGR1, ETV4 et ETV5) dans différents types de tumeurs de patients (e.g. cancer du sein, mélanome). Des analyses par immunohistochimie pourraient être envisagées sur des biopsies correspondant à : (i) différents stades (e.g. primaire vs métastatique) ou différentes localisations (e.g. nodulaire vs superficielle) de la tumeur, (ii) différents types de traitements (e.g. chirurgie, chimiothérapie, immunotherapie) ou (iii) différentes réponses au traitement (sensible vs résistant aux chimiothérapies). Pour cela, nous disposons d'un anticorps monoclonal spécifique de l'enveloppe HERV-K(HML2) et collaborons avec les services de dermatologie (C. Robert) et sénologie (S. Delaloge) de l'Institut Gustave Roussy.

De plus, lorsque nous aurons identifié le/les partenaires directs de l'enveloppe HERV-K(HML2) impliqués dans l'initiation de la transduction de signal, nous pourrons envisager le criblage de chimiothèques pour trouver un inhibiteur de la liaison. Cet inhibiteur pourrait notamment avoir un intérêt pour supprimer l'induction de la voie des MAP kinase médiée par l'enveloppe et permettre ainsi une meilleure efficacité des chimiothérapies.
Une perspective plus lointaine serait l'élaboration d'un vaccin thérapeutique qui permettrait le ciblage des cellules de la tumeur exprimant l'enveloppe HERV-K(HML2) à leur surface. Ce vaccin pourrait être administré après avoir vérifié sur des biopsies que la tumeur du patient exprime l'enveloppe du rétrovirus endogène. Les effets secondaires constituent néanmoins une barrière importante à ce genre de traitements. En effet, certains organes ou tissus sains expriment HERV-K(HML2) et pourraient constituer une cible collatérale consécutive à la vaccination.

2.5.3 Enveloppe HERV-K(HML2) et autres situations physio-pathologiques

En dehors de son expression dans plusieurs type de cancers, HERV-K(HML2) est associé à des pathologies auto-immunes et neurologiques comme la sclérose en plaque ou la maladie de Charcot (ou ALS) (revue dans (Christensen, 2010; Trela et al., 2016)). Dans ces deux cas, la voie des MAP kinases, notamment via p38, est activée de façon aberrante, et participe à la pathogenèse (revue dans (Kim and Choi, 2010)). Il serait intéressant de déterminer si l'enveloppe HERV-K(HML2) est impliquée dans l'activation de la transduction du signal dans ces deux modèles.
Enfin, l'enveloppe du rétrovirus endogène est également exprimée dans certains tissus sains, en particulier dans le placenta (Kämmerer et al., 2011), où son rôle est pour l'instant inconnu. On peut imaginer que sa capacité à activer ERK 1/2 soit importante pour la prolifération des cytotrophoblastes et que les propriétés d'induction de la migration qui lui sont associée participent à l'invasion de la decidua maternelle.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Parmi les HERV, la famille de bétarétrovirus HERV-K(HML2) est la seule à posséder plusieurs copies provirales présentant des cadres ouverts de lecture intacts pour les trois gènes essentiels *gag*, *pol* et *env*. Les rétrovirus appartenant au groupe HML2 sont entrés dans le génome des primates il y a environ 45 millions d'années et ont subi depuis plusieurs vagues successives d'amplification. Certains provirus sont présents uniquement dans le génome humain, ce qui indique qu'ils se sont insérés après la divergence homme-chimpanzé. Des représentants de HERV-K(HML2) sont polymorphes au sein de la population humaine et une étude très récente a identifié une copie intacte, potentiellement réplicative du virus, ce qui suggère que l'amplification de la famille est toujours en cours.

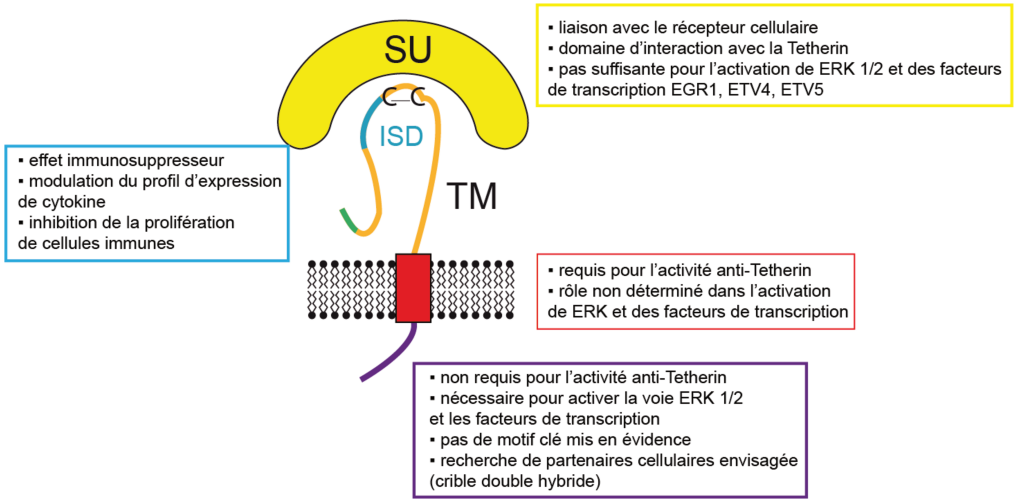


Figure 30. Bilan sur le rôle des différents domaines fonctionnels de l'enveloppe HERV-K(HML2)
La représentation schématique de l'enveloppe est la même qu'en fig. 5 de l'introduction.

Dans cette thèse nous avons entrepris la caractérisation de certaines propriétés de Phoenix, progéniteur putatif des éléments HERV-K(HML2) humains du génome. Les résultats obtenus illustrent la « dualité » de cette famille à la fois endogène mais aussi très proche des infectieux. Du fait d'une très longue période de co-évolution avec son hôte, des gènes capables de contrôler son amplification ont été sélectionnés. C'est le cas de la Tetherin, facteur de restriction cellulaire qui s'oppose au relargage de la plupart des virus enveloppés. Cependant, à l'instar de nombreux virus infectieux, HERV-K(HML2) possède une activité antagoniste de la Tetherin, portée par sa glycoprotéine d'enveloppe, ce qui a sûrement contribué au succès de l'amplification et à la dynamique de la famille dans les génomes. Nous

avons montré d'autre part que l'enveloppe HERV-K(HML2) possède des propriétés oncogéniques et participe probablement au développement et à l'agressivité de tumeurs *in vivo* ce qui la rapproche de l'enveloppe du bétarétrovirus infectieux de mouton JSRV, oncogénique chez son hôte. A travers ces différents travaux, nous avons mené une caractérisation moléculaire fine de la glycoprotéine d'enveloppe HERV-K(HML2) (Fig. 30). Cette caractérisation va nous permettre d'identifier des partenaires cellulaires et à terme de développer des inhibiteurs spécifiques qui pourraient être utilisés en thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

Abada, P., Noble, B., Cannon, P.M., 2005. Functional domains within the human immunodeficiency virus type 2 envelope protein required to enhance virus production. J. Virol. 79, 3627–3638. doi:10.1128/JVI.79.6.3627-3638.2005
Abal, M., 2014. ETV5 transcription program links BDNF and promotion of EMT at invasive front of endometrial carcinomas. Carcinogenesis 35, 2679–2686. doi:10.1093/carcin/bgu198
Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., Nagata, S., 1993. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 1756–60.
Adamah, D.J.B., Gokhale, P.J., Eastwood, D.J., Goepel, J., Walsh, J.R., Moore, H.D., Andrews, P.W., Del Mazo, J., Von Eyben, F.E., Leffers, H., Skakkebæk, N.E., Almstrup, K., McLachlan, J., 2006. Dysfunction of the mitotic:meiotic switch as a potential cause of neoplastic conversion of primordial germ cells, in: International Journal of Andrology. pp. 219–227. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00569.x
Adamson, C.S., Jones, I.M., 2004. The molecular basis of HIV capsid assembly—five years of progress. Rev. Med. Virol. 14, 107–121. doi:10.1002/rmv.418
Adamson, E.D., Mercola, D., 2002. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. Tumour Biol. 23, 93–102.
Agromayor, M., Soler, N., Caballe, A., Kueck, T., Freund, S.M., Allen, M.D., Bycroft, M., Perisic, O., Ye, Y., McDonald, B., Scheel, H., Hofmann, K., Neil, S.J.D., Martin-Serrano, J., Williams, R.L., 2012. The UBAP1 subunit of ESCRT-I interacts with ubiquitin via a SOUBA domain. Structure 20, 414–428. doi:10.1016/j.str.2011.12.013
Albin, J.S., Harris, R.S., 2010. NIH Public Access 4, 1–26. doi:10.1017/S1462399409001343.Interactions
Alfano, N., Michaux, J., Morand, S., Aplin, K., Tsangaras, K., Löber, U., Fabre, P.-H., Fitriana, Y., Semiadi, G., Ishida, Y., Helgen, K.M., Roca, A.L., Eiden, M. V., Greenwood, A.D., 2016. An endogenous gibbon ape leukemia virus (GALV) identified in a rodent (*Melomys burtoni* subsp.) from Wallacea (Indonesia). J. Virol. 90, JVI.00723–16. doi:10.1128/JVI.00723-16
Alian, A., Sela-Donenfeld, D., Panet, A., Eldor, A., 2000. Avian hemangioma retrovirus induces cell proliferation via the envelope (env) gene. Virology 276, 161–8. doi:10.1006/viro.2000.0550
Allen, T.E., Sherrill, K.J., Crispell, S.M., Perrott, M.R., Carlson, J.O., DeMartini, J.C., 2002. The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. J. Gen. Virol. 83, 2733–2742.
Alvarez, R.A., Hamlin, R.E., Monroe, A., Moldt, B., Hotta, M.T., Rodriguez Caprio, G., Fierer, D.S., Simon, V., Chen, B.K., 2014. HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells. J Virol 88, 6031–6046. doi:10.1128/jvi.00449-14
Amet, T., Byrd, D., Hu, N., Sun, Q., Li, F., Zhao, Y., Hu, S., Grantham, A., Yu, Q., 2014. BST-2 expression in human hepatocytes is inducible by all three types of interferons and restricts production of hepatitis C virus. Curr Mol Med 14, 349–360. doi:10.2174/1566524013666131118111719
Andersson, A.C., Merza, M., Venables, P., Ponten, F., Sundstrom, J., Cohen, M., Larsson, E., 1996. Elevated levels of the endogenous retrovirus ERV3 in human sebaceous glands. J Invest Dermatol 106, 125–128. doi:0022202X96830818 [pii]
Andersson, A.C., Svensson, A.C., Rolny, C., Andersson, G., Larsson, E., 1998. Expression of human endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) mRNA in normal and neoplastic tissues. Int. J. Oncol. 12, 309–313.
Andrew, A.J., Miyagi, E., Kao, S., Strebel, K., 2009. The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. Retrovirology 6, 80. doi:10.1186/1742-4690-6-80
Andrews, W.D., Tuke, P.W., Al Chalabi, A., Gaudin, P., Ijaz, S., Parton, M.J., Garson, J.A., 2000. Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease. J Med Virol. 61, 527–532.
Antony, J.M., Ellestad, K.K., Hammond, R., Imaizumi, K., Mallet, F., Warren, K.G., Power, C., 2007. The Human Endogenous Retrovirus Envelope Glycoprotein, Syncytin-1, Regulates Neuroinflammation and Its Receptor Expression in Multiple Sclerosis : A Role for Endoplasmic

Reticulum Chaperones in Astrocytes 1. J. Immunol. 179, 1210–1224. doi:10.4049/jimmunol.179.2.1210
Antony, J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D.A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren, K., Power, C., 2004. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. Nat. Neurosci. 7, 1088–95. doi:10.1038/nn1319
Anwar, F., Davenport, M.P., Ebrahimi, D., 2013. Footprint of APOBEC3 on the genome of human retroelements. J. Virol. 87, 8195–204. doi:10.1128/JVI.00298-13
Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Charneau, P., 2006. Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. Retrovirology 3, 38. doi:10.1186/1742-4690-3-38
Arjan-Odedra, S., Swanson, C.M., Sherer, N.M., Wolinsky, S.M., Malim, M.H., 2012. Endogenous MOV10 inhibits the retrotransposition of endogenous retroelements but not the replication of exogenous retroviruses. Retrovirology 9, 53. doi:10.1186/1742-4690-9-53
Armezzani, A., Arnaud, F., Caporale, M., di Meo, G., Iannuzzi, L., Murgia, C., Palmarini, M., 2011. The signal peptide of a recently integrated endogenous sheep betaretrovirus envelope plays a major role in eluding gag-mediated late restriction. J. Virol. 85, 7118–7128. doi:10.1128/JVI.00407-11
Arnaud, F., Black, S.G., Murphy, L., Griffiths, D.J., Neil, S.J., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2010. Interplay between Ovine Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2/Tetherin and Endogenous Retroviruses. J. Virol. 84, 4415–4425. doi:10.1128/JVI.00029-10
Arnaud, F., Caporale, M., Varela, M., Biek, R., Chessa, B., Alberti, A., Golder, M., Mura, M., Zhang, Y.P., Yu, L., Pereira, F., Demartini, J.C., Leymaster, K., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2007a. A paradigm for virus-host coevolution: Sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. PLoS Pathog. 3, 1716–1729. doi:10.1371/journal.ppat.0030170
Arnaud, F., Murcia, P.R., Palmarini, M., 2007b. Mechanisms of late restriction induced by an endogenous retrovirus. J. Virol. 81, 11441–11451. doi:10.1128/JVI.01214-07
Arnaud, F., Varela, M., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2008. Endogenous retroviruses: Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host. Cell. Mol. Life Sci. doi:10.1007/s00018-008-8500-9
Baillie, G.J., van de Lagemaat, L.N., Baust, C., Mager, D.L., 2004. Multiple groups of endogenous betaretroviruses in mice, rats, and other mammals. J. Virol. 78, 5784–98. doi:10.1128/JVI.78.11.5784-5798.2004
Balada, E., Vilardell-Tarrés, M., Ordi-Ros, J., 2010. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. Int. Rev. Immunol. 29, 351–370. doi:10.3109/08830185.2010.485333
Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O., Skog, J., 2011. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. Nat. Commun. 2, 180. doi:10.1038/ncomms1180
Balda, B.R., Hehlmann, R., Cho, J.R., Spiegelman, S., 1975. Oncornavirus-like particles in human skin cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3697–3700.
Balk, S.P., Knudsen, K.E., 2008. AR, the cell cycle, and prostate cancer. Nucl. Recept. Signal. 6, e001. doi:10.1621/nrs.06001
Ball, J.M., Mulligan, M.J., Compans, R.W., 1997. Basolateral sorting of the HIV type 2 and SIV envelope glycoproteins in polarized epithelial cells: role of the cytoplasmic domain. AIDS Res. Hum. Retroviruses 13, 665–75.
Ballana, E., Esté, J.A., 2015. SAMHD1: At the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. Trends Microbiol. 23, 680–692. doi:10.1016/j.tim.2015.08.002
Bampi, C., Rasga, L., Roux, L., 2013. Antagonism to human BST-2/tetherin by Sendai virus glycoproteins. J. Gen. Virol. 94, 1211–1219. doi:10.1099/vir.0.051771-0
Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E. a, Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 410, 120–124. doi:10.1038/35065138
Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M., Barton, G.M., 2009. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. Nat. Immunol.

10, 1200–1207. doi:10.1038/ni.1792
Barrett, B.S., Smith, D.S., Li, S.X., Guo, K., Hasenkrug, K.J., Santiago, M.L., 2012. A single nucleotide polymorphism in tetherin promotes retrovirus restriction in vivo. PLoS Pathog. 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002596
Bartee, E., McCormack, A., Früh, K., 2006. Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators. PLoS Pathog. 2, 0975–0988. doi:10.1371/journal.ppat.0020107
Basyuk, E., Galli, T., Mougel, M., Blanchard, J.M., Sitbon, M., Bertrand, E., 2003. Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. Dev. Cell 5, 161–174. doi:10.1016/S1534-5807(03)00188-6
Battivelli, E., Migraine, J., Lecossier, D., Matsuoka, S., Perez-Bercoff, D., Saragosti, S., Clavel, F., Hance, A.J., 2011. Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. J. Virol. 85, 7828–35. doi:10.1128/JVI.00648-11
Baudino, L., Yoshinobu, K., Morito, N., Santiago-Raber, M.L., Izui, S., 2010. Role of endogenous retroviruses in murine SLE. Autoimmun. Rev. doi:10.1016/j.autrev.2010.07.012
Baust, C., Baillie, G.J., Mager, D.L., 2002. Insertional polymorphisms of ETn retrotransposons include a disruption of the wiz gene in C57BL/6 mice. Mamm. Genome 13, 423–428. doi:10.1007/s00335-002-2178-3
Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Wu, G., 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. Reprod. Biol. 8, 179–211. doi:10.1016/S1642-431X(12)60012-6
Beaufils, P., Choquet, D., Mamoun, R.Z., Malissen, B., 1993. The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. Embo J 12, 5105–5112.
Beer, C., Pedersen, L., Wirth, M., 2005. Amphotropic murine leukaemia virus envelope protein is associated with cholesterol-rich microdomains. Virol. J. 2, 36. doi:10.1186/1743-422X-2-36
Bego, M.G., Mercier, J., Cohen, E. a, 2012. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. J. Virol. 86, 3513–27. doi:10.1128/JVI.06971-11
Beimforde, N., Hanke, K., Ammar, I., Kurth, R., Bannert, N., 2008. Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. Virology 371, 216–225. doi:10.1016/j.virol.2007.09.036
Belshaw, R., Katzourakis, A., Paces, J., Burt, A., Tristem, M., 2005. High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. Mol. Biol. Evol. 22, 814–817. doi:10.1093/molbev/msi088
Belshaw, R., Pereira, V., Katzourakis, A., Talbot, G., Paces, J., Burt, A., Tristem, M., 2004. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 4894–9. doi:10.1073/pnas.0307800101
Bénit, L., De Parseval, N., Casella, J.F., Callebaut, I., Cordonnier, A., Heidmann, T., 1997. Cloning of a new murine endogenous retrovirus, MuERV-L, with strong similarity to the human HERV-L element and with a gag coding sequence closely related to the Fv1 restriction gene. J. Virol. 71, 5652–7.
Bénit, L., Dessen, P., Heidmann, T., 2001. Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. J. Virol. 75, 11709–19. doi:10.1128/JVI.75.23.11709-11719.2001
Bénit, L., Lallemand, J.B., Casella, J.F., Philippe, H., Heidmann, T., 1999. ERV-L elements: A family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. J. Virol. 73, 3301–3308.
Berger, A., Sommer, A.F.R., Zwarg, J., Hamdorf, M., Welzel, K., Esly, N., Panitz, S., Reuter, A., Ramos, I., Jatiani, A., Mulder, L.C.F., Fernandez-Sesma, A., Rutsch, F., Simon, V., König, R., Flory, E., 2011. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. PLoS Pathog. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002425
Bertrand, P., Côté, M., Zheng, Y.-M., Albritton, L.M., Liu, S.-L., 2008. Jaagsiekte sheep retrovirus

utilizes a pH-dependent endocytosis pathway for entry. J. Virol. 82, 2555–9. doi:10.1128/JVI.01853-07
Best, S., Le Tissier, P., Towers, G., Stoye, J.P., 1996. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. Nature 382, 826–829. doi:10.1038/382826a0
Bhardwaj, N., Maldarelli, F., Mellors, J., Coffin, J.M., 2014. HIV-1 infection leads to increased transcription of HERV-K (HML-2) proviruses in vivo but not to increased virion production. J. Virol. 88, 11108–11120. doi:10.1128/JVI.01623-14
Bhardwaj, N., Montesio, M., Roy, F., Coffin, J.M., 2015. Differential expression of HERV-K (HML-2) proviruses in cells and virions of the teratocarcinoma cell line tera-1. Viruses 7, 939–968. doi:10.3390/v7030939
Bieda, K., Hoffmann, a, Boller, K., 2001. Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. J. Gen. Virol. 82, 591–596.
Billcliff, P.G., Rollason, R., Prior, I., Owen, D.M., Gaus, K., Banting, G., 2013. CD317/tetherin is an organiser of membrane microdomains. J. Cell Sci. 126, 1553–64. doi:10.1242/jcs.112953
Birkmayer, G.D., Balda, B.-R., Miller, F., Braun-Falco, O., 1972. Virus-like particles in metastases of human malignant melanoma. Naturwissenschaften 59, 369–370. doi:10.1007/BF00617924
Bishop, K.N., Verma, M., Kim, E.Y., Wolinsky, S.M., Malim, M.H., 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. PLoS Pathog. 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000231
Bittner, J.J., 1936. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science 84, 162. doi:10.1126/science.84.2172.162
Bjerregaard, B., Holck, S., Christensen, I.J., Larsson, L.I., 2006. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. Cell. Mol. Life Sci. 63, 1906–1911. doi:10.1007/s00018-006-6201-9
Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L., Heidmann, T., 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13013–13018. doi:10.1073/pnas.2132646100
Blaise, S., Mangeney, M., Heidmann, T., 2001. The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties. J. Gen. Virol. 82, 1597–1600.
Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., Colonna, M., 2006. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. J. Immunol. 177, 3260–5. doi:177/5/3260 [pii]
Blond, J., Besème, F., Duret, L., Bedin, F., Perron, H., Mandrand, B., Bese, R.I.C., 1999. Molecular Characterization and Placental Expression of HERV-W , a New Human Endogenous Retrovirus Family Molecular Characterization and Placental Expression of HERV-W , a New Human Endogenous Retrovirus Family. J. Virol. 73, 1175–1185.
Blond, J.L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., Cosset, F.L., 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. J. Virol. 74, 3321–9. doi:10.1128/JVI.74.7.3321-3329.2000
Blondeau, C., Pelchen-Matthews, A., Mlcochova, P., Marsh, M., Milne, R.S.B., Towers, G.J., 2013. Tetherin restricts herpes simplex virus 1 and is antagonized by glycoprotein M. J. Virol. 87, 13124–33. doi:10.1128/JVI.02250-13
Boese, a, Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2000. Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. Oncogene 19, 4328–4336. doi:10.1038/sj.onc.1203794
Bogerd, H.P., Cullen, B.R., 2008. Single-stranded RNA facilitates nucleocapsid: APOBEC3G complex formation. RNA 14, 1228–36. doi:10.1261/rna.964708
Bogerd, H.P., Wiegand, H.L., Doehle, B.P., Lueders, K.K., Cullen, B.R., 2006. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. Nucleic Acids Res. 34, 89–95. doi:10.1093/nar/gkj416
Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tonjes, R.R., Kurth, R., 1997. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. J Virol 71, 4581–4588.
Boller, K., König, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R., 1993. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human

teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. Virology. doi:10.1006/viro.1993.1487
Bour, S., Strebel, K., 2003. The HIV-1 Vpu protein: A multifunctional enhancer of viral particle release. Microbes Infect. doi:10.1016/S1286-4579(03)00191-6
Braaten, D., Franke, E.K., Luban, J., 1996. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. J. Virol. 70, 3551–3560.
Brady, T., Lee, Y.N., Ronen, K., Malani, N., Berry, C.C., Bieniasz, P.D., Bushman, F.D., 2009. Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. Genes Dev. 23, 633–642. doi:10.1101/gad.1762309
Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.-J., Buck, F., Richter, D., Kindler, S., 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. Biochem. J. 384, 239–46. doi:10.1042/BJ20040812
Bronson, D.L., Fraley, E.E., Fogh, J., Kalter, S.S., 1979. Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera-1) cell cultures: An electron microscopic study. J. Natl. Cancer Inst. 63, 337–339. doi:10.1093/jnci/63.2.337
Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., Braun, R.E., 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nat. Genet. 36, 647–652. doi:10.1038/ng1366
Buller, B.Y.R.S., Sitbon, M., Portis, J.L., 1988. gp70 LINKED TO THE Rmcf GENE RESTRICTS MCF VIRUS REPLICATION IN VIVO AND PROVIDES PARTIAL FRIEND MURINE LEUKEMIA VIRUS THE ENDOGENOUS MINK CELL FOCUS-FORMING (MCF) RESISTANCE TO ERYTHROLEUKEMIA INDUCED BY Inoculation of IRW or BALB / c neonatal mice wit 167.
Burdick, R., Smith, J.L., Chaipan, C., Friew, Y., Chen, J., Venkatachari, N.J., Delviks-Frankenberry, K.A., Hu, W.-S., Pathak, V.K., 2010. P Body-Associated Protein Mov10 Inhibits HIV-1 Replication at Multiple Stages. J Virol 84, 10241–10253. doi:10.1128/JVI.00585-10
Burrows, T.D., King, a, Loke, Y.W., 1996. Trophoblast migration during human placental implantation. Hum. Reprod. Update 2, 307–321. doi:10.1016/S0143-4004(96)90253-2
Buscher, K., 2005. Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. Cancer Res. 65, 4172–4180. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2983
Büscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Löwer, J., Löwer, R., Kurth, R., Denner, J., 2006. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. Melanoma Res. 16, 223–34. doi:10.1097/01.cmr.0000215031.07941.ca
Büscher, K., Trefzer, U., Hofmann, M., Sterry, W., Kurth, R., Denner, J., 2005. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. Cancer Res. 65, 4172–4180. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2983
Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., Hoffmann, C., 2005. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. Nat. Rev. Microbiol. doi:10.1038/nrmicro1263
Bushman, F.D., 2003. Targeting survival: Integration site selection by retroviruses and LTR-Retrotransposons. Cell. doi:10.1016/S0092-8674(03)00760-8
Byun, H., Halani, N., Mertz, J. a, Ali, A.F., Lozano, M.M., Dudley, J.P., 2010. Retroviral Rem protein requires processing by signal peptidase and retrotranslocation for nuclear function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 12287–12292. doi:10.1073/pnas.1004303107
Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Covell, D.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1998. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. EMBO J. 17, 4572–4584. doi:10.1093/emboj/17.16.4572
Cai, D., Cao, J., Li, Z., Zheng, X., Yao, Y., Li, W., Yuan, Z., 2009. Up-regulation of bone marrow stromal protein 2 (BST2) in breast cancer with bone metastasis. BMC Cancer 9, 102. doi:10.1186/1471-2407-9-102
Callahan, M.K., Popernack, P.M., Tsutsui, S., Truong, L., Schlegel, R. a, Henderson, A.J., 2003. Phosphatidylserine on HIV envelope is a cofactor for infection of monocytic cells. J. Immunol. 170, 4840–4845. doi:10.4049/jimmunol.170.9.4840
Callahan, R., Smith, G.H., 2008. Common integration sites for MMTV in viral induced mouse

mammary tumors. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 13, 309–321. doi:10.1007/s10911-008-9092-6
Callahan, R., Smith, G.H., 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. Oncogene 19, 992–1001. doi:10.1038/sj.onc.1203276
Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D.B., Wang, Y.-H., Shaw, J.L., Du, Q., Li, C., Arai, N., Yao, Z., Lanier, L.L., Liu, Y.-J., 2009. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. J. Exp. Med. 206, 1603–14. doi:10.1084/jem.20090547
Caporale, M., Arnaud, F., Mura, M., Golder, M., Murgia, C., Palmarini, M., 2009. The signal peptide of a simple retrovirus envelope functions as a posttranscriptional regulator of viral gene expression. J. Virol. 83, 4591–604. doi:10.1128/JVI.01833-08
Caporale, M., Cousens, C., Centorame, P., Pinoni, C., De las Heras, M., Palmarini, M., 2006. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. J. Virol. 80, 8030–8037. doi:10.1128/JVI.00474-06
Caporale, M., Martineau, H., De las Heras, M., Murgia, C., Huang, R., Centorame, P., Di Francesco, G., Di Gialleonardo, L., Spencer, T.E., Griffiths, D.J., Palmarini, M., 2013. Host species barriers to Jaagsiekte sheep retrovirus replication and carcinogenesis. J. Virol. 87, 10752–62. doi:10.1128/JVI.01472-13
Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., sborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., Lachuer, J., Puisieux, A., Pringle, J.H., Ansieau, S., Tulchinsky, E., 2013. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. Cancer Cell 24, 466–480. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.018
Carlson, L.A., Briggs, J.A.G., Glass, B., Riches, J.D., Simon, M.N., Johnson, M.C., Müller, B., Grünewald, K., Kräusslich, H.G., 2008. Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis. Cell Host Microbe 4, 592–599. doi:10.1016/j.chom.2008.10.013
Carmi, S., Church, G.M., Levanon, E.Y., 2011. Large-scale DNA editing of retrotransposons accelerates mammalian genome evolution. Nat Commun 2, 519.
Casartelli, N., Sourisseau, M., Feldmann, J., Guivel-Benhassine, F., Mallet, A., Marcelin, A.G., Guatelli, J., Schwartz, O., 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. PLoS Pathog. 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000955
Celestino, M., Calistri, a., Del Vecchio, C., Salata, C., Chiuppesi, F., Pistello, M., Borsetti, a., Palu, G., Parolin, C., 2012. Feline Tetherin Is Characterized by a Short N-Terminal Region and Is Counteracted by the Feline Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein. J. Virol. 86, 6688–6700. doi:10.1128/JVI.07037-11
Charneau, P., Alizon, M., Clavel, F., 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human A Second Origin of DNA Plus-Strand Synthesis Is Required for Optimal Human Immunodeficiency Virus Replication. J. Virol. 66, 2814–2820.
Charneau, P., Clavel, F., 1991. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. J Virol 65, 2415–2421.
Chazal N Gay B, Boulanger P., C.C., 1994. Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells. J Virol 68, 11–122.
Chen, H., Lilley, C.E., Yu, Q., Lee, D. V., Chou, J., Narvaiza, I., Landau, N.R., Weitzman, M.D., 2006. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. Curr. Biol. 16, 480–485. doi:10.1016/j.cub.2006.01.031
Chen, T., Meng, Z., Gan, Y., Wang, X., Xu, F., Gu, Y., Xu, X., Tang, J., Zhou, H., Zhang, X., Gan, X., Van Ness, C., Xu, G., Huang, L., Fang, Y., Wu, J., Zheng, S., Jin, J., Huang, W., Xu, R., 2013. The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating β-catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K 1–10. doi:10.1038/leu.2013.8
Chen, W.Y., Townes, T.M., 2000. Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 377–82. doi:10.1073/pnas.97.1.377

Chen, X., Bode, A.M., Dong, Z., Cao, Y., 2016. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is regulated by oncoviruses in cancer. FASEB J. doi:10.1096/fj.201600388R

Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S. a, Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature 447, 823–828. doi:10.1038/nature05841

Chernomordik, L. V., Leikina, E., Frolov, V., Bronk, P., Zimmerberg, J., 1997. An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. J. Cell Biol. 136, 81–93. doi:10.1083/jcb.136.1.81

Chessa, B., Pereira, F., Arnaud, F., Amorim, A., Goyache, F., Mainland, I., Kao, R.R., Pemberton, J.M., Beraldi, D., Stear, M.J., Alberti, A., Pittau, M., Iannuzzi, L., Banabazi, M.H., Kazwala, R.R., Zhang, Y.-P., Arranz, J.J., Ali, B.A., Wang, Z., Uzun, M., Dione, M.M., Olsaker, I., Holm, L.-E., Saarma, U., Ahmad, S., Marzanov, N., Eythorsdottir, E., Holland, M.J., Ajmone-Marsan, P., Bruford, M.W., Kantanen, J., Spencer, T.E., Palmarini, M., 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. Science 324, 532–6. doi:10.1126/science.1170587

Chitra, E., Lin, Y.-W., Davamani, F., Hsiao, K.-N., Sia, C., Hsieh, S.-Y., Wei, O.L., Chen, J.-H., Chow, Y.-H., 2010. Functional interaction between Env oncogene from Jaagsiekte sheep retrovirus and tumor suppressor Sprouty2. Retrovirology 7, 62. doi:10.1186/1742-4690-7-62

Choi, Y.W., Henrard, D., Lee, I., Ross, S.R., 1987. The mouse mammary tumor virus long terminal repeat directs expression in epithelial and lymphoid cells of different tissues in transgenic mice. J. Virol. 61, 3013–9.

Chow, Y.-H.J., Alberti, A., Mura, M., Pretto, C., Murcia, P., Albritton, L.M., Palmarini, M., 2003. Transformation of rodent fibroblasts by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope is receptor independent and does not require the surface domain. J. Virol. 77, 6341–6350. doi:10.1128/JVI.77.11.6341-6350.2003

Christensen, T., 2016. Human endogenous retroviruses in neurologic disease. Apmis 124, 116–126. doi:10.1111/apm.12486

Christensen, T., 2010. HERVs in neuropathogenesis. J. Neuroimmune Pharmacol. doi:10.1007/s11481-010-9214-y

Chu, H., Wang, J.J., Qi, M., Yoon, J.J., Chen, X., Wen, X., Hammonds, J., Ding, L., Spearman, P., 2012. Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages. Cell Host Microbe 12, 360–372. doi:10.1016/j.chom.2012.07.011

Chudak, C., Beimforde, N., George, M., Zimmermann, A., Lausch, V., Hanke, K., Bannert, N., 2013. Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2). Retrovirology 10, 140. doi:10.1186/1742-4690-10-140

Chung, T.W., Lee, Y.C., Kim, C.H., 2004. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. Faseb J 18, 1123–1125. doi:10.1096/fj.03-1429fje

Chuong, E.B., Elde, N.C., Feschotte, C., 2016. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. Science (80-.). 351, 1083–1087. doi:10.1126/science.aad5497

Cianciolo, G.J., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Snyderman, R., 1985. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. Science 230, 453–455. doi:10.1126/science.2996136

Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R., Bushman, F., 2005. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. Nat. Med. 11, 1287–1289. doi:10.1038/nm1329

Cocka, L.J., Bates, P., 2012. Identification of Alternatively Translated Tetherin Isoforms with Differing Antiviral and Signaling Activities. PLoS Pathog. 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002931

Colas, E., Colas, E., Muinelo-Romay, L., Muinelo-Romay, L., alonso-Alconada, L., alonso-Alconada, L., Llaurado, M., Llaurado, M., Monge, M., Monge, M., Barbazan, J., Barbazan, J., Gonzalez, M., Gonzalez, M., Schoumacher, M., Schoumacher, M., Pedrola, N., Pedrola, N., Ertekin, T., Ertekin, T., Devis, L., Devis, L., Ruiz, A., Ruiz, A., Castellvi, J., Castellvi, J., Doll, A., Doll, A., Gil-Moreno, A., Gil-Moreno, A., Vazquez-Levin, M., Vazquez-Levin, M., Lapyckyj, L.,

Lapyckyj, L., Lopez-Lopez, R., Lopez-Lopez, R., Robine, S., Robine, S., Friederich, E., Friederich, E., Castro, M., Castro, M., Reventos, J., Reventos, J., Vignjevic, D., Vignjevic, D., Abal, M., Abal, M., 2012. ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. Oncogene 31, 4778–4788. doi:10.1038/onc.2011.632

Cole, G., Simonetti, K., Ademi, I., Sharpe, S., 2012. Dimerization of the transmembrane domain of human tetherin in membrane mimetic environments. Biochemistry 51, 5033–5040. doi:10.1021/bi201747t

Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Contreras-Galindo, a. C., Gonzalez-Hernandez, M.J., Ferlenghi, I., Giusti, F., Lorenzo, E., Gitlin, S.D., Dosik, M.H., Yamamura, Y., Markovitz, D.M., 2012. Characterization of Human Endogenous Retroviral Elements in the Blood of HIV-1-Infected Individuals. J. Virol. 86, 262–276. doi:10.1128/JVI.00602-11

Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Dube, D., Gonzalez-Hernandez, M.J., Chan, S., Meng, F., Dai, M., Omenn, G.S., Gitlin, S.D., Markovitz, D.M., 2015. Human Endogenous Retroviruses Type-K (HERV-K) Virus Particles Package and Transmit HERV-K-Related Sequences. J. Virol. 89, JVI.00544–15. doi:10.1128/JVI.00544-15

Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., He, S., Contreras-Galindo, A.C., Gonzalez-Hernandez, M.J., Kappes, F., Dube, D., Chan, S.M., Robinson, D., Meng, F., Dai, M., Gitlin, S.D., Chinnaiyan, A.M., Omenn, G.S., Markovitz, D.M., 2013. HIV infection reveals widespread expansion of novel centromeric human endogenous retroviruses. Genome Res. 23, 1505–1513. doi:10.1101/gr.144303.112

Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Leissner, P., Verjat, T., Ferlenghi, I., Bagnoli, F., Giusti, F., Dosik, M.H., Hayes, D.F., Gitlin, S.D., Markovitz, D.M., 2008. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. J. Virol. 82, 9329–9336. doi:10.1128/JVI.00646-08

Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., Lorenzo, E., Yamamura, Y., 2006. Detection of HERV-K(HML-2) viral RNA in plasma of HIV type 1-infected individuals. AIDS Res. Hum. Retroviruses 22, 979–84. doi:10.1089/aid.2006.22.979

Contreras-Galindo, R., López, P., Vélez, R., Yamamura, Y., 2007. HIV-1 infection increases the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro. AIDS Res. Hum. Retroviruses 23, 116–122. doi:10.1089/aid.2006.0117

Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Gubelmann, C., Imbeault, M., Santoni de Sio, F.R., Rowe, H.M., Mouscaz, Y., Deplancke, B., Trono, D., 2013. Global and Stage Specific Patterns of Kruppel-Associated-Box Zinc Finger Protein Gene Expression in Murine Early Embryonic Cells. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0056721

Costoya, J. a, Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolfi, P.P., 2004. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat. Genet. 36, 653–659. doi:10.1038/ng1367

Côté, M., Kucharski, T.J., Liu, S.-L., 2008. Enzootic nasal tumor virus envelope requires a very acidic pH for fusion activation and infection. J. Virol. 82, 9023–34. doi:10.1128/JVI.00648-08

Côté, M., Zheng, Y.M., Albritton, L.M., Liu, S.L., 2011. Single residues in the surface subunits of oncogenic sheep retrovirus envelopes distinguish receptor-mediated triggering for fusion at low pH and infection. Virology 421, 173–183. doi:10.1016/j.virol.2011.09.022

Cousens, C., Minguijon, E., Dalziel, R.G., Ortin, a, Garcia, M., Park, J., Gonzalez, L., Sharp, J.M., de las Heras, M., 1999. Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors of sheep. J. Virol. 73, 3986–3993.

Cowan, S., Hatziioannou, T., Cunningham, T., Muesing, M.A., Gottlinger, H.G., Bieniasz, P.D., 2002. Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 11914–9. doi:10.1073/pnas.162299499

Cui, J., Holmes, E.C., 2012. Endogenous Lentiviruses in the Ferret Genome. J. Virol. 86, 3383–3385. doi:10.1128/JVI.06652-11

Cully, M., You, H., Levine, A.J., Mak, T.W., 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer 6, 184–92. doi:10.1038/nrc1819

Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T., Kräusslich, H.-G., 2005. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. J. Virol. 79, 1581–94.

doi:10.1128/JVI.79.3.1581-1594.2005
Danilkovitch-Miagkova, A., Duh, F.-M., Kuzmin, I., Angeloni, D., Liu, S.-L., Miller, a D., Lerman, M.I., 2003. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 4580–5. doi:10.1073/pnas.0837136100
De La Fuente, R., Baumann, C., Fan, T., Schmidtmann, A., Dobrinski, I., Muegge, K., 2006. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. Nat. Cell Biol. 8, 1448–1454. doi:10.1038/ncb1513
De las Heras, M., González, L., Sharp, J.M., 2003a. Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 25–54.
De las Heras, M., Ortín, A., Benito, A., Summers, C., Ferrer, L.M., Sharp, J.M., 2006. In-situ Demonstration of Mitogen-activated Protein Kinase Erk 1/2 Signalling Pathway in Contagious Respiratory Tumours of Sheep and Goats. J. Comp. Pathol. 135, 1–10. doi:10.1016/j.jcpa.2006.02.002
De las Heras, M., Ortín, A., Cousens, C., Minguijón, E., Sharp, J.M., 2003b. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 201–223.
de Parseval, N., Casella, J., Gressin, L., Heidmann, T., 2001. Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. Virology 279, 558–569. doi:10.1006/viro.2000.0737
De Parseval, N., Heidmann, T., 2005. Human endogenous retroviruses: From infectious elements to human genes. Cytogenet. Genome Res. doi:10.1159/000084964
de Parseval, N., Heidmann, T., 1998. Physiological knockout of the envelope gene of the single-copy ERV-3 human endogenous retrovirus in a fraction of the Caucasian population. J. Virol. 72, 3442–5.
de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J.-F., Benit, L., Heidmann, T., 2003. Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. J. Virol. 77, 10414–22. doi:10.1128/JVI.77.19.10414-10422.2003
Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Pique, C., Pham, D., Dokhelar, M.C., 1997. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. J Virol 71, 259–266.
Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., Mouscadet, J.-F., 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. Retrovirology 5, 114. doi:10.1186/1742-4690-5-114
Denne, M., Sauter, M., Armbruester, V., Licht, J.D., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2007. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. J Virol 81, 5607–5616. doi:JVI.02771-06 [pii]\r10.1128/JVI.02771-06
Dewannieux, M., Blaise, S., Heidmann, T., 2005. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. J. Virol. 79, 15573–7. doi:10.1128/JVI.79.24.15573-15577.2005
Dewannieux, M., Collins, M.K., 2008. Spontaneous heteromerization of gammaretrovirus envelope proteins: a possible novel mechanism of retrovirus restriction. J. Virol. 82, 9789–94. doi:10.1128/JVI.02696-07
Dewannieux, M., Dupressoir, A., Harper, F., Pierron, G., Heidmann, T., 2004. Identification of autonomous IAP LTR retrotransposons mobile in mammalian cells. Nat. Genet. 36, 534–539. doi:10.1038/ng1353
Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G., Heidmann, T., 2006. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. Genome Res. 16, 1548–1556. doi:10.1101/gr.5565706
Dewannieux, M., Heidmann, T., 2013. Endogenous retroviruses: Acquisition, amplification and taming of genome invaders. Curr. Opin. Virol. 3, 646–656. doi:10.1016/j.coviro.2013.08.005
Dewannieux, M., Vernochet, C., Ribet, D., Bartosch, B., Cosset, F.L., Heidmann, T., 2011. The mouse iape endogenous retrovirus can infect cells through any of the five gpi-anchored ephrina proteins. PLoS Pathog. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002309
Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene 26, 3279–90. doi:10.1038/sj.onc.1210421

Dietrich, I., McMonagle, E.L., Petit, S.J., Vijayakrishnan, S., Logan, N., Chan, C.N., Towers, G.J., Hosie, M.J., Willett, B.J., 2011. Feline tetherin efficiently restricts release of feline immunodeficiency virus but not spreading of infection. J. Virol. 85, 5840–5852. doi:10.1128/JVI.00071-11

Dirks, C., Duh, F.-M., Rai, S.K., Lerman, M.I., Miller, a D., 2002. Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. J. Virol. 76, 2141–2149. doi:10.1128/jvi.76.5.2141-2149.2002

Dong, K.B., Maksakova, I.A., Mohn, F., Leung, D., Appanah, R., Lee, S., Yang, H.W., Lam, L.L., Mager, D.L., Schübeler, D., Tachibana, M., Shinkai, Y., Lorincz, M.C., 2008. DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. EMBO J. 27, 2691–701. doi:10.1038/emboj.2008.193

Dörrschuck, E., Fischer, N., Bravo, I.G., Hanschmann, K.-M., Kuiper, H., Spötter, A., Möller, R., Cichutek, K., Münk, C., Tönjes, R.R., 2011. Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases. J. Virol. 85, 3842–57. doi:10.1128/JVI.01880-10

Douglas, J.L., Gustin, J.K., Viswanathan, K., Mansouri, M., Moses, A. V., Fr??h, K., 2010. The great escape: Viral strategies to counter BST-2/ tetherin. PLoS Pathog. doi:10.1371/journal.ppat.1000913

Dube, D., Contreras-Galindo, R., He, S., King, S.R., Gonzalez-Hernandez, M.J., Gitlin, S.D., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., 2014. Genomic flexibility of human endogenous retrovirus type K. J. Virol. 88, 9673–82. doi:10.1128/JVI.01147-14

Dubé, M., Roy, B.B., Guiot-Guillain, P., Binette, J., Mercier, J., Chiasson, A., Cohen, E. a, 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. PLoS Pathog. 6, e1000856. doi:10.1371/journal.ppat.1000856

Dudley, J.P., Mertz, J.A., Bhadra, S., Palmarini, M., Kozak, C.A., 2011. Endogenous retroviruses and cancer, in: Retroviruses and Insights into Cancer. pp. 119–162. doi:10.1007/978-0-387-09581-3_5

Dultz, E., Hildenbeutel, M., Martoglio, B., Hochman, J., Dobberstein, B., Kapp, K., 2008. The signal peptide of the mouse mammary tumor virus rem protein is released from the endoplasmic reticulum membrane and accumulates in nucleoli. J. Biol. Chem. 283, 9966–9976. doi:10.1074/jbc.M705712200

Dunlap, K. a, Palmarini, M., Varela, M., Burghardt, R.C., Hayashi, K., Farmer, J.L., Spencer, T.E., 2006. Endogenous retroviruses regulate periimplantation placental growth and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 14390–14395. doi:10.1073/pnas.0603836103

Dupressoir, A., Lavialle, C., Heidmann, T., 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured syncytins in placentation. Placenta 33, 663–671. doi:10.1016/j.placenta.2012.05.005

Dupressoir, A., Marceau, G., Vernochet, C., Bénit, L., Kanellopoulos, C., Sapin, V., Heidmann, T., 2005. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 725–730. doi:10.1073/pnas.0406509102

Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P., Heidmann, T., 2009. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 12127–32. doi:10.1073/pnas.0902925106

Dupressoir, A., Vernochet, C., Harper, F., Guegan, J., Dessen, P., Pierron, G., Heidmann, T., 2011. PNAS Plus: A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. Proc. Natl. Acad. Sci. doi:10.1073/pnas.1112304108

Duran-Troise, G., Bassin, R.H., Rein, A., Gerwin, B.I., 1977. Loss of Fv-1 restriction in Balb/3T3 cells following infection with a single N tropic murine leukemia virus particle. Cell 10, 479–488. doi:10.1016/0092-8674(77)90035-6

Ebert, P.J.R., Jiang, S., Xie, J., Li, Q.-J., Davis, M.M., 2009. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. Nat. Immunol. 10, 1162–1169. doi:10.1038/ni.1797

Eckert, D., Kim, P., 2001. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. Annu. Rev. Biochem. 777–810.
Einfeld, D., Hunter, E., 1988. Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85, 8688–92.
Elder, J.H., Lerner, D.L., Hasselkus-Light, C.S., Fontenot, D.J., Hunter, E., Luciw, P.A., Montelaro, R.C., Phillips, T.R., 1992. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. J. Virol. 66, 1791–4.
Elsässer, S.J., Noh, K.-M., Diaz, N., Allis, C.D., Banaszynski, L.A., 2015. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. Nature 522, 240–4. doi:10.1038/nature14345
Erhardt, A., Hassan, M., Heintges, T., Häussinger, D., 2002. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. Virology 292, 272–84. doi:10.1006/viro.2001.1227
Erikson, E., Adam, T., Schmidt, S., Lehmann-Koch, J., Over, B., Goffinet, C., Harter, C., Bekeredjian-Ding, I., Sertel, S., Lasitschka, F., Keppler, O.T., 2011. In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 13688–93. doi:10.1073/pnas.1101684108
Esnault, C., Casella, J.-F., Heidmann, T., 2002. A Tetrahymena thermophila ribozyme-based indicator gene to detect transposition of marked retroelements in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 30, e49.
Esnault, C., Cornelis, G., Heidmann, O., Heidmann, T., 2013. Differential Evolutionary Fate of an Ancestral Primate Endogenous Retrovirus Envelope Gene, the EnvV Syncytin, Captured for a Function in Placentation. PLoS Genet. 9. doi:10.1371/journal.pgen.1003400
Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A.J., Heidmann, T., Schwartz, O., 2005. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. Nature 433, 430–433. doi:10.1038/nature03238
Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Heidmann, O., Heidmann, T., 2008a. Restriction by APOBEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cycle: ex vivo effects and in vivo "traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. Retrovirology 5, 75. doi:10.1186/1742-4690-5-75
Esnault, C., Priet, S., Ribet, D., Vernochet, C., Bruls, T., Lavialle, C., Weissenbach, J., Heidmann, T., 2008b. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 17532–17537. doi:10.1073/pnas.0807413105
Evans, L.H., Cloyd, M.W., Joklik, C.W.K., 1985. Friend and Moloney murine leukemia viruses specifically recombine with different endogenous retroviral sequences to generate mink cell focus-forming viruses j * F- - wx 82, 459–463.
Exline, C.M., Yang, S.J., Haworth, K.G., Rengarajan, S., Lopez, L.A., Droniou, M.E., Seclen, E., Cannon, P.M., 2015. Determinants in HIV-2 Env and tetherin required for functional interaction. Retrovirology 12, 67. doi:10.1186/s12977-015-0194-0
Faff, O., Murray, A.B., Schmidt, J., Leib-Mosch, C., Erfle, V., Hehlmann, R., 1992. Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin. J. Gen. Virol. 73, 1087–1097.
Fan, H., 1997. Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: A multistep process. Trends Microbiol. doi:10.1016/S0966-842X(96)10076-7
Fang, K.-H., Kao, H.-K., Chi, L.-M., Liang, Y., Liu, S.-C., Hseuh, C., Liao, C.-T., Yen, T.-C., Yu, J.-S., Chang, K.-P., 2014. Overexpression of BST2 is associated with nodal metastasis and poorer prognosis in oral cavity cancer. Laryngoscope 124, E354–E360. doi:10.1002/lary.24700
Fass, D., Harrison, S.C., Kim, P.S., 1996. Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. Nat. Struct. Biol. 3, 465–9. doi:10.1126/science.1057453
Fenouillet, E., Gluckman, J.C., Jones, I.M., 1994. Functions of HIV envelope glycans. Trends Biochem. Sci. 19, 65–70. doi:10.1016/0968-0004(94)90034-5
Feschotte, C., Gilbert, C., 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. Nat. Rev. Genet. 13, 283–296. doi:10.1038/nrg3199
Fey, D., Croucher, D.R., Kolch, W., Kholodenko, B.N., n.d. Crosstalk and signalling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. doi:10.3389/fphys.2012.00355

Fidler, I.J., 1973. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. Nature 242, 148–149. doi:10.1038/10.1038/newbio242148a0
Fitzpatrick, K., Skasko, M., Deerinck, T.J., Crum, J., Ellisman, M.H., Guatelli, J., 2010. Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. PLoS Pathog. 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000701
Fletcher, A.J., Towers, G.J., 2013. Inhibition of retroviral replication by members of the TRIM protein family. Curr. Top. Microbiol. Immunol. doi:10.1007/978-3-642-37765-5_2
Flockerzi, A., Ruggieri, A., Frank, O., Sauter, M., Maldener, E., Kopper, B., Wullich, B., Seifarth, W., Müller-Lantzsch, N., Leib-Mösch, C., Meese, E., Mayer, J., 2008. Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. BMC Genomics 9, 354. doi:10.1186/1471-2164-9-354
Förster, F., Medalia, O., Zauberman, N., Baumeister, W., Fass, D., 2005. Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 4729–34. doi:10.1073/pnas.0409178102
Frank, O., Giehl, M., Zheng, C., Hehlmann, R., Leib-Mösch, C., Seifarth, W., 2005. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. J. Virol. 79, 10890–901. doi:10.1128/JVI.79.17.10890-10901.2005
Frendo, J.-L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.-L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., Mallet, F., 2003. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. Mol. Cell. Biol. 23, 3566–74. doi:10.1128/MCB.23.10.3566
Fuchs, N. V., Kraft, M., Tondera, C., Hanschmann, K.-M., Lower, J., Lower, R., 2011. Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3. J. Virol. 85, 3436–3448. doi:10.1128/JVI.02539-10
Fujii, M., Tsuchiya, H., Chuhjo, T., Akizawa, T., Seiki, M., 1992. Interaction of HTLV-1 Tax1 with p67SRF causes the aberrant induction of cellular immediate early genes through CArG boxes. Genes Dev. 6, 2066–2076. doi:10.1101/gad.6.11.2066
Furtak, V., Mulky, A., Rawlings, S.A., Kozhaya, L., Lee, K., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., 2010. Perturbation of the P-body component Mov10 inhibits HIV-1 infectivity. PLoS One 5. doi:10.1371/journal.pone.0009081
Galão, R.P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., Neil, S.J.D., 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by tetherin induces NFkB-dependent proinflammatory responses. Cell Host Microbe 12, 633–644. doi:10.1016/j.chom.2012.10.007
Galão, R.P., Pickering, S., Curnock, R., Neil, S.J.D., 2014. Retroviral retention activates a Syk-dependent HemITAM in Human tetherin. Cell Host Microbe 16, 291–303. doi:10.1016/j.chom.2014.08.005
Gallahan, D., Kozak, C., Callahan, R., 1987. A new common integration region (int-3) for mouse mammary tumor virus on mouse chromosome 17. J. Virol. 61, 218–20.
Galli, U.M., Sauter, M., Lecher, B., Maurer, S., Herbst, H., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2005. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. Oncogene 24, 3223–8. doi:10.1038/sj.onc.1208543
Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C.M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., Malim, M.H., 2007. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. J. Virol. 81, 2165–78. doi:10.1128/JVI.02287-06
Ganser-Pornillos, B.K., Chandrasekaran, V., Pornillos, O., Sodroski, J.G., Sundquist, W.I., Yeager, M., 2011. Hexagonal assembly of a restricting TRIM5alpha protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 534–539. doi:10.1073/pnas.1013426108
Garcia, J.V., Miller, A.D., 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. Nature 350, 508–511. doi:10.1038/350508a0
Garrison, K.E., Jones, R.B., Meiklejohn, D.A., Anwar, N., Ndhlovu, L.C., Chapman, J.M., Erickson, A.L., Agrawal, A., Spotts, G., Hecht, F.M., Rakoff-Nahoum, S., Lenz, J., Ostrowski, M.A., Nixon, D.F., 2007. T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. PLoS Pathog. 3, 1617–1627. doi:10.1371/journal.ppat.0030165

Garson, J.A., Tuke, P.W., Giraud, P., Paranhos-Baccala, G., Perron, H., 1998. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis [1]. Lancet 351, 33. doi:10.1016/S0140-6736(98)24001-3

Ge, B., 2014. MAPKK-Independent Activation of p38 ␣ Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38 ␣ 1291, 1291–1295. doi:10.1126/science.1067289

Ge, Y., Dombkowski, A.A., LaFiura, K.M., Tatman, D., Yedidi, R.S., Stout, M.L., Buck, S.A., Massey, G., Becton, D.L., Weinstein, H.J., Ravindranath, Y., Matherly, L.H., Taub, J.W., 2006. Differential gene expression, GATA1 target genes, and the chemotherapy sensitivity of Down syndrome megakaryocytic leukemia. Blood 107, 1570–1581. doi:10.1182/blood-2005-06-2219

George, M., Schwecke, T., Beimforde, N., Hohn, O., Chudak, C., Zimmermann, A., Kurth, R., Naumann, D., Bannert, N., 2011. Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element. Retrovirology 8, 30. doi:10.1186/1742-4690-8-30

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., De Wilde, M., 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. Cell 59, 103–112. doi:10.1016/0092-8674(89)90873-8

Gilbert, C., Feschotte, C., 2010. Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. PLoS Biol. 8. doi:10.1371/journal.pbio.1000495

Gilbert, C., Maxfield, D.G., Goodman, S.M., Feschotte, C., 2009. Parallel germline infiltration of a lentivirus in two malagasy lemurs. PLoS Genet. 5. doi:10.1371/journal.pgen.1000425

Gnirß, K., Fiedler, M., Krämer-Kühl, A., Bolduan, S., Mittler, E., Becker, S., Schindler, M., Pöhlmann, S., 2014. Analysis of determinants in filovirus glycoproteins required for tetherin antagonism. Viruses 6, 1654–1671. doi:10.3390/v6041654

Goding, C.R., 2011. A picture of Mitf in melanoma immortality. Oncogene 30, 2304–2306. doi:10.1038/onc.2010.641

Goering, W., Ribarska, T., Schulz, W.A., 2011. Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. Carcinogenesis 32, 1484–1492. doi:10.1093/carcin/bgr181

Goffinet, C., Allespach, I., Homann, S., Tervo, H.M., Habermann, A., Rupp, D., Oberbremer, L., Kern, C., Tibroni, N., Welsch, S., Krijnse-Locker, J., Banting, G., Kräusslich, H.G., Fackler, O.T., Keppler, O.T., 2009. HIV-1 Antagonism of CD317 Is Species Specific and Involves Vpu-Mediated Proteasomal Degradation of the Restriction Factor. Cell Host Microbe 5, 285–297. doi:10.1016/j.chom.2009.01.009

Golovkina, T.V.T. V., Dzuris, J., Van Den Hoogen, B., Jaffe, A.B.A.B., Wright, P.C.P.C., Cofer, S.M.S.M., Ross, S.R.S.R., van den, H.B., 1998. A novel membrane protein is a mouse mammary tumor virus receptor. J.Virol. 72, 3066–3071.

Golovkina, T. V, Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Buggiano, V., de V, O., Ross, S.R., 1997. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. J.Virol. 71, 3895–3903.

Golovkina, T. V, Prescott, J.A., Ross, S.R., 1993. Mouse mammary tumor virus-induced tumorigenesis in sag transgenic mice: a laboratory model of natural selection. J. Virol. 67, 7690–4.

Gonzalez-Hernandez, M.J., Cavalcoli, J.D., Sartor, M.A., Contreras-Galindo, R., Meng, F., Dai, M., Dube, D., Saha, A.K., Gitlin, S.D., Omenn, G.S., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., 2014. Regulation of the human endogenous retrovirus K (HML-2) transcriptome by the HIV-1 Tat protein. J Virol 88, 8924–8935. doi:10.1128/jvi.00556-14

Gonzalez-Hernandez, M.J., Swanson, M.D., Contreras-Galindo, R., Cookinham, S., King, S.R., Noel, R.J., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., 2012. Expression of Human Endogenous Retrovirus Type-K (HML-2) is activated by the Tat protein of HIV-1. J. Virol. doi:10.1128/JVI.07215-11

Goodchild, N.L., Douglas Freeman, J., Mager, D.L., 1995. Spliced HERV-H endogenous retroviral sequences in human genomic DNA: Evidence for amplification via retrotransposition. Virology 206, 164–173. doi:10.1016/S0042-6822(95)80031-X

Goodchild, N.L., Wilkinson, D. a, Mager, D.L., 1993. Recent evolutionary expansion of a subfamily of RTVL-H human endogenous retrovirus-like elements. Virology. doi:S0042-6822(83)71535-7 [pii]\r10.1006/viro.1993.1535

Goto, T., Kennel, S.J., Abe, M., Takishita, M., Kosaka, M., Solomon, A., Saito, S., 1994. A novel

membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. Blood 84, 1922–1930.
Göttlinger, H.G., Dorfman, T., Cohen, E.A., Haseltine, W.A., 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 7381–5.
Götz, N., Sauter, D., Usmani, S.M., Fritz, J. V., Goffinet, C., Heigele, A., Geyer, M., Bibollet-Ruche, F., Learn, G.H., Fackler, O.T., Hahn, B.H., Kirchhoff, F., 2012. Reacquisition of nef-mediated tetherin antagonism in a single in vivo passage of HIV-1 through its original chimpanzee host. Cell Host Microbe 12, 373–380. doi:10.1016/j.chom.2012.07.008
Götzinger, N., Sauter, M., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 1996. Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. J. Gen. Virol. 77, 2983–2990.
Gould, S.J., Booth, A.M., Hildreth, J.E.K., 2003. The Trojan exosome hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10592–10597. doi:10.1073/pnas.1831413100
Green, N., Shinnick, T.M., Witte, O., Ponticelli, a, Sutcliffe, J.G., Lerner, R. a, 1981. Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 6023–6027. doi:10.1073/pnas.78.10.6023
Groudine, M., Eisenman, R., Weintraub, H., 1981. Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. Nature 292, 311–7. doi:10.1038/292311a0
Grover, J.R., Llewellyn, G.N., Soheilian, F., Nagashima, K., Veatch, S.L., Ono, A., 2013. Roles Played by Capsid-Dependent Induction of Membrane Curvature and Gag-ESCRT Interactions in Tetherin Recruitment to HIV-1 Assembly Sites. J. Virol. 87, 4650–4664. doi:10.1128/JVI.03526-12
Grow, E.J., Flynn, R. a., Chavez, S.L., Bayless, N.L., Wossidlo, M., Wesche, D.J., Martin, L., Ware, C.B., Blish, C. a., Chang, H.Y., Pera, R.A.R., Wysocka, J., 2015. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. Nature 522, 221–5. doi:10.1038/nature14308
Gu, G., Zhao, D., Yin, Z., Liu, P., 2012. BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity. J. Cell. Biochem. 113, 1013–1021. doi:10.1002/jcb.23433
Gupta, R.K., Hué, S., Schaller, T., Verschoor, E., Pillay, D., Towers, G.J., 2009. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000443
Gupta, R.K., Mlcochova, P., Pelchen-Matthews, A., Petit, S.J., Mattiuzzo, G., Pillay, D., Takeuchi, Y., Marsh, M., Towers, G.J., 2009. Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 20889–20894. doi:10.1073/pnas.0907075106
Guzzo, C., Jung, M., Graveline, A., Banfield, B.W., Gee, K., 2012. IL-27 increases BST-2 expression in human monocytes and T cells independently of type I IFN. Sci. Rep. 2, 974. doi:10.1038/srep00974
Habermann, A., Krijnse-Locker, J., Oberwinkler, H., Eckhardt, M., Homann, S., Andrew, A., Strebel, K., Kräusslich, H.-G., 2010. CD317/tetherin is enriched in the HIV-1 envelope and downregulated from the plasma membrane upon virus infection. J. Virol. 84, 4646–58. doi:10.1128/JVI.02421-09
Hahn, S., Ugurel, S., Hanschmann, K.-M., Strobel, H., Tondera, C., Schadendorf, D., Löwer, J., Löwer, R., 2008. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. AIDS Res. Hum. Retroviruses 24, 717–723. doi:10.1089/aid.2007.0286
Hamilton, B.A., Smith, D.J., Mueller, K.L., Kerrebrock, A.W., Bronson, R.T., Van Berkel, V., Daly, M.J., Kruglyak, L., Reeve, M.P., Nemhauser, J.L., Hawkins, T.L., Rubin, E.M., Lander, E.S., 1997. The vibrator mutation causes neurodegeneration via reduced expression of PITP??: Positional complementation cloning and extragenic suppression. Neuron 18, 711–722. doi:10.1016/S0896-6273(00)80312-8
Hammonds, J., Ding, L., Chu, H., Geller, K., Robbins, A., Wang, J.-J., Yi, H., Spearman, P., 2012.

The tetherin/BST-2 coiled-coil ectodomain mediates plasma membrane microdomain localization and restriction of particle release. J. Virol. 86, 2259–72. doi:10.1128/JVI.05906-11
Hammonds, J., Wang, J.J., Yi, H., Spearman, P., 2010. Immunoelectron microscopic evidence for tetherin/BST2 as the physical bridge between HIV-1 virions and the plasma membrane. PLoS Pathog. 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000749
Han, G.Z., Worobey, M., 2015. A Primitive Endogenous Lentivirus in a Colugo: Insights into the Early Evolution of Lentiviruses. Mol. Biol. Evol. 32, 211–215. doi:10.1093/molbev/msu297
Hanger, J.J., Bromham, L.D., McKee, J.J., O'Brien, T.M., Robinson, W.F., 2000. The nucleotide sequence of koala (Phascolarctos cinereus) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. J. Virol. 74, 4264–72. doi:10.1128/JVI.74.9.4264-4272.2000
Hanke, K., Chudak, C., Kurth, R., Bannert, N., 2013a. The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). Int. J. Cancer 132, 556–567. doi:10.1002/ijc.27693
Hanke, K., Hohn, O., Bannert, N., 2016. HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep. Apmis 124, 67–87. doi:10.1111/apm.12475
Hanke, K., Hohn, O., Liedgens, L., Fiddeke, K., Wamara, J., Kurth, R., Bannert, N., 2013b. Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. J. Virol. 87, 11019–30. doi:10.1128/JVI.03031-12
Hanke, K., Kramer, P., Seeher, S., Beimforde, N., Kurth, R., Bannert, N., 2009. Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain. J. Virol. 83, 12790–800. doi:10.1128/JVI.01368-09
Harila, K., Salminen, A., Prior, I., Hinkula, J., Suomalainen, M., 2007. The Vpu-regulated endocytosis of HIV-1 Gag is clathrin-independent. Virology 369, 299–308. doi:10.1016/j.virol.2007.08.009
Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., Malim, M.H., 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. Cell 113, 803–809. doi:10.1016/S0092-8674(03)00423-9
Harris, R.S., Perrino, F.W., Shaban, N.M., 2015. The multidimensional nature of antiviral innate immunity. Cell Host Microbe 17, 423–425. doi:10.1016/j.chom.2015.03.011
Hatfield, D., Oroszlan, S., 1990. The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. Trends Biochem. Sci. doi:10.1016/0968-0004(90)90159-9
Hauser, H., Lopez, L. a, Yang, S.J., Oldenburg, J.E., Exline, C.M., Guatelli, J.C., Cannon, P.M., 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. Retrovirology 7, 51. doi:10.1186/1742-4690-7-51
Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Xia, G., Kihara, K., Oshima, H., 2001. Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. J. Androl. 22, 999–1011.
Hayashi, T., Yamada, T., Kageyama, Y., Negishi, T., Kihara, K., 2004. Expression failure of the Notch signaling system is associated with the pathogenesis of maturation arrest in male infertility patients. Fertil. Steril. 81, 697–699. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.08.026
Hayman, M.J., 1978. Viral polyproteins in chick embryo fibroblasts infected with avian sarcoma leukosis viruses. Virology 85, 241–252. doi:10.1016/0042-6822(78)90428-2
Hayward, A., Grabherr, M., Jern, P., 2013. Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus–host evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 20146–20151. doi:10.1073/pnas.1315419110
Henderson, L.E., Sowder, R., Copeland, T.D., Smythers, G., Oroszlan, S., 1984. Quantitative separation of murine leukemia virus proteins by reversed-phase high-pressure liquid chromatography reveals newly described gag and env cleavage products. J Virol 52, 492–500.
Henzy, J.E., Coffin, J.M., 2013. Betaretroviral envelope subunits are noncovalently associated and restricted to the mammalian class. J. Virol. 87, 1937–46. doi:10.1128/JVI.01442-12
Heslin, D.J., Murcia, P., Arnaud, F., Van Doorslaer, K., Palmarini, M., Lenz, J., 2009. A single amino acid substitution in a segment of the CA protein within Gag that has similarity to human immunodeficiency virus type 1 blocks infectivity of a human endogenous retrovirus K provirus in the human genome. J. Virol. 83, 1105–1114. doi:10.1128/JVI.01439-08
Heusinger, E., Kluge, S.F., Kirchhoff, F., Sauter, D., 2015. Early Vertebrate Evolution of the Host

Restriction Factor Tetherin. J. Virol. JVI.02149–15–. doi:10.1128/JVI.02149-15
Hinz, A., Miguet, N., Natrajan, G., Usami, Y., Yamanaka, H., Renesto, P., Hartlieb, B., McCarthy, A.A., Simorre, J.P., Göttlinger, H., Weissenhorn, W., 2010. Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. Cell Host Microbe 7, 314–323. doi:10.1016/j.chom.2010.03.005
Hoch-Marchaim, H., Weiss, A.M., Bar-Sinai, A., Fromer, M., Adermann, K., Hochman, J., 2003. The leader peptide of MMTV Env precursor localizes to the nucleoli in MMTV-derived T cell lymphomas and interacts with nucleolar protein B23. Virology 313, 22–32. doi:10.1016/S0042-6822(03)00236-8
Hofacre, A., Fan, H., 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. Viruses. doi:10.3390/v2122618
Hofacre, A., Fan, H., 2004. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. J. Virol. 78, 10479–89. doi:10.1128/JVI.78.19.10479-10489.2004
Hofacre, A., Nitta, T., Fan, H., 2009. Jaagsiekte sheep retrovirus encodes a regulatory factor, Rej, required for synthesis of Gag protein. J. Virol. 83, 12483–12498. doi:10.1128/JVI.01747-08
Hohn, O., Hanke, K., Lausch, V., Zimmermann, A., Mostafa, S., Bannert, N., 2014. CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K(HML-2). Viruses 6, 4332–4345. doi:10.3390/v6114332
Holmes, R.K., Koning, F.A., Bishop, K.N., Malim, M.H., 2007. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation: Comparisons with APOBEC3G. J. Biol. Chem. 282, 2587–2595. doi:10.1074/jbc.M607298200
Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., Skowronski, J., 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. Nature 474, 658–661. doi:10.1038/nature10195
Hron, T., Fábryová, H., Pačes, J., Elleder, D., 2014. Endogenous lentivirus in Malayan colugo (Galeopterus variegatus), a close relative of primates. Retrovirology 11, 84. doi:10.1186/s12977-014-0084-x
Hsu, T., Phung, A., Choe, K., Kim, J.W., Fan, H., 2015a. A role for a zinc finger protein (Zfp111) in transformation of 208F rat fibroblasts by Jaagsiekte Sheep Retrovirus envelope protein. J. Virol. JVI.01631–15–. doi:10.1128/JVI.01631-15
Hsu, T., Phung, A., Choe, K., Kim, J.W., Fan, H., 2015b. A role for a zinc finger protein (Zfp111) in transformation of 208F rat fibroblasts by Jaagsiekte Sheep Retrovirus envelope protein. J. Virol. JVI.01631–15–. doi:10.1128/JVI.01631-15
Huang, G., Li, Z., Wan, X., Wang, Y., Dong, J., 2013. Human endogenous retroviral K element encodes fusogenic activity in melanoma cells. J. Carcinog. 12, 5. doi:10.4103/1477-3163.109032
Huang, J., Fan, T., Yan, Q., Zhu, H., Fox, S., Issaq, H.J., Best, L., Gangi, L., Munroe, D., Muegge, K., 2004. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. Nucleic Acids Res. 32, 5019–5028. doi:10.1093/nar/gkh821
Huang, W., Li, S., Hu, Y., Yu, H., Luo, F., Zhang, Q., Zhu, F., 2011. Implication of the env gene of the human endogenous retrovirus W family in the expression of BDNF and DRD3 and development of recent-onset schizophrenia. Schizophr. Bull. 37, 988–1000. doi:10.1093/schbul/sbp166
Hughes, J.F., Coffin, J.M., 2005. Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. Genetics 171, 1183–1194. doi:10.1534/genetics.105.043976
Hull, S., Fan, H., 2006. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. J. Virol. 80, 8069–80. doi:10.1128/JVI.00013-06
Hulme, A.E., Perez, O., Hope, T.J., 2011. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 9975–80. doi:10.1073/pnas.1014522108
Hungnes, O., Tjotta, E., Grinde, B., 1992. Mutations in the central polypurine tract of HIV-1 result in delayed replication. Virology 190, 440–442. doi:10.1016/0042-6822(92)91230-R
Huntley, S., Baggott, D.M., Hamilton, A.T., Tran-Gyamfi, M., Yang, S., Kim, J., Gordon, L., Branscomb, E., Stubbs, L., 2006. A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc

finger genes: Insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors. Genome Res. 16, 669–677. doi:10.1101/gr.4842106
Hussain, A., Wesley, C., Khalid, M., Chaudhry, A., Jameel, S., 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. J. Virol. 82, 893–902. doi:10.1128/JVI.01373-07
Ignatowicz, L., Kappler, J.W., Marrack, P., 1992. The effects of chronic infection with a superantigen-producing virus. J. Exp. Med. 175, 917–923.
Ikeda, H., Kato, K., Suzuki, T., Kitani, H., Matsubara, Y., Takase-Yoden, S., Watanabe, R., Kitagawa, M., Aizawa, S., 2000. Properties of the naturally occurring soluble surface glycoprotein of ecotropic murine leukemia virus: binding specificity and possible conformational change after binding to receptor. J. Virol. 74, 1815–1826. doi:10.1128/JVI.74.4.1815-1826.2000
Ikeda, H., Odaka, T., 1983. Cellular expression of murine leukemia virus gp70-related antigen on thymocytes of uninfected mice correlates with Fv-4 gene-controlled resistance to friend leukemia virus infection. Virology 128, 127–139. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(83)90324-0
Imai, S., Okumoto, M., Iwai, M., Haga, S., Mori, N., Miyashita, N., Moriwaki, K., Hilgers, J., Sarkar, N.H., 1994. Distribution of mouse mammary tumor virus in Asian wild mice. J Virol 68, 3437–3442.
Indik, S., Günzburg, W.H., Salmons, B., Rouault, F., 2005. A novel, mouse mammary tumor virus encoded protein with Rev-like properties. Virology 337, 1–6. doi:10.1016/j.virol.2005.03.040
Inuzuka, M., Hayakawa, M., Ingi, T., 2005. Serine, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. J. Biol. Chem. 280, 35776–35783. doi:10.1074/jbc.M505712200
Iramaneerat, K., Rattanatunyong, P., Khemapech, N., Triratanachat, S., Mutirangura, A., 2011. HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance. Int. J. Gynecol. Cancer 21, 51–7. doi:10.1097/IGC.0b013e3182021c1a
Ishida, T., Obata, Y., Ohara, N., Matsushita, H., Sato, S., Uenaka, A., Saika, T., Miyamura, T., Chayama, K., Nakamura, Y., Wada, H., Yamashita, T., Morishima, T., Old, L.J., Nakayama, E., 2008. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. Cancer Immun. 8, 1–10. doi:081042 [pii]
Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B.O., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T., Ishihara, K., Hirano, T., 1995. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. Genomics 26, 527–534. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(95)80171-H
Ito, J., Watanabe, S., Hiratsuka, T., Kuse, K., Odahara, Y., Ochi, H., Kawamura, M., Nishigaki, K., 2013. Refrex-1, a soluble restriction factor against feline endogenous and exogenous retroviruses. J. Virol. 87, 12029–40. doi:10.1128/JVI.01267-13
Iwasaki, Y.W., Siomi, M.C., Siomi, H., 2015. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. Annu. Rev. Biochem. 84, 405–33. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034258
Iwatani, Y., Chan, D.S.B., Wang, F., Maynard, K.S., Sugiura, W., Gronenborn, A.M., Rouzina, I., Williams, M.C., Musier-Forsyth, K., Levin, J.G., 2007. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. Nucleic Acids Res. 35, 7096–7108. doi:10.1093/nar/gkm750
Jacobs, F.M.J., Greenberg, D., Nguyen, N., Haeussler, M., Ewing, A.D., Katzman, S., Paten, B., Salama, S.R., Haussler, D., 2014. An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. Nature 516, 242–5. doi:10.1038/nature13760
Jähner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C.L., Harbers, K., Löhler, J., Simon, I., Jaenisch, R., 1982. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. Nature 298, 623–8. doi:10.1038/298623a0
Jamjoom, G.A., Maatouk, J., Gazal, M., Damanhouri, L., Awliaa, A., Ruwaihi, N., Bawazeer, M., Halabi, H., Adel, A.A., Abdulla, A., 1997. Follow-up of HIV western blot indeterminate results. Ann Saudi Med 17, 518–521. doi:17-518 [pii]
Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J.B., Caillet, M., Marsh, M., Berlioz-Torrent, C., 2011. The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. PLoS Pathog. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1001265
Jern, P., Coffin, J.M., 2008. Effects of retroviruses on host genome function. Annu Rev Genet 42,

709–732. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091501
Jha, A.R., Pillai, S.K., York, V.A., Sharp, E.R., Storm, E.C., Wachter, D.J., Martin, J.N., Deeks, S.G., Rosenberg, M.G., Nixon, D.F., Garrison, K.E., 2009. Cross-sectional dating of novel haplotypes of HERV-K 113 and HERV-K 115 indicate these proviruses originated in Africa before Homo sapiens. Mol. Biol. Evol. 26, 2617–2626. doi:10.1093/molbev/msp180
Jia, B., Serra-Moreno, R., Neidermyer, W., Rahmberg, A., Mackey, J., Fofana, I. Ben, Johnson, W.E., Westmoreland, S., Evans, D.T., 2009. Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000429
Johnson, C., Fan, H., 2011. Three-dimensional culture of an ovine pulmonary adenocarcinoma-derived cell line results in re-expression of surfactant proteins and Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology 414, 91–96. doi:10.1016/j.virol.2011.03.018
Johnson, C., Sanders, K., Fan, H., 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus transformation in Madin-Darby canine kidney epithelial cell three-dimensional culture. J. Virol. 84, 5379–5390. doi:10.1128/JVI.02323-09
Johnson, S.F., Telesnitsky, A., 2010. Retroviral RNA dimerization and packaging: The what, how, when, where, and why. PLoS Pathog. 6, 10–13. doi:10.1371/journal.ppat.1001007
Jolicoeur, P., Baltimore, D., 1976. Effect of Fv-1 gene product on proviral DNA formation and integration in cells infected with murine leukemia viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 73, 2236–40. doi:10.2307/65744
Jolly, C., Booth, N.J., Neil, S.J.D., 2010. Cell-cell spread of Human Immunodeficiency Virus type-1 overcomes tetherin/BST-2 mediated restriction in T cells. J. Virol. 84, 12185–12199. doi:10.1128/JVI.01447-10
Jones, P.H., Maric, M., Madison, M.N., Maury, W., Roller, R.J., Okeoma, C.M., 2013. BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). Virology 438, 37–49. doi:10.1016/j.virol.2013.01.010
Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., McNatt, M., Hatziioannou, T., Bieniasz, P.D., 2009. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. J. Virol. 83, 1837–1844. doi:10.1128/JVI.02211-08
Jung, Y.T., Lyu, M.S., Buckler-White, A., Kozak, C.A., 2002. Characterization of a Polytropic Murine Leukemia Virus Proviral Sequence Associated with the Virus Resistance Gene Rmcf of DBA/2 Mice. J. Virol. 76, 8218–8224. doi:10.1128/JVI.76.16.8218-8224.2002
Kaiser, S.M., Malik, H.S., Emerman, M., 2007. Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein. Science 316, 1756–1758. doi:10.1126/science.1140579
Kamata, M., Nitahara-Kasahara, Y., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., Aida, Y., 2005. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J Virol 79, 3557–3564. doi:79/6/3557 [pii]\r10.1128/JVI.79.6.3557-3564.2005
Kämmerer, U., Germeyer, A., Stengel, S., Kapp, M., Denner, J., 2011. Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. J. Reprod. Immunol. 91, 1–8. doi:10.1016/j.jri.2011.06.102
Kannan, P., Buettner, R., Pratt, D.R., Tainsky, M.A., 1991. Identification of a retinoic acid-inducible endogenous retroviral transcript in the human teratocarcinoma-derived cell line PA-1. J. Virol. 65, 6343–8.
Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M.K., Dobberstein, B., 2009. Katja Kapp, Sabrina Schrempf, Marius K. Lemberg* and Bernhard Dobberstein* 1–16.
Karlsson, H., Bachmann, S., Schroder, J., McArthur, J., Torrey, E.F., Yolken, R.H., 2001. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 4634–4639. doi:10.1073/pnas.061021998
Kashatus, D.F., 2013. Ral GTPases in tumorigenesis: Emerging from the shadows. Exp. Cell Res. doi:10.1016/j.yexcr.2013.06.020
Kassiotis, G., Stoye, J.P., 2016. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. Nat. Rev. Immunol. 16, 207–219. doi:10.1038/nri.2016.27
Katoh, I., Mírová, A., Kurata, S., Murakami, Y., Horikawa, K., Nakakuki, N., Sakai, T., Hashimoto, K., Maruyama, A., Yonaga, T., Fukunishi, N., Moriishi, K., Hirai, H., 2011. Activation of the long terminal repeat of human endogenous retrovirus K by melanoma-specific transcription factor MITF-M. Neoplasia 13, 1081–92. doi:10.1593/neo.11794

Katz, E., Lareef, M.H., Rassa, J.C., Grande, S.M., King, L.B., Russo, J., Ross, S.R., Monroe, J.G., 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. J. Exp. Med. 201, 431–9. doi:10.1084/jem.20041471

Katzourakis, A., Gifford, R.J., 2010. Endogenous viral elements in animal genomes. PLoS Genet. 6. doi:10.1371/journal.pgen.1001191

Katzourakis, A., Tristem, M., Pybus, O.G., Gifford, R.J., 2007. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 6261–5. doi:10.1073/pnas.0700471104

Kaufmann, S., Sauter, M., Schmitt, M., Baumert, B., Best, B., Boese, A., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., 2010. Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. J. Gen. Virol. 91, 1494–1502. doi:10.1099/vir.0.014241-0

Kawai, S., Azuma, Y., Fujii, E., Furugaki, K., Ozaki, S., Matsumoto, T., Kosaka, M., Yamada-Okabe, H., 2008. Interferon-alpha enhances CD317 expression and the antitumor activity of anti-CD317 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models. Cancer Sci. 99, 2461–2466. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00968.x

Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Húnig, T., Schimpl, A., Schubert, U., 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. J. Exp. Med. 185, 1295–305. doi:10.1084/jem.185.7.1295

Kim, E.K., Choi, E.-J., 2015. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. Arch. Toxicol. 89, 867–882. doi:10.1007/s00204-015-1472-2

Kim, E.K., Choi, E.-J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1802, 396–405. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009

Kizhatil, K., Albritton, L.M., 1997. Requirements for different components of the host cell cytoskeleton distinguish ecotropic murine leukemia virus entry via endocytosis from entry via surface fusion. J. Virol. 71, 7145–7156.

Kleiman, A., Senyuta, N., Tryakin, A., Sauter, M., Karseladze, A., Tjulandin, S., Gurtsevitch, V., Mueller-Lantzsch, N., 2004. HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. Int. J. Cancer 110, 459–461. doi:10.1002/ijc.11649

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A., Orenstein, J.M., 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. J. Virol. 64, 621–9.

Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., Koyanagi, Y., 2011. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. J. Virol. 85, 932–945. doi:10.1128/JVI.01668-10

Kobayashi, T., Takeuchi, J.S., Ren, F., Matsuda, K., Sato, K., Kimura, Y., Misawa, N., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Yamada, E., Tanaka, H., Hirsch, V.M., Koyanagi, Y., 2014. Characterization of red-capped mangabey tetherin: implication for the co-evolution of primates and their lentiviruses. Sci. Rep. 4, 5529. doi:10.1038/srep05529

Kobe, B., Center, R.J., Kemp, B.E., Poumbourios, P., 1999. Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 4319–4324.

Kolokithas, A., Rosenke, K., Malik, F., Hendrick, D., Swanson, L., Santiago, M.L., Portis, J.L., Hasenkrug, K.J., Evans, L.H., 2010. The glycosylated Gag protein of a murine leukemia virus inhibits the antiretroviral function of APOBEC3. J. Virol. 84, 10933–6. doi:10.1128/JVI.01023-10

Koning, F.A., Newman, E.N.C., Kim, E.-Y., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M., Malim, M.H., 2009. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. J. Virol. 83, 9474–85. doi:10.1128/JVI.01089-09

Kozak, S.L., Marin, M., Rose, K.M., Bystrom, C., Kabat, D., 2006. The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. J. Biol. Chem. 281, 29105–29119. doi:10.1074/jbc.M601901200

Kramer, P., Lausch, V., Volkwein, A., Hanke, K., Hohn, O., Bannert, N., 2016. The human endogenous retrovirus K(HML-2) has a broad envelope-mediated cellular tropism and is prone to inhibition at a post-entry, pre-integration step. Virology 487, 121–128. doi:10.1016/j.virol.2015.10.014

Kraus, B., Fischer, K., Sliva, K., Schnierle, B.S., 2014. Vaccination directed against the human endogenous retrovirus-K (HERV-K) gag protein slows HERV-K gag expressing cell growth in a murine model system. Virol. J. 11, 58. doi:10.1186/1743-422X-11-58

Krishnamurthy, J., Rabinovich, B.A., Mi, T., Switzer, K.C., Olivares, S., Maiti, S.N., Plummer, J.B., Singh, H., Kumaresan, P.R., Huls, H.M., Wang-Johanning, F., Cooper, L.J.N., 2015. Genetic engineering of T cells to target HERV-K, an ancient retrovirus on melanoma. Clin. Cancer Res. 21, 3241–3251. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3197

Kühl, A., Banning, C., Marzi, A., Votteler, J., Steffen, I., Bertram, S., Glowacka, I., Konrad, A., Stürzl, M., Guo, J.T., Schubert, U., Feldmann, H., Behrens, G., Schindler, M., Pöhlmann, S., 2011. The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 VPU employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin, in: Journal of Infectious Diseases. doi:10.1093/infdis/jir378

Kuhl, B.D., Sloan, R.D., Donahue, D.A., Bar-Magen, T., Liang, C., Wainberg, M.A., 2010. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1. Retrovirology 7, 115. doi:10.1186/1742-4690-7-115

Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A., Banting, G., 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. Traffic 4, 694–709. doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00129.x

Kwun, H.J., Han, H.J., Lee, W.J., Kim, H.S., Jang, K.L., 2002. Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 0. Virus Res. 86, 93–100. doi:10.1016/S0168-1702(02)00058-8

La Mantia, G., Maglione, D., Pengue, G., Di Cristofano, a, Simeone, a, Lanfrancone, L., Lania, L., 1991. Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences prefentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Res. 19, 1513–20. doi:10.1093/nar/19.7.1513

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature 410, 116–120. doi:10.1038/35065132

Laderoute, M.P., Giulivi, A., Larocque, L., Bellfoy, D., Hou, Y., Wu, H.-X., Fowke, K., Wu, J., Diaz-Mitoma, F., 2007. The replicative activity of human endogenous retrovirus K102 (HERV-K102) with HIV viremia. AIDS 21, 2417–2424. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f14d64

Laguette, N., Brégnard, C., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., Basmaciogullari, S., 2009. Nef-induced CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 host cells: role of p56lck kinase. J. Virol. 83, 7117–28. doi:10.1128/JVI.01648-08

Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., Benkirane, M., 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. Nature 474, 654–7. doi:10.1038/nature10117

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N.R., Kim, B., Margottin-Goguet, F., 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. Nat. Immunol. 13, 223–228. doi:10.1038/ni.2236

Langner, J.S., Fuchs, N. V, Hoffmann, J., Wittmann, A., Brutschy, B., Löwer, R., Suess, B., 2012. Biochemical analysis of the complex between the tetrameric export adapter protein Rec of HERV-K/HML-2 and the responsive RNA element RcRE pck30. J. Virol. 86, 9079–87. doi:10.1128/JVI.00121-12

Laurent-Crawford, a G., Krust, B., Riviere, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M.P., Dauguet, C., Hovanessian, a G., 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. AIDS Res Hum.Retroviruses 9, 761–773. doi:10.1089/aid.1993.9.761

Lavialle, C., Cornelis, G., Dupressoir, A., Esnault, C., Heidmann, O., Vernochet, C., Heidmann, T., 2013a. Paleovirology of "syncytins", retroviral env genes exapted for a role in placentation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 368, 20120507. doi:10.1098/rstb.2012.0507

Lavialle, C., Cornelis, G., Dupressoir, A., Esnault, C., Heidmann, O., Vernochet, C., Heidmann, T., 2013b. Paleovirology of "syncytins", retroviral env genes exapted for a role in placentation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 368, 20120507. doi:10.1098/rstb.2012.0507
Lavie, L., Kitova, M., Maldener, E., Meese, E., Mayer, J., 2005. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2). J. Virol. 79, 876. doi:10.1128/JVI.79.2.876
Lavie, L., Medstrand, P., Schempp, W., Meese, E., Mayer, J., 2004. Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-5): status, evolution, and reconstruction of an ancient betaretrovirus in the human genome. J. Virol. 78, 8788–98. doi:10.1128/JVI.78.16.8788-8798.2004
Lavillette, D., 2011. Cell Entry of Enveloped Viruses. doi:10.1016/B978-0-12-380860-8.00004-5
Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F.L., Kabat, D., 2002. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. J Virol 76, 6442–6452. doi:10.1128/JVI.76.13.6442
Lavillette, D., Maurice, M., Roche, C., Russell, S.J., Sitbon, M., Cosset, F.L., 1998. A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. J Virol 72, 9955–9965.
Law, J.A., Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat. Rev. Genet. 11, 204–220. doi:10.1038/nrg2719
Law, K.M., Satija, N., Esposito, A.M., Chen, B.K., 2016. Cell-to-Cell Spread of HIV and Viral Pathogenesis., 1st ed, Advances in virus research. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.aivir.2016.03.001
Le Rouzic, E., Benichou, S., 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology 2, 11. doi:10.1186/1742-4690-2-11
Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., Benichou, S., 2002. Docking of HIV-1 vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. J. Biol. Chem. 277, 45091–45098. doi:10.1074/jbc.M207439200
Le Tortorec, A., Neil, S.J.D., 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. J. Virol. 83, 11966–11978. doi:10.1128/JVI.01515-09
Leamnson, R.N., Halpern, M.S., 1976. Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. J. Virol. 18, 956–968.
Leder, A., Pattengale, P.K., Kuo, A., Stewart, T.A., Leder, P., 1986. Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: Multiple neoplasms and normal development. Cell 45, 485–495. doi:10.1016/0092-8674(86)90280-1
Lee, A., Huntley, D., Aiewsakun, P., Kanda, R.K., Lynn, C., Tristem, M., 2014. Novel Denisovan and Neanderthal retroviruses. J. Virol. 88, 12907–9. doi:10.1128/JVI.01825-14
Lee, W.J., Kwun, H.J., Kim, H.S., Jang, K.L., 2003. Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. Mol. Cells 15, 75–80.
Lehmann, M., Rocha, S., Mangeat, B., Blanchet, F., Uji-i, H., Hofkens, J., Piguet, V., 2011. Quantitative multicolor super-resolution microscopy reveals tetherin HIV-1 interaction. PLoS Pathog. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002456
Lemaître, C., Harper, F., Pierron, G., Heidmann, T., Dewannieux, M., 2014. The HERV-K human endogenous retrovirus envelope protein antagonizes Tetherin antiviral activity. J. Virol. 88, 13626–37. doi:10.1128/JVI.02234-14
Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G., 1998. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. J. Biol. Chem. 273, 22466–22470. doi:10.1074/jbc.273.35.22466
Leroux, C., Mornex, J.F., 2008. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. Small Rumin. Res. 76, 68–76. doi:10.1016/j.smallrumres.2007.12.010
Leroux, C., Vuillermoz, S., Mornex, J.F., Greenland, T., 1995. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. J. Gen. Virol. 76, 1533–1537. doi:10.1099/0022-1317-76-6-1533
Lewinski, M.K., Jafari, M., Zhang, H., Opella, S.J., Guatelli, J., 2015. Membrane Anchoring by a C-terminal Tryptophan Enables HIV-1 Vpu to Displace Bone Marrow Stromal Antigen 2 (BST2) from Sites of Viral Assembly. J. Biol. Chem. 290, 10919–10933. doi:10.1074/jbc.M114.630095

Leyva-Grado, V.H., Hai, R., Fernandes, F., Belicha-Villanueva, A., Carter, C., Yondola, M.A., 2014. Modulation of an ectodomain motif in the influenza A virus neuraminidase alters tetherin sensitivity and results in virus attenuation in vivo. J. Mol. Biol. 426, 1308–1321. doi:10.1016/j.jmb.2013.12.023

Li, H., Liu, Q., Hu, X., Feng, D., Xiang, S., He, Z., Hu, X., Zhou, J., Ding, X., Zhou, C., Zhang, J., 2009. Human ZCCHC12 activates AP-1 and CREB signaling as a transcriptional co-activator. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 41, 535–544. doi:10.1093/abbs/gmp042

Li, K., Zhang, S., Kronqvist, M., Wallin, M., Ekström, M., Derse, D., Garoff, H., 2008. Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus Env. J. Virol. 82, 7135–43. doi:10.1128/JVI.00448-08

Li, M., Xu, F., Muller, J., Hearing, V.J., Gorelik, E., 1998. Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. Int. J. Cancer 76, 430–436. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19980504)76:3<430::AID-IJC23>3.0.CO;2-D

Li, M., Yang, C., Tong, S., Weidmann, A., Compans, R.W., 2002. Palmitoylation of the murine leukemia virus envelope protein is critical for lipid raft association and surface expression. J Virol 76, 11845–11852.

Li, S.X., Barrett, B.S., Heilman, K.J., Messer, R.J., Liberatore, R.A., Bieniasz, P.D., Kassiotis, G., Hasenkrug, K.J., Santiago, M.L., 2014. Tetherin Promotes the Innate and Adaptive Cell–Mediated Immune Response against Retrovirus Infection In Vivo. J. Immunol. 193, 306–316. doi:10.4049/jimmunol.1400490

Li, W., Lee, M., Henderson, L., Tyagi, R., Bachani, M., Steiner, J., Campanac, E., Hoffman, D.A., von Geldern, G., Johnson, K., Maric, D., Morris, H.D., Lentz, M., Pak, K., Mammen, A., Ostrow, L., Rothstein, J., Nath, A., 2015. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. Sci. Transl. Med. 7, 307ra153. doi:10.1126/scitranslmed.aac8201

Li, X., Kaloyanova, D., van Eijk, M., Eerland, R., van der Goot, G., Oorschot, V., Klumperman, J., Lottspeich, F., Starkuviene, V., Wieland, F.T., Helms, J.B., 2007. Involvement of a Golgi-resident GPI-anchored protein in maintenance of the Golgi structure. Mol. Biol. Cell 18, 1261–1271. doi:10.1091/mbc.E06-03-0236

Liberatore, R.A., Bieniasz, P.D., 2011. Tetherin is a key effector of the antiretroviral activity of type I interferon in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 18097–18101. doi:10.1073/pnas.1113694108

Lim, E.S., Emerman, M., 2009. Simian immunodeficiency virus SIVagm from African green monkeys does not antagonize endogenous levels of African green monkey tetherin/BST-2. J Virol 83, 11673–11681. doi:10.1128/JVI.00569-09

Lim, E.S., Malik, H.S., Emerman, M., 2010. Ancient adaptive evolution of tetherin shaped the functions of Vpu and Nef in human immunodeficiency virus and primate lentiviruses. J Virol 84, 7124–7134. doi:10.1128/JVI.00468-10

Lindwasser, O.W., Chaudhuri, R., Bonifacino, J.S., 2007. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. Curr. Mol. Med. 7, 171–184. doi:10.2174/156652407780059177

Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Sapiro, G., Subramaniam, S., 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. Nature 455, 109–113. doi:10.1038/nature07159

Liu, S.-L., Duh, F.-M., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2003. Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. J. Virol. 77, 2850–8. doi:10.1128/JVI.77.5.2850

Liu, S.-L., Miller, a D., 2007. Oncogenic transformation by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. Oncogene 26, 789–801. doi:10.1038/sj.onc.1209850

Liu, S.-L., Miller, A.D., 2005. Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. J. Virol. doi:10.1128/JVI.79.2.927-933.2005

Liu, S.L., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2003. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. J Virol 77, 7924–7935. doi:10.1128/JVI.77.14.7924-7935.2003

Lo, W.-L., Felix, N.J., Walters, J.J., Rohrs, H., Gross, M.L., Allen, P.M., 2009. An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4+ T cells. Nat. Immunol. 10, 1155–1161. doi:10.1038/ni.1796

Lopez, L.A., Yang, S.J., Hauser, H., Exline, C.M., Haworth, K.G., Oldenburg, J., Cannon, P.M., 2010. Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal. J. Virol. 84, 7243–55. doi:10.1128/JVI.02636-09

Lorincz, M.C., Schubeler, D., Goeke, S.C., Walters, M., Groudine, M., Martin, D.I.K., 2000. Dynamic Analysis of Proviral Induction and De Novo Methylation: Implications for a Histone Deacetylase-Independent, Methylation Density-Dependent Mechanism of Transcriptional Repression. Mol. Cell. Biol. 20, 842–850. doi:10.1128/MCB.20.3.842-850.2000

Löwer, J., Wondrak, E.M., Kurth, R., 1987. Genome analysis and reverse transcriptase activity of human teratocarcinoma-derived retroviruses. J. Gen. Virol. 68.

Löwer, R., 1999. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: Facts and fantasies. Trends Microbiol. doi:10.1016/S0966-842X(99)01565-6

Löwer, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Müller-Lantzsch, N., Löwer, J., Kurth, R., 1993. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 4480–4.

Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R., 1996. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 5177–5184. doi:10.1073/pnas.93.11.5177

Löwer, R., Tönjes, R.R., Korbmacher, C., Kurth, R., Löwer, J., 1995. Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. J. Virol. 69, 141–9.

Macfarlane, C.M., Badge, R.M., 2015. Genome-wide amplification of proviral sequences reveals new polymorphic HERV-K(HML-2) proviruses in humans and chimpanzees that are absent from genome assemblies. Retrovirology 12, 35. doi:10.1186/s12977-015-0162-8

Madani, N., Kabat, D., 1998. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. J. Virol. 72, 10251–10255.

Maeda, N., Fan, H., 2008. Signal transduction pathways utilized by enzootic nasal tumor virus (ENTV-1) envelope protein in transformation of rat epithelial cells resemble those used by jaagsiekte sheep retrovirus. Virus Genes 36, 147–155. doi:10.1007/s11262-007-0193-x

Maeda, N., Fu, W., Ortin, A., de Las Heras, M., Fan, H., 2005. Roles of the Ras-MEK-mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. J. Virol. 79, 4440–50. doi:10.1128/JVI.79.7.4440-4450.2005

Maeda, N., Inoshima, Y., Fruman, D.A., Brachmann, S.M., Fan, H., 2003. Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. J Virol 77, 9951–9959. doi:10.1128/JVI.77.18.9951-9959.2003

Maeda, N., Palmarini, M., Murgia, C., Fan, H., 2001. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4449–54. doi:10.1073/pnas.071547598

Mager, D.L., Stoye, J.P., 2015. Mammalian Endogenous Retroviruses. Microbiol. Spectr. 3, MDNA3–0009–2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014

Magin-lachmann, C., Hahn, S., Strobel, H., Held, U., Lo, J., 2001. Rec (Formerly Corf) Function Requires Interaction with a Complex , Folded RNA Structure within Its Responsive Element rather than Binding to a Discrete Specific Binding Site 75, 10359–10371. doi:10.1128/JVI.75.21.10359

Magin, C., Löwer, R., Löwer, J., 1999. cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. J. Virol. 73, 9496–507.

Magiorkinis, G., Belshaw, R., Katzourakis, A., 2013. "There and back again": revisiting the pathophysiological roles of human endogenous retroviruses in the post-genomic era. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 368, 20120504–20120504. doi:10.1098/rstb.2012.0504

Magiorkinis, G., Gifford, R.J., Katzourakis, A., De Ranter, J., Belshaw, R., 2012. Env-less endogenous retroviruses are genomic superspreaders. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 7385–7390. doi:10.1073/pnas.1200913109

Mahauad-Fernandez, W.D., Borcherding, N.C., Zhang, W., Okeoma, C.M., 2015. Bone marrow stromal antigen 2 (BST-2) DNA is demethylated in breast tumors and breast cancer cells. PLoS

One 10, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0123931
Mahauad-Fernandez, W.D., Okeoma, C.M., 2016. The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. Immunity, Inflamm. Dis. 4, 4–23. doi:10.1002/iid3.92
Maik-Rachline, G., Seger, R., 2016. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. Drug Resist. Updat. 25, 1–12. doi:10.1016/j.drup.2015.12.001
Malassiné, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D., Heidmann, T., 2007. Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. Placenta 28, 185–191. doi:10.1016/j.placenta.2006.03.001
Malassiné, A., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Gerbaud, P., Cheynet, V., Oriol, G., Mallet, F., Evain-Brion, D., 2005. Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. Placenta 26, 556–562. doi:10.1016/j.placenta.2004.09.002
Maldonado, J.O., Martin, J.L., Mueller, J.D., Zhang, W., Mansky, L.M., 2014. New insights into retroviral Gag-Gag and Gag-membrane interactions. Front. Microbiol. doi:10.3389/fmicb.2014.00302
Malfavon-Borja, R., Feschotte, C., 2015. Fighting fire with fire: endogenous retrovirus envelopes as restriction factors. J. Virol. 89, 4047–50. doi:10.1128/JVI.03653-14
Malim, M.H., 2009. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 675–687. doi:10.1098/rstb.2008.0185
Malim, M.H., Emerman, M., 2008. HIV-1 Accessory Proteins-Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. Cell Host Microbe. doi:10.1016/j.chom.2008.04.008
Mameli, G., Cossu, D., Cocco, E., Frau, J., Marrosu, M.G., Niegowska, M., Sechi, L.A., 2015. Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. J. Neuroimmunol. 280, 66–68. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.03.003
Mangeat, B., Cavagliotti, L., Lehmann, M., Gers-Huber, G., Kaur, I., Thomas, Y., Kaiser, L., Piguet, V., 2012. Influenza virus partially counteracts restriction imposed by tetherin/BST-2. J. Biol. Chem. 287, 22015–22029. doi:10.1074/jbc.M111.319996
Mangeat, B., Gers-Huber, G., Lehmann, M., Zufferey, M., Luban, J., Piguet, V., 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000574
Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., Trono, D., 2004. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. Nature 424, 99–103. doi:10.1542/peds.114.2.S1.552
Mangeney, M., De Parseval, N., Thomas, G., Heidmann, T., 2001. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. J. Gen. Virol. 82, 2515–2518.
Mangeney, M., Heidmann, T., 1998. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 14920–14925. doi:10.1073/pnas.95.25.14920
Mangeney, M., Pothlichet, J., Renard, M., Ducos, B., Heidmann, T., 2005. Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. Cancer Res. 65, 2588–2591. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4231
Mangeney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Heidmann, T., 2007. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 20534–20539. doi:10.1073/pnas.0707873105
Manghera, M., Douville, R.N., 2013. Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors? Retrovirology 10, 16. doi:10.1186/1742-4690-10-16
Mansouri, M., Viswanathan, K., Douglas, J.L., Hines, J., Gustin, J., Moses, A. V, Früh, K., 2009. Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. J. Virol. 83, 9672–81. doi:10.1128/JVI.00597-09
Marchi, E., Kanapin, A., Magiorkinis, G., Belshaw, R., 2014. Unfixed endogenous retroviral insertions in the human population. J. Virol. 88, 9529–37. doi:10.1128/JVI.00919-14
Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K.,

Benarous, R., 1998. A Novel Human WD Protein, h-βTrCP, that Interacts with HIV-1 Vpu Connects CD4 to the ER Degradation Pathway through an F-Box Motif. Mol. Cell 1, 565–574. doi:10.1016/S1097-2765(00)80056-8

Marjuki, H., Alam, M.I., Ehrhardt, C., Wagner, R., Planz, O., Klenk, H.D., Ludwig, S., Pleschka, S., 2006. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Cα-mediated activation of ERK signaling. J. Biol. Chem. 281, 16707–16715. doi:10.1074/jbc.M510233200

Maudet, C., Bertrand, M., Le Rouzic, E., Lahouassa, H., Ayinde, D., Nisole, S., Goujon, C., Cimarelli, A., Margottin-Goguet, F., Transy, C., 2011. Molecular insight into how HIV-1 Vpr protein impairs cell growth through two genetically distinct pathways. J. Biol. Chem. 286, 23742–23752. doi:10.1074/jbc.M111.220780

Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Müller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K.D., Meese, E., 2004. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. Virology 322, 190–198. doi:10.1016/j.virol.2004.01.023

McClure, M.O., Sommerfelt, M.A., Marsh, M., Weiss, R.A., 1990. The pH independence of mammalian retrovirus infection. J. Gen. Virol. 71, 767–773. doi:10.1099/0022-1317-71-4-767

McCormick, A.L., Brown, R.H., Cudkowicz, M.E., Al-Chalabi, A., Garson, J.A., 2008. Quantification of reverse transcriptase in ALS and elimination of a novel retroviral candidate. Neurology 70, 278–283. doi:10.1212/01.wnl.0000297552.13219.b4

McGee-Estrada, K., Fan, H., 2007. Comparison of LTR enhancer elements in sheep betaretroviruses: Insights into the basis for tissue-specific expression. Virus Genes 35, 303–312. doi:10.1007/s11262-007-0079-y

McGee-Estrada, K., Palmarini, M., Fan, H., 2002. HNF-3beta Is a Critical Factor for the Expression of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus Long Terminal Repeat in Type II Pneumocytes but Not in Clara Cells. Virology 292, 87–97. doi:10.1006/viro.2001.1247

Mcgee-Estrada, K., Palmarini, M., Hallwirth, C., Fan, H., 2005. A Moloney murine leukemia virus driven by the jaagsiekte sheep retrovirus enhancers shows enhanced specificity for infectivity in lung epithelial cells. Virus Genes 31, 257–263. doi:10.1007/s11262-005-3239-y

McNatt, M.W., Zang, T., Bieniasz, P.D., 2013. Vpu Binds Directly to Tetherin and Displaces It from Nascent Virions. PLoS Pathog. 9, 40–44. doi:10.1371/journal.ppat.1003299

McNatt, M.W., Zang, T., Hatziioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I. Ben, Johnson, W.E., Neil, S.J.D., Bieniasz, P.D., 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000300

Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., L??hrmann, R., Tuschl, T., 2005. Identification of novel argonaute-associated proteins. Curr. Biol. 15, 2149–2155. doi:10.1016/j.cub.2005.10.048

Mertz, J. a, Simper, M.S., Lozano, M.M., Payne, S.M., Dudley, J.P., 2005. Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. J. Virol. 79, 14737–14747. doi:10.1128/JVI.79.23.14737-14747.2005

Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M., Li, H., Racimo, F., Mallick, S., Schraiber, J.G., Jay, F., Prüfer, K., de Filippo, C., Sudmant, P.H., Alkan, C., Fu, Q., Do, R., Rohland, N., Tandon, A., Siebauer, M., Green, R.E., Bryc, K., Briggs, A.W., Stenzel, U., Dabney, J., Shendure, J., Kitzman, J., Hammer, M.F., Shunkov, M. V, Derevianko, A.P., Patterson, N., Andrés, A.M., Eichler, E.E., Slatkin, M., Reich, D., Kelso, J., Pääbo, S., Filippo, C. De, Sudmant, P.H., Alkan, C., Fu, Q., Do, R., Rohland, N., Tandon, A., Siebauer, M., Richard, E., Bryc, K., Briggs, A.W., Stenzel, U., Dabney, J., Kitzman, J., Hammer, M.F., Shunkov, M. V, Derevianko, A.P., Patterson, N., Eichler, E.E., Slatkin, M., Reich, D., Kelso, J., 2012. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. Science 338, 222–6. doi:10.1126/science.1224344

Mi, S., Lee, X., Li, X.-P., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.-Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C., McCoy, J.M., 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403, 785–789. doi:10.1038/35001608

Michaud, E.J., Van Vugt, M.J., Bultman, S.J., Sweet, H.O., Davisson, M.T., Woychik, R.P., 1994. Differential expression of a new dominant agouti allele (Aiapy) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. Genes Dev. 8, 1463–1472. doi:10.1101/gad.8.12.1463

Miller, A.D., 2003. Identification of Hyal2 as the cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus and ovine nasal adenocarcinoma virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 275, 179–99.
Miller, A.D., Bonham, L., Alfano, J., Kiem, H.P., Reynolds, T., Wolgamot, G., 1996. A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials. J. Virol. 70, 1804–9.
Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., Bushman, F.D., 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. PLoS Biol. 2. doi:10.1371/journal.pbio.0020234
Miyagi, E., Andrew, A.J., Kao, S., Strebel, K., 2009. Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 2868–2873. doi:10.1073/pnas.0813223106
Miyagi, E., Brown, C.R., Opi, S., Khan, M., Goila-Gaur, R., Kao, S., Walker, R.C., Hirsch, V., Strebel, K., 2010. Stably expressed APOBEC3F has negligible antiviral activity. J. Virol. 84, 11067–75. doi:10.1128/JVI.01249-10
Miyakawa, K., Matsunaga, S., Watashi, K., Sugiyama, M., Kimura, H., Yamamoto, N., Mizokami, M., Wakita, T., Ryo, A., 2015. Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy. Oncotarget 6, 21840–52. doi:10.18632/oncotarget.4808
Miyakawa, K., Ryo, A., Murakami, T., Ohba, K., Yamaoka, S., Fukuda, M., Guatelli, J., Yamamoto, N., 2009. BCA2/rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. PLoS Pathog. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000700
Monde, K., Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., Ono, a., 2012. Human Endogenous Retrovirus K Gag Coassembles with HIV-1 Gag and Reduces the Release Efficiency and Infectivity of HIV-1. J. Virol. 86, 11194–11208. doi:10.1128/JVI.00301-12
Monot, M., Erny, A., Gineys, B., Desloire, S., Dolmazon, C., Aublin-Gex, A., Lotteau, V., Archer, F., Leroux, C., 2015. Early Steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Mediated Cell Transformation Involve the Interaction between Env and the RALBP1 Cellular Protein. J. Virol. 89, 8462–73. doi:10.1128/JVI.00590-15
Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F.A., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E., Westaway, D., 1999. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel1. J. Mol. Biol. 292, 797–817. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.3108
Moreau-Gachelin, F., 2008. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. Retrovirology 5, 99. doi:10.1186/1742-4690-5-99
Morozov, V. a., Morozov, A. V., Semaan, M., Denner, J., 2012. Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1. Retrovirology 9, 67. doi:10.1186/1742-4690-9-67
Morozov, V.A., Dao Thi, V.L., Denner, J., 2013. The Transmembrane Protein of the Human Endogenous Retrovirus - K (HERV-K) Modulates Cytokine Release and Gene Expression. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0070399
Morrison, J.H., Guevara, R.B., Marcano, A.C., Saenz, D.T., Fadel, H.J., Rogstad, D.K., Poeschla, E.M., 2014. Feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins antagonize tetherin through a distinctive mechanism that requires virion incorporation. J. Virol. 88, 3255–72. doi:10.1128/JVI.03814-13
Mothes, W., Boerger, a L., Narayan, S., Cunningham, J.M., Young, J. a, 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. Cell 103, 679–689. doi:10.1016/S0092-8674(00)00170-7
Moyes, D., Griffiths, D.J., Venables, P.J., 2007. Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease. Trends Genet. 23, 326–333. doi:10.1016/j.tig.2007.05.004
Mühle, M., Kroniger, T., Hoffmann, K., Denner, J., 2016. The immunosuppressive domain of the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1 binds to human monocytes and B cells. Immunol. Res. 64, 721–729. doi:10.1007/s12026-015-8776-4

Muir, A., Lever, A.M.L., Moffett, A., 2006. Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. J. Gen. Virol. 87, 2067–2071. doi:10.1099/vir.0.81412-0
Müllner, M., Salmons, B., Günzburg, W.H., Indik, S., 2008. Identification of the Rem-responsive element of mouse mammary tumor virus. Nucleic Acids Res. 36, 6284–6294. doi:10.1093/nar/gkn608
Mura, M., Murcia, P., Caporale, M., Spencer, T.E., Nagashima, K., Rein, A., Palmarini, M., 2004. Late viral interference induced by transdominant Gag of an endogenous retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 11117–22. doi:10.1073/pnas.0402877101
Murakami, T., 2008. Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. Microbiol. Immunol. 52, 287–295. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00008.x
Murcia, P.R., Arnaud, F., Palmarini, M., 2007. The transdominant endogenous retrovirus enJS56A1 associates with and blocks intracellular trafficking of Jaagsiekte sheep retrovirus Gag. J. Virol. 81, 1762–72. doi:10.1128/JVI.01859-06
Muriaux, D., Darlix, J.-L., 2010. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. RNA Biol. 7, 744–753. doi:10.4161/rna.7.6.14065
Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., Rein, A., 2001. RNA is a structural element in retrovirus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 5246–51. doi:10.1073/pnas.091000398
Murphy, L., Varela, M., Desloire, S., Ftaich, N., Murgia, C., Golder, M., Neil, S., Spencer, T.E., Wootton, S.K., Lavillette, D., Terzian, C., Palmarini, M., Arnaud, F., 2015. The sheep tetherin paralog oBST2B blocks envelope glycoprotein incorporation into nascent retroviral virions. J. Virol. 89, 535–44. doi:10.1128/JVI.02751-14
Musinova, Y.R., Sheval, E. V, Dib, C., Germini, D., Vassetzky, Y.S., 2015. Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. Cell. Mol. Life Sci. doi:10.1007/s00018-015-2077-x
Muster, T., Waltenberger, A., Grassauer, A., Hirschl, S., Caucig, P., Romirer, I., F??dinger, D., Seppele, H., Schanab, O., Magin-Lachmann, C., L??wer, R., Jansen, B., Pehamberger, H., Wolff, K., 2003. An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells. Cancer Res. 63, 8735–8741.
Neil, S.J.D., Eastman, S.W., Jouvenet, N., Bieniasz, P.D., 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. PLoS Pathog. 2, 354–367. doi:10.1371/journal.ppat.0020039
Neil, S.J.D., Sandrin, V., Sundquist, W.I., Bieniasz, P.D., 2007. An Interferon-alpha-Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein. Cell Host Microbe 2, 193–203. doi:10.1016/j.chom.2007.08.001
Neil, S.J.D., Zang, T., Bieniasz, P.D., 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature 451, 425–430. doi:10.1038/nature06553
Nelson, P., Rylance, P., Roden, D., Trela, M., Tugnet, N., 2014. Viruses as potential pathogenic agents in systemic lupus erythematosus. Lupus 23, 596–605. doi:10.1177/0961203314531637
Nethe, M., Berkhout, B., van der Kuyl, A.C., 2005. Retroviral superinfection resistance. Retrovirology 2, 52. doi:10.1186/1742-4690-2-52
Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., Thiery, J.P., 2016. Emt: 2016. Cell 166, 21–45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028
Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J.P., Yap, M.W., 2004. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 13324–8. doi:10.1073/pnas.0404640101
Nitta, T., Hofacre, A., Hull, S., Fan, H., 2009. Identification and mutational analysis of a Rej response element in Jaagsiekte sheep retrovirus RNA. J. Virol. 83, 12499–12511. doi:10.1128/JVI.01754-08
Oh, S., Shin, S., Janknecht, R., 2012. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer 1826, 1–12. doi:10.1016/j.bbcan.2012.02.002
Ohtomo, T., Sugamata, Y., Ozaki, Y., Ono, K., Yoshimura, Y., Kawai, S., Koishihara, Y., Ozaki, S., Kosaka, M., Hirano, T., Tsuchiya, M., 1999. Molecular Cloning and Characterization of a Surface Antigen Preferentially Overexpressed on Multiple Myeloma Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 583–591. doi:10.1006/bbrc.1999.0683
Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are

essential for de novo methylation and mammalian development. Cell 99, 247–257. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6
Oliff, a I., Hager, G.L., Chang, E.H., Scolnick, E.M., Chan, H.W., Lowy, D.R., 1980. Transfection of molecularly cloned Friend murine leukemia virus DNA yields a highly leukemogenic helper-independent type C virus. J. Virol. 33, 475–86.
Oliveira, N.M., Satija, H., Kouwenhoven, I.A., Eiden, M. V, 2007. Changes in viral protein function that accompany retroviral endogenization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 17506–17511. doi:10.1073/pnas.0704313104
Ooi, Y.S., Dubé, M., Kielian, M., 2015. BST2/Tetherin inhibition of alphavirus exit. Viruses 7, 2147–2167. doi:10.3390/v7042147
Opstelten, D.J., Wallin, M., Garoff, H., 1998. Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex. J. Virol. 72, 6537–6545.
Oricchio, E., Sciamanna, I., Beraldi, R., Tolstonog, G. V, Schumann, G.G., Spadafora, C., 2007. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. Oncogene 26, 4226–4233. doi:10.1038/sj.onc.1210214
Ormsby, C.E., Sengupta, D., Tandon, R., Deeks, S.G., Martin, J.N., Jones, R.B., Ostrowski, M.A., Garrison, K.E., Vazquez-Perez, J.A., Reyes-Teran, G., Nixon, D.F., 2012. Human endogenous retrovirus expression is inversely associated with chronic immune activation in HIV-1 infection. PLoS One 7, e41021. doi:10.1371/journal.pone.0041021
Ortín, A., Cousens, C., Minguijón, E., Pascual, Z., Pérez de Villarreal, M., Sharp, J.M., De las Heras, M., 2003. Characterization of enzootic nasal tumour virus of goats: Complete sequence and tissue distribution. J. Gen. Virol. 84, 2245–2252. doi:10.1099/vir.0.19125-0
Oshima, M., Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Dryden, K., Yeager, M., Rein, A., 2004. Effects of blocking individual maturation cleavages in murine leukemia virus gag. J. Virol. 78, 1411–1420. doi:10.1128/JVI.78.3.1411-1420.2004
Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. Annu. Rev. Genet. 35, 501–38. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.091032
Ott, D.E., 2008. Cellular proteins detected in HIV-1. Rev. Med. Virol. doi:10.1002/rmv.570
Overbaugh, J., Miller, A.D., Eiden, M. V, 2001. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycophosphatidylinositol-anchored and secreted proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 371–89, table of contents. doi:10.1128/MMBR.65.3.371-389.2001
Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., Thoulouze, M.-I., 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. Nat. Med. 16, 83–89. doi:10.1038/nm.2065
Palmarini, M., Fan, H., 2001. Retrovirus-Induced Ovine Pulmonary Adenocarcinoma, an Animal Model for Lung Cancer. J. Natl. Cancer Inst. 93, 1603–1614. doi:10.1093/jnci/93.21.1603
Palmarini, M., Gray, C. a, Carpenter, K., Fan, H., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2001a. Expression of endogenous betaretroviruses in the ovine uterus: effects of neonatal age, estrous cycle, pregnancy, and progesterone. J. Virol. 75, 11319–11327. doi:10.1128/JVI.75.23.11319-11327.2001
Palmarini, M., Hallwirth, C., York, D., Murgia, C., de Oliveira, T., Spencer, T., Fan, H., 2000. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. J. Virol. 74, 8065–76. doi:10.1128/JVI.74.17.8065-8076.2000
Palmarini, M., Maeda, N., Murgia, C., De-Fraja, C., Hofacre, a, Fan, H., 2001b. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. J. Virol. 75, 11002–11009. doi:10.1128/JVI.75.22.11002-11009.2001
Palmarini, M., Sharp, J.M., de las Heras, M., Fan, H., 1999. Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. J. Virol. 73, 6964–6972.
Pan, X.-B., Han, J.-C., Cong, X., Wei, L., 2012. BST2/tetherin inhibits dengue virus release from human hepatoma cells. PLoS One 7, e51033. doi:10.1371/journal.pone.0051033
Pan, X.-B., Qu, X.-W., Jiang, D., Zhao, X.-L., Han, J.-C., Wei, L., 2013. BST2/Tetherin inhibits hepatitis C virus production in human hepatoma cells. Antiviral Res. 98, 54–60.

doi:10.1016/j.antiviral.2013.01.009
Pardieu, C., Vigan, R., Wilson, S.J., Calvi, A., Zang, T., Bieniasz, P., Kellam, P., Towers, G.J., Neil, S.J.D., 2010. The RING-CH ligase K5 antagonizes restriction of KSHV and HIV-1 particle release by mediating ubiquitin-dependent endosomal degradation of tetherin. PLoS Pathog. 6, e1000843. doi:10.1371/journal.ppat.1000843
Pavlícek, A., Paces, J., Elleder, D., Pavlíc, A., Pac, J., Elleder, D., 2002. Processed Pseudogenes of Human Endogenous Retroviruses Generated by LINEs : Their Integration , Stability , and Distribution Processed Pseudogenes of Human Endogenous Retroviruses Generated by LINEs : Their Integration , Stability , and Distribution 391–399. doi:10.1101/gr.216902
Pellecchia, A., Pescucci, C., De Lorenzo, E., Luceri, C., Passaro, N., Sica, M., Notaro, R., De Angioletti, M., 2012. Overexpression of ETV4 is oncogenic in prostate cells through promotion of both cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition. Oncogenesis 1, e20. doi:10.1038/oncsis.2012.20
Penciolelli, J.F., Wendling, F., Robert-Lezenes, J., Barque, J.P., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., 1987. Genetic analysis of myeloproliferative leukemia virus, a novel acute leukemogenic replication-defective retrovirus. J. Virol. 61, 579–83.
Perez-Caballero, D., Soll, S.J., Bieniasz, P.D., 2008. Evidence for restriction of ancient primate gammaretroviruses by APOBEC3 but not TRIM5α proteins. PLoS Pathog. 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000181
Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., Bieniasz, P.D., 2009. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. Cell 139, 499–511. doi:10.1016/j.cell.2009.08.039
Perk, J., Iavarone, A., Benezra, R., 2005. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. Nat. Rev. Cancer 5, 603–614. doi:10.1038/nrc1712
Perl, A., Fernandez, D., 2010. Endogenous retroviral pathogenesis in lupus. Curr. Opin. … 22, 483–92. doi:10.1097/BOR.0b013e32833c6297
Perro, M., Tsang, J., Xue, S., Escors, D., Cesco-Gaspere, M., Pospori, C., Gao, L., Hart, D., Collins, M., Stauss, H., Morris, E.C., 2010. Generation of multi-functional antigen-specific human T-cells by lentiviral TCR gene transfer. Gene Ther. 17, 721–732. doi:10.1038/gt.2010.4
Perron, H., Dougier-Reynaud, H.-L., Lomparski, C., Popa, I., Firouzi, R., Bertrand, J.-B., Marusic, S., Portoukalian, J., Jouvin-Marche, E., Villiers, C.L., Touraine, J.-L., Marche, P.N., 2013. Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice. PLoS One 8, e80128. doi:10.1371/journal.pone.0080128
Perron, H., Garson, J.A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Mallet, F., Tuke, P.W., Voisset, C., Blond, J.L., Lalande, B., Seigneurin, J.M., Mandrand, B., 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 7583–8. doi:10.1073/pnas.94.14.7583
Perron, H., Germi, R., Bernard, C., Garcia-Montojo, M., Deluen, C., Farinelli, L., Faucard, R., Veas, F., Stefas, I., Fabriek, B.O., Van-Horssen, J., Van-der-Valk, P., Gerdil, C., Mancuso, R., Saresella, M., Clerici, M., Marcel, S., Creange, A., Cavaretta, R., Caputo, D., Arru, G., Morand, P., Lang, A.B., Sotgiu, S., Ruprecht, K., Rieckmann, P., Villoslada, P., Chofflon, M., Boucraut, J., Pelletier, J., Hartung, H.-P., 2012. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. Mult. Scler. J. 18, 1721–36. doi:10.1177/1352458512441381
Perron, H., Mekaoui, L., Bernard, C., Veas, F., Stefas, I., Leboyer, M., 2008. Endogenous Retrovirus Type W GAG and Envelope Protein Antigenemia in Serum of Schizophrenic Patients. Biol. Psychiatry 64, 1019–1023. doi:10.1016/j.biopsych.2008.06.028
Perron, M.J., Stremlau, M., Lee, M., Javanbakht, H., Song, B., Sodroski, J., 2007. The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid. J. Virol. 81, 2138–48. doi:10.1128/JVI.02318-06
Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Zuger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F.A., Uchil, P.D., Chatel, L., Bisiaux, A., Albert, M.L., Strambio-De-Castillia, C., Mothes, W., Pizzato, M., Grutter, M.G., Luban, J., 2011. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. Nature 472, 361–365. doi:10.1038/nature09976

Poeschla, E., Whitwam, T., Peretz, M., 2001. Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. J. Virol. 75, 9407–9414. doi:10.1128/JVI.75.19.9407-9414.2001
Pollheimer, J., Knöfler, M., 2005. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: A review. Placenta. doi:10.1016/j.placenta.2004.11.013
Postler, T.S., Desrosiers, R.C., 2012. The Cytoplasmic Domain of the HIV-1 Glycoprotein gp41 Induces NF-kappaB Activation through TGF-beta-Activated Kinase 1. Cell Host Microbe 11, 181–193.
Pothlichet, J., Heidmann, T., Mangeney, M., 2006a. A recombinant endogenous retrovirus amplified in a mouse neuroblastoma is involved in tumor growth in vivo. Int. J. Cancer 119, 815–822. doi:10.1002/ijc.21935
Pothlichet, J., Mangeney, M., Heidmann, T., 2006b. Mobility and integration sites of a murine C57BL/6 melanoma endogenous retrovirus involved in tumor progression in vivo. Int. J. Cancer 119, 1869–1877. doi:10.1002/ijc.22066
Pratilas, C.A., Taylor, B.S., Ye, Q., Viale, A., Sander, C., Solit, D.B., Rosen, N., 2009. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 4519–4524. doi:10.1073/pnas.0900780106
Prüfer, K., Racimo, F., Patterson, N., Jay, F., Sankararaman, S., Sawyer, S., Heinze, A., Renaud, G., Sudmant, P.H., de Filippo, C., Li, H., Mallick, S., Dannemann, M., Fu, Q., Kircher, M., Kuhlwilm, M., Lachmann, M., Meyer, M., Ongyerth, M., Siebauer, M., Theunert, C., Tandon, A., Moorjani, P., Pickrell, J., Mullikin, J.C., Vohr, S.H., Green, R.E., Hellmann, I., Johnson, P.L.F., Blanche, H., Cann, H., Kitzman, J.O., Shendure, J., Eichler, E.E., Lein, E.S., Bakken, T.E., Golovanova, L. V, Doronichev, V.B., Shunkov, M. V, Derevianko, A.P., Viola, B., Slatkin, M., Reich, D., Kelso, J., Pääbo, S., 2014. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. Nature 505, 43–9. doi:10.1038/nature12886
Pujol, F.M., Laketa, V., Schmidt, F., Mukenhirn, M., Müller, B., Boulant, S., Grimm, D., 2016. Mediated Exclusion from Virus Assembly Sites 90, 6709–6723. doi:10.1128/JVI.00504-16.Editor
Radoshitzky, S.R., Dong, L., Chi, X., Clester, J.C., Retterer, C., Spurgers, K., Kuhn, J.H., Sandwick, S., Ruthel, G., Kota, K., Boltz, D., Warren, T., Kranzusch, P.J., Whelan, S.P.J., Bavari, S., 2010. Infectious Lassa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin. J. Virol. 84, 10569–80. doi:10.1128/JVI.00103-10
Ragheb, J. a, Anderson, W.F., 1994. pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. J. Virol. 68, 3220–3231.
Rai, S.K., Duh, F.M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M.I., Miller, A.D., 2001. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 4443–8. doi:10.1073/pnas.071572898
Ratnam, S., Engler, P., Bozek, G., Mao, L., Podlutsky, A., Austad, S., Martin, T., Storb, U., 2014. Identification of Ssm1b, a novel modifier of DNA methylation, and its expression during mouse embryogenesis. Development 141, 2024–34. doi:10.1242/dev.105726
Rausch, J.W., le Grice, S.F.J., 2015. HIV Rev assembly on the Rev response element (RRE): A structural perspective. Viruses. doi:10.3390/v7062760
Refsland, E.W., Stenglein, M.D., Shindo, K., Albin, J.S., Brown, W.L., Harris, R.S., 2010. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: Implications for HIV-1 restriction. Nucleic Acids Res. 38, 4274–4284. doi:10.1093/nar/gkq174
Reiche, J., Pauli, G., Ellerbrok, H., 2010. Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. Melanoma Res. 20, 435–40. doi:10.1097/CMR.0b013e32833c1b5d
Reik, W., 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature 447, 425–432. doi:10.1038/nature05918
Rein, A., Schultz, A., 1984. Different recombinant murine leukemia viruses use different cell surface receptors. Virology 136, 144–152.

Reiss, D., Mager, D.L., 2007. Stochastic epigenetic silencing of retrotransposons: Does stability come with age? Gene. doi:10.1016/j.gene.2006.07.032
Renard, M., Varela, P.F., Letzelter, C., Duquerroy, S., Rey, F.A., Heidmann, T., 2005. Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. J. Mol. Biol. 352, 1029–1034. doi:10.1016/j.jmb.2005.07.058
Reuss, F.U., Coffin, J.M., 2000. The mouse mammary tumor virus transcription enhancers for hematopoietic progenitor and mammary gland cells share functional elements. J. Virol. 74, 8183–8187. doi:10.1128/JVI.74.17.8183-8187.2000
Rhyu, D.-W., Kang, Y.-J., Ock, M.-S., Eo, J.-W., Choi, Y.-H., Kim, W.-J., Leem, S.-H., Yi, J.-M., Kim, H.-S., Cha, H.-J., 2014. Expression of Human Endogenous Retrovirus env Genes in the Blood of Breast Cancer Patients. Int. J. Mol. Sci. 15, 9173–83. doi:10.3390/ijms15069173
Ribet, D., Dewannieux, M., Heidmann, T., 2004. An active murine transposon family pair: Retrotransposition of "master" MusD copies and ETn trans-mobilization. Genome Res. 14, 2261–2267. doi:10.1101/gr.2924904
Ribet, D., Harper, F., Dewannieux, M., Pierron, G., Heidmann, T., 2007. Murine MusD Retrotransposon: Structure and Molecular Evolution of an " Intracellularized " Retrovirus. J. Virol. 81, 1888–1898. doi:10.1128/JVI.02051-06
Ribet, D., Harper, F., Dupressoir, A., Dewannieux, M., Pierron, G., Heidmann, T., 2008. An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: Emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus. Genome Res. 18, 597–609. doi:10.1101/gr.073486.107
Richard, G., Puisieux, A., Caramel, J., 2014. Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development: implications for cancer cell plasticity. Cancer Cell Microenviron. 1–6. doi:10.14800/ccm.61
Robinson, L.R., Whelan, S.P.J., 2016. Infectious entry pathway mediated by the human endogenous retrovirus K envelope protein. J. Virol. 90, JVI.03136–15. doi:10.1128/JVI.03136-15
Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G., Brown, P.O., 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. EMBO J. 12, 2099–2108.
Rollason, R., Korolchuk, V., Hamilton, C., Jepson, M., Banting, G., 2009. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. J. Cell Biol. 184, 721–736. doi:10.1083/jcb.200804154
Rollason, R., Korolchuk, V., Hamilton, C., Schu, P., Banting, G., 2007. Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. J Cell Sci 120, 3850–8. doi:10.1242/jcs.003343
Rong, L., Zhang, J., Lu, J., Pan, Q., Lorgeoux, R.-P., Aloysius, C., Guo, F., Liu, S.-L., Wainberg, M.A., Liang, C., 2009. The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu. J. Virol. 83, 7536–46. doi:10.1128/JVI.00620-09
Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., Santoni, F.A., Pizzato, M., 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. Nature 526, 212–7. doi:10.1038/nature15399
Rosenberg, N., Jolicoeur, P., 1997. Retroviral Pathogenesis. Retroviruses 475–585.
Ross, S.R., 2010. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. Viruses. doi:10.3390/v2092000
Ross, S.R., 2008. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 13, 299–307. doi:10.1007/s10911-008-9090-8
Ross, S.R., Dzuris, J.L., Golovkina, T. V., Clemmons, W.C., Van Den Hoogen, B., 1997. Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), a retrovirus that exploits the immune system: Genetics of susceptibility to MMTV infection. Medicina (B. Aires). 57, 34–42.
Ross, S.R., Schmidt, J.W., Katz, E., Cappelli, L., Hultine, S., Gimotty, P., Monroe, J.G., 2006. An immunoreceptor tyrosine activation motif in the mouse mammary tumor virus envelope protein plays a role in virus-induced mammary tumors. J. Virol. 80, 9000–9008. doi:10.1128/JVI.00788-06

Ross, S.R., Schofield, J.J., Farr, C.J., Bucan, M., 2002. Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 12386–90. doi:10.1073/pnas.192360099
Rotblat, B., Ehrlich, M., Haklai, R., Kloog, Y., 2008. The Ras Inhibitor Farnesylthiosalicylic Acid (Salirasib) Disrupts The Spatiotemporal Localization Of Active Ras: A Potential Treatment For Cancer. Methods Enzymol. 439, 467–489. doi:10.1016/S0076-6879(07)00432-6
Rowe, H.M., Trono, D., 2011. Dynamic control of endogenous retroviruses during development. Virology. doi:10.1016/j.virol.2010.12.007
Rowell, J.F., Stanhope, P.E., Siliciano, R.F., 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. J. Immunol. 155, 473–88.
Roy, N., Pacini, G., Berlioz-Torrent, C., Janvier, K., 2014. Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. Front. Microbiol. doi:10.3389/fmicb.2014.00177
Ruda, V.M., Akopov, S.B., Trubetskoy, D.O., Manuylov, N.L., Vetchinova, A.S., Zavalova, L.L., Nikolaev, L.G., Sverdlov, E.D., 2004. Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K(HML-2) LTR. Virus Res. 104, 11–16. doi:10.1016/j.virusres.2004.02.036
Ruggieri, A., Maldener, E., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Meese, E., Fackler, O.T., Mayer, J., 2009. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) encodes a stable signal peptide with biological properties distinct from Rec. Retrovirology 6, 17. doi:10.1186/1742-4690-6-17
Salzwedel, K., Berger, E.A., 2000. Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 12794–12799. doi:10.1073/pnas.230438497
Sandrin, V., Muriaux, D., Darlix, J.-L., Cosset, F.-L., 2004. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. J. Virol. 78, 7153–7164. doi:10.1128/JVI.78.13.7153-7164.2004
Santiago-Raber, M.L., Baudino, L., Izui, S., 2009. Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. J. Autoimmun. 33, 231–238. doi:10.1016/j.jaut.2009.10.001
Sanz-Ramos, M., Stoye, J.P., 2013. Capsid-binding retrovirus restriction factors: Discovery, restriction specificity and implications for the development of novel therapeutics. J. Gen. Virol. doi:10.1099/vir.0.058180-0
Sarojini, S., Theofanis, T., Reiss, C.S., 2011. Interferon-induced tetherin restricts vesicular stomatitis virus release in neurons. DNA Cell Biol. 30, 965–74. doi:10.1089/dna.2011.1384
Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W.N., M??nch, J., Kim, K.A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B.F., Takehisa, J., Ogando, Y., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Ayouba, A., Peeters, M., Learn, G.H., Shaw, G., Sharp, P.M., Bieniasz, P., Hahn, B.H., Hatziioannou, T., Kirchhoff, F., 2009. Tetherin-Driven Adaptation of Vpu and Nef Function and the Evolution of Pandemic and Nonpandemic HIV-1 Strains. Cell Host Microbe 6, 409–421. doi:10.1016/j.chom.2009.10.004
Sauter, D., Specht, A., Kirchhoff, F., 2010. Tetherin: Holding on and letting go. Cell. doi:10.1016/j.cell.2010.04.022
Sauter, D., Vogl, M., Kirchhoff, F., 2011. Ancient origin of a deletion in human BST2/Tetherin that confers protection against viral zoonoses. Hum. Mutat. 32, 1243–1245. doi:10.1002/humu.21571
Sayah, D.M., Sokolskaja, E., Berthoux, L., Luban, J., 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. Nature 430, 569–573. doi:10.1038/nature02777
Sayeed, A., Luciani-Torres, G., Meng, Z., Bennington, J.L., Moore, D.H., Dairkee, S.H., 2013. Aberrant Regulation of the BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation and Apoptosis Evasion in High Grade Breast Cancer Cells. PLoS One 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0067191
Schanab, O., Humer, J., Gleiss, A., Mikula, M., Sturlan, S., Grunt, S., Okamoto, I., Muster, T., Pehamberger, H., Waltenberger, A., 2011. Expression of human endogenous retrovirus K is stimulated by ultraviolet radiation in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 24, 656–665. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00860.x
Schiavetti, F., Thonnard, J., Colau, D., Boon, T., Coulie, P.G., 2002. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. Cancer Res.

62, 5510–5516.
Schlecht-Louf, G., Mangeney, M., El-Garch, H., Lacombe, V., Poulet, H., Heidmann, T., 2014. A targeted mutation within the feline leukemia virus (FeLV) envelope protein immunosuppressive domain to improve a canarypox virus-vectored FeLV vaccine. J. Virol. 88, 992–1001. doi:10.1128/JVI.02234-13
Schlecht-Louf, G., Renard, M., Mangeney, M., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Bouallaga, I., Heidmann, T., 2010. Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 3782–3787. doi:10.1073/pnas.0913122107
Schmitt, K., Heyne, K., Roemer, K., Meese, E., Mayer, J., 2015. HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. Mob. DNA 6, 4. doi:10.1186/s13100-015-0035-7
Schmitt, K., Reichrath, J., Roesch, A., Meese, E., Mayer, J., 2013. Transcriptional profiling of human endogenous retrovirus group HERV-K(HML-2) loci in melanoma. Genome Biol. Evol. 5, 307–328. doi:10.1093/gbe/evt010
Schmitz-Winnenthal, F.H., Galindo-Escobedo, L. V., Rimoldi, D., Geng, W., Romero, P., Koch, M., Weitz, J., Krempien, R., Niethammer, A.G., Beckhove, P., Buchler, M.W., Z'graggen, K., 2007. Potential target antigens for immunotherapy in human pancreatic cancer. Cancer Lett. 252, 290–298. doi:10.1016/j.canlet.2007.01.003
Schmokel, J., Sauter, D., Schindler, M., Leendertz, F.H., Bailes, E., Dazza, M.-C., Saragosti, S., Bibollet-Ruche, F., Peeters, M., Hahn, B.H., Kirchhoff, F., 2011. The Presence of a vpu Gene and the Lack of Nef-Mediated Downmodulation of T Cell Receptor-CD3 Are Not Always Linked in Primate Lentiviruses. J. Virol. 85, 742–752. doi:10.1128/JVI.02087-10
Schoorlemmer, J., Pérez-Palacios, R., Climent, M., Guallar, D., Muniesa, P., 2014. Regulation of Mouse Retroelement MuERV-L/MERVL Expression by REX1 and Epigenetic Control of Stem Cell Potency. Front. Oncol. 4, 14. doi:10.3389/fonc.2014.00014
Schübeler, D., Lorincz, M.C., Cimbora, D.M., Telling, A., Feng, Y.Q., Bouhassira, E.E., Groudine, M., 2000. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. Mol. Cell. Biol. 20, 9103–12. doi:10.1128/MCB.20.24.9103-9112.2000
Schubert, H.L., Zhai, Q., Sandrin, V., Eckert, D.M., Garcia-Maya, M., Saul, L., Sundquist, W.I., Steiner, R.A., Hill, C.P., 2010. Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 17951–17956. doi:10.1073/pnas.1008206107
Schwartz, O., Maréchal, V., Gall, S. Le, Lemonnier, F., Heard, J.-M., 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV–1 Nef protein. Nat. Med. 2, 338–342. doi:10.1038/nm0396-338
Seifarth, W., Baust, C., Murr, a, Skladny, H., Krieg-Schneider, F., Blusch, J., Werner, T., Hehlmann, R., Leib-Mösch, C., 1998. Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. J. Virol. 72, 8384–8391.
Seifarth, W., Skladny, H., Krieg-schneider, F., Hehlmann, D., Leib-mo, C., 1995. Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences . Retrovirus-Like Particles Released from the Human Breast Cancer Cell Line T47-D Display Type B- and C-Related E. J. Virol. 69, 6408–6416.
Sen, A., Sherr, C.J., Todaro, G.J., 1978. Endogenous feline (RD-114) and baboon type C viruses have related specific RNA-binding proteins and genome binding sites. Virology 84, 99–107. doi:10.1016/0042-6822(78)90221-0
Serafino, A., Balestrieri, E., Pierimarchi, P., Matteucci, C., Moroni, G., Oricchio, E., Rasi, G., Mastino, A., Spadafora, C., Garaci, E., Vallebona, P.S., 2009. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. Exp. Cell Res. 315, 849–862. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.023
Serra-Moreno, R., Jia, B., Breed, M., Alvarez, X., Evans, D.T., 2011. Compensatory changes in the cytoplasmic tail of gp41 confer resistance to tetherin/BST-2 in a pathogenic Nef-deleted SIV. Cell Host Microbe 9, 46–57. doi:10.1016/j.chom.2010.12.005

Serra-Moreno, R., Zimmermann, K., Stern, L.J., Evans, D.T., 2013. Tetherin/BST-2 Antagonism by Nef Depends on a Direct Physical Interaction between Nef and Tetherin, and on Clathrin-mediated Endocytosis. PLoS Pathog. 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003487

Serra, C., Sotgiu, S., Mameli, G., Pugliatti, M., Rosati, G., Dolei, a, 2001. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. Neurol. Sci. 22, 171–3.

Seton-Rogers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., Brugge, J.S., 2004. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 1257–1262. doi:10.1073/pnas.0308090100

Sharp, P.M., Hahn, B.H., 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1. doi:10.1101/cshperspect.a006841

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., Malim, M.H., 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature 418, 646–650. doi:10.1038/nature00939

Shi, L., Zhang, Z., Yu, A.M., Wang, W., Wei, Z., Akhter, E., Maurer, K., Reis, P.C., Song, L., Petri, M., Sullivan, K.E., 2014. The SLE transcriptome exhibits evidence of chronic endotoxin exposure and has widespread dysregulation of non-coding and coding RNAs. PLoS One 9. doi:10.1371/journal.pone.0093846

Sicat, J., Sutkowski, N., Huber, B.T., 2005. Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 32, 1821–1831.

Siess, D.C., Kozak, S.L., Kabat, D., 1996. Exceptional fusogenicity of Chinese hamster ovary cells with murine retroviruses suggests roles for cellular factor(s) and receptor clusters in the membrane fusion process. J Virol 70, 3432–3439.

Simmons, G., Young, P., Hanger, J., Jones, K., Clarke, D., Mckee, J., Meers, J., 2012. Prevalence of koala retrovirus in geographically diverse populations in Australia. Aust. Vet. J. 90, 404–409. doi:10.1111/j.1751-0813.2012.00964.x

Simon, J.H., Gaddis, N.C., Fouchier, R. a, Malim, M.H., 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. Nat. Med. 4, 1397–1400. doi:10.1038/3987

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., Aravin, A. a, 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 246–258. doi:10.1038/nrm3089

Sloan, R.D., Wainberg, M.A., 2011. The role of unintegrated DNA in HIV infection. Retrovirology 8, 52. doi:10.1186/1742-4690-8-52

Smit, A.F.A., 1993. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. Nucleic Acids Res. 21, 1863–1872. doi:10.1101/gr.3694705

Sommerfelt, M.A., Weiss, R.A., 1990. Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells. Virology 176, 58–69. doi:10.1016/0042-6822(90)90230-O

Sonigo, P., Wain-Hobson, S., Bougueleret, L., Tiollais, P., Jacob, F., Brûlet, P., 1987. Nucleotide sequence and evolution of ETn elements. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 3768–71. doi:10.1073/pnas.84.11.3768

Sotgiu, S., Pugliatti, M., Sanna, A., Sotgiu, A., Castigli, P., Solinas, G., Dolei, A., Serra, C., Bonetti, B., Rosati, G., 2002. Multiple sclerosis complexity in selected populations: The challenge of Sardinia, insular Italy. Eur. J. Neurol. doi:10.1046/j.1468-1331.2002.00412.x

Souyri, M., Vigon, I., Penciolelli, J.F., Heard, J.M., Tambourin, P., Wendling, F., 1990. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. Cell 63, 1137–1147. doi:10.1016/0092-8674(90)90410-G

Spencer, T.E., Mura, M., Gray, C.A., Griebel, P.J., Palmarini, M., 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. J. Virol. 77, 749–753. doi:10.1128/JVI.77.1.749-753.2003

Stavrou, S., Nitta, T., Kotla, S., Ha, D., Nagashima, K., Rein, A.R., Fan, H., Ross, S.R., 2013. Murine leukemia virus glycosylated Gag blocks apolipoprotein B editing complex 3 and cytosolic sensor access to the reverse transcription complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 9078–83. doi:10.1073/pnas.1217399110

Steckbeck, J.D., Kuhlmann, A.S., Montelaro, R.C., 2014. Structural and functional comparisons of retroviral envelope protein C-terminal domains: Still much to learn. Viruses.

doi:10.3390/v6010284
Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S., Jentsch, T.J., 1991. Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. Nature 354, 304–308. doi:10.1038/354304a0
Stengel, S., Fiebig, U., Kurth, R., Denner, J., 2010. Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. Genes Chromosom. Cancer 49, 401–411. doi:10.1002/gcc.20751
Stetor, S.R., Rausch, J.W., Guo, M.J., Burnham, J.P., Boone, L.R., Waring, M.J., Le Grice, S.F.J., 1999. Characterization of (+) strand initiation and termination sequences located at the center of the equine infectious anemia virus genome. Biochemistry 38, 3656–3667. doi:10.1021/bi982764l
Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., Medzhitov, R., 2008. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. Cell 134, 587–598. doi:10.1016/j.cell.2008.06.032
Stewart, M., Warnock, M., Wheeler, A., Wilkie, N., Mullins, J., Onions, D., Neil, J., 1986. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. J. Virol. 58, 825–34.
Stocking, C., Kozak, C.A., 2008. Murine Endogenous retroviruses. Cell. Mol. Life Sci. 65, 3383–3398. doi:10.1007/s00018-008-8494-3
Stoye, J.P., 2012. Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. Nat. Rev. Microbiol. 10, 395–406. doi:10.1038/nrmicro2783
Stoye, J.P., 2001. Endogenous retroviruses: Still active after all these years? Curr. Biol. doi:10.1016/S0960-9822(01)00553-X
Stoye, J.P., Coffin, J.M., 1987. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. J. Virol. 61, 2659–69.
Stoye, J.P., Yap, M.W., 2008. Chance favors a prepared genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3177–3178. doi:10.1073/pnas.0800667105
Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. Nature 427, 848–853. doi:10.1038/nature02343
Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., Sodroski, J., 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 5514–9. doi:10.1073/pnas.0509996103
Strick, R., Ackermann, S., Langbein, M., Swiatek, J., Schubert, S.W., Hashemolhosseini, S., Koscheck, T., Fasching, P.A., Schild, R.L., Beckmann, M.W., Strissel, P.L., 2007. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-β. J. Mol. Med. 85, 23–38. doi:10.1007/s00109-006-0104-y
Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O., Benaroch, P., 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 12144–9. doi:10.1073/pnas.221256498
Subramanian, R.P., Wildschutte, J.H., Russo, C., Coffin, J.M., 2011. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. Retrovirology 8, 90. doi:10.1186/1742-4690-8-90
Sugimoto, J., Sugimoto, M., Bernstein, H., Jinno, Y., Schust, D., 2013. A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion. Sci. Rep. 3, 1462. doi:10.1038/srep01462
Suntsova, M., Garazha, A., Ivanova, A., Kaminsky, D., Zhavoronkov, A., Buzdin, A., 2015. Molecular functions of human endogenous retroviruses in health and disease. Cell. Mol. Life Sci. 72, 3653–3675. doi:10.1007/s00018-015-1947-6
Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D.A., Huber, B.T., 2001. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. Immunity 15, 579–589. doi:10.1016/S1074-7613(01)00210-2
Sutkowski, N., Palkama, T., Ciurli, C., Sekaly, R.P., Thorley-Lawson, D.A., Huber, B.T., 1996. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. J. Exp. Med. 184, 971–80. doi:10.1084/jem.184.3.971
Swanstrom, R., Wills, J.W., 1997. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins, in: Retroviruses. pp. 263–334.

Swiecki, M., Scheaffer, S.M., Allaire, M., Fremont, D.H., Colonna, M., Brett, T.J., 2011. Structural and biophysical analysis of BST-2/tetherin ectodomains reveals an evolutionary conserved design to inhibit virus release. J. Biol. Chem. 286, 2987–2997. doi:10.1074/jbc.M110.190538
Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., Lenschow, D.J., Colonna, M., 2012. Cutting edge: paradoxical roles of BST2/tetherin in promoting type I IFN response and viral infection. J. Immunol. 188, 2488–92. doi:10.4049/jimmunol.1103145
Szpakowski, S., Sun, X., Lage, J.M., Dyer, A., Rubinstein, J., Kowalski, D., Sasaki, C., Costa, J., Lizardi, P.M., 2009. Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. Gene 448, 151–167. doi:10.1016/j.gene.2009.08.006
Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., Shinkai, Y., 2008. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. EMBO J. 27, 2681–2690. doi:10.1038/emboj.2008.192
Tai, A.K., Luka, J., Ablashi, D., Huber, B.T., 2009. HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. J. Clin. Virol. 46, 47–48. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.019
Tailor, C.S., Lavillette, D., Marin, M., Kabat, D., 2003. Cell surface receptors for gammaretroviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 281, 29–106.
Takeuchi, J.S., Ren, F., Yoshikawa, R., Yamada, E., Nakano, Y., Kobayashi, T., Matsuda, K., Izumi, T., Misawa, N., Shintaku, Y., Wetzel, K.S., Collman, R.G., Tanaka, H., Hirsch, V.M., Koyanagi, Y., Sato, K., 2015. Coevolutionary dynamics between tribe Cercopithecini tetherins and their lentiviruses. Sci. Rep. 5, 16021. doi:10.1038/srep16021
Tarlinton, R., Meers, J., Young, P., 2008. Endogenous retroviruses: Biology and evolution of the endogenous koala retrovirus. Cell. Mol. Life Sci. doi:10.1007/s00018-008-8499-y
Tarlinton, R.E., Meers, J., Young, P.R., 2006. Retroviral invasion of the koala genome. Nature 442, 79–81. doi:10.1038/nature04841
Taylor, G.M., Gao, Y., Sanders, D.A., 2001. Fv-4: identification of the defect in Env and the mechanism of resistance to ecotropic murine leukemia virus. J. Virol. 75, 11244–8. doi:10.1128/JVI.75.22.11244-11248.2001
Taylor, J.K., Coleman, C.M., Postel, S., Sisk, J.M., Bernbaum, J.G., Venkataraman, T., Sundberg, E.J., Frieman, M.B., 2015. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF7a Inhibits Bone Marrow Stromal Antigen 2 Virion Tethering through a Novel Mechanism of Glycosylation Interference. J. Virol. 89, 11820–33. doi:10.1128/JVI.02274-15
Tedbury, P.R., Freed, E.O., 2015. The cytoplasmic tail of retroviral envelope glycoproteins. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. doi:10.1016/bs.pmbts.2014.10.009
Telesnitsky, A., Goff, S.P., 1997. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA, in: Retroviruses. pp. 121–160. doi:NBK19383 [bookaccession]
Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. 2, 569–579. doi:10.1038/nri855
Thomas, C.Y., Khiroya, R., Schwartz, R.S., Coffin, J.M., 1984. Role of recombinant ecotropic and polytropic viruses in the development of spontaneous thymic lymphomas in HRS/J mice. J Virol 50, 397–407.
Thomas, J.H., Schneider, S., 2011. Coevolution of retroelements and tandem zinc finger genes. Genome Res. 21, 1800–1812. doi:10.1101/gr.121749.111
Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Desbats, M.A., Leishman, C.C., Boccaccio, G.L., 2009. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. J. Cell Sci. 122, 563–73. doi:10.1242/jcs.038208
Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Loschi, M., Pasquini, J.M., Correale, J., Kindler, S., Boccaccio, G.L., 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. Mol. Biol. Cell 16, 405–20. doi:10.1091/mbc.E04-06-0516
Threadgill, D.S., Steagall, W.K., Flaherty, M.T., Fuller, F.J., Perry, S.T., Rushlow, K.E., Le Grice, S.F., Payne, S.L., 1993. Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant. J. Virol. 67, 2592–600.
Tokarev, A., Suarez, M., Kwan, W., Fitzpatrick, K., Singh, R., Guatelli, J., 2013. Stimulation of NF-κB activity by the HIV restriction factor BST2. J. Virol. 87, 2046–2057. doi:10.1128/JVI.02272-12
Tomlins, S.A., Laxman, B., Dhanasekaran, S.M., Helgeson, B.E., Cao, X., Morris, D.S., Menon, A.,

Jing, X., Cao, Q., Han, B., Yu, J., Wang, L., Montie, J.E., Rubin, M.A., Pienta, K.J., Roulston, D., Shah, R.B., Varambally, S., Mehra, R., Chinnaiyan, A.M., 2007. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. Nature 448, 595–599.

Trela, M., Nelson, P.N., Rylance, P.B., 2016. The role of molecular mimicry and other factors in the association of Human Endogenous Retroviruses and autoimmunity. APMIS 124, 88–104. doi:10.1111/apm.12487

Tristem, M., 2000. Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. J. Virol. 74, 3715–3730.

Turcanova, V.L., Bundgaard, B., Höllsberg, P., 2009. Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. J. Clin. Virol. 46, 15–19. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.015

Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M.I., Kidd, K.K., Lenz, J., 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. Curr. Biol. 11, 1531–1535. doi:10.1016/S0960-9822(01)00455-9

Unge, T., Solomin, L., Mellini, M., Derse, D., Felber, B.K., Pavlakis, G.N., 1991. The Rex regulatory protein of human T-cell lymphotropic virus type I binds specifically to its target site within the viral RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 7145–9.

Urnovitz, H.B., Murphy, W.H., 1996. Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. Clin. Microbiol. Rev. 9, 72–99.

Usami, Y., Wu, Y., Göttlinger, H.G., 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. Nature 526, 218–23. doi:10.1038/nature15400

Vagin, V. V, Sigova, A., Li, C., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. and antisense siRNAs that theoretically can be. Science (80-.). 313, 320–324.

Valsesia-Wittmann, S., Morling, F.J., Hatziioannou, T., Russell, S.J., Cosset, F.L., 1997. Receptor co-operation in retrovirus entry: Recruitment of an auxiliary entry mechanism after retargeted binding. EMBO J. 16, 1214–1223. doi:10.1093/emboj/16.6.1214

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., 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. doi:10.1016/j.chom.2008.03.001

van de Lagemaat, L.N., Medstrand, P., Mager, D.L., 2006. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns. Genome Biol. 7, R86. doi:10.1186/gb-2006-7-9-r86

van der Kuyl, a C., Dekker, J.T., Goudsmit, J., 1999. Discovery of a new endogenous type C retrovirus (FcEV) in cats: evidence for RD-114 being an FcEV(Gag-Pol)/baboon endogenous virus BaEV(Env) recombinant. J. Virol. 73, 7994–8002.

Vandegraaff, N., Devroe, E., Turlure, F., Silver, P.A., Engelman, A., 2006. Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication. Virology 346, 415–426. doi:10.1016/j.virol.2005.11.022

Vargiu, L., Rodriguez-Tomé, P., Sperber, G.O., Cadeddu, M., Grandi, N., Blikstad, V., Tramontano, E., Blomberg, J., 2016. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. Retrovirology 13, 7. doi:10.1186/s12977-015-0232-y

Varthakavi, V., Smith, R.M., Bour, S.P., Strebel, K., Spearman, P., 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 15154–9. doi:10.1073/pnas.2433165100

Venables, P.J., Brookes, S.M., Griffiths, D., Weiss, R. a, Boyd, M.T., 1995. Abundance of an endogenous retroviral envelope protein in placental trophoblasts suggests a biological function. Virology. doi:10.1006/viro.1995.1442

Venkatesh, S., Bieniasz, P.D., 2013. Mechanism of HIV-1 Virion Entrapment by Tetherin. PLoS Pathog. 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003483

Vigan, R., Neil, S.J.D., 2010. Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. J. Virol. 84, 12958–12970.

doi:10.1128/JVI.01699-10
Vigdorovich, V., Miller, a D., Strong, R.K., 2007. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. J. Virol. 81, 3124–9. doi:10.1128/JVI.02177-06
Virgen, C.A., Kratovac, Z., Bieniasz, P.D., Hatziioannou, T., 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3563–8. doi:10.1073/pnas.0709258105
Viswanathan, K., Smith, M.S., Malouli, D., Mansouri, M., Nelson, J.A., Fr??h, K., 2011. BST2/tetherin enhances entry of human cytomegalovirus. PLoS Pathog. 7. doi:10.1371/journal.ppat.1002332
Volkman, H.E., Stetson, D.B., 2014. The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. Nat. Immunol. 15, 415–22. doi:10.1038/ni.2872
Wainwright, D.A., Balyasnikova, I. V, Han, Y., Lesniak, M.S., 2011. The expression of BST2 in human and experimental mouse brain tumors. Exp. Mol. Pathol. 91, 440–446. doi:S0014-4800(11)00052-9 [pii]\r10.1016/j.yexmp.2011.04.012
Walsh, C.P., Chaillet, R., Bestor, T.H., 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. Nat. Genet. 20, 116–117. doi:10.1038/2413
Wang-Johanning, F., Frost, a R., Johanning, G.L., Khazaeli, M.B., LoBuglio, a F., Shaw, D.R., Strong, T. V, 2001. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. Clin. Cancer Res. 7, 1553–1560.
Wang-Johanning, F., Frost, A.R., Jian, B., Epp, L., Lu, D.W., Johanning, G.L., 2003. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. Oncogene 22, 1528–1535. doi:10.1038/sj.onc.1206241
Wang-Johanning, F., Li, M., Esteva, F.J., Hess, K.R., Yin, B., Rycaj, K., Plummer, J.B., Garza, J.G., Ambs, S., Johanning, G.L., 2013. Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer. Int. J. Cancer 134, 587–595. doi:10.1002/ijc.28389
Wang-Johanning, F., Liu, J., Rycaj, K., Huang, M., Tsai, K., Rosen, D.G., Chen, D.T., Lu, D.W., Barnhart, K.F., Johanning, G.L., 2007. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. Int. J. Cancer 120, 81–90. doi:10.1002/ijc.22256
Wang-Johanning, F., Radvanyi, L., Rycaj, K., Plummer, J.B., Yan, P., Sastry, K.J., Piyathilake, C.J., Hunt, K.K., Johanning, G.L., 2008. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. Cancer Res. 68, 5869–5877. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6838
Wang-Johanning, F., Rycaj, K., Plummer, J.B., Li, M., Yin, B., Frerich, K., Garza, J.G., Shen, J., Lin, K., Yan, P., Glynn, S.A., Dorsey, T.H., Hunt, K.K., Ambs, S., Johanning, G.L., 2012. Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-k envelope protein antibodies in targeting breast tumors. J. Natl. Cancer Inst. 104, 189–210. doi:10.1093/jnci/djr540
Wang, C.T., Zhang, Y., McDermott, J., Barklis, E., 1993. Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. J. Virol. 67, 7067–76.
Wang, E., Obeng-Adjei, N., Ying, Q., Meertens, L., Dragic, T., Davey, R.A., Ross, S.R., 2008. Mouse mammary tumor virus uses mouse but not human transferrin receptor 1 to reach a low pH compartment and infect cells. Virology 381, 230–240. doi:10.1016/j.virol.2008.08.013
Wang, W., Nie, J., Prochnow, C., Truong, C., Jia, Z., Wang, S., Chen, X.S., Wang, Y., 2013. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. Retrovirology 10, 14. doi:10.1186/1742-4690-10-14
Wang, X., Han, Y., Dang, Y., Fu, W., Zhou, T., Ptak, R.G., Zheng, Y.H., 2010. Moloney leukemia virus 10 (MOV10) protein inhibits retrovirus replication. J. Biol. Chem. 285, 14346–14355. doi:10.1074/jbc.M110.109314
Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R., Malim, M.H., 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. J Exp Med 174, 1477–1482.
Weinelt, J., Neil, S.J.D., 2014. Differential sensitivities of tetherin isoforms to counteraction by primate lentiviruses. J. Virol. 88, 5845–58. doi:10.1128/JVI.03818-13
Weiss, R.A., 2016. Human endogenous retroviruses: friend or foe? Apmis 124, 4–10.

doi:10.1111/apm.12476
Weiss, R.A., 2006. The discovery of endogenous retroviruses. Retrovirology 3, 67. doi:10.1186/1742-4690-3-67
White, J.M., 1992. Membrane fusion. [Review]. Science (80-.). 258, 917–924. doi:10.1016/S0092-8674(03)00112-0
Wildschutte, J.H., Ram, D., Subramanian, R., Stevens, V.L., Coffin, J.M., 2014. The distribution of insertionally polymorphic endogenous retroviruses in breast cancer patients and cancer-free controls. Retrovirology 11, 62. doi:10.1186/s12977-014-0062-3
Wildschutte, J.H., Williams, Z.H., Montesion, M., Subramanian, R.P., Kidd, J.M., Coffin, J.M., 2016. Discovery of unfixed endogenous retrovirus insertions in diverse human populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 201602336. doi:10.1073/pnas.1602336113
Wilson, S.J., Webb, B.L.J., Ylinen, L.M.J., Verschoor, E., Heeney, J.L., Towers, G.J., 2008. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3557–3562. doi:10.1073/pnas.0709003105
Wolf, D., Goff, S.P., 2009. Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. Nature 458, 1201–1204. doi:10.1038/nature07844
Wolgamot, G., Miller, A.D., 1999. Replication of Mus dunni endogenous retrovirus depends on promoter activation followed by enhancer multimerization. J. Virol. 73, 9803–9.
Wootton, S.K., Halbert, C.L., Miller, a D., 2006. Envelope proteins of Jaagsiekte sheep retrovirus and enzootic nasal tumor virus induce similar bronchioalveolar tumors in lungs of mice. J. Virol. 80, 9322–9325. doi:10.1128/JVI.00865-06
Wootton, S.K., Halbert, C.L., Miller, A.D., 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. Nature 434, 904–907. doi:10.1038/nature03492
Wu, T., Yan, Y., Kozak, C. a., 2005. Rmcf2, a xenotropic provirus in the Asian mouse species Mus castaneus, blocks infection by polytropic mouse gammaretroviruses. J. Virol. 79, 9677–84. doi:10.1128/JVI.79.15.9677-9684.2005
Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S.S.M., 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science (80-.). 300, 1749–51. doi:10.1126/science.1083413
Xian, W., Pappas, L., Pandya, D., Selfors, L.M., Derksen, P.W., De Bruin, M., Gray, N.S., Jonkers, J., Rosen, J.M., Brugge, J.S., 2009. Fibroblast growth factor receptor 1-Transformed mammary epithelial cells are dependent on RSK activity for growth and survival. Cancer Res. 69, 2244–2251. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3398
Yan, Q., Huang, J., Fan, T., Zhu, H., Muegge, K., 2003. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. EMBO J. 22, 5154–5162. doi:10.1093/emboj/cdg493
Yang, H., Wang, J., Jia, X., McNatt, M.W., Zang, T., Pan, B., Meng, W., Wang, H.-W., Bieniasz, P.D., Xiong, Y., 2010. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 18428–32. doi:10.1073/pnas.1011485107
Yang, J., Bogerd, H.P., Peng, S., Wiegand, H., Truant, R., Cullen, B.R., 1999. An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 13404–13408. doi:10.1073/pnas.96.23.13404
Yin, X., Guo, M., Gu, Q., Wu, X., Wei, P., Wang, X., 2014. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. Virol J 11, 151. doi:10.1186/1743-422X-11-151
Yin, X., Hu, Z., Gu, Q., Wu, X., Zheng, Y.-H., Wei, P., Wang, X., 2014. Equine tetherin blocks retrovirus release and its activity is antagonized by equine infectious anemia virus envelope protein. J. Virol. 88, 1259–70. doi:10.1128/JVI.03148-13
Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H., 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet. doi:10.1016/S0168-9525(97)01181-5
Yondola, M.A., Fernandes, F., Belicha-Villanueva, A., Uccelini, M., Gao, Q., Carter, C., Palese, P., 2011. Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. J. Virol. 85, 2480–91. doi:10.1128/JVI.02188-10
Young, G.R., Eksmond, U., Salcedo, R., Alexopoulou, L., Stoye, J.P., Kassiotis, G., 2012. Resurrection of endogenous retroviruses in antibody-deficient mice. Nature 491, 774–778. doi:10.1038/nature11599

Young, G.R., Stoye, J.P., Kassiotis, G., 2013. Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis. Bioessays 35, 794–803. doi:10.1002/bies.201300049
Young, J.A., Bates, P., Willert, K., Varmus, H.E., 1990. Efficient incorporation of human CD4 protein into avian leukosis virus particles. Science 250, 1421–3.
Young, N.L., Bieniasz, P.D., 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. PLoS Pathog. 3, 0119–0130. doi:10.1371/journal.ppat.0030010
Yu, P., Lübben, W., Slomka, H., Gebler, J., Konert, M., Cai, C., Neubrandt, L., da Costa, O.P., Paul, S., Dehnert, S., Döhne, K., Thanisch, M., Storsberg, S., Wiegand, L., Kaufmann, A., Nain, M., Quintanilla-Martinez, L., Bettio, S., Schnierle, B., Kolesnikova, L., Becker, S., Schnare, M., Bauer, S., 2012. Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors Are Essential for the Control of Endogenous Retrovirus Viremia and ERV-Induced Tumors. Immunity 37, 867–879. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.018
Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., Yu, X.-F., 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. Science 302, 1056–1060. doi:10.1126/science.1089591
Yusoff, P., Lao, D.H., Ong, S.H., Miin Wong, E.S., Lim, J., Lo, T.L., Leong, H.F., Fong, C.W., Guy, G.R., 2002. Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. J. Biol. Chem. 277, 3195–3201. doi:10.1074/jbc.M108368200
Zahn, J., Kaplan, M.H., Fischer, S., Dai, M., Meng, F., Saha, A.K., Cervantes, P., Chan, S.M., Dube, D., Omenn, G.S., Markovitz, D.M., Contreras-Galindo, R., 2015. Expansion of a novel endogenous retrovirus throughout the pericentromeres of modern humans. Genome Biol. 16, 74. doi:10.1186/s13059-015-0641-1
Zanni, V., Eymery, A., Coiffet, M., Zytnicki, M., Luyten, I., 2013. retrotransposons at the fl amenco locus re fl ect the regulatory properties of piRNA clusters. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 19842–19847. doi:10.1073/pnas.1313677110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1313677110
Zavala, G., Pretto, C., Chow, Y.H.J., Jones, L., Alberti, A., Grego, E., De las Heras, M., Palmarini, M., 2003. Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. Virology 312, 95–105. doi:10.1016/S0042-6822(03)00205-8
Zeng, M., Hu, Z., Shi, X., Li, X., Zhan, X., Li, X.-D., Wang, J., Choi, J.H., Wang, K., Purrington, T., Tang, M., Fina, M., DeBerardinis, R.J., Moresco, E.M.Y., Pedersen, G., McInerney, G.M., Karlsson Hedestam, G.B., Chen, Z.J., Beutler, B., 2014. MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses. Science 346, 1486–92. doi:10.1126/science.346.6216.1486
Zhang, F., Landford, W.N., Ng, M., McNatt, M.W., Bieniasz, P.D., Hatziioannou, T., 2011. SIV Nef Proteins Recruit the AP-2 Complex to Antagonize Tetherin and Facilitate Virion Release. PLoS Pathog 7, 1–14. doi:10.1371/journal.ppat.1002039
Zhang, F., Wilson, S.J., Landford, W.C., Virgen, B., Gregory, D., Johnson, M.C., Munch, J., Kirchhoff, F., Bieniasz, P.D., Hatziioannou, T., 2009. Nef Proteins from Simian Immunodeficiency Viruses Are Tetherin Antagonists. Cell Host Microbe 6, 54–67. doi:10.1016/j.chom.2009.05.008
Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., Gao, L., 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. Nature 424, 94–8. doi:10.1038/nature01707
Zhou, F., Krishnamurthy, J., Wei, Y., Li, M., Hunt, K., Johanning, G.L., Cooper, L.J.N., Wang-Johanning, F., 2015. Chimeric Antigen Receptor T cells Targeting HERV-K Inhibit Breast Cancer and Its Metastasis through Downregulation of RAS. Oncoimmunology 4, 00–00. doi:10.1080/2162402X.2015.1047582
Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W., Resh, M.D., 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. J. Virol. 68, 2556–69.
Zhu, H., Geiman, T.M., Xi, S., Jiang, Q., Schmidtmann, A., Chen, T., Li, E., Muegge, K., 2006. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. EMBO J. 25, 335–345. doi:10.1038/sj.emboj.7600925
Zhu, Q., Maitra, U., Johnston, D., Lozano, M., Dudley, J.P., 2004. The Homeodomain Protein CDP Regulates Mammary-Specific Gene Transcription and Tumorigenesis. Mol. Cell. Biol. 24, 4810–

4823. doi:10.1128/MCB.24.11.4810
Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. Nat Biotechnol 15, 871–875. doi:10.1038/nbt0997-871
zur Hausen, H., Fox, J.G., Wang, T.C., Parsonnet, J., 2006. Infections Causing Human Cancer, Infections Causing Human Cancer. doi:10.1002/3527609318

Auteur : Cécile Lemaître

Virologie moléculaire d'un rétrovirus endogène humain fonctionnel

Environ 8% du génome humain est constitué de rétrovirus endogènes (HERV). La famille de bétarétrovirus HERV-K(HML2), l'une des plus actives chez l'homme, est entrée il y a 45 millions d'années dans le génome des primates et s'est amplifiée efficacement depuis, et ce malgré l'existence de nombreuses protéines cellulaires, appelées facteurs de restriction, qui s'opposent à la réplication du virus dans la cellule hôte. La Tetherin/BST2, l'un d'entre eux, est une protéine membranaire capable de bloquer le relargage des virions dans le milieu extracellulaire et est active sur la plupart des virus enveloppés testés jusqu'à présent, en particulier HERV-K(HML2). Nous avons tout d'abord mis en évidence que l'enveloppe (Env) de la famille HML2 est un antagoniste de la Tetherin, propriété qui a pu contribuer au succès de l'amplification de la famille HERV-K(HML2) dans les génomes. Plusieurs domaines de l'enveloppe coopèrent pour s'opposer à l'action du facteur de restriction : la SU (domaine d'interaction), ainsi que la partie transmembranaire, alors que la queue cytoplasmique n'est pas indispensable. Le mécanisme de cette inhibition n'a pas été encore complètement élucidé, mais l'on sait, comme pour la glycoprotéine d'Ebola, que l'Env HERV-K(HML2) n'induit ni relocalisation, ni dégradation de la Tetherin. Etant donné le grand polymorphisme insertionnel de la famille HERV-K(HML2), il est très probable que cette activité anti-Tetherin endogène soit variable entre les individus, ce qui pourrait avoir des conséquences dans les pathologies où les éléments HERV-K(HML2) sont spécifiquement induits. Parmi ces pathologies, les cancers de la peau, du sein et de la lignée germinale présentent une association particulièrement forte avec l'expression de l'Env HERV-K(HML2), que nous avons voulu mieux comprendre dans la suite de ces travaux de thèse. Nous avons dans un premier temps montré que l'expression de l'Env dans des cellules humaines non transformées de l'épithélium de sein (MCF10A), induit la transition vers un phénotype mésenchymateux (EMT, transition épithélio-mésenchymateuse), caractéristique de l'apparition de métastases dans les cancers. Cette transition est associée à une augmentation de la mobilité des cellules (mise en évidence dans des tests Transwell), à un changement de morphologie des cellules et à une modification du profil d'expression de quelques marqueurs moléculaires caractéristiques (E-cadherin, N-cadherin, vimentin, fibronectin). Grâce à une étude transcriptomique en cellules 293T, nous avons mis en évidence que l'expression de l'Env HERV-K induit fortement plusieurs facteurs de transcription : ETV4, ETV5, ainsi que EGR1, qui ont été identifiés comme des marqueurs du processus de tumorigénèse dans différents modèles. Nous avons également montré que l'Env HERV-K active la voie des MAP kinases via ERK 1/2 –dérégulée dans un grand nombre de cancers- en amont de la kinase Raf. Ces phénomènes d'induction de la transduction de signal requièrent la présence de la queue cytoplasmique de l'enveloppe. De façon remarquable, seule l'enveloppe du bétarétrovirus de mouton JSRV, oncogénique *in vivo*, est capable d'activer les mêmes voies de signalisation, ce qui renforce l'hypothèse d'une implication de l'Env HERV-K(HML2) dans la tumorigenèse.

Molecular virology of a functionnal human endogenous retrovirus

Human endogenous retroviruses (HERV) represent about 8% of our genomic content. HERV-K(HML2) betaretroviral family is one of the most active in humans. Although it entered 45 million years ago in the primate genomes, its members have amplified quite recently despite the existence of restriction factors, which are host proteins blocking viral replication in cells. Tetherin/BST2 is one of them and acts by keeping the viral particles attached to the cell surface. It targets most enveloped viruses tested so far including HERV-K(HML2). We show that the envelope protein (Env) of HML2 family is an antagonist of Tetherin retriction, property that probably helped the endogenous retrovirus to efficiently amplify in the genomes. We mapped several domains required for antagonism : the surface subunit of Env (SU), which interacts with Tetherin, and the transmembrane. We also show that the cytoplasmic tail is dispensable for counteraction. Similar to Ebola glycoprotein, HERV-K(HML2) Env does not mediate Tetherin degradation or cell surface removal; therefore, it uses a yet-undescribed mechanism to inactivate the restriction factor. Due to their recent amplification, HERV-K(HML2) elements are extremely polymorphic in the human population, and it is likely that individuals will not all possess the same anti-Tetherin potential. This could have functional consequences in pathologies where HERV-K(HML2) is specifically induced. Among them, melanomas, breast cancers and germ line tumors display a strong association with HML2 Env expression, that we wanted to better analyse. We first show that Env expression in a model of epithelial human breast cancer cells induces the so-called EMT (epithelial mesenchymal transition), critical for cancer progression and the process of metastasis. This includes enhanced migratory capacities (shown by transwell assays), changes in cell morphology and characteristic modifications in a set of molecular markers (e.g. E-cadherin, N-cadherin, vimentin, fibronectin). Microarray experiments performed in 293T cells revealed that HERV-K(HML2) Env is a strong inducer of several transcription factors, namely ETV4, ETV5 and EGR1, which have been associated with cellular transformation. Importantly, we also show that HERV-K(HML2) Env activates the MAP kinase pathway via ERK 1/2, key player in numerous cancers. This induction occurs upstream of the kinase Raf and involves the cytoplasmic tail of HERV-K(HML2) Env. In addition, this phenomenon is very specific, being absent with every other Env tested, except for JSRV Env which is already known to have transforming properties *in vivo*.