

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

INSERM U1259 MAVIVH

THÈSE

présentée par :

Aurélie DROUIN

soutenue le : **09 octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Etude de la capacité d'échappement de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 à la restriction de l'infection médiée par la protéine IFITM3

THÈSE dirigée par :

Madame BRAIBANT Martine

Maitre de Conférences, HDR, Université de Tours

et co-encadrée par :

Madame BOUVIN-PLEY Mélanie

Maitre de Conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur NEGRONI Matteo

Directeur de recherche CNRS, Strasbourg

Monsieur CIMARELLI Andrea

Directeur de recherche CNRS, Lyon

JURY :

Madame ZAMBORLINI Alessia

Professeur, Université Paris-Saclay

Monsieur NEGRONI Matteo

Directeur de recherche CNRS, Strasbourg

Monsieur CIMARELLI Andrea

Directeur de recherche CNRS, Lyon

Monsieur THIBAUT Gilles

Président du jury, PU-PH, Université de Tours

Madame BOUVIN-PLEY Mélanie

Maitre de Conférences, Université de Tours

Madame BRAIBANT Martine

Maitre de Conférences, HDR, Université de Tours

Remerciements

Tout d'abord je tiens à adresser un grand merci aux membres de mon jury, Matteo Negroni, Andrea Cimorelli, Alessia Zamborlini et Gilles Thibault, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Vous êtes chacun des spécialistes dans vos domaines ce qui promet des discussions très intéressantes autour de cette étude.

Martine, merci de m'avoir donné ma chance en master 2, puis ensuite d'avoir cru en moi pour continuer ce projet sur les IFITM. Ces quatre années de thèse ont été intenses et pleines de péripéties mais très enrichissantes. Tu m'as toujours laissé de la latitude dans ce projet que j'ai pu poursuivre avec ton soutien et tu m'as toujours encouragée à aller partager mes résultats en congrès, dommage que le COVID19 s'en soit mêlé. En tout cas, merci car tu as toujours su être là dans les moments importants et ce avec une grande efficacité.

Mélanie, merci de ton optimisme à tout épreuve et de tes encouragements réguliers, partager ton bureau fut un véritable plaisir et tu as toujours su voir le positif dans mes résultats quand moi-même je doutais. Ton humour et ton rire « fort » communicatif ont toujours été un plaisir à partager, je suis désolée de devoir te laisser seule dans le bureau face à Alain et Florian, ce sera un vrai challenge pour toi aussi.

Je remercie également Sidaction pour avoir financé ma thèse pendant 3 ans et l'Agence Nationale de Recherche contre le SIDA (ANRS) d'avoir accepté de financer ma quatrième année de thèse.

Philippe, merci pour ta positivité communicative, ta bienveillance et tes encouragements réguliers, cela fait chaud au cœur d'avoir un directeur d'unité comme toi. Grâce à toi et ton soutien, l'unité a de belles années devant elle avec pleins de nouveaux projets à venir. **Denys**, merci pour votre disponibilité, votre humour quelquefois diabolique pour les petits nouveaux (et même pour les anciens parfois..) et votre rigueur au sein du labo.

Angélique, merci de ta bienveillance, tu es un vrai rayon de soleil dans ce laboratoire, tes petites attentions et ton sourire quotidien me manqueront. **Sarah**, notre ancienne gestionnaire, ton humour et ta joie de vivre ont été un vrai plaisir à partager à mon arrivée en M2 et pendant mon début de thèse.

Maxou, tu m'as encadré à mon arrivée dans ce laboratoire et tu m'as transmis ta passion pour la recherche tout en m'apprenant les subtilités des manip'. Merci pour ta gentillesse, ton humour et tous les moments détentes que l'on a pu passer au bureau avec Mélanie, Alain et Thibault, ou en dehors du bureau avec les autres copains, c'est toujours un plaisir de te revoir et je suis contente de te voir épanoui dans ta nouvelle vie parisienne (Qui l'eut cru 😊). **Thibault**, ou monsieur « Gui Noiseau », partager ton bureau au début de ma thèse fut un vrai plaisir, on a passé tellement de temps à rigoler

au détriment de notre Maxou et sa chevelure (ton affiche de thèse le prouve). Merci de ta bienveillance et de ton humour, le bureau n'a plus jamais été le même sans toi. **Baptiste**, merci de ta douceur, de ta gentillesse, de tes moqueries amicales (bruit ambiant du labo, je m'en rappellerais..^^) et surtout de ton partage de glace Haagendaz au besoin. Je te souhaite le meilleur pour ton après thèse !

Karl, tu n'as pas souvent été au bureau quand moi j'y étais au vu de toutes tes responsabilités à l'hôpital mais tu as toujours été bienveillant et plein d'humour, j'espère que l'on continuera à pouvoir passer de bons moments tous ensemble hors labo. **Seb**, tu es quelqu'un de drôle, gentil et avenant, toujours prêt à rendre service, merci de ta gentillesse et de tes petites blagues de médecin qui dérident. **Julien M**, on a, à peu près démarré nos thèses en même temps, bien que toi, tes responsabilités se soient démultipliées rapidement avec ton évolution au sein de l'hôpital aussi ! Tu es super positif et c'est toujours un plaisir de parler avec toi !

Virgile, alors toi si on m'avait dit quand tu es arrivé en M2 tout timide et réservé que tu étais complètement fufou, je ne l'aurais pas cru, et pourtant tu reprends le flambeau et chante à tue-tête la chanson « Alain Moreau, qu'est-ce qu'il y a sous ton grand chapeau... » qui se transmet de thésard en thésard et qu'Alain adore ... Tu chantes tout et n'importe quoi d'ailleurs et tu as un certain sens artistique dans certains types de dessin. Tu me fais beaucoup rire et tu es une vague de fraîcheur et de légèreté (Elsa sera d'accord avec moi sur la fraîcheur vu que tu l'attaques régulièrement avec des glaçons.. 😊). **Yannick**, le breton éternellement blanc (ou très rouge), ta tête les lundis matin (ou le vendredi matin tu me diras..) vaut souvent le détour (ça va je t'embête), mais tu as toujours le sourire et une bonne blague à raconter. **Jade**, que d'aventures avec toi, notre premier biotechnocentre et l'attaque d'âne, merci pour tes plans machiavéliques mais finalement tout pourris pour mettre une andouillette en fond d'écran sur mon ordi et que je ne comprenne pas ta blague .. c'était tellement drôle 😊 Merci aussi pour tes petits mots d'amour dans mon agenda consistant souvent en 4 lettres (c***, b***, ou en 5 prout).

Eric, Emmanuelle B, Hugues, Catherine, Christophe et Philippe C., merci pour votre bonne humeur quand on se croise, vos retours sur mes présentations en réunion et vos conseils sur les manip.

JC, merci pour ta bienveillance et ton écoute toujours avec le sourire, j'apprécie toujours de prendre le temps de te parler et merci pour ta patience, oui car après tout tu as quand même travaillé avec notre petite Julie, pendant presque 5 ans et avec le sourire (même quand elle était sous hormone, chapeau !). **Romu**, je ne t'ai pas vu si souvent mais merci de ton énergie, quelle vague de fraîcheur de t'avoir dans les parages, avec tes blagues de beauf et ta bonne humeur totalement contagieuse.

Marianne, merci de ta bonne humeur contagieuse, de tes histoires incroyables et de tes blagues de beauf (oui toi aussi). C'est toujours un plaisir de partager des moments avec toi, on se sent tout de suite à l'aise à tes côtés j'adore, c'est sûrement dû à ta bienveillance et à ton humour (les blagues de beauf oui on y revient). **Julien Gaillard**, merci de m'avoir appris les subtilités de la microscopie électronique et confocale, de tous tes conseils et du temps que tu as pu m'accorder professionnellement mais avant tout je voudrais te remercier pour ta personnalité et ton écoute, tu es quelqu'un de profondément humain, et ça a été une joie de te connaître, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Elodie, merci pour ton écoute attentive, tes conseils et le partage de tes compétences et de ton expérience. Tu es toujours prête à aider et à partager ton expérience professionnelle pour aider les thésards et stagiaires en détresse et toujours pleine de bons conseils. Tu es un exemple de travail avec une organisation hors pair mais aussi une personne aux qualités humaines indéniables. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et positive avec moi. J'espère que les années à venir te réservent de belles surprises aussi bien pros que personnelles et j'espère rester en contact avec toi pour me réjouir même de loin pour toi.

Manue, tu es une personne adorable, rigolote et pleine de vie, j'adore ton énergie elle est totalement communicative tout comme ton rire et ta bienveillance. Merci de m'avoir guidé au sein du labo à mon arrivée, et d'avoir partagé tes sucreries quand je partageais le petit bureau derrière le tien en M2. On a partagé plein de bons moments aussi bien le midi au labo qu'en dehors du labo, tu m'impressionnes toujours autant sur des rollers et pour le surf il faut qu'on remette ça !! **Clara**, avec Manue tu as été une des premières personnes avec qui j'ai partagé des moments détente au sein de ce labo (toujours autour de sucreries étonnamment), j'ai passé tellement de temps à rire à te regarder te chamailler avec Thibault. **Amélie**, la petite stagiaire que j'étais à mon arrivée en M2 était un peu effrayé par toi au début, lorsque je ne t'avais croisé que de loin, mais quand tu es revenue au labo lors de ma thèse, j'ai appris à connaître une personne bienveillante et rigolote, pleine d'humour toujours prête à partager des moments de détente, de rigolade mais aussi de bons conseils. **Anne Bull**, merci de ta gentillesse, de ta douceur et de tes petits déjeuners que l'on attend tous avec impatience à chaque fois car on sait que l'on va se régaler !

Merci à tous les stagiaires pharma, que j'ai encadré qui ont toujours été très intéressés par mon sujet de thèse, merci aux M2 qui sont passés au labo, mention spéciale à **Ronan**, avec qui nous avons beaucoup rigolé et à **Marie-Alice**, qui a partagé le temps de son stage mon sujet de thèse ! Merci **Marie-Alice** pour ta contribution à ma thèse et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à **Agnès Petit**, **Aurélia Hiron** et **Catherine Dupuy**, pour m'avoir donné l'occasion d'enseigner au sein du département de microbiologie, et merci à Gwendoline, de m'avoir aidé lors de la mise en place des TP mais aussi merci pour les séances de sport du midi.

Alainnnnnnnnn, merci d'être toi, merci d'être toujours présent pour écouter les thésards en détresse et pour les rebooster au besoin ! Tu es d'une gentillesse et d'une humanité rare, mon passage au labo n'aurait pas été le même sans toi, tu es toujours là pour me remonter le moral mais aussi toujours là pour partager nos moments de folies et pour nous embêter ! On a partagé tellement de discussions, tellement d'opinions sur tout et rien, tu m'as beaucoup apporté ces dernières années, aussi bien en termes de manip qu'humainement parlant, tu es une personne géniale, j'ai adoré partager ton bureau !! Désolé de te le dire mais tu vas vraiment t'ennuyer sans nous. Moi je m'ennuierai sans toi en tout cas ça c'est sûr !! Mais Luynes n'est pas très loin, même si je ne suis plus au labo, tu ne te débarrasseras pas de moi aussi facilement !! Mouhahahaaa !!!!! **Florian**, qui l'eut cru, tu es sympa en fin de compte !!! Malgré tous tes efforts pour faire croire que tu détestes l'humanité, tu ne peux pas t'empêcher d'être sympa quand on t'oblige à parler. En même temps, quand tu as une voisine de bureau qui parle beaucoup tu finis par lui répondre pour arrêter le bruit environnant, et puis si tu ne réponds pas je te lance des trucs donc bon. Sans rigoler, tu as été une rencontre inattendue dans ce laboratoire et un soutien bienveillant au cours de ces dernières années, toujours là pour discuter quand il y avait besoin. Merci pour tout et j'espère pouvoir repasser encore plein de bons moments avec toi et ta petite famille (qui étonnamment est beaucoup plus sympa que toi !!).

Elsa, merci de ta bienveillance, de ton sourire et de ta philosophie de vie, tu vois toujours le verre à moitié plein, bon sauf si tu es très fatiguée et en manque de soleil, mais c'est normal en même temps, tu nous viens du Mexique ! Merci de tes encouragements continus, tu crois en moi et tu me pousse toujours à avoir confiance en moi. Tu es une fille géniale, avec le cœur sur la main, tu me dis toujours que je suis un peu magique car quand je viens au labo je lance des paillettes de joie avec mes sourires et ma bonne humeur, mais de mon point de vue, c'est ta positivité et ta joie de vivre qui sont totalement contagieuses, à chaque fois que je te croise tu me boostes toujours plus. Courage pour la dernière ligne droite, je t'amènerai du sucre pour t'aider à tenir le coup. **Anne Be**, merci de toutes nos discussions sur les lamas, les coiffures et nattes chaque matin autour d'un café (ou d'un thé pour toi) à admirer les belles coiffures d'Elsa, tu es une fille absolument adorable et pleine d'humour, plein de bonheur pour la suite ! **Steph**, ma copine de VIH, avec toi j'ai partagé beaucoup de bons moments, de partages d'info mais aussi et surtout beaucoup de rigolades et de discussions avec notre petit groupe de copain sur Tours. Toujours partante pour toutes les activités et tu as été le moteur de la vie sociale du labo depuis ton arrivée à toujours proposer et organiser que l'on se retrouve ! Tellement de bons moments tous ensemble, vous allez vraiment tous me manquer !

Félicitations pour ta quatrième année, tu vas pouvoir finir sereinement et préparer au mieux la suite ! Je suis sûre que cette dernière année sera pleine de péripéties, de congrès (en vrai cette fois), tu penseras à moi si tu vas au ColdSpring l'année prochaine ! De toute façon je serai là quand ce sera ton tour de passer ta thèse et puis on restera en contact ma copine, après tout on a encore plein de recettes de cosmétiques maisons à partager et bien d'autres choses encore ! **Flo**, petit oiseau devenu grand, te voilà parti à Lyon pour une nouvelle aventure dans un nouveau labo, tu as l'air de t'y plaire et de t'y épanouir, je suis vraiment contente pour toi et j'espère qu'on se créera des occasions pour continuer à se voir ! Merci de ta légèreté, de tes blagues qui n'appartiennent qu'à toi, tu es tellement naturel, j'ai tellement ri à tes côtés ces dernières années en te voyant dans tellement d'états différents ! Ta personnalité est une vraie palette de couleurs, qui explose et déborde régulièrement ! Tu m'as fait tellement rire, tellement de fois ! Merci mon Floflo pour ces dernières années !!

Julie D., ma copine de chanson de Disney, un soir de décembre tu as aidé la pauvre M2 que j'étais perdue face à la machine de Western Blot, depuis ce jour on est devenu amies et on s'est découvert une passion commune pour la chanson, pour les Disneys en particulier, les gens du labo n'ont jamais vraiment su apprécier notre talent et pourtant on a fait des performances musicales assez exceptionnelles surtout quand on était enfermées au L3 ! On a partagé plein de choses ces dernières années aussi bien au labo qu'en dehors, tous nos doutes, tous nos espoirs et tellement de moments de complicité. Je t'ai vu grandir et évoluer surtout cette dernière année pendant laquelle tu es devenue maman, ça n'a pas toujours été facile, les hormones t'ont joué beaucoup de tours (et à nous aussi du coup) mais ton côté attachant a toujours fini par prendre le dessus. Même insupportable et droguée aux hormones, tu t'inquiétais toujours pour tes amis et les gens que tu aimes, ne change pas, sois fière de la personne que tu es devenue, de la maman que tu es et j'espère de la super futur Ingénieure en quelque chose que tu seras. **Julie M.**, ma copine !! Tu es arrivée à un moment compliqué pour moi lors de cette thèse, où j'avais beaucoup de doutes mais tu as su avec ton énergie, ta bienveillance et ton optimisme à tout épreuve me redonner motivation et courage. Tu as su m'aider, m'épauler, aussi bien personnellement que professionnellement (si tu avais été là depuis le début on aurait tout déchiré à nous deux). Merci d'être toi, tu es une très belle personne, on en rencontre peu des personnes aussi gentilles et aussi altruistes que toi, tu as tellement à offrir, n'en doute jamais ! Tu es vraiment une personne géniale et une amie en or, partager ta vie au quotidien au labo fut un véritable plaisir, tu vas vraiment me manquer ! Mais ce n'est pas parce que je finis ma thèse qu'on ne se verra plus hein, je pense que notre petit trio de choc avec Charline continuera de partager encore beaucoup de choses dans le futur ! Merci pour tout, j'ai hâte de continuer à partager plein de moments avec toi, de continuer à partager nos recettes healthy, nos recettes cosméto et nos ateliers Fimo ! On a encore tellement à partager ensemble. **Charline**, ma petite Charline, tu as été une véritable découverte lors

de cette thèse, notre amitié n'était pas écrite, on s'est d'abord apprivoisé timidement puis rapidement notre curiosité insatiable pour la vie, pour le monde qui nous entoure et nos philosophies de vie se sont rencontrées pour nous faire partager tous ces moments d'amitié et de complicité. Tu m'as fait découvrir pleins de choses et présenté la vie comme un monde sans limite plein de possibilités. Merci d'être toi, tu es une fille géniale, une personne en or toujours avide de découverte et de partage, ta facilité à te lier, à partager et à vivre le moment présent m'impressionnera toujours. Tu es une personne avec mille personnalités, avec un million d'envies, un million de projets, tu es étincelante de vie et de partage. Ces dernières années n'ont pas été facile pour nous, pour toi, mais te connaître au milieu de tout ça a été une vraie bouffée d'air frais et d'amitié, nous sommes devenues de véritables piliers dans la vie l'une de l'autre et j'espère que quoi que l'avenir nous réserve cela ne changera pas. J'ai hâte de continuer à découvrir un million de choses sur toi et avec toi, et de voir qui tu vas devenir, te voir évoluer ces dernières années a été comme voir un papillon sortir de sa chrysalide, j'ai hâte de voir la suite et je suis persuadée que seul le meilleur t'attend désormais.

Ma petite **coco**, ma meilleure amie de toujours, tu as toujours cru en moi et vu en moi bien plus de chose que moi-même, tu m'as toujours poussée et encouragée quoi qu'il arrive avec un optimisme incroyable, je t'en remercie du fond du cœur. Tu m'as connue dans tous mes états et pour autant tu m'as toujours épaulée, sans toi je n'aurais pas vécu cette thèse, ni ces dernières années de la même manière, merci ma coco !! **Alicia**, mon chouchou, merci de ton amitié et de ta présence sans relâche, tu es toujours là pour m'écouter me plaindre et me changer les idées, maintenant que je finis ma thèse on va pouvoir passer plus de moments ensemble. **Sophia**, ma plus vieille amie, merci de ton soutien et de me voir comme tu me vois, tu m'as vue changer et évoluer ces dernières années en continuant de me soutenir et d'avoir foi en moi quoi qu'il arrive <3. Maintenant que cette thèse est terminée, je vais enfin pouvoir venir te voir à Barcelone (si le COVID nous laisse faire). **Lore et Quentin**, mes copains de master, on s'est suivi ces dernières années et on continuera à se suivre, j'ai hâte de découvrir ce que la vie nous réserve 😊

A ma famille, merci de croire en moi et de m'avoir toujours poussée, quoi que je fasse je sais que vous me soutiendrez toujours et me ferez confiance. Merci **Maman et Papa**, de me donner de l'amour inconditionnel et de croire en moi quoi qu'il arrive, je serai toujours votre petite fille et j'aurai toujours besoin de vous-même quand je serai docteur ! Merci ma **mamie**, pour ta fierté sans borne pour moi et pour ta bienveillance. Mon grand frère, **Seb**, on s'est tellement rapproché ces dernières années, je ne sais même pas comment te remercier, tu as été d'un soutien sans faille lors de cette thèse et je t'en remercie du fond du cœur, tu as toujours su me changer les idées souvent à base de cuberdon d'ailleurs (Merci **Charlotte** aussi 😊) et tu as toujours cru en moi. **Remy**, mon mimi, mon petit frère, je suis tellement fière de toi, tu me fais toujours rire et tu cherches toujours à me

faire plaisir, vous êtes tellement bienveillant **Coralie** et toi, je suis sûre que vous serez des parents en or. Je vous aime tous infiniment, et j'ai hâte de retrouver le temps de vivre et de partager de nouveaux moments avec vous.

Julien, je ne sais même pas par où commencer, depuis 12 ans que l'on est ensemble, on a grandi et évolué l'un à côté de l'autre sans jamais se perdre. Au fil de ces années tu m'as toujours épaulée et soutenue, et par-dessous tout tu as toujours cru en moi, tu as subi tous mes changements d'humeur, mes doutes, mes angoisses mais aussi toutes mes joies et mes victoires. On a tout vécu ensemble et tu as toujours su te montrer à la hauteur. Tu m'as apporté plus que ce que je n'aurais pu imaginer, tu as toujours su trouver les mots pour me remonter le moral, tu es le seul à réussir à me faire sourire même quand je suis au plus bas et à me redonner confiance en moi. On se connaît par cœur et pour autant ta bienveillance et ton amour à mon égard ne cessent de me surprendre. Merci pour tout, pour tes attentions du quotidien et merci d'être toi, j'ai hâte de découvrir ce que la vie nous réserve.

Liste des principales abréviations

ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALIX	ALG-2 Interacting protein X
ANRS	Agence Nationale de Recherche sur le Sida
AP	Adaptor protein
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARN	Acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
bnAbs	broadly neutralizing Antibodies
BTB	Broad complex, Tram track and Bric à brac
CA	Capside
CCR5	C-C Chemokine Receptor type 5
CD4	Cluster de Différentiation 4
CD4bs	CD4 binding site
CDR-H3	Complementary Determining Region - Heavy chain 3
Cellule NK	Cellule Natural killer
CHR	C-terminal Repeat
CMH-I / II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité classe 1 / 2
CRF	Circulating Recombinant Form
CTD	Domaine C-terminal
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor type 4
DC	Dendritic Cell
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
EC	Ectodomaine
ECL	ExtraCellular Loop
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENF	Enfuvirtide
Env	Glycoprotéine d'enveloppe
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERManI	Endoplasmic Reticulum Mannosidase Class I
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport

Fab	Fragment antigen binding
FcR	Fragment constant Receptor
FP	Fusion Peptid
Gag	Group-specific antigen
GALT	Gut Associated Lymphoïd Tissue
GBPs	Guanylate Binding Protein
GMP	Guanosine Monophosphate
Gp	Glycoprotéine d'enveloppe
GTP	Guanosine Triphosphate
HD	Hydrophobic Domain
HEK	Human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HR1 / 2	Heptad Region 1 / 2
ICL	Intracellular Loop
IFITM	InterFeron Induced TransMembrane proteins
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IN	Intégrase
IP	Immunoprécipitation
IRGs	Immunity-Related GTPases
ISG	Interferon stimulated genes
IVR	InterVening Region
kDa	Kilodalton
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor
LLP	Lentivirus Lytic Peptides
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MARCH	Membrane-Associated RING-CH
MHR	Major Homology Region
mobNAbs	monoclonal broadly Neutralizing Antibodies
MPER	Membrane Proximal External Region
MVC	Maraviroc
nAbs	neutralizing Antibody
NC	NucléoCapside
Nef	Negative factor
NHR	N-terminal Repeat
NLS	Nuclear Localisation Signal

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTD	Domaine N-terminal
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Pre Integration Complex
PNGS	Potential N-Glycosylation Site
Pol	Polymérase
POZ	POxvirus and Zincfinger
Pr	Protéase
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
Rev	Regulator of viral gene expression
Rev	Regulator of viral expression
RING	Really Interesting New Gene
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse transcriptase
RTC	Reverse transcriptase Complex
sCD4	soluble CD4
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience acquise
SP	Spacer peptide
TAR	Trans-activation Response
Tat	Transactivator of transcription
TCR	T Cell Receptor
TI	Transcriptase inverse
TM	Transmembranaire
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
URF	Unique recombinant Form
VAPA	Vesicle-Associated membrane Protein-associated A
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simien
VLIgS	Very Large Inducible GTPases
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U

Résumé

Les protéines IFITM (*interferon-induced transmembrane proteins*) font partie de la réponse immunitaire innée. Elles bloquent l'entrée de nombreux virus dans la cellule hôte non infectée. Dans le cas du VIH, il a été montré qu'elles agissent également dans la cellule infectée en s'incorporant au sein des virus lors de leur formation, diminuant ainsi leur capacité à infecter de nouvelles cellules. Plusieurs travaux récents suggèrent que la glycoprotéine d'enveloppe (Env) pourrait jouer un rôle fondamental dans la restriction de l'infection du VIH-1 par les protéines IFITM, en particulier par la protéine IFITM3. Néanmoins les capacités de Env à y échapper n'ont été que peu explorées et aucun consensus quant aux mécanismes mis en jeu n'a pu être établi. Ainsi, cette étude a pour but d'étudier le rôle de Env dans la capacité du VIH à échapper à l'action de la protéine IFITM3.

Dans ces travaux, nous avons montré que des virus qui ne diffèrent que par l'Env exprimée à leur surface présentent des sensibilités variables à la protéine IFITM3 avec une inhibition de leur infectiosité de plus de 60% pour les virus les plus sensibles et sans aucune inhibition voire même une augmentation de leur infectiosité pour les plus résistants. De façon intéressante, cette sensibilité ne semble pas être dépendante ni de la quantité de protéines IFITM3, ni de la quantité d'Env incorporées au sein des virions. Le niveau de sensibilité des virus à IFITM3 semble donc dépendre de la nature de l'Env exprimée à leur surface.

Par l'étude des propriétés antigéniques et fonctionnelles de ces Env et la mise en œuvre de techniques d'immunoprécipitation et de microscopie confocale, nous avons pu mettre en évidence des différences conformationnelles et d'interaction avec la protéine IFITM3 entre les Env des virus sensibles et résistants. Nos résultats suggèrent que la protéine IFITM3 interagit avec les trimères d'Env matures des virus sensibles à IFITM3, les stabilisant dans un état conformationnel exposant les boucles variables V1V2 et empêchant ainsi les changements conformationnels requis pour la fusion des membranes virales et cellulaires. En revanche, les modifications post-traductionnelles subies par les trimères d'Env des virus résistants à IFITM3, semble bloquer l'accès de la protéine IFITM3 à son site de liaison, rendant le trimère d'Env fonctionnel.

En conclusion, nos résultats soulignent l'importance de Env dans la modulation de la sensibilité du VIH-1 à l'inhibition de l'infection par la protéine IFITM3. Ils apportent un éclairage nouveau quant au mécanisme par lequel Env peut échapper à ce facteur de restriction.

Mot clés : VIH-1, glycoprotéines d'enveloppe, IFITM3, facteur de restriction

Abstract

The IFITM proteins (interferon-induced transmembrane proteins) are part of the innate immune response. They block the entry of many viruses into the uninfected host cell. In the case of HIV, it has been shown that they also act in the infected cell by incorporating themselves into viruses during their formation, thus reducing their ability to infect new cells. Several recent works suggest that the envelope glycoprotein (Env) could play a fundamental role in the restriction of the infection of HIV-1 by the IFITM proteins, in particular by the IFITM3 protein. However, the ability of Env to escape this restriction remains poorly explored and no consensus about the mechanisms involved have been established. The purpose of this study is to study the role of Env in the ability of HIV to escape the action of the protein IFITM3.

In our study, we showed that viruses that differed only in the Env expressed on their surface presented variable sensitivities to the IFITM3 protein with an inhibition of their infectivity of more than 60% for the most sensitive virus and without any inhibition or even an increase in their infectivity for the most resistant. Interestingly, this sensitivity does not appear to be dependent either on the level of IFITM3, or on the level of Env incorporated within virions. The level of sensitivity of viruses to IFITM3 therefore seems to depend on the nature of the Env expressed on their surface.

By studying the antigenic and functional properties of these Env and by performing immunoprecipitation and confocal microscopy experiments, we showed differences between sensitive and resistant Envs both in their conformation and their capacity to interact with the IFITM3 protein. Our results suggest that the IFITM3 protein interacts with the mature Env trimer of IFITM3-sensitive viruses, stabilizing a conformational state in which the V1V2 loops are exposed, thereby preventing the conformational changes required for fusion of viral and cell membranes. By contrast, post-translational changes undergone by the Env trimer of IFITM3-resistant viruses would block the access of the IFITM3 protein to its binding site, rendering the Env trimer functional.

In conclusion, our data highlight the important role of Env in modulating the sensitivity of HIV-1 to the inhibition of infection by IFITM3. They provide new information about the mechanism by which Env may escape this restriction factor.

Keywords: HIV-1, envelope glycoprotein, IFITM3, restriction factor

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des principales abréviations.....	10
Résumé	13
Abstract	14
Liste des figures	17
INTRODUCTION	19
Généralités	21
Découverte, classification et répartition géographique.....	21
Origine du VIH	23
Diversité génétique	24
Structure des particules virales matures.....	25
Organisation génétique du virus	26
1) Génome viral	26
2) Les protéines de structure.....	27
3) Les enzymes virales	28
4) Les protéines régulatrices.....	29
5) Les protéines auxiliaires	29
Cycle de multiplication viral	30
1) Les étapes précoces du cycle viral.....	30
2) Les étapes tardives du cycle viral	34
Physiopathologie de l'infection	36
1) La phase aiguë ou primo-infection	37
2) La phase asymptomatique ou chronique	39
3) La phase SIDA	39
Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1	40
Biosynthèse et maturation	40
Structure des glycoprotéines d'enveloppe.....	43
1) Structure primaire/secondaire	43
2) Structure tertiaire	45
3) Structure quaternaire du complexe trimérique	47
Rôle des glycoprotéines d'enveloppe dans l'entrée virale.....	47
1) Fixation au récepteur CD4	48
2) Fixation aux corécepteurs	49
3) Fusion virale.....	51
Réponses immunitaires ciblant les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1	52
1) Réponse humorale.....	53

2) Protéines antivirales ciblant les glycoprotéines d'enveloppe	61
Les protéines IFITM	70
1) Activité anti VIH-1.....	72
2) La protéine IFITM3.....	75
OBJECTIF	81
MATERIEL ET METHODES	85
1) Culture cellulaire.....	87
2) Plasmides	87
3) Production des virus pseudotypés	87
4) Gradient iodixanol	88
5) Marquage Immunogold et observation au microscope électronique à transmission	88
6) Infectiosité virale	89
7) Caractérisation du tropisme viral	89
8) Test de neutralisation.....	90
9) Sensibilité aux inhibiteurs d'entrée.....	90
10) Construction de gènes <i>env</i> chimériques avec échanges V1V2 et / ou V3.....	91
11) Immunoprécipitation.....	91
12) Western blot.....	92
13) Marquage immunofluorescent.....	92
14) Microscopie confocale.....	93
15) Analyses statistiques	93
RESULTATS.....	95
Partie 1 : Etude de l'incorporation des protéines IFITM3 au sein des virions.....	99
1) Vérification du modèle d'incorporation des protéines IFITM3	99
2) Etude de l'effet de l'incorporation d'IFITM3	101
3) Etude des déterminants moléculaires de Env	107
Partie 2 : Etude de l'interaction de la protéine IFITM3 avec Env dans les cellules productrices	113
1) Caractérisation de l'interaction entre IFITM3 et Env	113
2) Suivi de la localisation des protéines IFITM3 et Env au sein des cellules productrices.....	115
DISCUSSION	118
PERSPECTIVES	126
BIBLIOGRAPHIE	130
ANNEXE 1.....	154
ANNEXE 2.....	190

Liste des figures

Figure 1 : Distribution mondiale des sous-types et formes recombinantes du VIH-1 de groupe M.....	22
Figure 2 : Représentation phylogénétique des groupes du VIH-1 et du VIH-2 et des transmissions inter-espèces.	23
Figure 3 : Les mécanismes de diversité du VIH	24
Figure 4 : Représentation schématisée d'une particule virale mature	25
Figure 5 : Organisation génomique du VIH-1	26
Figure 6 : Représentation schématisée des étapes précoces du cycle viral du VIH-1	31
Figure 7 : Représentation schématisée des étapes tardives du cycle viral du VIH-1.	35
Figure 8 : Progression de l'infection naturelle par le VIH-1	38
Figure 9 : Classification de Fiebig des différents stades de l'infection par le VIH-1.....	39
Figure 10 : Processus de N-glycosylation.	40
Figure 11 : Biosynthèse et trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppes et de Gag	41
Figure 12 : Les différents modèles d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe	42
Figure 13 : Structure secondaire de la gp120 du virus modèle HbX2	43
Figure 14 : Structure secondaire de la gp41.....	44
Figure 15 : Structure cristalline d'un monomère de gp120 de la souche HBX2 du VIH-1.....	46
Figure 16 : Structure cristalline de l'ectodomaine de la gp41.....	46
Figure 17 : Représentation des changements conformationnels du trimère d'enveloppe après sa fixation au récepteur CD4.....	49
Figure 18 : Représentation schématisée d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)	50
Figure 19 : Evolution naturelle au cours de l'infection par le VIH-1 du tropisme viral chez un patient non traité	51
Figure 20 : Représentation schématisée des étapes de l'entrée virale.....	52
Figure 21 : Représentation schématisée des différentes formes de trimères de glycoprotéines d'enveloppe à la surface du virus induisant des anticorps.	54
Figure 22 : Echappement du virus à la neutralisation par des anticorps autologues neutralisants.	55
Figure 23 : Cinétique d'apparition des anticorps anti VIH-1 au cours de l'infection.....	56
Figure 24 : Représentation schématisée des épitopes cibles des anticorps monoclonaux largement neutralisants.	56
Figure 25 : Représentation de l'interaction de l'anticorps PG9 avec le trimère d'enveloppe du VIH-1	57
Figure 26 : Représentation schématisée de la structure d'un oligosaccharide pré-assemblé qui se fixera à un résidu Asparagine (N) lors de la N-glycosylation.....	61
Figure 27 : Représentation schématisée des modes d'action des facteurs antiviraux GBP5, 90K et MARCH8	63
Figure 28 : Représentation schématisée d'une partie du mécanisme d'action de SERINC5.....	69
Figure 29 : Représentation schématisée des deux voies de restriction virale des protéines IFITM	71
Figure 30 : Schéma de la séquence primaire des IFITM	72
Figure 31 : Représentation des différents modèles topologiques proposés et organisation des domaines de la protéine IFITM3	76
Figure 32 : Structure secondaire prédite pour la protéine IFITM3	77
Figure 33 : Représentation schématisée des sites potentiels de modification post traductionnelle de la protéine IFITM3 humaine.....	77
Figure 34 : Mise au point du modèle d'incorporation d'IFITM3 au sein des virus.....	98
Figure 35 : Vérification de l'incorporation des protéines IFITM3 au sein des virus.....	100
Figure 36 : Effet de l'incorporation des protéines IFITM3 sur l'infectiosité des virus	102
Figure 37 : Impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur la sensibilité des virus pseudotypés à certains bNAbs	106
Figure 38 : Impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur la sensibilité des virus pseudotypés à différents inhibiteurs d'entrée	106

Figure 39 : Corrélation entre la sensibilité des virus pseudotypés à IFITM3 et leur augmentation de sensibilité à PG16.....	108
Figure 40 : Impact des boucles V1V2 et V3 de Env sur la sensibilité des virus à IFITM3	108
Figure 41: Corrélation entre la sensibilité des virus pseudotypés par les Env parentales et chimériques à la restriction par IFITM3 et l'augmentation de la sensibilité à PG16.....	112
Figure 42 : Interaction entre Env et IFITM3 dans les cellules productrices	112
Figure 43 : Analyse en microscopie confocale de l'expression de Env et IFITM3 dans des cellules productrices de virus sensibles ou résistants à IFITM3.	116
Figure 44. Représentation du cluster de transmission étudié et les différents prélèvements.....	192

INTRODUCTION

Généralités

Découverte, classification et répartition géographique

Le VIH ou Virus d'ImmunoDéficiency Humaine a été découvert en 1983 à l'institut Pasteur par Françoise Barré-Sinoussi et ses collaborateurs qui l'identifient alors comme le LAV ou *Lymphadenopathy Associated Virus* (Barré-Sinoussi et al., 1983). Ce virus infecte les cellules immunitaires et à long terme est responsable de leur déplétion qui mène au Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquise (SIDA). Depuis le début de l'épidémie, plus de 39 millions de personnes sont décédées de maladies liées au VIH. En 2018, l'ONUSIDA recensait 37,9 millions de personnes infectées dans le monde, 1,7 millions de nouvelles infections et 770 000 décès liés à l'infection par le VIH (ONUSIDA, 2018).

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae* dont les membres présentent la particularité de rétro-transcrire l'ARN viral en ADN grâce à l'enzyme transcriptase inverse. La capacité du VIH à encapsider deux copies de son ARN génomique le classe au sein de la sous-famille des *Orthoretrovirinae*. Chez un hôte infecté, le stade SIDA se déclare après une longue période asymptomatique, ce qui fait du VIH un rétrovirus du genre *lentivirus* (*lenti* signifiant lent).

A l'heure actuelle, 2 types de VIH ont été décrits : le VIH-1 isolé en 1983 et responsable de la pandémie actuelle, et le VIH-2 isolé à l'institut Pasteur en 1986, moins virulent que le premier et essentiellement localisé dans des zones endémiques de l'Afrique de l'Ouest (Clavel et al., 1986).

Le VIH-1 est divisé en 4 groupes distincts en fonction de sa diversité génétique :

- Le groupe M (*Major* ou *Main*), premier groupe découvert en 1983, responsable de la pandémie mondiale
- Le groupe O (*Outlier*) identifié en 1990 (De Leys et al., 1990)
- Le groupe N (*New* ou non-M non-O) décrit en 1998 (Simon et al., 1998)
- Le groupe P, découvert plus tardivement en 2009 (Plantier et al., 2009).

La répartition géographique de ces 4 groupes varie au niveau mondial. En effet, seuls les virus du groupe M sont retrouvés dans le monde entier, les virus du groupe N sont, eux, endémiques à l'Afrique centrale et à l'Afrique de l'Ouest tandis que les virus des groupes O et P sont principalement d'origine camerounaise (Hemelaar, 2012; Mourez et al., 2013).

Chaque groupe de VIH-1 résulte d'une transmission indépendante d'un virus simien (*Simian Immunodeficiency Virus* ou SIV) du singe à l'Homme (Peeters et al., 2013). Le groupe M, responsable de la pandémie actuelle (95% des infections), se subdivise en 9 sous-types : A, B, C, D, F, G, H, J et K. Parmi ces sous-types, le sous-type C est responsable du plus grand nombre

d'infections dans le monde avec une prédominance en Asie, en Afrique centrale et subsaharienne. Le sous-type B quant à lui, est présent essentiellement en Europe et aux Etats-Unis tandis que le sous-type A est retrouvé en Europe de l'Est et en Asie centrale, les autres sous-types, eux, sont principalement localisés en Afrique (Hemelaar, 2012) (Figure 1). Outre ces différents sous-types, des formes recombinantes résultant d'une recombinaison d'au moins deux souches distinctes circulent actuellement, conduisant à une diversité génétique du virus très importante. Parmi ces formes recombinantes, les URF (*Unique Recombinant Form*), retrouvées chez un seul individu se distinguent des CRF (*Circulating Recombinant Form*) capables d'infecter plusieurs individus et d'initier une épidémie. A l'heure actuelle, plus d'une centaine de CRF ont été répertoriées (Los Alamos National Laboratory).

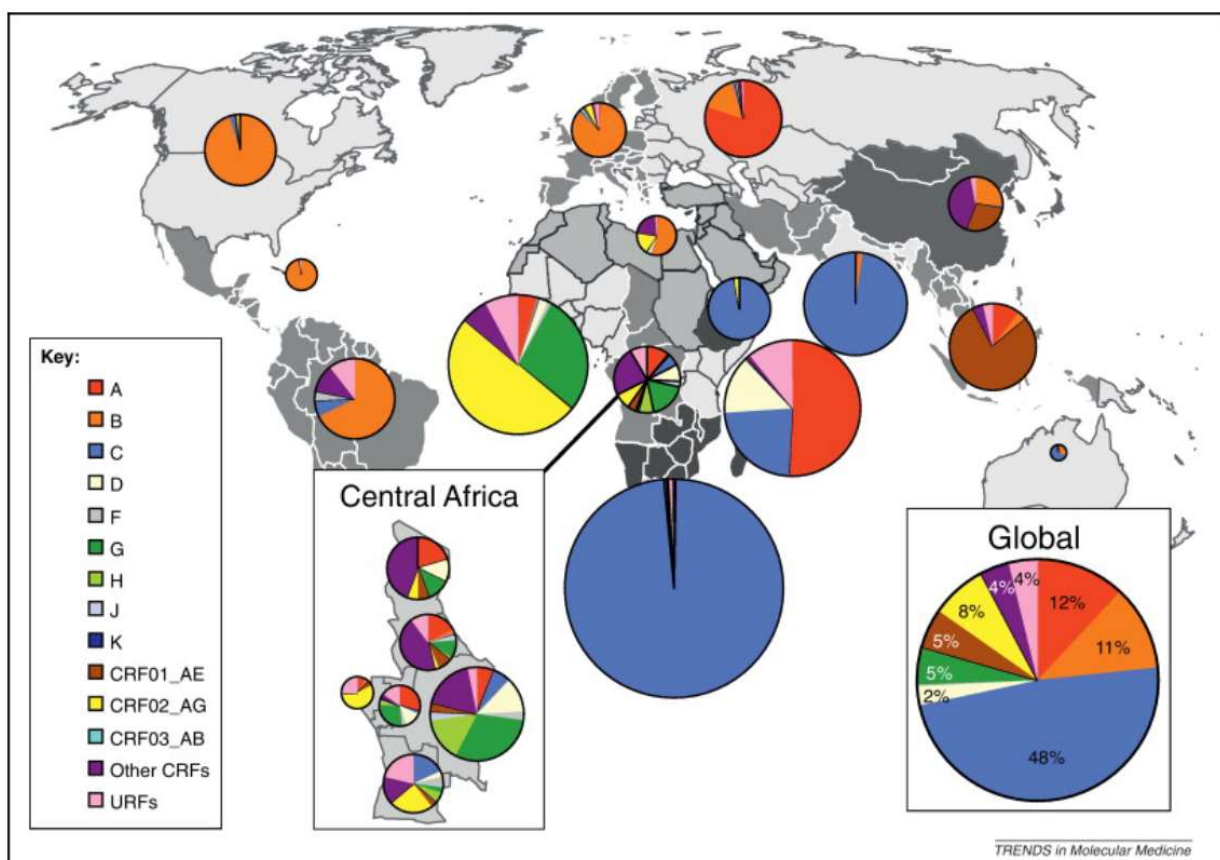


Figure 1 : Distribution mondiale des sous-types et formes recombinantes du VIH-1 de groupe M

La distribution mondiale entre 2004 et 2007 des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 du groupe M est représentée par un diagramme à secteurs dont la surface correspond au nombre de personnes infectées par le VIH-1. Chaque sous-type ou forme recombinante du VIH-1 du groupe M est représenté par un code couleur spécifique (d'après Hemelaar, 2012).

Le VIH-2 est lui aussi composé de plusieurs groupes génétiquement différents (9 groupes nommés de A à I) parmi lesquels seuls les 2 premiers groupes, le A et le B sont endémiques en Afrique de l'Ouest, les autres groupes étant très peu représentés (Visseaux et al., 2016). L'existence de ce nouveau type de VIH, le VIH-2, a été suspectée en 1985 chez des patients sénégalais qui présentaient un profil sérologique plus proche d'une infection par le SIV observée chez les macaques, que du VIH de type 1 (Barin et al., 1985). Ces différences importantes retrouvées entre les deux types de VIH ont

permis de poser l'hypothèse d'une origine distincte et d'une dérive à partir de différents virus simiens.

Origine du VIH

Au Gabon, en 1989, un rétrovirus a été isolé chez des chimpanzés de l'espèce *Pan troglodytes troglodytes* (*cpzPtt*) (Peeters et al., 1989). Des similitudes entre le rétrovirus isolé chez ces animaux, le SIVcpzPtt, et le VIH-1 ont permis d'émettre l'hypothèse d'une origine simienne du VIH-1 (Huet et al., 1990). Par la suite, des études phylogénétiques ont été réalisées et ont permis de montrer que des événements de transmission indépendants et inter-espèces ont conduit à l'émergence des différents types et groupes de VIH (Figure 2) (Tebit and Arts, 2011).

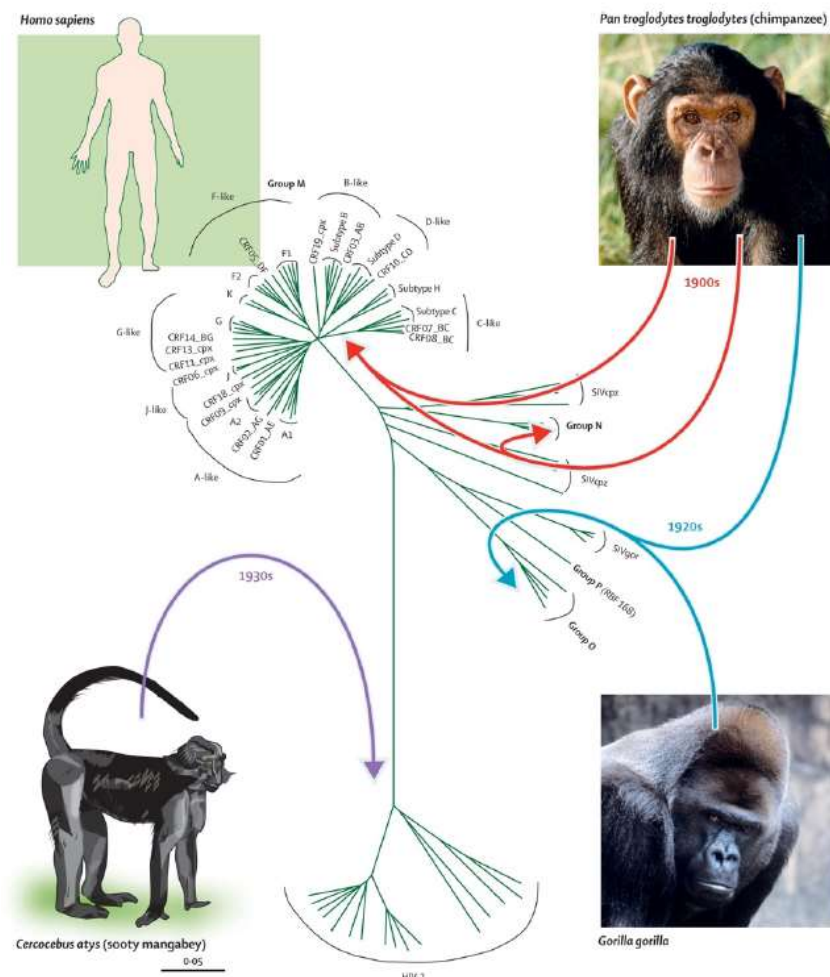


Figure 2 : Représentation phylogénétique des groupes du VIH-1 et du VIH-2 et des transmissions inter-espèces.

Les dates de transmissions estimées des souches de SIV provenant de différentes espèces simiennes à l'homme sont indiquées. La représentation phylogénétique permet de visualiser la diversité génétique des groupes M, N, O et P du VIH-1 et du VIH-2 (d'après Tebit and Arts, 2011).

Ainsi, les groupes M et N du VIH-1 résultent de deux événements de transmission indépendants entre le chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* et l'homme (Keele et al., 2006; Van Heuverswyn et

al., 2007) alors que les groupes O et P résultent eux de deux autres événements de transmission indépendants provenant des gorilles de l'espèce *Gorilla gorilla* (D'arc et al., 2015; Plantier et al., 2009). Les différents groupes du VIH-2 proviennent chacun d'un événement de transmission inter-espèce ayant comme source un autre primate, le Sooty mangabey (*Cercocebus atys*) (Hirsch et al., 1989).

L'analyse phylogénétique et évolutive du VIH-1 a permis de situer le point de départ de l'épidémie à Kinshasa (République Démocratique du Congo) dans les années 1920 (Faria et al., 2014). Les groupes M et O partagent ainsi la même histoire évolutive jusqu'en 1960, date à laquelle le groupe M s'est propagé à d'autres continents dont les Etats-Unis tandis que le groupe O est resté circonscrit au continent africain (Gilbert et al., 2007).

Diversité génétique

La diversité génétique du VIH-1 est bien représentée par les nombreux sous-types et formes recombinantes circulant à l'échelle mondiale mais également à l'échelle de l'individu par la présence des nombreux variants viraux retrouvés dans l'organisme. En effet, bien qu'un seul variant viral soit généralement transmis lors d'une infection naturelle, de nombreux variants génétiquement proches et organisés en « quasi-espèce » sont rapidement identifiés chez le sujet infecté quelques mois après la transmission (Li et al., 2010; Wei et al., 2003a).

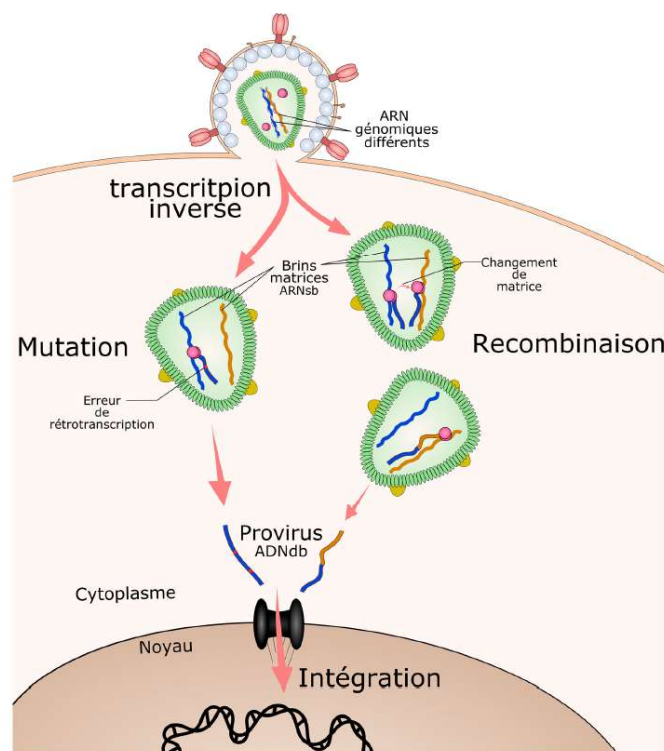


Figure 3 : Les mécanismes de diversité du VIH

Après décapsidation du virus, pendant l'étape de transcription inverse, des erreurs de rétrotranscription et des phénomènes de recombinaison conduisent à augmenter la diversité génétique (illustration de Beretta, 2018).

Cette grande diversité génétique du VIH-1 s'explique d'une part par des caractéristiques virales intrinsèques telles qu'un haut taux de mutation résultant de l'activité de la transcriptase inverse dépourvue de fonction correctrice, des événements de recombinaison entre variants conduisant à des virus chimériques et mosaïques, et un taux de réplication élevé (Figure 3) (Cuevas et al., 2015; Ramirez et al., 2008; Zhuang et al., 2002). D'autre part, des facteurs de l'hôte tels que la pression de sélection exercée par le système immunitaire du patient ou par les traitements antirétroviraux, contribuent également à l'émergence de cette quasi-espèce (Smyth et al., 2012).

Structure des particules virales matures

Le VIH-1 est un virus à ARN de 80 à 120nm de diamètre. Il est enveloppé d'une bicouche phospholipidique empruntée à la cellule hôte lors du bourgeonnement viral. A la surface de chaque virus se trouve une dizaine de spicules d'enveloppe formées par des trimères d'hétérodimères, soit trois sous-unités de surface gp120 associées à trois sous-unités transmembranaires gp41 (Figure 4) (Checkley et al., 2011; Zhu et al., 2003).

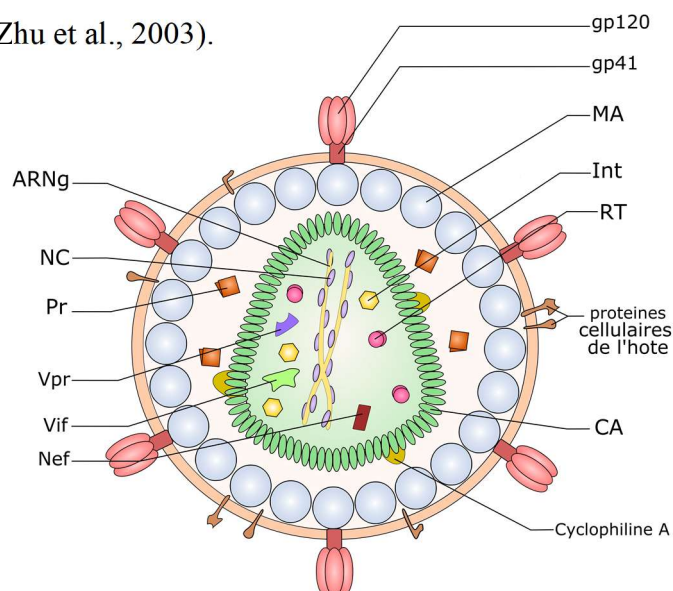


Figure 4 : Représentation schématique d'une particule virale mature

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine se compose d'une capside (CA) qui renferme l'ARN viral associé aux protéines de nucléocapside (NC), ainsi que les enzymes virales (RT et Int) et les protéines auxiliaires (Vpr, Vif, Nef). La capside est entourée d'une matrice virale (MA), elle-même enveloppée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (illustration de Beretta, 2018).

Directement liée au feuillet interne de la membrane virale, la matrice (MA), formée de l'oligomérisation d'environ 2000 copies de protéine p17, renferme la protéase virale p11 (Pr) ainsi que la capside virale (CA). La capside du VIH-1, retrouvée au centre du virion sous forme conique, est composée d'environ 1000 à 1500 copies de protéine p24 (Mateu, 2009). Elle renferme le génome viral composé de deux ARN monocaténares de polarité positive associés à deux nucléoprotéines p7 et p9 formant la nucléocapside (NC). Au sein de la capside se trouvent également des protéines

auxiliaires (Vif, Vpr et Nef) (Frankel and Young, 1998) et deux enzymes clés de la réplication virale, la transcriptase inverse (TI ou RT pour *Reverse Transcriptase*) et l'intégrase p32 (IN ou Int). Ces 2 enzymes permettent respectivement de convertir le génome viral ARN en ADN et d'intégrer ce dernier dans le génome de sa cellule cible.

Organisation génétique du virus

1) Génome viral

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,8Kb. Après l'étape de rétrotranscription et d'intégration dans le génome de la cellule cible, le génome viral se retrouve encadré par des séquences terminales répétées non codantes (LTR ou *Long Terminal Repeat*). Ces LTR contiennent en 5' le promoteur viral ainsi que l'ensemble des signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN proviral et en 3' les signaux de polyadénylation et de terminaison de la transcription (Freed, 2001; Peterlin and Trono, 2003).

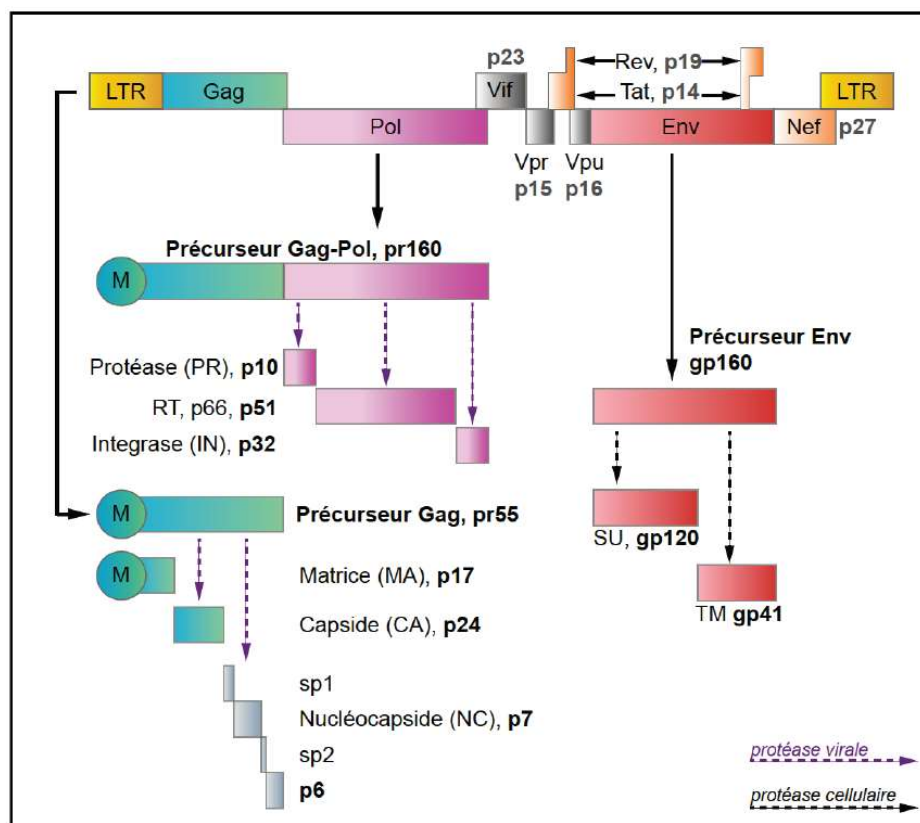


Figure 5 : Organisation génomique du VIH-1

Le génome viral intégré est encadré de séquences LTR et comporte trois gènes principaux *gag*, *pol* et *env*, quatre gènes auxiliaires *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* ainsi que deux gènes de régulation *rev* et *tat*. Après traduction, 15 protéines virales sont produites, les flèches pleines indiquent la traduction des trois précurseurs polyprotéiques. Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol est réalisé par la protéase virale (flèche pointillée violette) permettant la libération des protéines structurales et enzymes virales, tandis que le précurseur Env est clivé par une protéase cellulaire (flèche pointillée noire), pour donner les glycoprotéines gp120 et gp41 (d'après Peterlin and Trono, 2003).

Entre les deux régions LTR, le génome comprend 9 cadres ouverts de lecture se chevauchant partiellement (*Open Reading Frames*, ORFs) codant pour trois polyprotéines communes aux rétrovirus Gag, Gag-Pol et Env, deux protéines régulatrices Tat et Rev et quatre protéines auxiliaires Vif, Vpr, Vpu et Nef (Figure 5) (Frankel and Young, 1998).

Les précurseurs Gag et Gag-Pol seront clivés par la protéase virale afin de libérer les protéines structurales (matrice, capsid, nucléocapsid et p6) et les enzymes (protéase, intégrase et transcriptase inverse). Le précurseur Env est une glycoprotéine d'enveloppe immature gp160 qui sera clivée par une protéase cellulaire, la furine, pour donner la sous-unité de surface gp120 et la sous-unité transmembranaire gp41.

2) Les protéines de structure

Le gène *gag* code une polyprotéine précurseur de 55 kDa Gag (Pr55_{Gag}) qui après clivage par la protéase virale Pr, permet l'obtention de plusieurs protéines structurales : les protéines de matrice (17 kDa), de capsid (24 kDa), de nucléocapsid (7 kDa), du domaine p6 (6 kDa) et de deux peptides courts sp1 et sp2 (Bell and Lever, 2013). La traduction et le clivage de ce seul précurseur est suffisant pour entraîner un auto-assemblage en virion immature au niveau de la membrane plasmique de la cellule productrice (Gheysen et al., 1989). Ainsi, Pr55Gag est primordial pour initier et diriger le processus d'assemblage du VIH-1. La polyprotéine Gag peut également être produite comme une protéine de fusion Gag-Pol de 160 kDa lors d'un décalage du cadre de lecture ribosomique pouvant survenir dans 5% des cas (Briggs and Kräusslich, 2011).

La matrice de 17kDa se situe en N-terminal de la polyprotéine Gag et joue un rôle important dans son ancrage à la membrane plasmique. En effet, la matrice se lie directement au feuillet interne de la membrane plasmique grâce à l'ajout d'un radical myristyl post-traductionnel en N terminal ce qui permet l'orientation du côté C-terminal de Gag au centre du virion (Freed, 2015; Klein et al., 2007). De plus, la matrice interagit avec la queue cytoplasmique de la glycoprotéine d'enveloppe ce qui jouerait potentiellement un rôle sur l'incorporation d'Env dans les particules virales (Checkley et al., 2011; Freed, 2015).

Outre la protection du génome viral, la capsid de 24kDa interagit avec plusieurs facteurs de la cellule hôte permettant le transport du génome viral jusqu'au noyau (Campbell and Hope, 2015). Le domaine C terminal de la capsid contient une interface qui joue une part importante dans la multimérisation de Gag, en particulier au niveau de la région d'homologie majeure (MHR pour *Major Homology Region*), très conservée au sein de la sous-famille des *Orthoretrovirinae* dont fait partie le VIH (Gamble et al., 1997). Les différentes interactions entre les domaines N-terminal et C-terminal sont essentielles au processus d'assemblage (Li et al., 2007).

La nucléocapside de 7kDa contient deux domaines en doigt de zinc impliqués dans la reconnaissance du génome viral à ARN (Summers et al., 1992). En plus de sa fonction de liaison à l'ARN génomique, elle aide à l'assemblage du virion immature et à la transcription inverse (Bell and Lever, 2013).

De part et d'autre de la nucléocapside se trouvent deux courts peptides, Sp1 (*Spacer peptide 1*) et Sp2 (*Spacer peptide 2*). Le peptide d'espacement 1 (Sp1) joue un rôle dans l'assemblage de la capside et l'interaction Gag-Gag (Bell and Lever, 2013). En 5' du peptide d'espacement 2 (Sp2) se trouve le site responsable du décalage du cadre de lecture du ribosome permettant la formation du précurseur Gag-Pol.

En C-terminal de la polyprotéine Gag se trouve le domaine p6 qui est capable de se lier à la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) de la cellule hôte et de catalyser les étapes de fission membranaire pour terminer le processus de bourgeonnement viral (Carlton and Martin-Serrano, 2009; Huang et al., 1995). Au sein de ce domaine p6, une séquence conservée LXXLF est importante pour l'encapsidation de la protéine auxiliaire Vpr (Kondo and Göttinger, 1996).

Le gène *env* code une polyprotéine précurseur de 160 kDa, la gp160. Après clivage par une protéase cellulaire (la furine), cette polyprotéine conduit aux sous-unités des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1, les sous-unités de surface gp120 et transmembranaires gp41 (Checkley et al., 2011). Ces deux sous-unités vont interagir par des liaisons non covalentes afin de former les glycoprotéines d'enveloppe qui sont fonctionnelles sous forme de trimère d'hétérodimères, soit trois sous-unités de surface gp120 liées à trois sous-unités transmembranaires gp41. La bonne conformation de ces glycoprotéines d'enveloppe est cruciale puisque ce sont elles qui permettent la reconnaissance des récepteurs et corécepteurs cellulaires conduisant à l'entrée virale. Jouant un rôle central dans notre étude, nous reviendrons plus en détail sur ces glycoprotéines d'enveloppe ultérieurement.

3) Les enzymes virales

Le gène *pol* en phase avec le gène *gag* est initialement traduit en une polyprotéine précurseur Pr160Gag-Pol qui après clivage par la protéase virale génère les trois enzymes indispensables à la multiplication virale :

- La protéase Pr de 15 kDa fonctionnelle sous forme dimérique et dont le site d'activité enzymatique se trouve à l'interface de ces dimères (Frankel and Young, 1998);
- La transcriptase inverse qui est un hétérodimère formé des sous-unités p51 (transcriptase inverse) et p66 (transcriptase inverse + RNase H). Etant une ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse permet la synthèse d'ADN à

partir d'ARN viral, tandis que l'activité de la RNase H conduit à l'élimination de la matrice ARN du duplex ARN/ADN.

- L'intégrase (32 kDa) agit sous forme de multimères et permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée (Hu and Hughes, 2012).

4) Les protéines régulatrices

Tat et Rev sont deux facteurs viraux permettant la régulation de l'expression des gènes du VIH.

Tat (*Transactivator of transcription*) est une protéine de 14 kDa qui agit comme facteur activateur de la transcription. La transcription des gènes du VIH-1 est assez faible au niveau basal mais Tat a la capacité de l'augmenter de façon considérable (Dayton et al., 1986) en interagissant avec l'élément tige boucle TAR (*TransActivation Response element*) au sein du LTR5'.

Rev (*Regulator of viral gene expression*) est une phosphoprotéine de 19 kDa qui agit au niveau post-transcriptionnel en régulant l'export nucléaire des ARNm viraux non épissés ou partiellement épissés vers le cytoplasme (Karn and Stoltzfus, 2012).

5) Les protéines auxiliaires

Le génome du VIH-1 code également pour quatre protéines auxiliaires ou accessoires : Vif, Vpr et Nef, retrouvées encapsidées ainsi que Vpu non encapsidée. Ces protéines ne sont pas indispensables à la réplication du virus *in vitro* mais sont indispensables *in vivo*. En effet, ces protéines sont capables de contrecarrer et moduler certains facteurs cellulaires antiviraux permettant un échappement partiel aux mécanismes immunitaires innés mis en place par les cellules lors de l'infection par le VIH (Yamada et al., 2015).

Vif (*Viral infectivity factor*) est une protéine de 23 kDa dont l'un des rôles principaux est d'induire la dégradation des facteurs de restriction de la famille APOBEC (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide*). Ces derniers sont des cytidines désaminases qui induisent des hypermutations au sein du génome viral. La protéine Vif permet de contrecarrer ces facteurs antiviraux en polyubiquitinant les protéines APOBEC ce qui conduit à leur dégradation au sein du protéasome (Salter et al., 2014).

Vpr (*Viral protein r*) est une protéine multifonctionnelle de 14 kDa qui se retrouve encapsidée dans le virion par son interaction avec la région C-terminale du domaine p6 du précurseur Gag. La protéine Vpr possède des signaux de localisation nucléaire lui permettant de participer à la translocation nucléaire du complexe de pré-intégration PIC (*Pre Integration Complex*) (Sherman et al., 2001). En outre, Vpr induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 permettant ainsi une

transcription plus importante du virus tout en modulant la qualité de la transcription inverse (Guenzel et al., 2014).

Vpu (*Viral protein u*) est une phosphoprotéine membranaire de 16 kDa commune au génome du VIH-1 et à celui du SIVcpz. Elle entraîne notamment la dégradation des nouvelles molécules de CD4 synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et augmente le relargage des virions en antagonisant l'action du facteur de restriction Téthérine ou BST2 (Dubé et al., 2010).

Nef (*Negative Factor*) est une phosphoprotéine de 27 kDa associée à la membrane plasmique. Nef interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le trafic intracellulaire et module l'expression de nombreuses molécules à la surface cellulaire. Nef réduit notamment l'expression du récepteur CD4 à la surface cellulaire en interagissant avec celui-ci *via* une protéine adaptatrice AP, conduisant à l'endocytose du complexe formé et sa dégradation via le lysosome (Aiken et al., 1994; Lindwasser et al., 2007). Nef est également impliquée dans la diminution d'expression de CMH-1 (Complexe majeur d'histocompatibilité) à la surface et aurait un effet régulateur sur le récepteur des cellules T (TCR) (Abraham and Fackler, 2012).

Cycle de multiplication viral

Le cycle de réplication du VIH-1 peut se décomposer en deux grandes phases aboutissant à la production de virus infectieux en approximativement 48 heures. La phase précoce comprend l'attachement et l'entrée dans la cellule cible, la décapsidation, la transcription inverse et l'intégration au génome de la cellule hôte (Figure 6). La phase tardive inclut les événements permettant l'obtention de particules virales matures, c'est-à-dire la transcription des gènes viraux, leur traduction en protéines, l'assemblage, la maturation et le relargage des virions dans le milieu extracellulaire (Figure 7).

1) Les étapes précoces du cycle viral

a. Attachement aux cellules cibles et entrée virale

L'entrée du virus dans la cellule hôte est un mécanisme complexe qui démarre par un contact entre les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 et des molécules de surface cellulaires (Figure 6). L'adhésion virale consécutive à l'interaction avec les protéoglycanes de type héparane-sulfate peut être peu spécifique mais également très spécifique, comme lors de l'interaction avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ des lymphocytes T CD4⁺ des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (Arthos et al., 2008) ou avec la lectine DC-SIGN des cellules dendritiques (Geijtenbeek et al., 2000; McDonald et al., 2003). Cette première étape d'attachement permet le rapprochement des glycoprotéines d'enveloppe et du

récepteur cellulaire CD4 principalement présent sur les cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. L'adhésion virale est alors suivie de la fixation des sous-unités de surface gp120 des glycoprotéines d'enveloppe du virus avec le récepteur CD4 (Kwong et al., 1998).

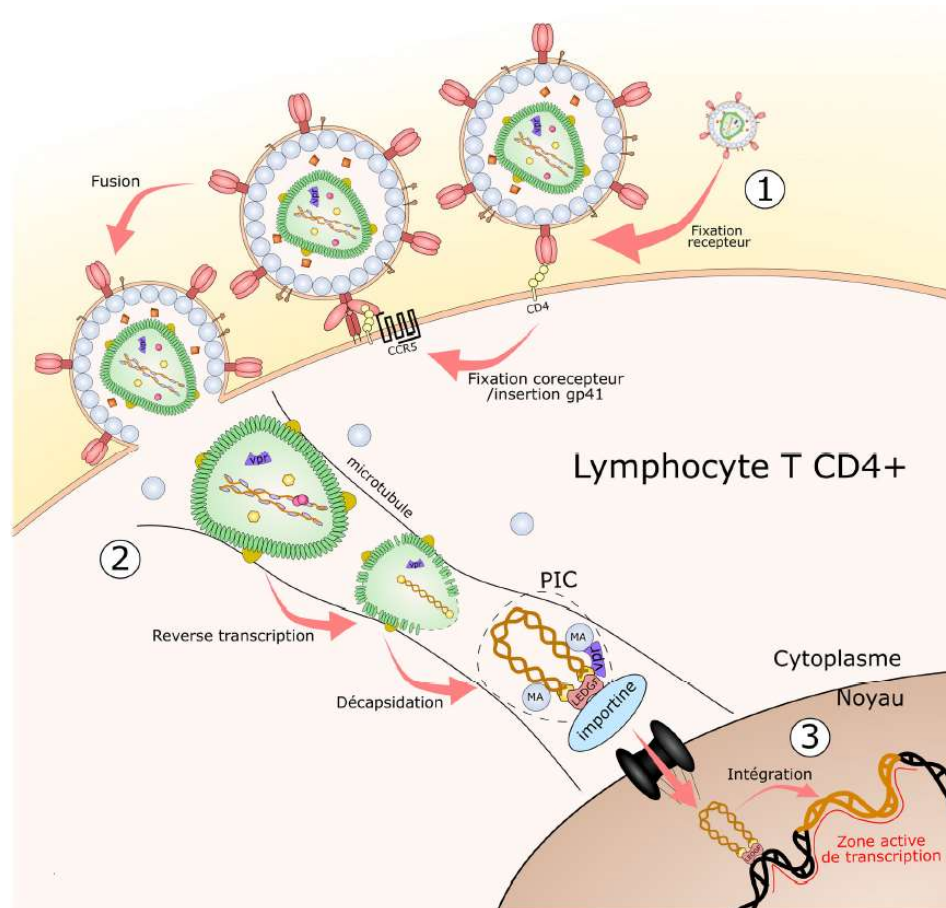


Figure 6 : Représentation schématique des étapes précoces du cycle viral du VIH-1

(1) Reconnaissance du récepteur CD4 à la surface de la cellule cible par la sous-unité gp120 de la glycoprotéine d'enveloppe entraînant un changement conformationnel de l'enveloppe permettant l'attachement au corécepteur CCR5 ou CXCR4. Cette double reconnaissance permet l'insertion du peptide de fusion de la gp41 de l'enveloppe dans la membrane plasmique de la cellule cible ce qui aboutit à la fusion des membranes virale et cellulaire. (2) Une fois la capside libérée dans le cytoplasme les étapes de rétrotranscription du génome viral ARN en ADNc bicaténaire et la décapsidation mènent à la formation du complexe de pré-intégration (PIC) qui permet le transfert du génome viral à l'intérieur du noyau. (3) L'intégration aura ensuite lieu préférentiellement dans une zone active de transcription (Illustration de Beretta, 2018).

Cette fixation induit un changement de conformation au niveau de l'enveloppe qui permet l'exposition de sa boucle variable V3, responsable de l'interaction avec les corécepteurs CCR5 (*C-C Chemokine receptor type 5*) et / ou CXCR4 (*C-X-C Chemokine receptor 4*) (Rizzuto et al., 1998; Shaik et al., 2019). L'engagement des corécepteurs induit un second changement conformationnel qui va permettre l'exposition du peptide de fusion de la gp41 et son insertion dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Un repliement des sous-unités gp41 entraîne le rapprochement des

membranes cellulaire et virale jusqu'à la formation du pore de fusion permettant la libération de la capsid dans le cytoplasme de la cellule hôte (Melikyan, 2008; Wilen et al., 2012) (Figure 6).

b. Décapsidation et transcription inverse

Après libération de la capsid virale dans le cytoplasme, le mécanisme de décapsidation (ou *uncoating*) doit avoir lieu afin de libérer le génome et les enzymes virales encapsidées, la transcriptase inverse et l'intégrase. Cette décapsidation correspond à la dissociation du réseau formé par la protéine de capsid p24 (Aiken, 2009) (Figure 6). La mécanistique et la chronologie de cet événement précoce restent encore controversés, mais de récentes études semblent confirmer que cette étape aurait majoritairement lieu au sein du noyau (Blanco-Rodriguez et al., 2020; Burdick et al., 2020; Dharan et al., 2020; Selyutina et al., 2020). Initialement, certaines études suggéraient que la décapsidation était un mécanisme passif qui avait lieu très rapidement après la libération de la capsid dans le cytoplasme (Bukrinsky, 2004; Dvorin and Malim, 2003; Grewe et al., 1990; Lehmann-Che and Saïb, 2004; Lukic et al., 2014; Suzuki and Craigie, 2007). Or, il a été plus récemment démontré que la capsid était essentielle à l'étape de transcription inverse et d'intégration, supportant l'hypothèse que la décapsidation n'avait pas lieu immédiatement après la fusion et que les étapes de transcription inverse comme de décapsidation étaient interdépendantes (Arhel, 2010). Actuellement, deux modèles sont proposés pour décrire cette étape, dans le premier modèle la capsid virale reste intacte jusqu'au pore nucléaire où le génome rétro-transcrit est transloqué au sein du noyau (Hulme et al., 2015). Dans le second modèle, la capsid perd son intégrité pendant son trajet de la membrane plasmique au pore nucléaire et seulement quelques protéines de capsid restent associées aux ribonucléoprotéines virales. Cette seconde hypothèse est renforcée par de récentes études démontrant que ce processus est dépendant du réseau de microtubules (Malikov and Naghavi, 2017). Des expériences d'imagerie en temps réel ont même pu mettre en évidence une déstabilisation des protéines de capsid dans les 30 minutes suivant l'entrée virale (Mamede et al., 2017). Plus récemment, plusieurs équipes ont mis en évidence que l'import nucléaire avait lieu très rapidement après l'entrée du virus dans la cellule hôte (moins de 5 heures) et qu'un « core » viral comprenant l'ARN et les protéines virales, reste pratiquement intact jusqu'à la translocation nucléaire (Burdick et al., 2020; Dharan et al., 2020). En effet, Burdick et coll. montrent que la transcription inverse commence dans le cytoplasme mais qu'elle a aussi lieu dans le noyau, où l'on trouve un complexe de pré-intégration encore associé à des protéines de capsid (Burdick et al., 2020; Dharan et al., 2020). Cette hypothèse est appuyée par les données de CLEM de l'étude de Blanco-Rodriguez et coll. qui montrent une association entre l'ADN rétro-transcrit et l'intégrase ainsi que des protéines de capsid au sein du noyau de la cellule hôte (Blanco-Rodriguez et al., 2020). Ainsi, ces auteurs posent l'hypothèse que la décapsidation et la transcription inverse seraient

complètes seulement une fois dans le noyau octroyant une protection supplémentaire pour le virus vis-à-vis des senseurs ADN du système immunitaire inné, et facilitant ainsi l'échappement du virus. De plus, les protéines de capsid auraient un lien direct avec la sélection des sites d'intégration au sein de l'ADN hôte (Burdick et al., 2020). Le génome viral sous sa forme de dimère d'ARN simple brin positif doit être rétro-transcrit en ADN double brin linéaire et transporté dans le noyau afin d'être intégré au sein du génome de la cellule hôte. Le mécanisme de transcription inverse est bien décrit même si le moment exact de son initiation reste controversé. Après libération de l'ARN viral, celui-ci s'associe avec la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN) afin de former le complexe RTC (*Reverse Transcription Complex*) ce qui permet de catalyser la transcription inverse (Warren et al., 2012). La TI est un hétérodimère composé de deux sous-unités, la p66 qui possède les activités catalytiques polymérase et RNase H, et un produit de protéolyse de la p66, la sous unité p51, qui a un rôle purement structural. La TI ou ADN polymérase ARN/ADN dépendante rétro-transcrit le génome ARN viral en ADN (-) et la RNase H digère la matrice ARN de l'hybride ARN-ADN généré lors de la réaction (Hu and Hughes, 2012). Enfin, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire (+) à l'ADN simple brin (-) afin de donner l'ADN bicaténaire appelé ADNc. Celui-ci reste associé avec certaines protéines virales et cellulaires afin de former le complexe de pré-intégration ou PIC (*Pre Integration Complex*) qui sera adressé au noyau (Figure 6).

c. Transport du PIC et intégration

Le complexe de pré-intégration ou PIC se compose de l'ADN double brin viral linéaire associé aux protéines virales MA, RT, IN, NC et Vpr et de protéines cellulaires telles que LEDGF et BAF1 (Maillot et al., 2013). La majorité de ces protéines possèdent des signaux de localisation nucléaire ou NLS (*Nuclear Localization Sequence*) leur permettant d'interagir avec la machinerie d'import nucléaire de la cellule. Le réseau de microtubules permet de diriger le PIC au niveau des membranes nucléaires et les importines α et β permettent la diffusion active du PIC à travers le pore nucléaire (Suzuki and Craigie, 2007). A l'intérieur du noyau, l'ADN viral bicaténaire et linéaire peut s'intégrer dans le génome de la cellule préférentiellement au niveau des zones actives de transcription grâce au facteur cellulaire LEDGF (Figure 6). L'activité endonucléase de l'intégrase permet le clivage des extrémités 3' de l'ADN viral lors du passage cytoplasmique afin qu'une fois au sein du noyau celui-ci s'insère de façon covalente dans le génome cellulaire que l'intégrase clive également. Ainsi, les extrémités 3'OH du génome viral sont liguées au génome de la cellule, tandis que les extrémités 5' phosphate sont appariées par les enzymes cellulaires de réparation de l'ADN (Delelis et al., 2008; Grandgenett et al., 2015).

2) Les étapes tardives du cycle viral

a. Transcription et traduction provirale

Une fois intégré au génome de la cellule hôte, le provirus se comporte comme un gène cellulaire dont la transcription dépend de l'action concomitante des facteurs viraux et cellulaires qui régulent l'activité du promoteur viral, le LTR5'. Au sein du LTR5', la région U3 permet le recrutement des protéines cellulaires activatrices de la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II). Les premiers ARNs transcrits seront épissés, générant ainsi des ARNs courts (environ 2 kb), comme ceux codant les protéines régulatrices Tat et Rev ou la protéine auxiliaire Nef (Figure 7). L'accumulation de Tat (*Transactivator of transcription*), capable de se fixer sur le domaine TAR d'un transcrit naissant induisant le recrutement d'un groupe de facteurs et cofacteurs cellulaires qui forme le complexe de super élongation (Liu et al., 2014), permet ensuite l'augmentation de la processivité de l'ARN polymérase, générant ainsi une grande quantité d'ARN génomiques (9 kb). Ces ARNs seront à l'origine aussi des ARN partiellement épissés (5kb). Les systèmes cellulaires ne permettent pas l'export des transcrits partiellement épissés ou non épissés, contenant donc de larges quantités d'introns. Pour contourner cela, la protéine régulatrice Rev se lie au motif RRE (*Rev Response Element*) présent sur ces transcrits et guide leur translocation dans le cytoplasme grâce à sa séquence d'export nucléaire (NES ou *Nuclear Export Sequence*) (Fernandes et al., 2012)(Figure 7).

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm sont traduits par la machinerie ribosomale cellulaire. Ainsi, les ARN multi-épissés sont les premiers à être traduits afin de produire les protéines régulatrices indispensables à la transcription des ARN non épissés et partiellement épissés dont la traduction ultérieure génère les polyprotéines Gag, Gag-Pol et le précurseur Env. Le clivage par la protéase virale des polyprotéines Gag et Gag-Pol permet d'obtenir les différents composants structuraux (protéines de matrice, de capsid et de nucléocapsid) et enzymatiques (l'intégrase, la transcriptase inverse, la protéase) nécessaires à la formation d'un virion. Le précurseur Env est traduit sous forme d'enveloppe immature, gp160, au niveau du Réticulum Endoplasmique Rugueux (RER) où elle suivra la voie sécrétoire des protéines cellulaires. Pendant sa migration du RER à la membrane plasmique, l'enveloppe est glycosylée et clivée par une protéase cellulaire permettant l'obtention des deux domaines fonctionnels de Env, la sous-unité de surface gp120 et la sous-unité transmembranaire gp41 qui vont s'assembler au sein des membranes cellulaires sous forme de trimères d'hétérodimères gp120/gp41 pour donner l'enveloppe virale mature (Figure 7).

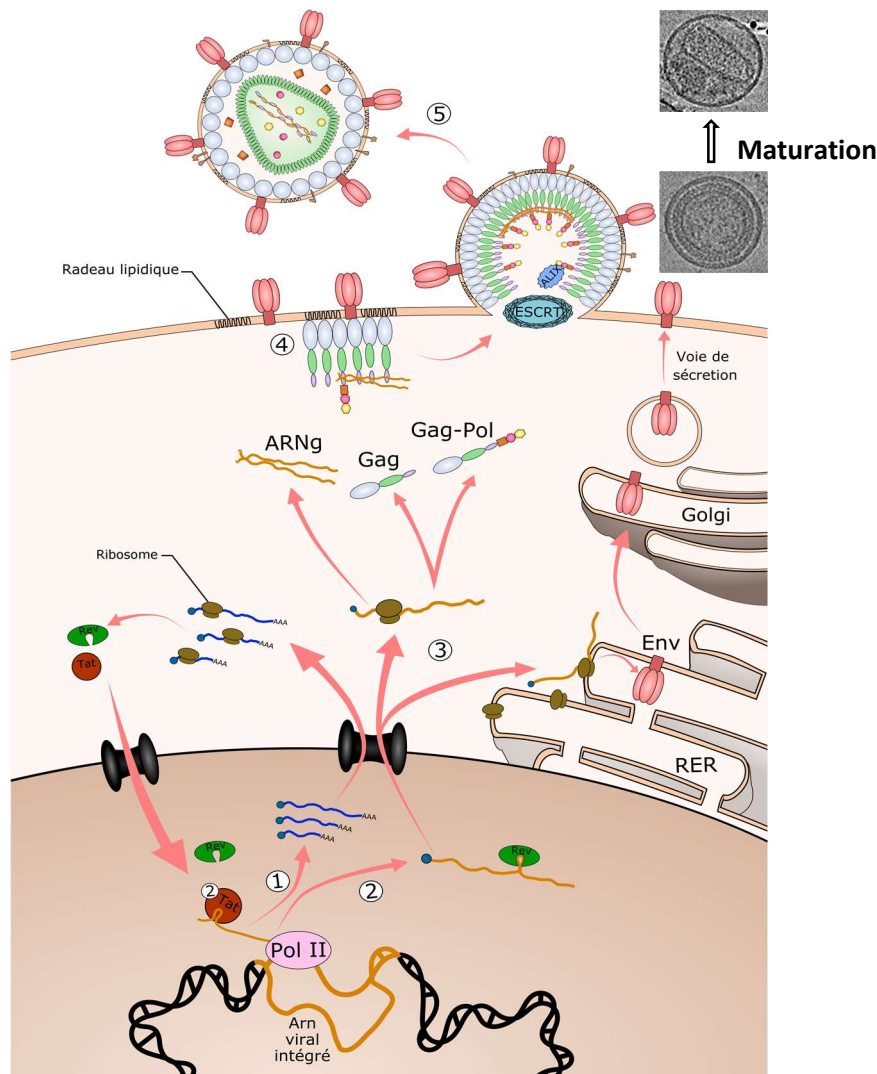


Figure 7 : Représentation schématique des étapes tardives du cycle viral du VIH-1.

(1) Après intégration du génome viral, la polymérase cellulaire transcrit les petits ARN viraux multi-épissés codant Rev et Tat. Ces protéines régulatrices vont être importées dans le noyau grâce à leur signal de localisation nucléaire (NLS). (2) Tat se fixe sur la région 5' LTR des ARN naissants permettant l'élongation de la transcription et la synthèse des ARNm épissés et de l'ARN génomique viral. (3) L'ARN non épissé est exporté hors du noyau grâce à son interaction avec la protéine Rev puis traduit par les ribosomes de la cellule hôte en polyprotéines Gag, Gag-Pol ou exporté au niveau du réticulum endoplasmique pour la traduction de l'enveloppe. Après l'exportation, le domaine matrice de Gag permet l'ancrage à la membrane plasmique, tandis que l'ARN génomique interagit avec la nucléocapside et l'enveloppe est envoyée à la membrane plasmique de la cellule en suivant la voie de sécrétion cellulaire. (4) L'assemblage de la particule se fait préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques où l'assemblage des polyprotéines Gag/Gag-Pol permet la formation de bourgeons. La machinerie ESCRT de la cellule hôte est nécessaire pour permettre la séparation des membranes virale et cellulaire. (5) Une fois le virion immature libéré, la protéase virale clive les polyprotéines Gag et Gag-Pol afin de former une particule virale mature (Illustration de Beretta, 2018 et Sundquist and Kräusslich, 2012).

b. Assemblage et bourgeonnement viral

L'assemblage viral est un mécanisme nécessitant la coordination de plusieurs acteurs viraux, Gag, Gag-Pol, Env et l'ARN viral qui doivent se trouver ensemble à la membrane plasmique afin de former des nouvelles particules virales infectieuses (Figure 7). Les trimères d'enveloppe matures et fonctionnels de même que les précurseurs Gag et Gag-Pol se retrouvent au niveau de domaines

membranaires à composition particulière, de type radeaux lipidiques (*lipid-rafts*), au sein de la membrane plasmique de la cellule infectée (Hawkes et al., 2015; Ono and Freed, 2001). Le recrutement des composants viraux sur ces sites est médié par le précurseur Gag, chacun de ses domaines jouant un rôle précis lors de l'assemblage viral. Un domaine N-myristoylé au niveau de la matrice permet son ancrage à la membrane plasmique tandis que le domaine Nucléocapside (NC) permet l'interaction de Gag avec le signal d'encapsidation (ψ -élément) des ARN viraux non épissés dimériques (Abd El-Wahab et al., 2014; De Guzman et al., 1998). La multimérisation des précurseurs Gag et Gag-Pol au niveau de la membrane plasmique se fait *via* leurs domaines matrice et capsid, conduisant à la formation d'une structure protéique membranaire de forme sphérique qui entoure un ARN viral dimérisé interagissant avec les domaines NC. Ce réarrangement de Gag permet ainsi la formation de bourgeons viraux immatures. La machinerie cellulaire ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) est nécessaire pour compléter l'étape de bourgeonnement. Le domaine p6 de Gag interagit avec des protéines cellulaires (ALIX et TSG-1) capable de recruter les protéines du complexe ESCRT-III qui vont s'assembler à la base du bourgeon formé et en rapprocher les deux extrémités jusqu'à leur fusion libérant ainsi la particule virale immature (Sundquist and Kräusslich, 2012) (Figure 7).

c. Maturation des particules virales

Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, les particules virales immatures subissent un réarrangement morphologique dû à la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol. La protéase virale sous sa forme active, dimérique, est capable de cliver ces deux précurseurs de façon séquentielle permettant la libération de leurs domaines protéiques respectifs. La particule virale mature se compose d'une première couche formée par les protéines de matrice qui reste associée au feuillet interne de la membrane virale tandis que les nucléocapsides restent associées avec l'ARN viral dimérique formant ainsi un complexe ribonucléique, lui-même entouré d'un maillage de protéines p24 formant la capsid virale (Freed, 2015). Après ces réarrangements morphologiques la particule virale est mature et capable d'infecter de nouvelles cellules cibles ce qui marque la fin du cycle viral (Figure 7).

Physiopathologie de l'infection

La majorité des infections par le VIH sont dues à une transmission sexuelle (dans 80% des cas) mais ce virus peut également être transmis par voie parentérale notamment lors du partage de seringues souillées chez les usagers de drogues ou encore *via* une transmission mère-enfant (materno-foetale, périnatale ou par l'allaitement maternel) (Cohen et al., 2011). Quelle que soit la voie de transmission,

l'infection se développe en trois phases distinctes, la phase aiguë ou de primo-infection, la phase asymptomatique ou chronique puis la phase symptomatique appelé Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise ou SIDA.

1) La phase aiguë ou primo-infection

La phase aiguë ou de primo-infection débute dès la transmission du virus, dure entre 3 et 12 semaines et s'accompagne de manifestations cliniques peu spécifiques proches d'un syndrome grippal ou d'une mononucléose. Pendant les 7 à 10 premiers jours correspondant à la « phase d'éclipse », le virus reste indétectable dans le plasma. Il se réplique localement dans les lymphocytes T CD4 (LT CD4+) constituant la cible majoritaire du VIH mais aussi dans les macrophages et les cellules dendritiques présents au niveau des muqueuses, sous muqueuses et vaisseaux lymphatiques du lieu d'infection primaire (Hladik and McElrath, 2008; Shaw and Hunter, 2012). Il s'ensuit une dissémination rapide du virus dans l'organisme, en particulier au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale (GALT (*Gut-associated lymphoid tissue*) qui deviennent les réservoirs permanents du virus. Sur le plan virologique, la phase de primo-infection se caractérise par une réplication virale très active (Figure 8). Cette expansion virale conduit à la détection du virus dans différents fluides corporels tels que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et le lait maternel à des charges virales élevées responsables d'un risque élevé de transmission. Sur le plan immunologique, la réplication virale active entraîne une chute rapide des LT CD4+ circulants mais également des LT CD4+ présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires colonisés par le virus. Cette baisse de LT CD4+ est transitoire, puisqu'en réponse à l'infection, l'immunité humorale et cellulaire entrent en jeu et permettent la production d'anticorps anti-VIH et la multiplication des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques entraînant ainsi une baisse de la virémie et une augmentation des LT CD4+ périphériques (Cohen et al., 2011). La phase aiguë se termine lorsque le taux de LT CD4+ se stabilise après une légère remontée et lorsque la virémie diminue en se stabilisant à un niveau variable selon les individus (Figure 8).

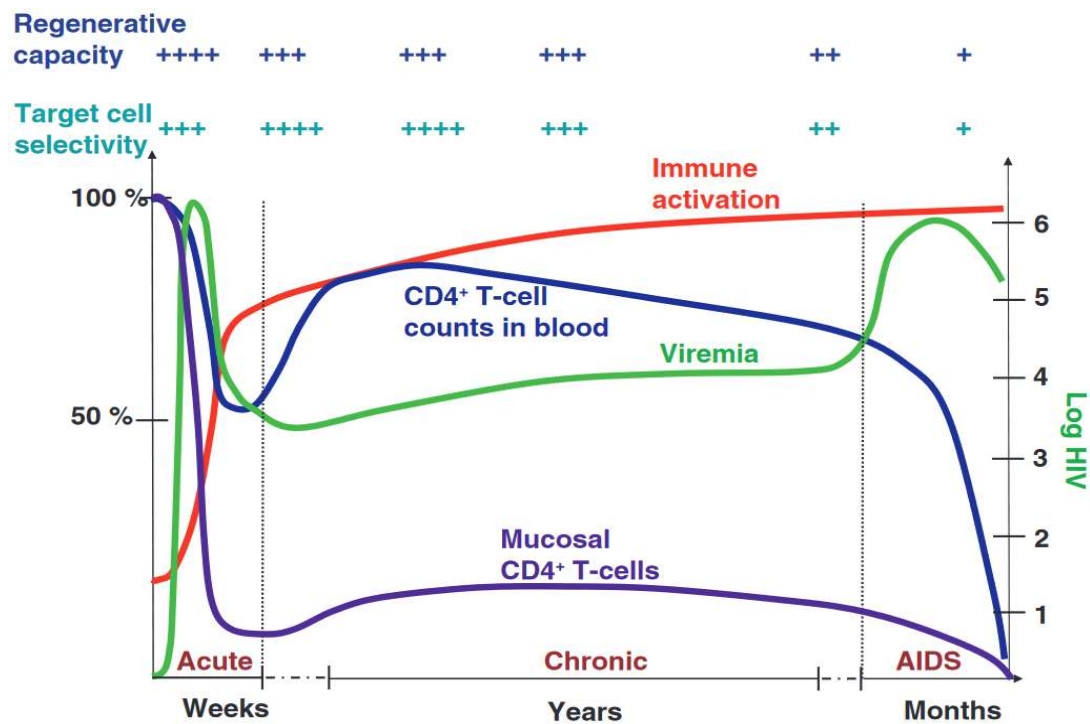


Figure 8 : Progression de l'infection naturelle par le VIH-1

Les trois phases de l'infection par le VIH-1, la primo-infection, la phase chronique et le stade SIDA, sont caractérisées par l'évolution au cours du temps de la virémie (charge virale plasmatique en vert) et du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants (en bleu) ou au niveau des muqueuses (en violet). Une activation immunitaire globale est observée très tôt après la primo-infection et reste stable ensuite au cours des 3 phases de l'infection (en rouge) (d'après Grossman et al., 2006).

Une classification des différents stades de l'infection aiguë en fonction de l'apparition des marqueurs virologiques a été proposée en 2003. Elle est encore utilisée aujourd'hui lors du diagnostic. La phase I de cette classification correspond à l'éclipse, la phase II à la détection possible de l'ARN viral (par RT-qPCR), la phase III à la détection de l'antigène p24 (par ELISA) et la phase IV à la détection des anticorps anti-VIH (ELISA et/ou Western Blot) (Fiebig et al., 2003) (Figure 9).

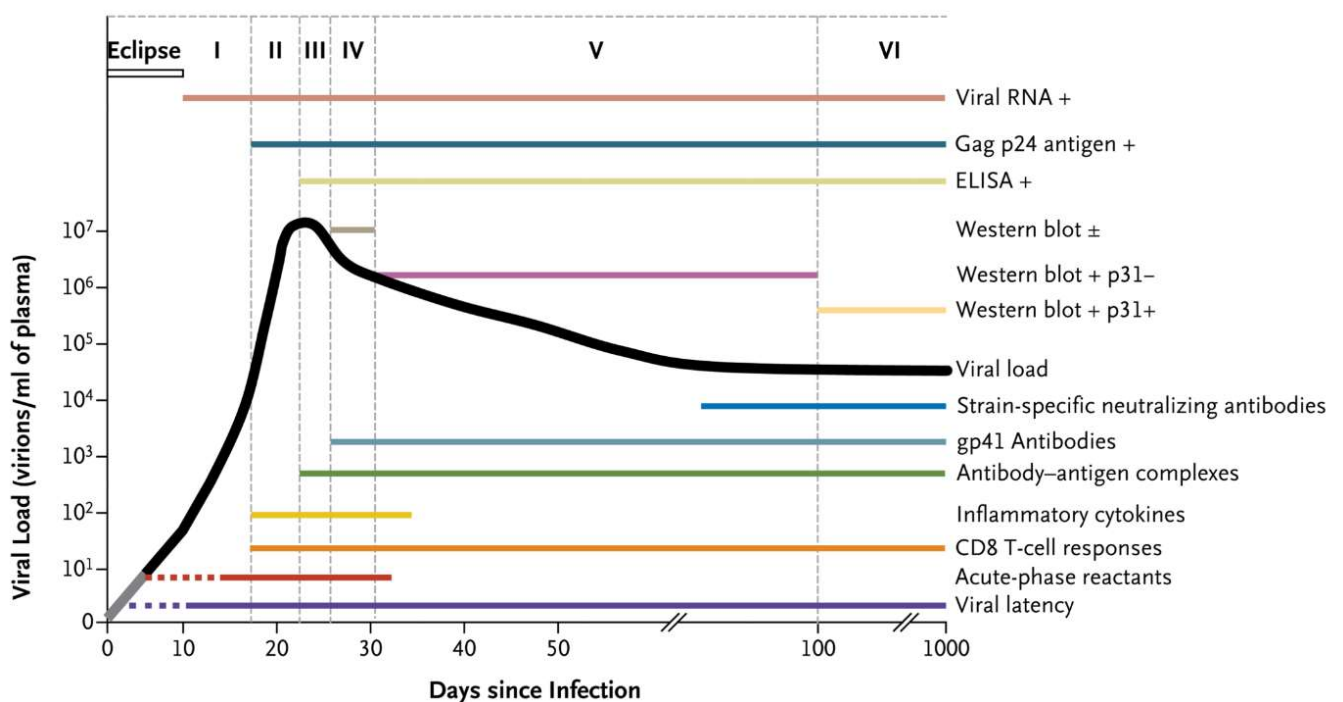


Figure 9 : Classification de Fiebig des différents stades de l'infection par le VIH-1

La progression de l'infection par le VIH-1 peut être classifiée en six phases distinctes définies en fonction de l'apparition séquentielle de certains marqueurs biologiques. La phase I correspond à la phase d'éclipse, la phase II démarre dès l'apparition de l'ARN viral plasmatique, la phase III avec la détection de l'antigène de capsid (p24) et la phase IV lors de la détection des autres anticorps anti-VIH-1 (d'après Cohen et al., 2011).

2) La phase asymptomatique ou chronique

La phase chronique démarre lorsque la virémie se stabilise (Figure 8). Elle correspond à une phase asymptomatique dont la durée varie selon les individus : moins de 3 ans pour les « progressseurs rapides » (5% des individus), 7 à 10 ans pour les « progressseurs typiques » (90% des individus), à plus de 10 ans chez les « progressseurs lents ». A ces trois catégories de patients s'ajoutent les « *elite controllers* » capables de contrôler efficacement (charge virale indétectable) et durablement l'infection grâce à une réponse T cytotoxique plus large et plus efficace (Walker, 2007). Pendant cette phase, des réservoirs de cellules contenant le génome viral intégré à l'état latent se forment au niveau des tissus lymphoïdes mais également au niveau de cellules circulantes. Les contacts étroits entre les cellules cibles largement abondantes dans ces réservoirs ainsi que la charge virale élevée localement favorisent la propagation silencieuse du virus. Globalement, la charge virale plasmatique reste relativement faible même si elle entraîne une diminution lente et progressive du nombre de LT CD4⁺ dans le sang circulant, jusqu'à descendre sous le seuil « normal » et atteindre des valeurs critiques entre 500 et 350 CD4⁺/mm³.

3) La phase SIDA

La phase SIDA est due à l'épuisement du système immunitaire du patient infecté, ce qui se caractérise par une déplétion en lymphocytes T cytotoxiques mais également en LT CD4⁺ dans le sang, dont le nombre passe sous le seuil critique de 200/mm³ (Figure 8). Cet épuisement du système immunitaire favorise la réplication virale et la charge virale plasmatique augmente rapidement. Les patients au stade SIDA sont donc immunodéprimés et susceptibles de développer des complications tumorales et/ou des infections opportunistes d'origine bactérienne, virale, fongique ou parasitaire, qui peuvent leur être fatales (Grossman et al., 2006).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Biosynthèse et maturation

Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous forme de précurseurs gp160 (de 833 à 900 acides aminés). Ces précurseurs se retrouvent au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) grâce au peptide signal présent sur leur partie N-terminale (Checkley et al., 2011). Cet adressage permet aux glycoprotéines d'enveloppe de rejoindre la voie sécrétoire cellulaire afin d'être transportées jusqu'à la membrane plasmique où elles pourront être incorporées au sein des virions néoformés. Suite à leur synthèse, les précurseurs gp160 subissent de nombreuses modifications post traductionnelles telles que la formation de ponts disulfures et des glycosylations permettant ainsi le repliement correct des glycoprotéines d'enveloppes matures. Les précurseurs subissent majoritairement des glycosylations de type N-glycosylation (peu de O-glycosylation observées), avec ajout de N-glycanes sur des résidus asparagine présentant un motif N-X-S/T (X étant n'importe quel acide aminé excepté la proline) (Leonard et al., 1990; Raska et al., 2010). Au sein des séquences d'enveloppe, ces résidus asparagine susceptibles d'être N-glycosylés sont appelés PNGS pour *Potential N-linked Glycosylation Sites*. La N-glycosylation démarre au niveau du RE par l'ajout de molécules de type Glc3Man9GlcNAc2 sur les PNGS. La glycosylation intensive du précurseur ainsi que l'action de l'enzyme disulfide isomérase contribuant à la formation de ponts disulfures, permettent le bon repliement des précurseurs protéiques. Les monomères de gp160 correctement repliés s'oligomérisent ensuite principalement sous forme de trimères (bien que quelques dimères ou tétramères puissent être observés) ce qui facilite leur migration vers l'appareil de Golgi. Au sein du Golgi, les motifs glycosidiques synthétisés dans le RE sont ensuite maturés par des enzymes cellulaires afin de former des N-glycanes de type « high-mannose » ou complexes qui aboutissent à une glycoprotéine d'enveloppe glycosylée d'une masse moléculaire d'environ 160kDa (Figure 10).

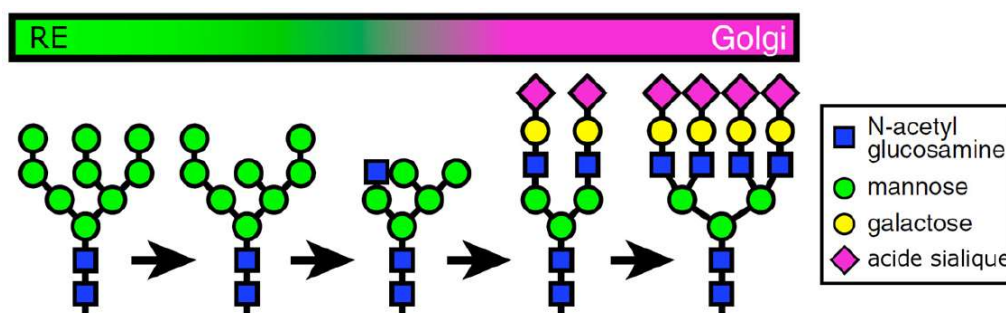


Figure 10 : Processus de N-glycosylation.

Les glycanes sont ajoutés dans le RE au niveau de l'asparagine de motif N-X-S/T sous leur forme Glc3Man9GlcNAc2, puis subissent ensuite des étapes de maturation, de repliements, de modifications des sucres de leur chaîne glycosidique mais également la formation de ponts disulfures. Au niveau de l'appareil de Golgi, d'autres modifications ont lieu comme l'ajout de N-acetyl glucosamine, de mannose, de galactose, d'acide sialique, etc (d'après Yolitz et al., 2018).

Cette glycoprotéine d'enveloppe maturée et correctement repliée subit ensuite un clivage par une endoprotéase cellulaire de type furine au niveau du motif K/R-X-K/R-R situé dans la région constante C5 de la gp160 ce qui aboutit à la formation des sous-unités de surface gp120 et transmembranaire gp41 (Freed et al., 1989). Ces deux sous unités restent liées de façon non covalente et s'associent en trimères d'hétérodimère, soit trois gp120 liées à trois gp41 pour former les spicules d'enveloppe. Lorsque ces complexes trimériques se trouvent à la surface de la cellule, s'ils ne sont pas rapidement incorporés au sein des virions en formation, ils sont recyclés par endocytose clathrine dépendante limitant ainsi leur exposition au système immunitaire (Figure 11).

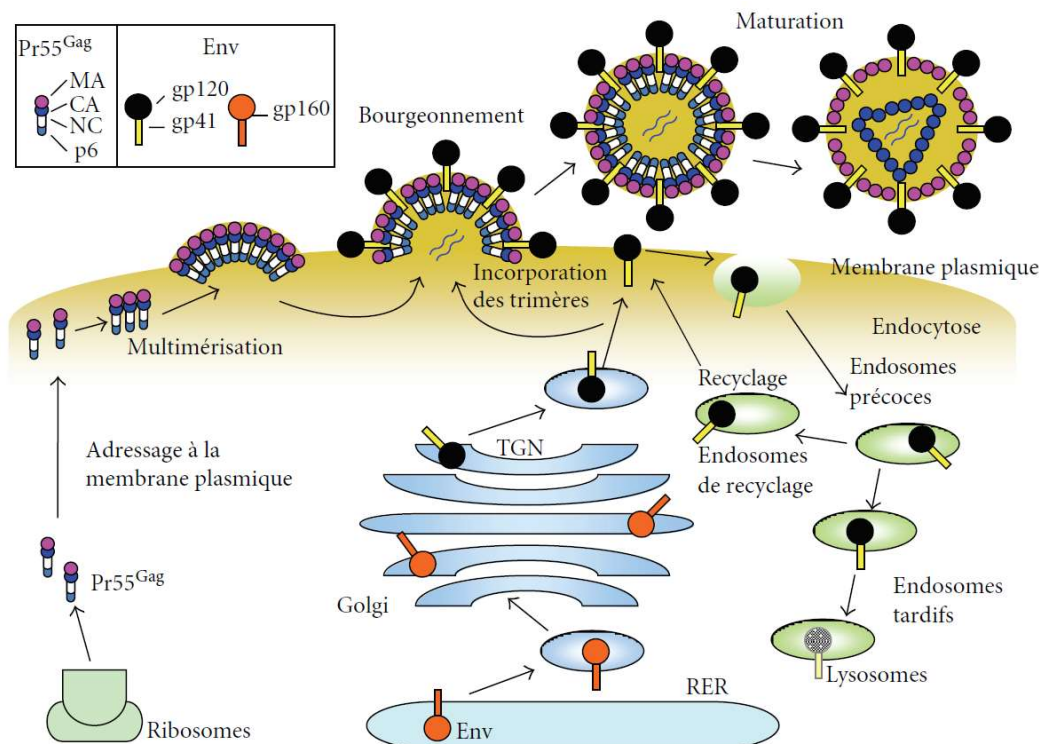


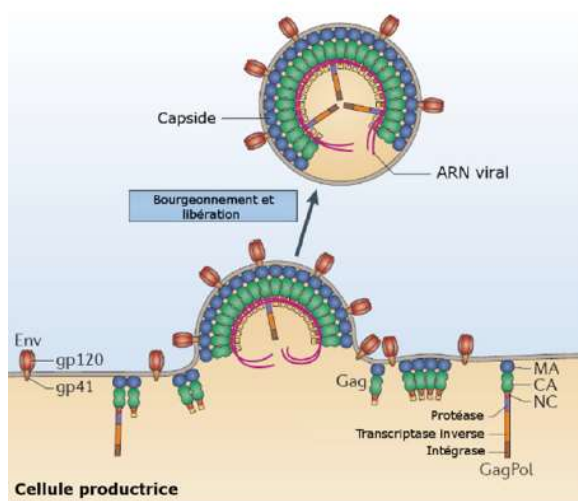
Figure 11 : Biosynthèse et trafic intracellulaire des glycoprotéines d'enveloppes et de Gag

Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées et glycosylées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) sous la forme de précurseurs gp160 qui s'oligomérisent en trimères. Le précurseur Pr55Gag est synthétisé dans le cytoplasme de la cellule infectée et est adressé à la membrane plasmique où il se multimérise. Les oligomères de gp160 sont transportés vers l'appareil de Golgi et traversent le réseau trans-Golgien (TGN) où les précurseurs gp160 sont alors clivés par la protéase cellulaire, la furine, en sous-unités gp120 et gp41. Ces hétéro-trimères empruntent les voies sécrétrices cellulaires jusqu'à la membrane plasmique où ils sont incorporés sous forme de spicules d'enveloppe au sein des particules virales. Un système d'internalisation des trimères existe afin d'éviter une exposition prolongée des spicules à la surface cellulaire. Les trimères non incorporés au sein des virions sont internalisés par endocytose, où ils seront envoyés vers les endosomes tardifs afin d'être dégradés dans des lysosomes ou retourneront à la membrane plasmique grâce aux endosomes de recyclage (d'après Murakami, 2012).

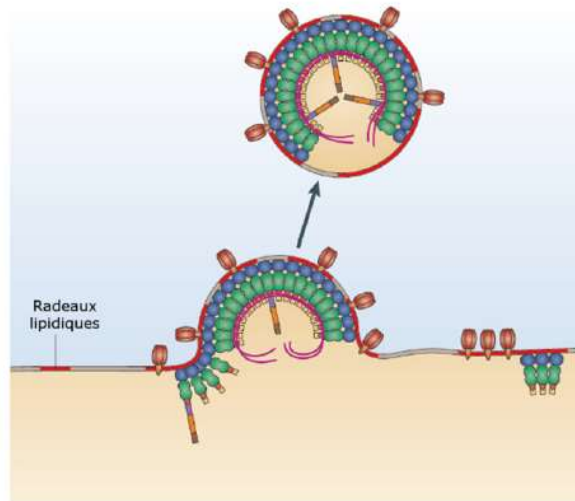
Jusqu'alors aucun consensus quant à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe au sein des particules virales n'a pu être trouvé mais quatre modèles d'incorporation distincts et non mutuellement exclusifs sont proposés (Checkley et al., 2011; Freed, 2015; Murakami, 2012) (Figure 12).

- Le modèle « passif » qui repose sur une incorporation aléatoire et passive, dans lequel l'enveloppe est incorporée de façon non spécifique du fait de sa présence au niveau de la membrane plasmique sans intervention d'autres acteurs viraux ou cellulaires.
- Le modèle Gag-Env dans lequel ces deux polyprotéines seraient co-recrutées à la membrane plasmique au niveau d'une plateforme d'assemblage de type radeaux lipidiques.
- Le modèle d'interaction directe entre la sous unité gp41 de Env et le domaine matrice de Gag.
- Le dernier modèle repose sur une interaction indirecte entre Env et Gag par le biais de protéines cellulaires intermédiaires qui favoriseraient l'incorporation de Env dans les particules virales.

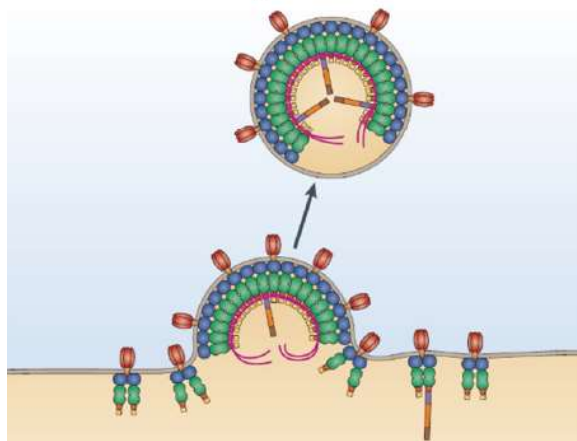
A. Incorporation passive



B. Interaction à un site d'assemblage



C. Interaction direct Gag-Env



D. Indirect interaction Gag-Env

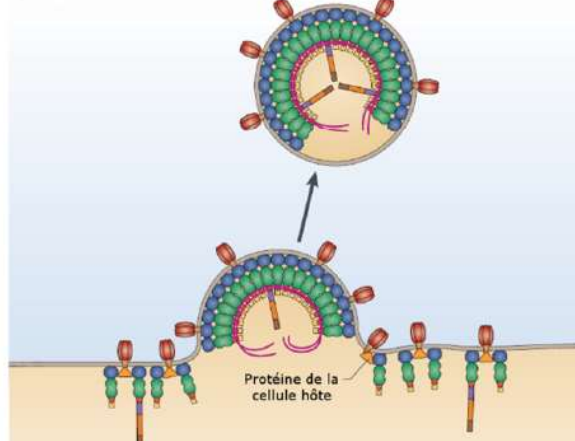


Figure 12 : Les différents modèles d'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe

A. Incorporation passive de l'enveloppe au sein des particules virales. **B.** Localisation de Gag et Env à un site d'assemblage membranaire (de type radeaux lipidiques). **C.** Interaction directe entre la MA de Gag et la queue cytoplasmique de la gp41. **D.** Interaction indirecte entre MA et la gp41 par l'intermédiaire de facteurs cellulaires (d'après Freed, 2015).

Structure des glycoprotéines d'enveloppe

1) Structure primaire/secondaire

La sous-unité de surface gp120 est une glycoprotéine de 120 kDa, composée d'environ 500 aa et constituée de 5 domaines variables V1 à V5 séparés par des régions plus constantes (C1 à C5) (Willey et al., 1986) (Figure 13).

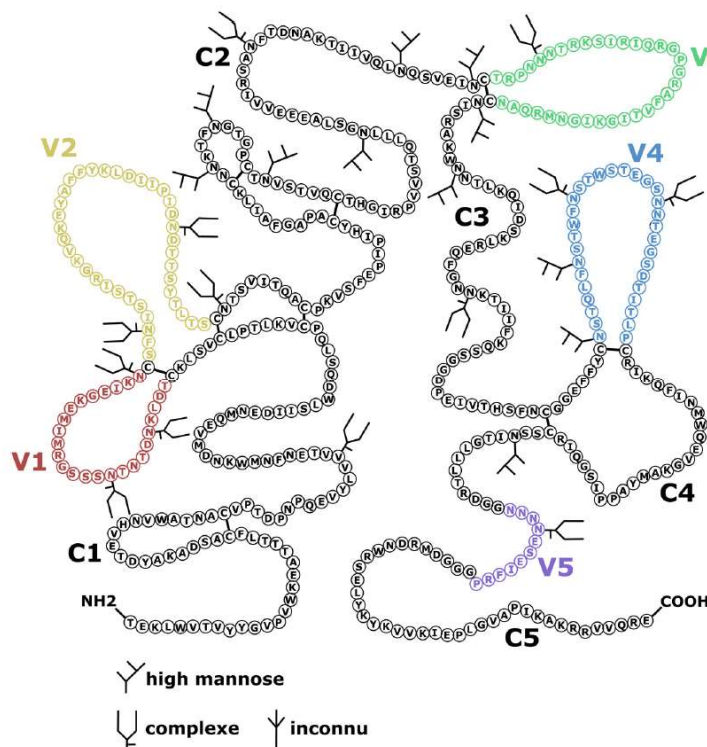


Figure 13 : Structure secondaire de la gp120 du virus modèle HbX2

Les boucles variables V1 à V5 sont représentées par différentes couleurs. Les sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués par des ramifications à l'endroit des motifs N-X-S/T et les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures sont représentées en noir (adapté de Zolla-Pazner, 2004).

Certains résidus cystéine fortement conservés au sein de la gp120 permettent la formation de ponts disulfures indispensables à la structure tertiaire de l'enveloppe (Leonard et al., 1990). La sous unité gp120 possède un nombre variable de sites de N-glycosylation (entre 20 et 35) représentant environ la moitié de son poids moléculaire. Les régions V1 et V2 de cette glycoprotéine sont les plus variables en longueur et en nombre de PNGS, conférant à l'enveloppe une certaine capacité d'échappement à la réponse immunitaire humorale (Checkley et al., 2011). La boucle V3 est une région semi-conservée constituée de 30 à 35 acides aminés, qui joue un rôle majeur dans l'entrée virale en particulier *via* son interaction avec les corécepteurs du VIH (Freed et al., 1991; Hwang et al., 1991). Cette boucle V3 est directement impliquée dans le tropisme du virus en interagissant avec les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4 selon la séquence d'acides aminés présente au sein de la boucle (Hartley et al., 2005). A noter que les boucles V1 et V2 seraient également impliquées dans ce tropisme cellulaire mais dans une moindre mesure (O'Brien et al., 1990). Les régions constantes C1

et C5 interagissent avec la gp41 tandis que C2, C3 et C4 forment le core de la gp120, site majeur abritant les domaines de liaison au CD4 (Julien et al., 2012; Pantophlet and Burton, 2006).

La sous-unité transmembranaire gp41, est une protéine de 41kDa, composée d'environ 345 aa et qui possède une séquence plus conservée que la gp120. Cette protéine est organisée en trois domaines distincts : un domaine extracellulaire ou ectodomaine (EC), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Figure 14).

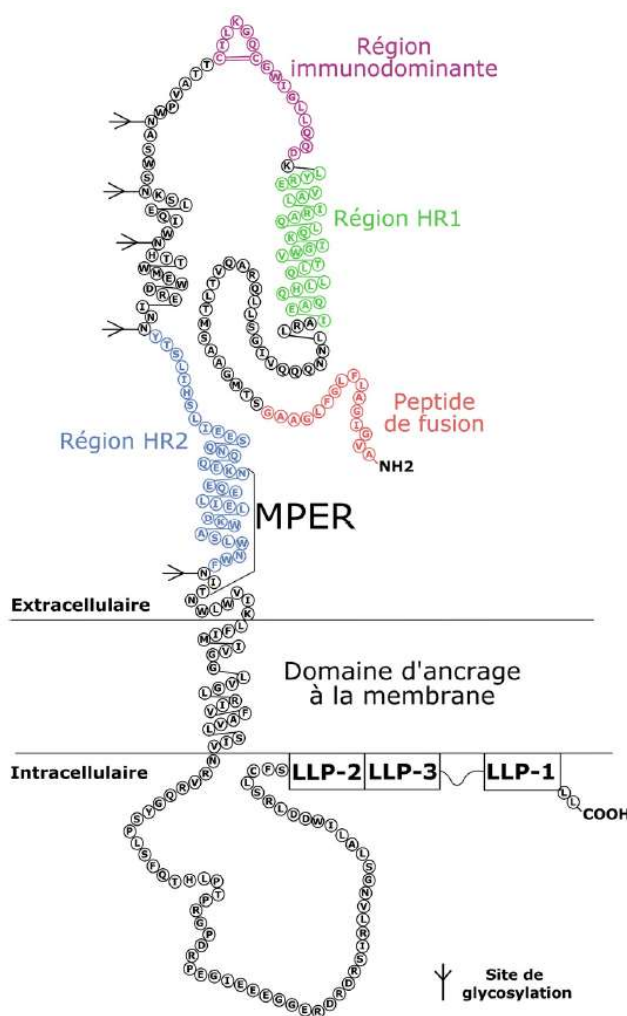


Figure 14 : Structure secondaire de la gp41

Les régions colorées correspondent aux régions structurales et fonctionnelles de l'ectodomaine de la gp41. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par des ramifications (adapté de Gallaher et al., 1989).

L'ectodomaine composé de 170 aa est impliqué dans la fusion des membranes virale et cellulaire lors de l'entrée du virus. Ce domaine contient les sites de N-glycosylations de la gp41 (entre 3 et 5 en fonction de l'enveloppe) et se compose de 5 régions distinctes : la région N-terminale correspondant au peptide de fusion, le domaine HR1 (*Heptad Repeat I*) ou NHR (*N-terminal Heptad Repeat*), une région en boucle, le domaine HR2 (*Heptad Repeat II*) ou CHR (*C-terminal Heptad Repeat*) et la région MPER (*Membrane-Proximal External Region*). Le peptide de fusion est un domaine riche en glycines et en résidus hydrophobes jouant un rôle essentiel dans la capacité fusogène de la gp41

(Delahunty et al., 1996; Freed et al., 1992). Ce peptide se trouve enfoui au sein du complexe trimérique mais est libéré lors de l'interaction de la gp120 avec les récepteurs et corécepteurs, ce qui entraîne la déstabilisation des membranes cellulaires et la formation du pore de fusion (Yang et al., 2015). Les régions HR1 et HR2 sont des séquences heptamériques, organisées en motifs répétés de 7 acides aminés et structurées en hélices α . Ceci leur permet de s'enrouler l'une sur l'autre afin de former une super hélice (*coiled coil structure*) permettant le rapprochement des membranes cellulaire et virale (Weissenhorn et al., 1997). Ces deux séquences héptamériques sont reliées entre elles par un peptide très immunogène appelé « Domaine Immunodominant Principal » qui contient une boucle hydrophile (Burrer et al., 2005). La région MPER est composée des 24 aa de l'extrémité C-terminale de la gp41 très proche de la membrane plasmique et est fortement conservée.

Le domaine transmembranaire est une région hydrophobe constituée de 25 aa fortement conservée et organisée en hélice α . Elle permet l'ancrage de la glycoprotéine dans la bicouche lipidique et est indispensable à l'étape de fusion (Kondo et al., 2010; Shang et al., 2008).

La queue cytoplasmique, composée d'environ 150 aa, possède des rôles multiples du fait de sa proximité avec de nombreuses protéines cellulaires cytosoliques et se termine par trois motifs hydrophobes LLP (*Lentivirus Lytic Peptides*) essentiels à la réplication virale. Elle a notamment un rôle dans le transport de l'enveloppe virale au sein des cellules productrices par sa capacité à interagir avec les protéines AP1 et AP2, deux protéines adaptatrices cellulaires impliquées dans les mécanismes d'endocytose (Berlioz-Torrent et al., 1999). Le domaine cytoplasmique influence donc l'incorporation et la stabilité d'Env dans les particules virales, son expression à la surface cellulaire et la fusion virale (Checkley et al., 2011; Postler and Desrosiers, 2013).

2) Structure tertiaire

Les premières structures cristallines de la gp120 ont été obtenues en 1998, en utilisant la sous-unité de surface gp120 de la souche HBX2 du VIH-1 et en la complexant avec les deux domaines terminaux du CD4 et la partie Fab de l'anticorps b17 (Kwong et al., 1998). Cette première structure a ensuite été confirmée par d'autres études, avec ou sans ligand en association avec d'autres anticorps et par différents modèles de trimères (Chen et al., 2005; Kwon et al., 2012; Lee et al., 2016; Pancera et al., 2010). Grâce à ces études, il a été démontré qu'un monomère de gp120 est composé d'un domaine interne et d'un domaine externe reliés par un feuillet β inter-domaines nommé « *bridging sheet* » (Figure 15). Le domaine interne situé au sein du trimère comprend les régions C1 et C5 et est impliqué dans l'interaction avec la gp41. Les boucles variables V1/V2 émergent de ce domaine interne au sommet du trimère tandis que les boucles variables V3, V4 et V5 proviennent du domaine externe, fortement glycosylé qui est lui exposé à la surface du trimère. La boucle V3 est également

située à l'apex du trimère mais elle est enfouie sous les boucles V1/V2 et des glycanes ce qui rend difficile sa détection par le système immunitaire (Chaillon et al., 2011).

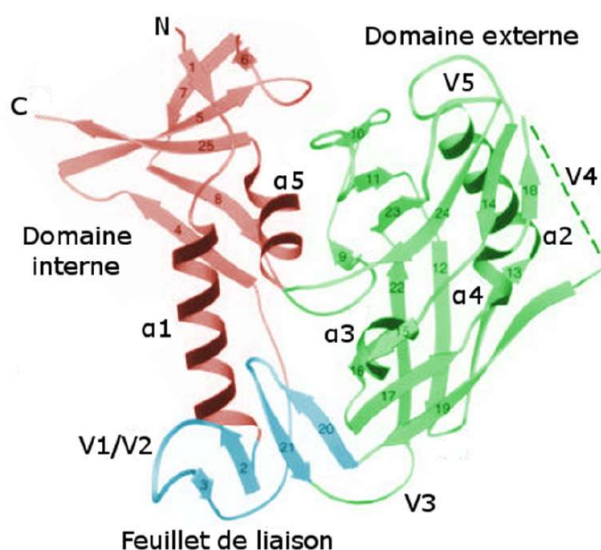


Figure 15 : Structure cristalline d'un monomère de gp120 de la souche HBX2 du VIH-1

Les domaines internes et externes sont colorés en rouge et vert respectivement. Le feuillet de liaison entre ces deux domaines est en bleu (d'après Kwong et al., 1998).

En ce qui concerne la gp41, il a été montré par cristallographie que les régions N et C-terminales de l'ectodomaine se composent de six hélices α formant un cylindre (Chan et al., 1997; Lu et al., 1995; Tan et al., 1997). Les 3 hélices α en position N-terminale correspondant au domaine HR1 se retrouvent à l'intérieur du complexe, et sont orientées de façon antiparallèle par rapport aux 3 hélices α en position C-terminale qui correspondent au domaine HR2 (Figure 16). Ces 6 hélices interagissent entre elles grâce à des résidus hydrophobes et forment ainsi une structure superenroulée (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997).

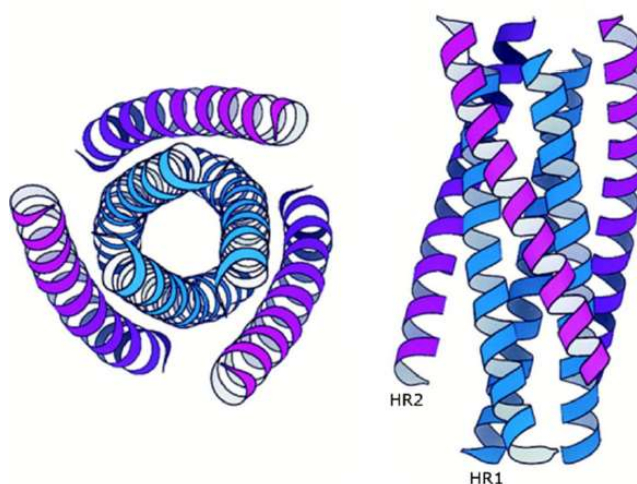


Figure 16 : Structure cristalline de l'ectodomaine de la gp41

Les hélices α correspondants au domaine HR1 (ou N-HR) sont en bleu tandis les hélices α HR2 (ou C-HR) sont en rose. Structure vue du dessus (à gauche) et de côté (à droite) (d'après Chan et al., 1997).

3) Structure quaternaire du complexe trimérique

L'observation et l'analyse de la structure des trimères d'enveloppe n'a été possible que récemment, du fait de la difficulté de production de trimères solubles purifiés. Des trimères d'enveloppes solubles et stables appelés SOSIP ont pu être produits en exprimant des enveloppes modifiées (Julien et al., 2013a). Ces enveloppes constituées de gp120 et de l'ectodomaine de la gp41 ont été modifiées par l'ajout d'un pont disulfure entre la gp120 et la gp41 (SOS) et la mutation Ile en Pro en position 559 (IP) renforçant ainsi les interactions gp120-gp41 mais également gp41-gp41 (Sanders et al., 2013, 2002). Par la suite, d'autres versions de trimères SOSIP ont été générées afin d'exprimer des séquences consensus représentatives des différents groupes du VIH-1 (de Taeye et al., 2015; Guenaga et al., 2015; Pugach et al., 2015; Sanders et al., 2013; Stewart-Jones et al., 2016). Par exemple, Sliepen *et al.* se sont basés sur la dernière séquence consensus représentative des isolats viraux du groupe M pour générer une nouvelle version de trimère SOSIP, plus représentative des enveloppes virales de ce groupe du VIH-1. Ces nouveaux trimères SOSIP, appelé SOSIP-v7, présentent un second pont disulfure entre le résidu 73 de la gp120 et le résidu 561 de la gp41 permettant une meilleure stabilité du trimère. Ces SOSIP-v7 présentent également un bouclier glycanique plus complet, plus proche de celui des enveloppes sauvages, leur permettant d'être mieux reconnus par les anticorps neutralisants (Sliepen et al., 2019). L'analyse par tomographie et cristallographie par rayon X de ces structures SOSIP a permis de mieux comprendre l'organisation des trimères d'enveloppe. Dans sa conformation initiale, à l'état de pré-fusion, le trimère d'Env est en conformation « fermée » avec une orientation de son site de liaison au CD4 vers l'intérieur du trimère, le rendant peu accessible aux anticorps neutralisants (Kwon et al., 2012 ; Tran et al., 2012). Cette conformation fermée est stabilisée par les interactions entre les sous unités gp120/gp41 tout comme par la capacité de la boucle V2 à interagir à la fois avec la boucle V3 du même monomère et celle du monomère adjacent, gardant ainsi les boucles V3 enfouies au sein du core du trimère (Julien et al., 2013a; Lyumkis et al., 2013; Pancera et al., 2014a).

Rôle des glycoprotéines d'enveloppe dans l'entrée virale

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 ont un rôle clé dans l'entrée virale, sous leur forme fonctionnelle de trimères, elles vont se fixer à leur récepteur cellulaire CD4, ce qui induit un changement dans leur conformation, libérant ainsi des sites capables d'interagir avec les corécepteurs cellulaires CCR5 et/ou CXCR4. Cette nouvelle interaction induit un nouveau changement conformationnel permettant le rapprochement des membranes cellulaire et virale et la formation du pore de fusion conduisant à la libération du contenu viral au sein du cytoplasme de la cellule cible.

1) Fixation au récepteur CD4

Le récepteur CD4 est une glycoprotéine de 55 kDa de la superfamille des immunoglobulines qui est exprimé à la surface de nombreuses cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4+, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Klatzmann et al., 1984; Wang et al., 2002). Ce récepteur se décompose en une partie extracellulaire constituée de quatre domaines (D1 à D4), d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Physiologiquement, le CD4 a un rôle essentiel dans la reconnaissance immunitaire et l'activation des lymphocytes. En effet, il est le ligand principal des molécules de CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité II) et participe ainsi à la formation du complexe CMH-peptide-TCR (*T Cell Receptor*) entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte T CD4+ (Doyle and Strominger, 1987).

Le contact entre la gp120 et le récepteur CD4 a lieu dans une zone conservée de l'Env, nommée site de liaison au CD4 ou *CD4 binding site*, dépourvue de glycosylation, à l'interface entre le domaine externe, interne et le feuillet de liaison et le domaine D1 du CD4 (Peterson and Seed, 1988). Cette interaction met en jeu 26 résidus de la gp120 et 22 résidus du CD4, deux résidus du domaine D1 du CD4 sont particulièrement importants pour cette liaison, la phénylalanine en position 43 (Phe43) et l'arginine en position 59 (Arg59). Cette interaction délimite deux cavités (Kwong et al., 1998), une cavité superficielle, remplie de molécules d'eau, à l'interface entre le domaine interne et externe, et une autre cavité hydrophobe, appelée cavité Phe43, enfouie au sein de la gp120 à l'intersection des 3 domaines. Cette cavité Phe43 est cruciale à la fixation du CD4, puisque ce résidu est responsable à lui seul de 23% des contacts interatomiques.

L'interaction Env-CD4 induit des changements conformationnels dont la dissociation des interactions entre les boucles V1V2 et V3, ce qui conduit au réarrangement de la gp41 (état intermédiaire de pré-fusion), à l'exposition de la boucle V3 et à la réorganisation des domaines V1/V2 pour former le *bridging sheet* (Guttman et al., 2014; Harris et al., 2011; Huang et al., 2005; Liu et al., 2008; Pancera et al., 2010) (Figure 17). Chaque monomère de gp120 subit alors une rotation et les boucles V1/V2 ainsi que le site de liaison au CD4 sont repositionnés en périphérie du trimère (Kwon et al., 2012; Liu et al., 2008; Tran et al., 2012).

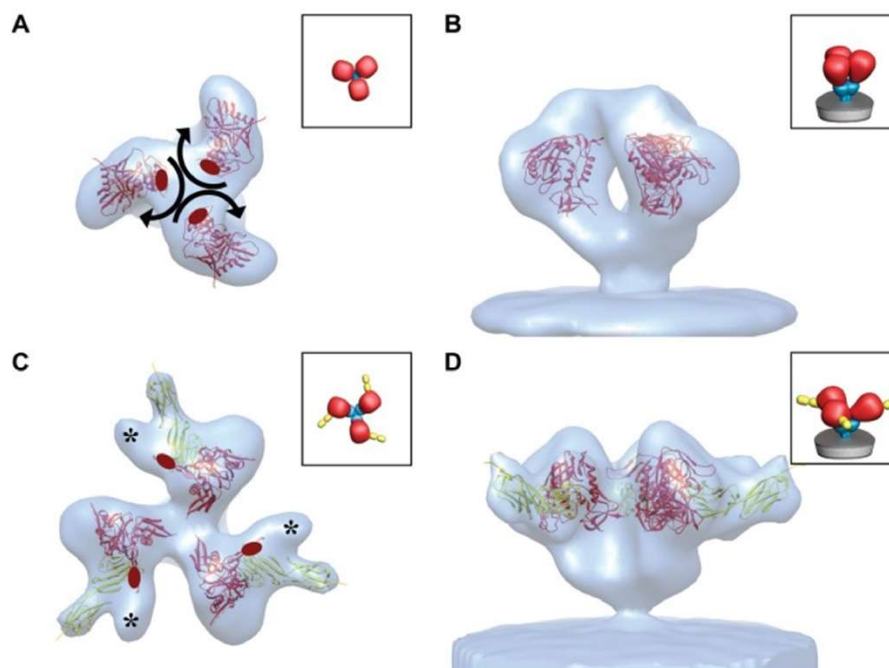


Figure 17 : Représentation des changements conformationnels du trimère d'enveloppe après sa fixation au récepteur CD4

Les différents panneaux montrent des vues de haut (A, C) ou de côté (B, D) de cartes de densités électroniques de l'Env trimérique HIV-1 BaL obtenue par cryo-tomographie électronique. Les boucles V1 et V2 sont représentées par les formes ovales rouges et les flèches noires indiquent les rotations subies par chaque monomère de gp120 après la fixation au CD4. Les panneaux A et B représentent la conformation fermée du trimère, non liée à du CD4 soluble tandis que les panneaux C et D représentent la conformation ouverte lors de la liaison au CD4 soluble (d'après Tran et al., 2012).

2) Fixation aux corécepteurs

La liaison de l'Env avec le CD4 est nécessaire pour l'entrée mais non suffisante, l'Env doit également interagir avec un corécepteur cellulaire CCR5 et/ou CXCR4 pour compléter le processus d'entrée dans la cellule. Deux corécepteurs majeurs ont ainsi été mis en évidence : le récepteur CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) (Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Jansson et al., 1996) et le récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) (Feng et al., 1996, 1995). Ces deux récepteurs sont des récepteurs aux chimiokines et appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ces RCPG jouent un rôle dans la transmission de l'information du milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules et régulent ainsi de nombreuses fonctions physiologiques. Le CCR5 et le CXCR4 sont tous deux composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, d'un domaine C-terminal intracellulaire et de 7 hélices transmembranaires liées par trois boucles intracellulaires (ICL1-3) et trois boucles extracellulaires (ECL1-3) (Tan et al., 2013; Wu et al., 2010) (Figure 18).

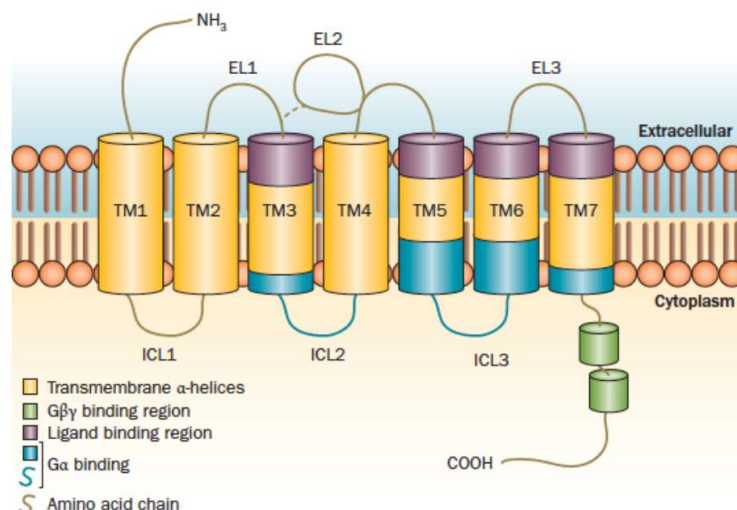


Figure 18 : Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)

Les corécepteurs d'entrée du VIH-1, le CCR5 et le CXCR4 sont des RCPG constitués de 7 domaines transmembranaires (TM1 à TM7), de 3 boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3) et de 3 boucles intracellulaires (ICL1 à ICL3). Les différentes régions impliquées dans des interactions avec les protéines G sont en bleus (d'après Neumann et al., 2014).

Après fixation au CD4, les changements de conformation permettent l'exposition de la boucle V3 qui va alors pouvoir interagir avec l'un des corécepteurs. Les différents modèles d'interaction montrent que la pointe de la boucle V3 de la gp120 interagit avec ECL2 alors que la base de V3 et le *bridging sheet* lient le domaine N-terminal du co-récepteur (Huang et al., 2007; Tamamis and Floudas, 2014). Cette seconde interaction entraîne de nouveaux changements conformationnels conduisant au rapprochement des membranes cellulaire et virale et à l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Le tropisme viral correspond ainsi à la propriété d'un isolat du VIH à interagir spécifiquement avec le corécepteur CCR5 (virus à tropisme R5), le corécepteur CXCR4 (virus à tropisme X4) ou avec à la fois les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (virus à tropisme double R5/X4) (Esté and Telenti, 2007). Cette propriété est portée par la séquence de l'enveloppe du VIH-1, en particulier par la séquence en acide aminé de la boucle V3 (Chen et al., 2013; Cordonnier et al., 1989; Zhou et al., 2011) et dans une moindre mesure des boucles V1/V2 (Cardozo et al., 2007a; Chan et al., 1999; Pastore et al., 2006). En effet, il a été montré qu'en présence de charge positive sur l'acide aminé en position 11 ou 25 de la boucle V3 cela conduit le virus à interagir préférentiellement avec le corécepteur CXCR4 alors qu'en absence de ces charges, il interagirait par défaut avec le corécepteur CCR5 (Obermeier et al., 2012).

Le corécepteur CCR5 est trouvé à la surface des lymphocytes T CD4+ « mémoire », des T CD4+ activés, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules de la microglie, tandis que le corécepteur CXCR4, est préférentiellement retrouvé sur les lymphocytes T CD4+ naïfs.

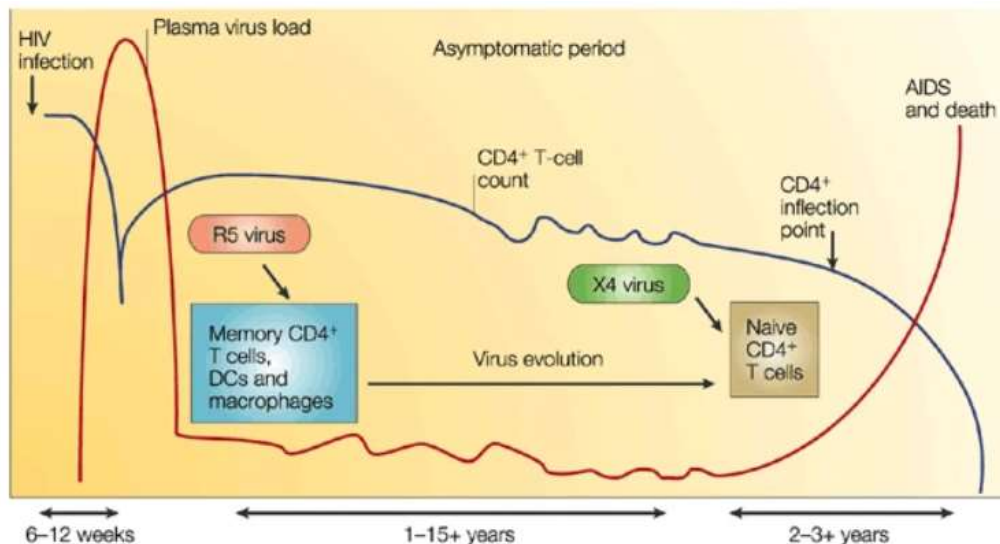


Figure 19 : Evolution naturelle au cours de l'infection par le VIH-1 du tropisme viral chez un patient non traité

Les trois stades de l'infection naturelle sont schématisés : la phase aiguë ou de primo-infection, la phase asymptomatique ou chronique et le stade SIDA (d'après Rowland-Jones, 2003).

De nombreuses études sur la transmission du VIH-1 montrent que ce sont les virus de tropisme R5 qui sont préférentiellement transmis au cours de la primo-infection (Keele et al., 2008; Ping et al., 2013; Salazar-Gonzalez et al., 2009). Au cours de l'infection, des changements de tropisme peuvent être observés puisque chez 40 à 50% des patients, la population virale initialement R5 évolue vers un tropisme X4 ou un double tropisme R5/X4 (Shepherd et al., 2008). L'apparition de variants viraux capables d'utiliser le corécepteur CXCR4 est concomitante à la déplétion en lymphocytes T CD4⁺ et à l'apparition des premiers signes cliniques de la phase SIDA (Figure 19).

3) Fusion virale

Après l'interaction de la sous-unité gp120 du trimère d'enveloppe avec son récepteur cellulaire CD4 puis son corécepteur cellulaire CCR5 et/ou CXCR4, les changements de conformation induits conduisent à l'exposition du trimère de gp41 hors de la gp120. Les peptides de fusion composés de résidus hydrophobes s'insèrent alors dans la membrane de la cellule hôte. Suite à l'ancrage, la région en hélice HR1 et la région en hélice HR2 de chaque sous unité de gp41 s'assemblent pour former le complexe à 6 hélices (6HB) (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997). La formation de ce complexe induit le rapprochement des membranes virale et cellulaire conduisant à la formation d'un pore de fusion (Melikyan, 2008) (Figure 20).

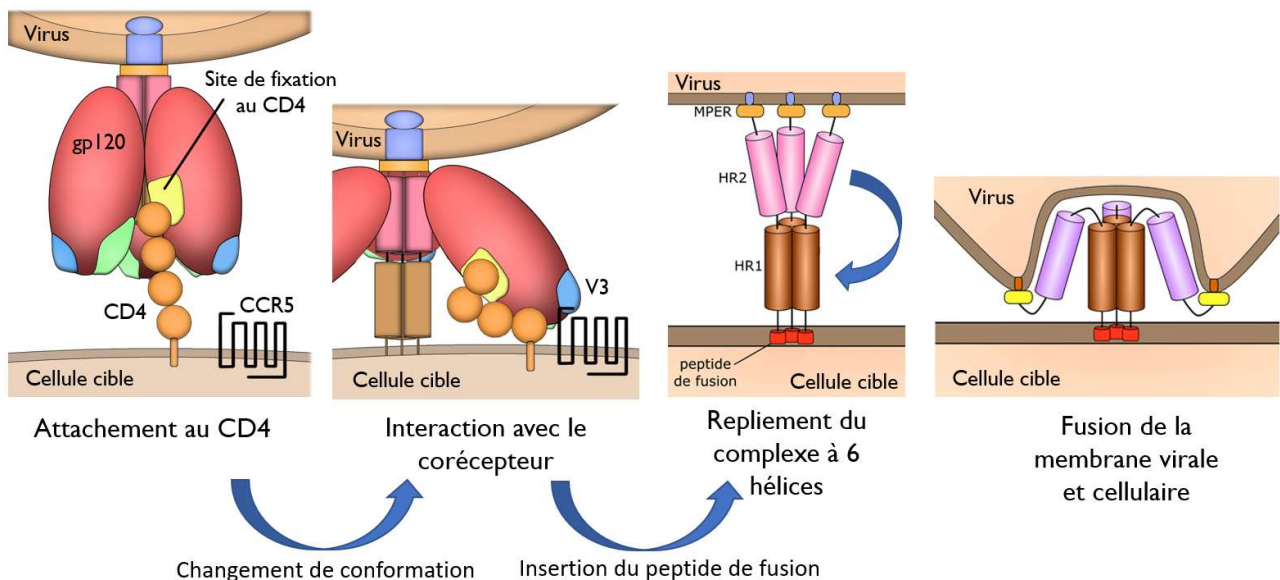


Figure 20 : Représentation schématique des étapes de l'entrée virale

(A) Attachement de la glycoprotéine d'enveloppe sur la cellule cible par son interaction avec le récepteur cellulaire CD4 (B) Interaction de la sous unité gp120 et en particulier sa boucle V3 avec le corécepteur cellulaire induisant un changement de conformation (C) Insertion des peptides de fusion dans la membrane de la cellule cible et repliement du complexe à 6 hélices, les domaines HR2 de la gp41 se replient sur le domaine HR1 conduisant au rapprochement des membranes cellulaires et virales (D) Formation du pore de fusion entre les membranes virale et cellulaire et entrée du virus dans la cellule hôte (Illustration de Beretta, 2018).

Réponses immunitaires ciblant les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 sont les seules protéines virales présentes à la surface des particules, ce qui fait d'elles une cible majoritaire pour le système immunitaire.

De nombreuses protéines présentant des activités antivirales sont exprimées à un niveau basal au sein de nos cellules. Une fois l'infection virale détectée, les mécanismes de l'immunité innée entrent en jeu, entraînant des cascades de reconnaissance au sein de nos cellules qui conduisent à l'expression de nombreuses cytokines. Parmi elles, les interférons (IFN) seront, entre autres, responsables de la surexpression de centaines de protéines antivirales de type ISG pour *Interferon Stimulated Genes*. Les protéines IFITM3 pour *InterFeron Induced TransMembrane proteins* de type 3 font partie de ces ISG. L'étude de celles-ci étant le sujet central de mes travaux, une partie plus détaillée leur sera dédiée par la suite.

Dans un second temps, l'immunité adaptative conduit à la production d'anticorps capable de reconnaître et de lier ces Env. La grande variabilité des Env du VIH-1 leur permet d'échapper à la majorité de ces anticorps mais chez certains patients, des anticorps ont montré la capacité d'être largement neutralisants, c'est à dire capable de neutraliser un grand nombre d'enveloppes différentes. D'autre part, il existe des anticorps capables de lier les Env sans les neutraliser mais permettant le

recrutement de cellules effectrices de type NK (*Natural Killer*) qui auront la capacité de lyser les particules virales.

1) Réponse humorale

La réponse immunitaire humorale de l'hôte vis à vis du VIH-1 se traduit par la production d'anticorps ciblant les différentes protéines du virus et tout particulièrement ses glycoprotéines d'enveloppe se trouvant en surface. Ces anticorps peuvent se fixer à la surface du virus et ainsi empêcher sa migration à travers les muqueuses, empêcher son entrée dans la cellule cible ou encore sa libération dans le cytoplasme. Les anticorps produits contre le virus ne possèdent pas tous la capacité d'être neutralisants, le pouvoir neutralisant d'un anticorps étant défini comme sa capacité à s'attacher au virion et à inhiber son pouvoir infectieux (Reading and Dimmock, 2007).

a. Anticorps non neutralisants

La réponse immunitaire humorale débute très tôt après l'infection par le VIH-1. En effet, des complexes immuns sont détectés 8 jours après la détection du virus dans le plasma, des anticorps non neutralisants dirigés contre la gp41 sont détectés au bout d'environ 13 jours puis ceux contre la gp120 après environ 27 jours (McMichael et al., 2010; Tomaras et al., 2008). Ces premiers anticorps IgM et IgG sont capables de se fixer aux virions mais ils cibleraient plus particulièrement des formes de gp120/gp41 non fonctionnelles ou la face « non neutralisante » de la gp120 monomérique, induisant ainsi une réponse anticorps non-neutralisante (Figure 21) (Burton and Mascola, 2015; Crooks et al., 2007; Liu et al., 2011; Moore et al., 2006). Trois à 4 semaines post-infection, des anticorps dirigés contre Gag sont également détectés. Ces anticorps détectés très précocement ne possèdent pas de pouvoir neutralisant mais contribuent à l'activité antivirale *via* le récepteur au fragment constant Fc des anticorps (Su and Moog, 2014). Ainsi, le système du complément est un mécanisme clé de la réponse immunitaire innée mais aussi un effecteur de l'immunité adaptative puisqu'il agit en se fixant sur la partie Fc d'un complexe antigène-anticorps permettant la lyse de différents virus enveloppés. Les protéines du complément et ces anticorps sont également capables d'opsoniser la particule virale, c'est-à-dire de se fixer à sa surface afin que celle-ci soit reconnue par des cellules immunitaires effectrices capable d'entraîner sa phagocytose ou sa lyse par des granules cytotoxiques. Ce sont principalement les phagocytes mononucléés (macrophages et monocytes), les granulocytes polynucléés (neutrophiles) et les cellules dendritiques qui sont capables de médier le premier mécanisme appelé ADCP (*Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*) alors que le second mécanisme appelé ADCC (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) fait plutôt intervenir les cellules tueuses naturelles ou NK (*Natural Killer*) (Huber and Trkola, 2007).

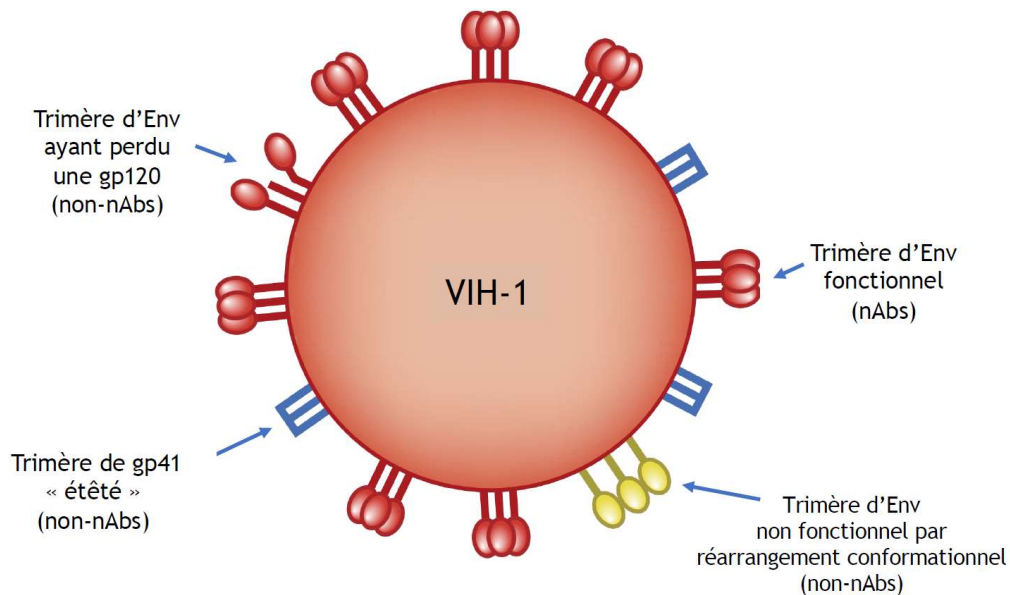


Figure 21 : Représentation schématique des différentes formes de trimères de glycoprotéines d'enveloppe à la surface du virus induisant des anticorps.

Les anticorps non neutralisants (non-nAbs pour *non-neutralizing antibodies*) peuvent cibler des formes altérées de trimères, des monomères de gp120 ou encore des débris d'enveloppe provenant de cellules infectées. Les anticorps neutralisants (nAbs) ne se lieraient eux, en principe, qu'à des trimères d'enveloppe fonctionnels (d'après Burton and Mascola, 2015).

b. Anticorps neutralisants autologues

Les premiers anticorps neutralisants (nAbs) sont détectables deux à trois mois après la primo-infection et leur apparition entraîne l'émergence de mutations dans la glycoprotéine d'enveloppe (Alter and Moody, 2010; Moog et al., 1997; Richman et al., 2003; Wei et al., 2003a). Ces anticorps neutralisants sont dirigés contre les variants de la quasi-espèce virale infectant l'individu et sont donc qualifiés d'autologues. Ils possèdent un spectre d'activité étroit puisqu'ils ne neutralisent pas ou peu les souches hétérologues (Bunnik et al., 2008; Gray et al., 2007; Richman et al., 2003). Ainsi, les anticorps neutralisants autologues sont efficaces vis-à-vis de variants présents plusieurs semaines ou mois avant leur apparition mais sont en revanche incapables de neutraliser les variants contemporains majoritaires (Bunnik et al., 2008; Richman et al., 2003; Wei et al., 2003a). Ce processus continu d'échappement du virus à la réponse humorale va conduire à une diversification des variants viraux infectant l'individu (Figure 22). Ces anticorps neutralisants autologues vont principalement cibler les régions accessibles en surface comme les régions variables des glycoprotéines d'enveloppe, en particulier leurs boucles variables V1/V2 et V3 (Gray et al., 2011; Moore et al., 2009; Rong et al., 2009; van Gils et al., 2011). Les Env échappent à la neutralisation par ces anticorps par des mutations ponctuelles au niveau de leur épitope cible. Des mutations insertionnelles au niveau des boucles V1/V2 et V3, entraînant l'allongement de ces régions ainsi que la redistribution et/ou l'augmentation du nombre de PNGS à la surface des Env peuvent également limiter l'accessibilité

des anticorps à leur épitope (Bunnik et al., 2008; Simon D. W. Frost et al., 2005; Rong et al., 2009; Wei et al., 2003a).

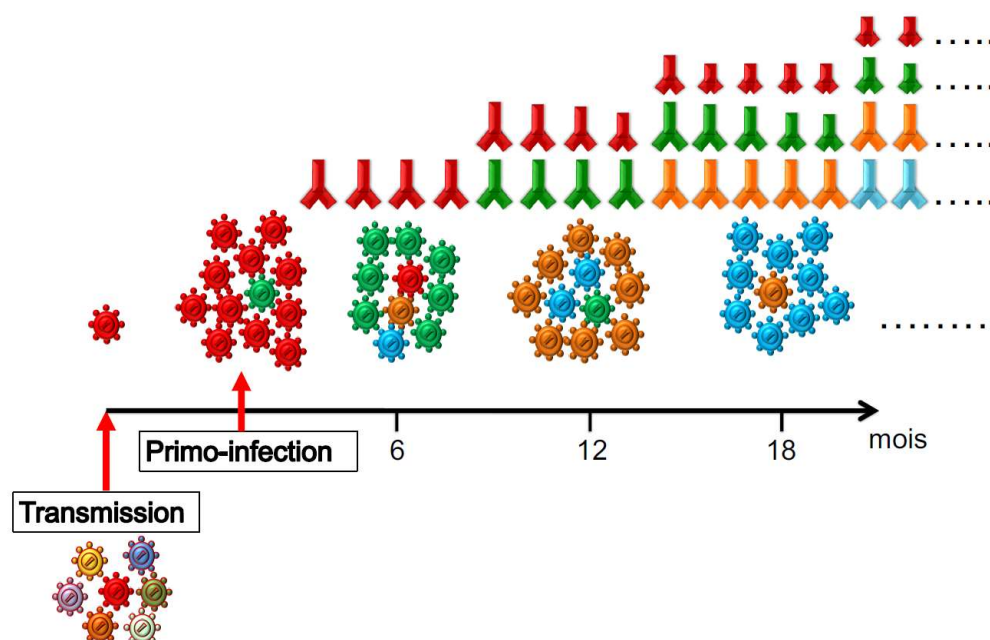


Figure 22 : Echappement du virus à la neutralisation par des anticorps autologues neutralisants.

Chaque couleur correspond à des variants viraux présents dans le sérum à différents temps, contre lesquels des anticorps spécifiques sont produits par un individu infecté. Ce schéma illustre l'apparition progressive des anticorps neutralisants autologues vis-à-vis de la population virale qui évolue et la pression de sélection faisant émerger les variants résistants. La réponse neutralisante est ainsi efficace vis-à-vis des variants de la quasi-espèce présents antérieurement, mais peu ou pas efficace vis-à-vis des variants émergents contemporains (Stefic et al., 2019).

c. Anticorps monoclonaux largement neutralisants

Plusieurs années après l'infection, 10 à 25% des individus infectés par le VIH-1 développent des anticorps neutralisants contre des souches hétérologues. Environ 1% d'entre eux sont appelés *elite neutralizers* car capable de développer des anticorps dits « largement neutralisants » ou bNAbs (*broadly neutralizing antibodies*), c'est-à-dire présentant une neutralisation efficace contre un large spectre de virus hétérologues appartenant à des sous-types différents (Euler et al., 2012; Rusert et al., 2016; Simek et al., 2009) (Figure 23). Par la suite, des lymphocytes B producteurs d'anticorps monoclonaux largement neutralisants (MobNabs) ont ainsi pu être isolés afin de les produire en grande quantité (Falkowska et al., 2014; Huang et al., 2014, 2012; Walker et al., 2009; Walker and Burton, 2018).

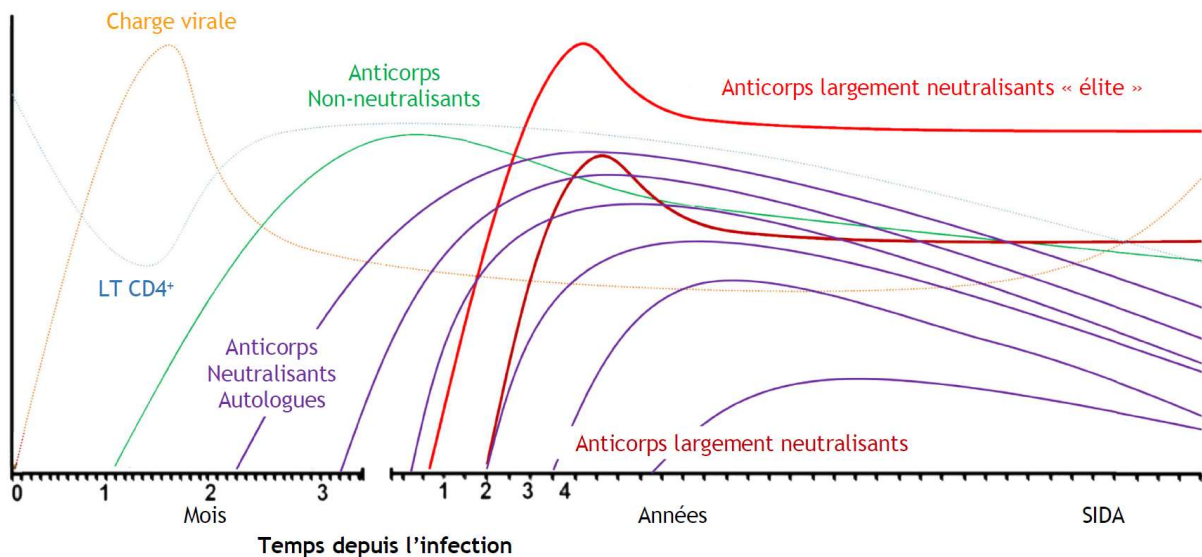


Figure 23 : Cinétique d'apparition des anticorps anti VIH-1 au cours de l'infection

Les anticorps non neutralisants apparaissent en premier, environ quinze jours à la suite de l'infection. Ils sont suivis environ trois mois plus tard par le développement d'anticorps neutralisants autologues. Puis pour certains patients (10 à 25%), après plusieurs années d'infection, une réponse anticorps neutralisante hétérologue à large spectre se développe. Environ 1% d'entre eux sont considérés comme neutralisateurs élités et présentent une activité neutralisante puissante et de large spectre (d'après Euler et al., 2012).

a) Cibles des MobNAbs

La caractérisation des anticorps MobNAbs a permis l'identification de six sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 : l'apex du trimère au niveau des boucles V1/V2, le supersite N332 de la boucle V3, le site de liaison au CD4 (CD4bs), l'interface gp120-gp41, la région MPER de la gp41 et le peptide de fusion (Figure 24).

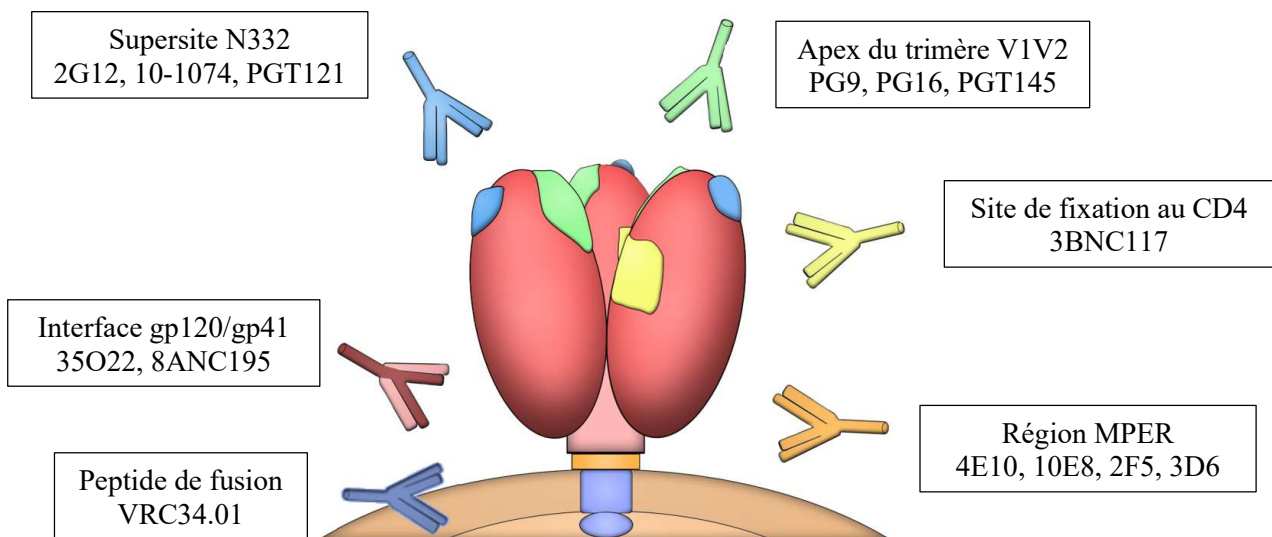


Figure 24 : Représentation schématique des épitopes cibles des anticorps monoclonaux largement neutralisants.

Schéma de la glycoprotéine d'enveloppe et localisation des épitopes cibles des MobNAbs sur le trimère d'enveloppe. Les boucles V1/V2 sont représentées en vert à l'apex du trimère ; V3 en bleu ; le site de fixation au CD4 en jaune ; la région externe proche de la membrane (MPER) de la gp41 en orange, l'interface gp120/gp41 en rouge et rose et en bleu foncé le peptide de fusion (d'après Beretta, 2018).

A noter que pour certains de ces anticorps, la reconnaissance de leur épitope est largement dépendante de la conformation trimérique des Env (Burton and Mascola, 2015). La capacité d'une Env à être neutralisée par ces MobNAbs nous donne donc des informations indirectes sur sa conformation fonctionnelle.

b) L'apex du trimère V1V2

Les boucles V1/V2 sont situées à l'apex du trimère et interagissent avec les boucles V3 afin de stabiliser le trimère dans sa conformation fermée. Un site de vulnérabilité au niveau de la V2, à l'apex du trimère et à la convergence de régions conservées situées au sein de la boucle V1/V2 et de la boucle V3 a été identifié (Julien et al., 2013a; Lyumkis et al., 2013). Ce site est protégé à la fois par de nombreux glycanes, notamment les glycanes N156 et N160 hautement mannosylés mais aussi par les boucles hypervariables V1 et V2 (Chaillon et al., 2011; McLellan et al., 2011). Cet épitope quaternaire relativement bien protégé est cependant accessible pour certains anticorps présentant des chaînes lourdes avec une région CDR-H3 (*Complementary Determining Region - Heavy chain 3*) particulièrement longue et fortement anionique leur permettant de traverser le bouclier glycanique et d'accéder à la protéine. C'est le cas des anticorps PG9 et PG16 (Doria-Rose et al., 2014; McLellan et al., 2011; Walker et al., 2009) qui ont été décrits comme interagissant avec les glycanes N160 et N156 et/ou N173 des boucles V1/V2, ainsi qu'avec un domaine riche en lysine chargé positivement (Doria-Rose et al., 2012; McLellan et al., 2011). Pour l'anticorps PG9, il a même été montré qu'un seul exemplaire de cet anticorps est capable de se lier au trimère et de reconnaître les glycanes N160 situés sur deux protomères distincts de gp120 du trimère permettant ainsi d'expliquer la nature quaternaire de l'épitope (Julien et al., 2013a) (Figure 25).

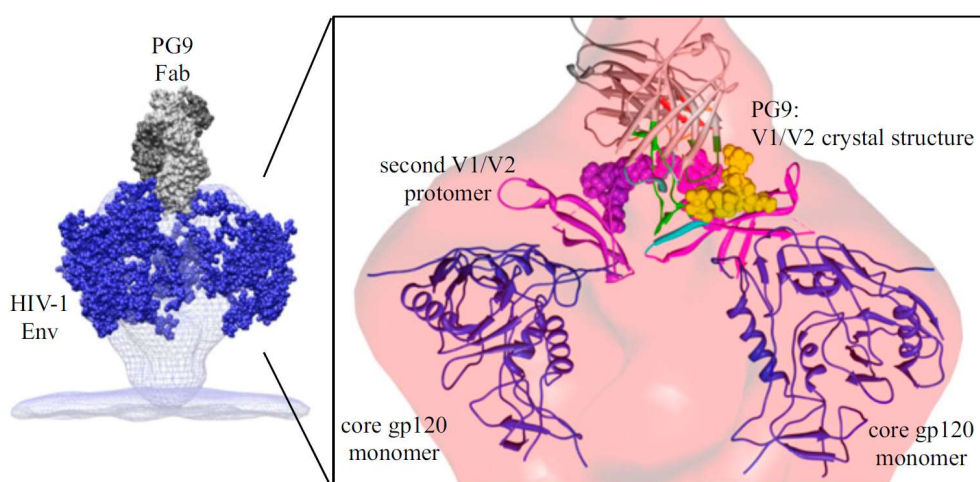


Figure 25 : Représentation de l'interaction de l'anticorps PG9 avec le trimère d'enveloppe du VIH-1
 Les anticorps PG9 sont dirigés contre le site de vulnérabilité V2, un épitope quaternaire impliquant la liaison à deux monomères de gp120 sur le trimère (d'après Julien et al., 2013a).

D'autres anticorps ont par la suite été identifiés comme ciblant le site V2 mais avec un spectre d'activité moins large que celui observé pour PG9 et PG16 : les séries des PGT141-145 (Walker et al., 2011) et des CH01-CH04 (Bonsignori et al., 2012, 2011).

c) Le supersite N332 de la V3

Le supersite N332 ou site de vulnérabilité V3, correspond à une région riche en glycanes située à proximité de la boucle V3 de la gp120 (Julien et al., 2013b; Kong et al., 2013). Le premier MobNAb découvert ciblant cette région est l'anticorps 2G12 (Figure 24). Son épitope cible se trouve au niveau des glycanes N295, N332, N339 et N392 (Calarese et al., 2003; Sanders et al., 2002; Trkola et al., 1996). Par la suite, de nombreux autres anticorps plus puissants et de plus large spectre ont été identifiés. C'est le cas des séries d'anticorps PGT121-123, PGT125-131 et PGT135-137 (Walker et al., 2011) et de la série de variants somatiques de PGT121 dont le représentant le plus puissant est l'anticorps 10-1074 (Mouquet et al., 2012) (Figure 24). Tous ces anticorps vont partager le même mécanisme de reconnaissance que les anticorps spécifiques du site V2. En effet, ils pénètrent le bouclier glycanique grâce à leur long CDR-H3 qui leur permet l'accessibilité à au moins huit résidus situés entre les positions 323 et 330 à la base de la boucle V3 (Pejchal et al., 2011; Tang et al., 2011). PGT121 et PGT128 sont glycanes-dépendants et reconnaissent en particulier les glycanes N301 et N332 (Walker et al., 2011) tandis que les anticorps PGT121-*like* (provenant du même patient) ciblent en plus, des glycanes situés dans la boucle V1 (N137) et V2 (N156) (Julien et al., 2013a). Ainsi, les différents MobNAbs dirigés contre les glycanes associés à la boucle V3 ont chacun des spécificités propres de reconnaissance, avec des épitopes pouvant se chevaucher sans toutefois être identiques ; en revanche le glycanes N332 est toujours impliqué.

d) Le site de liaison au CD4 (CD4 binding site)

De nombreux MobNAbs ciblant le site de liaison au CD4 (CD4 binding site) ont été caractérisés (Figure 24). Cette classe d'anticorps comprend, l'anticorps monoclonal b12 (Roben et al., 1994), la série des VRC (VRC01, 02, 03, 06), les NIH45-46 (Scheid et al., 2011; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2010), le PGV04, la série des 3BNC (3BNC117 et 3BNC60) (Scheid et al., 2011; Wu et al., 2011) et l'anticorps N6 découvert plus récemment et présentant un spectre plus large et plus puissant (Huang et al., 2016). Ces anticorps ciblent le site de liaison au CD4 et empêche l'interaction entre le récepteur CD4 et la gp120. Pour faire cela, la majorité de ces anticorps présentent au sein de leur séquence, des signatures spécifiques du récepteur CD4 telles que l'acide aminé Arg71 situé dans la chaîne légère qui, comme le résidu Arg59 du CD4, interagit avec l'Asp368 du CD4bs de la gp120 (Scheid et al., 2011; Zhou et al., 2013). Ce domaine d'interaction étant primordial pour l'entrée des virus dans les cellules cibles, celui-ci est très conservé parmi les différents isolats du VIH-1 et les

anticorps ciblant ce site présentent souvent la capacité de neutraliser un large spectre de souches virales.

e) L'interface gp120/gp41

Tout d'abord isolé grâce à son interaction avec un monomère gp120 (Scheid et al., 2011), il s'est avéré que l'anticorps 8ANC195 interagissait plus particulièrement avec l'interface gp120-gp41 (Figure 24). En effet, ses interactions majeures ont lieu au niveau des glycanes 234, 276 sur la gp120, et le domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps interagit avec le résidu Arg456 (Scharf et al., 2014). La chaîne légère permet, elle, l'interaction avec la gp41 au niveau du glycanes N637 (Huang et al., 2014). Plus récemment, il a même été montré que cet anticorps est capable de se fixer à une conformation fermée du trimère d'enveloppe mais aussi à la conformation partiellement ouverte retrouvée après la liaison au CD4 (Scharf et al., 2015).

La découverte de cet anticorps a ensuite été suivie par l'identification d'autres bNAbs ciblant ce nouveau site de vulnérabilité, le PGT151 et le 35O22 (Falkowska et al., 2014; Huang et al., 2014; Pancera et al., 2014b) (Figure 24). Contrairement à l'anticorps 8ANC195, ces anticorps, eux, ne se lient pas à la gp120 sous forme monomérique. L'anticorps 35O22 se lie à un épitope proche de celui de 8ANC195, près du glycanes N234 et des 7 brins β (Pancera et al., 2014b). L'anticorps PGT151 cible un épitope quaternaire complexe comprenant des résidus situés sur la gp120 et la gp41 d'un même protomère et des résidus de la gp41 d'un protomère adjacent (Blattner et al., 2014; Lee et al., 2016). En plus de reconnaître spécifiquement l'interface gp120/gp41, il a récemment été décrit que l'anticorps PGT151 est également capable de cibler un autre site de vulnérabilité que représente le peptide de fusion (voir paragraphe g) (Lee et al., 2016; Yuan et al., 2019). La neutralisation par 35O22 est dépendante des glycanes N88, N230 et N241 sur la gp120 tandis que celle de PGT151 dépend des glycanes N611 et N637 situés sur la gp41. Ainsi ces deux bNAbs 35O22 et PGT151 sont fortement glycanes-dépendants (Falkowska et al., 2014; Huang et al., 2014).

f) La région MPER

La région externe proximale de la membrane de la gp41 ou MPER est une région très conservée, riche en tryptophane, qui relie le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de la gp41. Elle est la cible de plusieurs anticorps tels que 2F5, 4E10, Z13e1, 3D6 et 10E8 (Huang et al., 2012; Muster et al., 1993; Zwick et al., 2001) qui reconnaissent des épitopes chevauchants linéaires (Figure 24). L'anticorps 10E8 est à ce jour le plus puissant de sa classe et a le spectre le plus large (Huang et al., 2012). Il est capable de neutraliser le virus après attachement du CD4 mais également dans la conformation pré-fusion du trimère (Huang et al., 2014). Du fait de la position de la région MPER qui est enfouie dans le trimère et proche de la membrane, ce site est particulièrement difficile

d'accès. Ainsi, il est probable que ces anticorps ciblent le trimère préférentiellement dans une conformation d'intermédiaire de fusion après liaison au récepteur (Frey et al., 2008). De plus, la structure obtenue du trimère en liaison avec PGT121 et 10E8 indique que les glycanes N88 et N625 en restreignent l'accès et suggère que la reconnaissance par 10E8 nécessite que la région MPER soit soulevée au-dessus de la membrane (Lee et al., 2016). Les anticorps dirigés contre la région MPER ont généralement un long domaine CDR-H3 hypermuté qui leur permet d'interagir avec la gp41 (Cerutti et al., 2017).

g) Le peptide de fusion

Le peptide de fusion est une région composée de 15 à 20 résidus hydrophobes, située au niveau de l'extrémité N-terminale de la gp41, qui joue un rôle crucial dans le processus de fusion. Sa libération et les réarrangements structuraux qui s'ensuivent conduisent à la fusion des membranes cellulaires et virales. Récemment, Kong et coll. ont isolé l'anticorps VRC34.01 qui est capable de fixer le peptide de fusion empêchant les changements conformationnels de la gp120 et de la gp41 nécessaires à la fusion et l'entrée du virus (Kong et al., 2016). Par la suite, d'autres études ont montré que l'Env du VIH-1 est capable d'échapper à la neutralisation par cet anticorps VRC34.01 en mutant des résidus du peptide de fusion, et en particulier le résidu Ile515 (Dingens et al., 2018; Feng et al., 2019). Il est intéressant de noter que l'anticorps PGT151, d'abord identifié comme ciblant un épitope quaternaire particulier au niveau de l'interface gp120/gp41, a ensuite rapidement été caractérisé comme fixant ce site de vulnérabilité qu'est le peptide de fusion. Comme pour l'anticorps VRC34.01, il a été démontré que la capacité de neutralisation de PGT151 est dépendante de l'état ouvert ou fermé du trimère d'Env. En effet, ces 2 anticorps ciblent certains résidus du peptide de fusion qui ne sont pas accessibles lorsque le trimère est dans un état « fermé » (Ananthaswamy et al., 2019; Lee et al., 2016; Yuan et al., 2019). Plus récemment, un autre anticorps neutralisant, le bNAb ACS202 provenant d'un sérum de patient « *elite neutralizer* » a été identifié comme ciblant le peptide de fusion (Yuan et al., 2019). Il est intéressant de noter que dans cette dernière étude, Yuan et coll. mettent en évidence la capacité étonnante des deux bNAbs, VRC34.01 et ACS202 à traverser le bouclier glycanique protégeant le trimère d'Env afin d'aller interagir avec le peptide de fusion. Ces anticorps semblent même prendre avantage de la nature flexible et dynamique du peptide de fusion puisqu'ils sont capable de le reconnaître et de le neutraliser dans différentes conformations (Yuan et al., 2019).

2) Protéines antivirales ciblant les glycoprotéines d'enveloppe

a. ERManI

La protéine ERManI (*Endoplasmic Reticulum Class I α -Mannosidase*) est une protéine membranaire de 79,5 kDa localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Elle est constituée de 699 acides aminés et se décompose en 4 domaines : une queue cytoplasmique N-terminale, un domaine transmembranaire hydrophobe, un domaine « tige » et un domaine catalytique situés dans la lumière du RE. ERManI est une α -mannosidase de classe I appartenant à la famille des Glycoside Hydrolase 47 (GH47) actives sur les hydrates de carbone. Cette famille comprend 7 membres ERManI, EDEM1, EDEM2, EDEM3 et les mannosidases IA, IB et IC de l'appareil de Golgi. Les protéines EDEM ne montrent pas d'activité enzymatique *in vitro* alors que les protéines ERManI, IA, IB et IC clivent spécifiquement les résidus α 1,2 mannoses pendant la N-glycosylation et ont un rôle important dans la voie de dégradation des protéines associée au RE, appelée voie ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*) (Ghimire et al., 2018; Zhou et al., 2015). Quand les précurseurs glycoprotéiques se retrouvent au niveau de la lumière du RE, ils subissent un processus de N-glycosylation avec ajout d'oligosaccharides pré-assemblés sur leur résidus Asparagine au niveau de leur motif consensus Asn-X-(Ser/Thr). Ces oligosaccharides se composent de 14 sucres, dont 9 mannoses (dont 4 liés par des liaisons α 1,2), 2 N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et 3 glucoses N-terminaux (Figure 26).

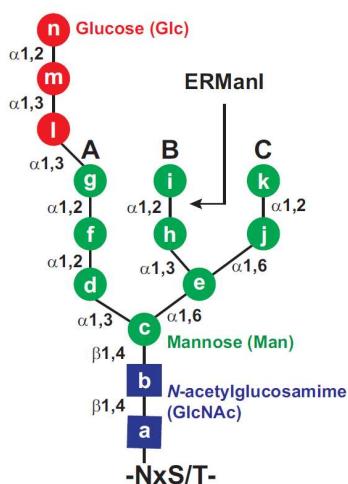


Figure 26 : Représentation schématique de la structure d'un oligosaccharide pré-assemblé qui se fixera à un résidu Asparagine (N) lors de la N-glycosylation

Oligosaccharide composé de deux résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc, carrés bleus), neuf résidus mannoses (Man, cercles verts) et trois résidus glucoses terminaux (Glc, cercles rouges). A, B et C représentent les trois branches de l'oligosaccharide. Le site de clivage préférentiel de l'enzyme ERManI est indiqué par une flèche noire (d'après Zhou et al., 2015).

Un clivage séquentiel de certains de ces sucres est nécessaire pour obtenir la bonne conformation des glycoprotéines. Les trois résidus glucose sont éliminés par l'action de glucosidases, tandis qu'un

résidu mannose est éliminé par l'action d'ERManI. Les glycoprotéines correctement repliées grâce à l'intervention de protéines chaperonnes continueront leur processus de maturation et seront dirigées vers l'appareil de Golgi. Or la maturation et le repliement des glycoprotéines sont sujets à des erreurs avec environ 85% des glycoprotéines qui se retrouvent mal-conformées et retenues dans le RE pour être soit réengagées dans la machinerie chaperonne jusqu'à obtenir le bon repliement, soit envoyées vers la voie de dégradation ERAD.

Dans le cas des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1, il a été mis en évidence que la protéine ERManI était capable grâce à ses fonctions de mannosidase d'entraîner une dégradation intensive de celles-ci en catalysant une activité de démannosylation excessive entraînant leur prise en charge par la voie ERAD. Cette action antivirale de ERManI semble être spécifique puisqu'il a été montré qu'elle interagit avec la glycoprotéine d'enveloppe via son domaine catalytique (Zhou et al., 2015).

b. GBP2/5

Les protéines GBPs (*Guanylate Binding Protein*), les protéines de résistance au myxome (MxA et MxB), les GTPases immunitaires ou IRGs (*Immunity-Related GTPases*) ainsi que les GTPases largement inductibles ou VLIGs (*Very Large Inducible GTPases*) forment la super famille des GTPases induites par l'interféron (Kim et al., 2012). Les protéines GBP2 et GBP5 font partie d'une famille comptant 7 membres (GBP1-7) présentant toutes une activité GTPase, c'est-à-dire une capacité à hydrolyser les molécules de GTP (Guanosine Triphosphate) en GBP (Guanosine Biphosphate) ou GMP (Guanosine Monophosphate). Les protéines GBP2/5 ont un poids moléculaire d'environ 67kDa, sont composées d'environ 590 acides aminés et présentent une architecture à bi-domaine avec un domaine N-terminal contenant la partie catalytique responsable de l'activité GTPase et un domaine C terminal hélical contenant un motif d'isoprénnylation (CaaX) capable de lier des lipides de type geranylgeranyl et permettant ainsi l'ancrage de ces protéines au niveau des membranes de l'appareil de Golgi (Hotter et al., 2017).

L'activité anti VIH-1 de la protéine GBP5 a d'abord été suggérée en 2015 par McLaren et coll. (McLaren et al., 2015) avant d'être confirmée en 2016 par Krapp et coll. (Krapp et al., 2015.). Ces derniers montrent que GBP5 possède une activité antivirale spécifique qui cible la glycosylation et la maturation des précurseurs Env, diminuant l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe matures au sein des virions et entraînant ainsi une perte de leur infectiosité (Figure 27).

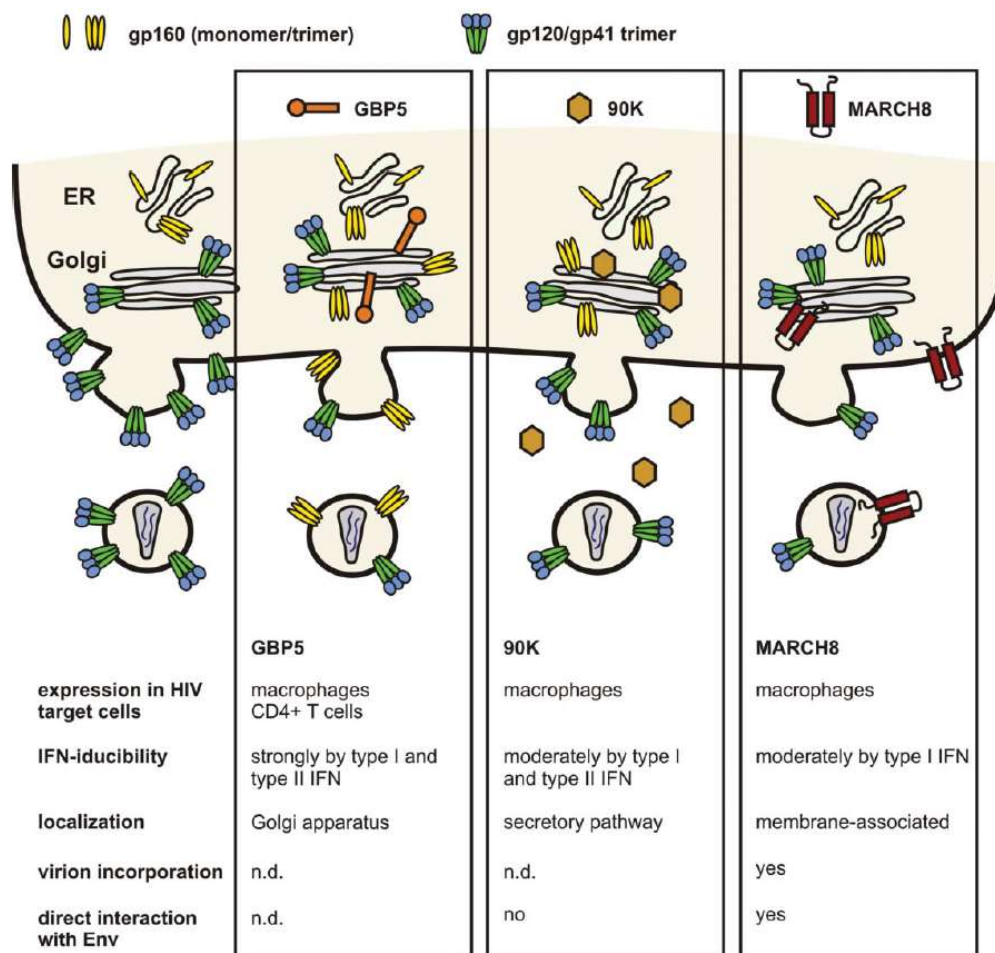


Figure 27 : Représentation schématique des modes d'action des facteurs antiviraux GBP5, 90K et MARCH8

Le facteur antiviral GBP5 réduit l'infectiosité des particules virales du VIH-1 en empêchant la maturation du précurseur d'enveloppe gp160 en glycoprotéine d'enveloppe mature gp120 et gp41. 90K semble limiter la maturation des Env mais surtout empêcher leur incorporation au sein des virions par un mécanisme encore peu compris. MARCH8 quant à lui diminue l'infectiosité des virus en limitant le nombre de spicule d'enveloppe à leur surface. Ce facteur entraîne l'internalisation des Env pour qu'elles ne restent pas en surface cellulaire et ne soient pas incorporé dans les virus (d'après Hotter et al., 2017).

La localisation de GBP5 au niveau de l'appareil de Golgi semble être primordiale pour cette activité antivirale ce qui n'est pas le cas de son activité GTPase (Hotter et al., 2017; Krapp et al., 2016).

Plus récemment, une activité similaire a été mise en évidence pour la protéine de la même famille, GBP2, et le mécanisme d'action antiviral de ces deux protéines a été en partie élucidé. Braun et coll. démontrent que les protéines GBP2/5 n'interagissent pas avec Env mais avec la partie cytoplasmique de la protéase cellulaire, la furine, empêchant le clivage nécessaire à la libération de son site catalytique (Braun et al., 2019). Ainsi, la furine n'est pas maturée et ne peut cliver le précurseur gp160 en ses sous-unités de surface gp120 et transmembranaire gp41. Certains virus sont néanmoins capables d'échapper partiellement à cette restriction en mutant le gène *vpu* pour qu'il ne soit plus traduit. Vpu et Env étant exprimés à partir du même ARN bicistronique, l'arrêt de la traduction de Vpu entraîne une augmentation de la synthèse d'Env (Guerrero et al., 2015). La restriction par GBP

étant saturable cela permet l'échappement de certaines enveloppes qui pourront ainsi être maturées et incorporées correctement au sein des virions (Braun et al., 2019; Krapp et al., 2016).

Ainsi, GBP2 et 5 ne ciblent pas directement une protéine du VIH-1 mais un de ses cofacteurs cellulaires. Cela explique leur capacité à restreindre divers virus enveloppés comme c'est le cas pour certains virus grippaux, le virus Zika ou encore le virus de la rougeole qui nécessitent tous une maturation de leurs glycoprotéines d'enveloppe par une protéase cellulaire (Braun et al., 2019).

c. 90K

La protéine 90K, également appelé Mac BP ou LGALS3BP, est une protéine sécrétée de 90kDa, qui est surexprimée en présence d'interféron de type I et II (ISGs). Elle a initialement été identifiée comme un antigène associé aux tumeurs puis en 1993 comme indicateur précoce d'évolution vers le stade SIDA chez les patients VIH+ (Natoli et al., 1993). 90K est une glycoprotéine de 585 acides aminés qui se compose de 4 domaines : le domaine N-terminal riche en cystéines qui contient la fonction de récepteur Scavenger et un peptide signal ; deux domaines ayant des homologies de séquence avec des structures connues : le domaine BTB (*Broad complex, Tram track and Bric à brac*) appelé aussi POZ (*POxvirus and Zincfinger*) et le domaine IVR (*InterVening Region*) ; et le domaine C-terminal. Son peptide signal en N-terminal lui permet d'emprunter la voie cellulaire sécrétrice dans laquelle elle subit des N-glycosylations lors de son passage au sein des complexes RE/Golgi avant d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire.

En 2013, 90K est décrit pour la première fois comme facteur antiviral du VIH-1 capable d'interférer avec le processus de maturation et d'incorporation de ses glycoprotéines d'enveloppe. Ainsi, Lodermeier et coll. montrent que c'est la forme associée aux cellules et non la forme sécrétée de 90K qui est responsable de cette activité antivirale de façon dose dépendante (Lodermeier et al., 2013). Ainsi, la surexpression de 90K dans les cellules productrices de virus entraîne une forte diminution du mécanisme de maturation du précurseur gp160 provoquant ainsi une diminution significative des spicules d'enveloppe matures (gp120 et gp41) incorporées au sein des virions et une diminution de leur infectiosité (Figure 27). Malgré une colocalisation importante de 90K et de Env dans les cellules productrices, aucune interaction n'a pu être démontrée entre ces deux protéines. Il semble que 90K n'interfère ni avec l'activité de la protéase cellulaire ni avec la glycosylation des Env et leur transport du RE au Golgi. L'activité antivirale de 90K, portée par ses deux domaines centraux (BTB/POZ et IRV), repose sur sa capacité à empêcher l'incorporation des spicules d'enveloppes matures au sein des virions bien que le mécanisme d'action mis en jeu ne soit pas encore connu. Plus récemment, il a été mis en évidence que cette action antivirale de 90K n'était pas spécifique au VIH-1 mais s'étendait à d'autres lentivirus (Lodermeier et al., 2018).

d. MARCH 1/2/8

Les protéines MARCH (*Membrane-Associated RING-CH*) possèdent une activité de type ubiquitine ligase et comptent au moins 11 membres au sein de leur famille (MARCH1 à MARCH11). Trois d'entre elles, MARCH-1, MARCH-2 et MARCH-8, ont été démontrées comme ayant une activité anti VIH-1 (Samji et al., 2014; Y. Zhang et al., 2019). Physiologiquement, ces protéines jouent un rôle dans la régulation de nombreuses protéines cellulaires transmembranaires ; elles sont notamment capables grâce à leur rôle au sein de la machinerie cellulaire UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) de diminuer l'expression de surface des molécules de CMH-II, de CD86, du TRAIL récepteur de type 1 ou encore de la transferrine (Chen et al., 2012; Fujita et al., 2013; Liu et al., 2016; van de Kooij et al., 2013). Les protéines MARCH sont des protéines transmembranaires (à l'exception de MARCH-7 et MARCH-10) d'environ 30kDa et sont constituées de moins de 300 acides aminés. Elles présentent au niveau de leur extrémité N-terminale une queue cytoplasmique contenant un motif C4HC3-RING finger (*Really Interesting New Gene*) qui porte l'activité d'ubiquitine ligase E3, capable de recruter les enzymes cellulaires de type E2.

Les protéines MARCH-1, MARCH-2 et MARCH-8 sont des protéines transmembranaires principalement retrouvées au niveau de la membrane plasmique. La protéine MARCH-8 a été identifiée la première comme facteur antiviral capable de diminuer l'infectiosité des particules virales du VIH-1 en diminuant l'expression des Env à la surface cellulaire et ainsi leur incorporation au sein des virions (Tada et al., 2015). En effet, Tada et coll. montrent que MARCH-8 a un large effet antiviral ciblant à la fois le VIH-1 mais également d'autres virus enveloppés puisqu'ils montrent que MARCH-8 est capable d'interagir avec la gp120 du VIH-1 mais également avec l'Env du VSV (Tada et al., 2015) (Figure 27). Plus récemment, les protéines MARCH-1 et MARCH-2 ont également été identifiées comme possédant une activité antivirale similaire. L'étude de ces 3 protéines a permis de mettre en évidence que leur domaine RING-CH, et plus particulièrement l'activité enzymatique E3 ubiquitine ligase de ce domaine, est crucial à leur action antivirale suggérant l'implication de la machinerie d'ubiquitination dans ce phénomène (Zhang et al., 2018; Y. Zhang et al., 2019). L'ubiquitination permet l'adressage des protéines vers des compartiments cellulaires particuliers comme par exemple les endosomes, le RE ou encore le protéasome pour leur dégradation. Bien que l'activité d'ubiquitination soit indispensable à l'activité antivirale, Zhang et coll. montrent que les protéines MARCH n'entraînent pas la dégradation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 mais seulement leur relocalisation vers d'autres compartiments intracellulaires empêchant ainsi leur incorporation au sein de virions. L'activité antivirale de MARCH-1 et MARCH-2 comme celle de MARCH-8 n'est pas limitée au VIH-1 mais est également efficace contre d'autres virus enveloppés tel que le VIH-2, le SIV ou encore le VSV. Grâce à leur

activité ubiquitine ligase, ces protéines agissent soit en délocalisant les glycoprotéines d'enveloppes de la membrane plasmique comme c'est le cas pour le VIH-1, ou en leur faisant subir une poly-ubiquitinylation conduisant à leur dégradation au sein du protéasome comme c'est le cas pour le VSV. Il est intéressant de noter que les protéines MARCH-1 et MARCH-8 sont incorporées au sein des virions lors du bourgeonnement viral, alors que ce n'est pas le cas pour MARCH-2. L'intérêt de cette incorporation n'a pas encore été élucidé. Enfin, la protéine MARCH-8 n'est que peu induite par les interférons de type I contrairement à MARCH-1 et MARCH-2, et seule la protéine MARCH-2 est surexprimée lors de l'infection par le VIH-1. Cela laisse ainsi supposer que MARCH-2 a un rôle prépondérant et physiologiquement plus relevant que les deux autres protéines dans la lutte des cellules contre les infections virales et en particulier contre le VIH-1 (Zhang et al., 2018; Y. Zhang et al., 2019).

e. SERINC5

Les protéines SERINC (*SERine INCorporator*) font partie d'une famille de protéines transmembranaires décrites en 2005 par Inuzuka et coll. comme étant des incorporeurs de sérine jouant un rôle important dans la synthèse de lipides en particulier de la phosphatidylsérine et des sphingolipides. En 2015, deux équipes distinctes mettent en évidence que les protéines SERINC5 et dans une moindre mesure SERINC3, sont incorporées au sein des particules virales de VIH-1 inhibant ainsi leur infectiosité (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). Ces deux équipes montrent également que l'effet antiviral des protéines SERINC est antagonisé par la protéine virale auxiliaire Nef qui entraîne leur internalisation de la membrane plasmique vers les compartiments endosomaux empêchant ainsi leur incorporation au sein des virions (Fackler, 2015; Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015).

SERINC5 a l'effet antiviral le plus marqué. C'est une protéine glycosylée à 10 domaines transmembranaires, présentant des extrémités N et C-terminales cytoplasmiques. Son activité antivirale ne semble pas dépendante de sa glycosylation puisque ses deux formes, non glycosylée et entièrement glycosylée, respectivement de 35 et 51kDa, ont démontré une activité antivirale significative (Sharma et al., 2018). Le mécanisme d'action de SERINC5 a été très étudié mais il n'est pas encore totalement élucidé. Un premier effet de SERINC5 sur la capacité de fusion des enveloppes a été mis en évidence en 2015 mais cet effet reste trop limité pour expliquer le niveau d'inhibition d'infectiosité observé (Aiken, 2015; Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). Un effet post-fusion sur l'étape d'élargissement des pores de fusion, a ensuite été proposée (Sood et al., 2017; Tedbury and Sarafianos, 2017). Plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que l'activité antivirale de SERINC5 était liée à son activité potentielle d'incorporeur de sérine, or aucun changement dans le lipidome des virus ou des cellules productrices n'a pu être mis en évidence remettant par ailleurs en

question l'existence de cette fonction d'incorporateur de sérine pour SERINC5 (Firrito et al., 2018; Trautz et al., 2017).

Il a également été montré que Nef n'était pas la seule protéine virale capable de contrecarrer l'effet de SERINC5. Certaines Env, en particulier celles provenant d'isolats primaires de patients infectés, ont été démontrées comme résistantes à cet effet antiviral (Beitari et al., 2017; Gonzalez-Enriquez et al., 2017; Sood et al., 2017). La comparaison de l'impact de SERINC5 sur des Env résistantes ou sensibles a permis de mettre en évidence que les Env sensibles subissaient des changements conformationnels qui pourraient conduire à leur inactivation fonctionnelle. En effet, plus les Env sont sensibles à l'effet de SERINC5 plus elles sont sensibles à la neutralisation par des anticorps neutralisants et vice-versa. Ainsi, l'importance de la stabilité des trimères d'enveloppe a été mise en avant, les Env résistantes présentant plutôt une conformation de trimère « fermée » tandis que les Env sensibles auraient une conformation « ouverte » (Beitari et al., 2017; Schulte et al., 2018; Sood et al., 2017; Tedbury and Sarafianos, 2017). Jusque-là, bien que Env et SERINC aient été retrouvés colocalisés à la membrane plasmique de cellules infectées, en particulier au niveau de domaines résistants aux détergents de type radeaux lipidiques (Schulte et al., 2018), aucune interaction entre ces 2 protéines, qui permettrait d'expliquer le mécanisme d'action sous-jacent, n'avait pu être démontrée (Beitari et al., 2017; Sood et al., 2017). Or, plus récemment Zhang et coll., ont pu mettre en évidence des interactions entre ces deux protéines grâce à une technique de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) et des immunoprécipitations (X. Zhang et al., 2019). Dans cette étude, ils montrent que des différences d'interaction et de sensibilité des Env à l'inhibition par SERINC5 ne sont observables que lorsque les virus sont produits dans des cellules ne possédant pas le récepteur CD4 (CD4-). Plus précisément, ils montrent que dans des cellules CD4-, l'Env sensible NL4-3 interagit fortement avec SERINC5 ce qui induit la dissociation sélective de son trimère d'enveloppe tandis qu'une interaction beaucoup plus faible est détectée pour l'Env résistante AD8. A contrario, lorsque les virus sont produits dans des cellules CD4+, SERINC5 augmente fortement sa capacité à interagir avec l'Env résistante AD8 la rendant sensible et entraînant sa dissociation. Ainsi, ses résultats suggèrent qu'en présence de CD4, celui-ci interagit avec les enveloppes sensibles comme résistantes, provoquant l'ouverture des trimères d'enveloppe pour la fixation aux corécepteurs, rendant toutes les Envs sensibles à l'inhibition par SERINC5 (Zhang et al., 2019). Une étude de Staropoli et coll. confirme en partie ces données puisqu'ils montrent de leur côté que la présence de CD4 dans les cellules productrices induit une transition dans la conformation des trimères d'enveloppe qui passe d'un état fermé à un état ouvert, rendant les épitopes CD4-induit accessibles et ces virus sensibles à SERINC5 (Staropoli et al., 2019). Une nouvelle étude de Beitari et coll. conforte l'importance de la conformation des trimères d'Env, puisqu'ils montrent que SERINC5 agit en stabilisant les trimères dans un état « ouvert », les Env T/F naturellement plutôt en

conformation « fermée », doivent ainsi d'abord interagir avec le CD4 afin de s'ouvrir ce qui les rend sensibles à SERINC5 (Beitari et al., 2020). Les Env chroniques devenant résistantes à la restriction par SERINC5, Beitari et coll. posent l'hypothèse que cela serait plutôt dû à une accumulation de polymorphisme au niveau de la protéine Nef l'empêchant ainsi de contrecarrer SERINC5 en l'excluant des virions, plutôt qu'à une évolution de sa conformation (Beitari et al., 2020). Ainsi, la conformation des trimères d'Env semble donc avoir un rôle prédominant dans la sensibilité / résistance des Env à la restriction par SERINC5 bien que le mécanisme d'action reste peu compris et que d'autres mécanismes additionnels semblent impliqués.

L'utilisation de techniques de pointe impliquant de la microscopie de super résolution avec de la reconstruction 2D et 3D, a permis plus récemment d'en savoir plus sur la distribution des Env à la surface des virus en présence et en absence de la protéine SERINC5 dans les cellules productrices. Chen et coll. montrent ainsi qu'en absence de la protéine SERINC5 dans les cellules productrices, les Env forment des clusters à la surface des virus, facilitant le mécanisme de fusion avec leurs cellules cibles (Chen et al., 2020). Ils montrent également que lorsque la protéine SERINC5 est présente dans les cellules productrices, celle-ci est aussi retrouvée incorporée sous forme de cluster au sein des virions. De façon intéressante, Env et SERINC5 ne colocalisent que très peu à la surface des virus, bien que l'incorporation de SERINC5 soit responsable d'une dissociation des clusters d'Env inhibant ainsi en partie la fusion virale (Figure 28).

Ainsi, toutes ces données placent SERINC5 comme une protéine antivirale multifonctionnelle capable d'inhiber l'infectiosité du VIH-1 par plusieurs mécanismes. SERINC5 est à la fois capable d'interagir spécifiquement avec les trimères d'Env en modifiant leur conformation vers un état ouvert, tout en étant capable par un mécanisme indirect non encore défini d'entraîner une dissociation des clusters d'Env à la surface des virus (Chen et al., 2020; Staropoli et al., 2019; X. Zhang et al., 2019).

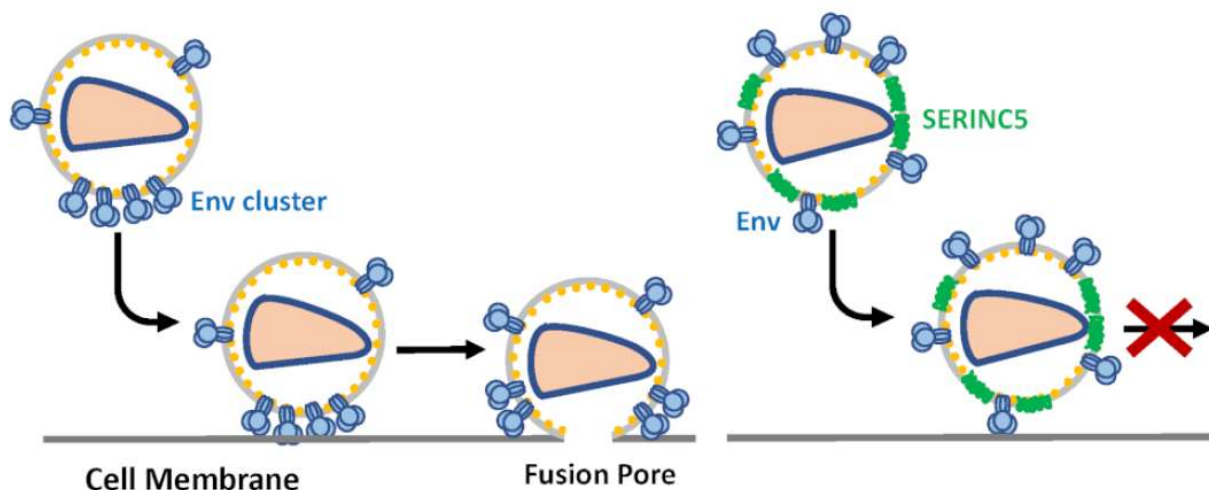


Figure 28 : Représentation schématique d'une partie du mécanisme d'action de SERINC5

En absence de protéines SERINC5 dans les cellules productrices, les virus produits présentent des clusters d'Env à leur surface, facilitant le mécanisme de fusion avec les cellules cibles. En présence de SERINC5 dans les cellules productrices, celle-ci est incorporée sous forme de clusters au sein des virus, entraînant par un mécanisme non encore défini la dissociation des clusters d'Env et empêchant ainsi la fusion correcte des virus avec les cellules cibles (d'après Chen et al., 2020).

Les protéines SERINC5 sont des protéines largement conservées au cours de l'évolution et ont été caractérisées comme protéines cellulaires antivirales, mais au contraire des facteurs de restriction anti VIH-1 décrit jusqu'ici, elles ne sont pas induites par les interférons. Ces protéines ce ne sont donc pas des ISGs, mais il a été récemment décrit que bien que n'entraînant pas leur surexpression, l'interféron modulait tout de même ces protéines en régulant leur localisation subcellulaire. En effet, en présence d'interféron de type I, les protéines SERINC5 quittent les compartiments intracellulaires tels que les endosomes car elles sont recrutées de façon massive au niveau de la membrane plasmique (Passos et al., 2019).

f. 25HC

La cholesterol-25 hydrolase ou CH25H est une ISG très conservée qui code pour une enzyme associée au réticulum endoplasmique qui catalyse la réaction d'oxydation du cholestérol en 25-Hydroxycholesterol ou 25HC (ajout d'un groupe hydroxyl en position 25 du cholestérol). Le 25HC appartient à une classe d'oxystérol endogène, c'est un facteur soluble qui contrôle la biosynthèse des stérols en régulant l'expression de récepteurs cellulaires ou encore de SREBP (*Sterol Responsive Element Binding Protein*). Les oxystérols ont un rôle important dans la défense immunitaire et sont retrouvés en quantités importantes dans les cellules dendritiques et les macrophages.

En 2013, l'enzyme CH25H et son produit soluble le 25HC sont caractérisés comme possédant une activité antivirale à spectre large, empêchant l'entrée de nombreux virus enveloppés tel que le VSV, le HSV, le VIH, le MHV68, EBOV, RVFV, RSSEV ou encore le virus Nipah. Liu et coll. montrent ainsi que la CH25H comme le 25HC sont capables d'induire des modifications membranaires au

niveau des cellules cibles empêchant le mécanisme de fusion virus-cellules (Liu et al., 2013, p. 25). Dans cette étude, ils mettent en évidence que l'enzyme CH25H présentent probablement des mécanismes antiviraux additionnels à la production du facteur 25HC, puisque l'inhibition virale observée par la CH25H est supérieure à celle observée pour le 25CH seul (Liu et al., 2013). En 2018, Gomes et coll. montrent que lorsque le facteur soluble 25HC est induit dans les cellules, celui-ci prend la place du cholestérol au sein de la membrane plasmique, augmentant ainsi la fluidité membranaire (Gomes et al., 2018). La relation entre rigidité des membranes et fusion virale est bien connue. En ce qui concerne le VIH-1, l'interaction de Env avec les récepteurs et corécepteurs cellulaires entraîne un changement de sa conformation conduisant à l'exposition et l'insertion de son peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible. La composition de la membrane plasmique est déterminante dans ce processus puisqu'il a été montré que le peptide de fusion s'insère dans la membrane de la cellule hôte sous forme de feuillet bêta mais a besoin de changer sa structure en hélices alpha pour former le pore de fusion (Heller and Rai, 2017; Lai and Freed, 2014). Gomes et coll. montrent qu'en remplaçant le cholestérol, le 25HC augmente la fluidité membranaire et empêche le peptide de fusion de changer correctement sa structure secondaire. Ainsi, le peptide de fusion bloqué sous forme de feuillet bêta est incapable de passer sous forme d'hélices alpha et de créer le pore de fusion nécessaire à l'entrée virale. Ils posent aussi l'hypothèse que 25HC serait capable de modifier les membranes virales mais cela n'est pas encore démontré (Gomes et al., 2018).

Les protéines IFITM

Les protéines IFITM pour *InterFeron Inducible TransMembrane* ont été découvertes en 1984 suite à un large criblage de protéines induites par l'interféron (Friedman et al., 1984). En 2009, leur large activité antivirale a été découverte contre plusieurs virus notamment le virus de la grippe, le virus West Nile et le virus de la dengue (Brass et al., 2009). Depuis, il a été mis en évidence qu'au moins 3 protéines de cette famille, les protéines IFITM1, IFITM2 et IFITM3, ont une activité antivirale sur de nombreux autres virus, enveloppés ou non, tels que le virus Marburg, le coronavirus du SRAS, le virus de l'hépatite C, le virus Ebola, le virus du Zika ou le VIH-1 (Diamond and Farzan, 2013; Lu et al., 2011; Perreira et al., 2013; Savidis et al., 2016). Cette activité antivirale de large spectre a d'abord été décrite dans les cellules cibles au sein desquelles la surexpression des protéines IFITM inhibe l'infection des virus avant qu'ils ne traversent la bicouche lipidique (Feeley et al., 2011; Lu et al., 2011). Rapidement, une activité antivirale de large spectre a également été décrite au niveau des cellules productrices dans lesquelles la présence des protéines IFITM conduirait à leur incorporation au sein des virions néoformés, les rendant ainsi moins infectieux (Figure 29) (Billet et al., 2015; Compton et al., 2014; Tartour et al., 2017, 2014).

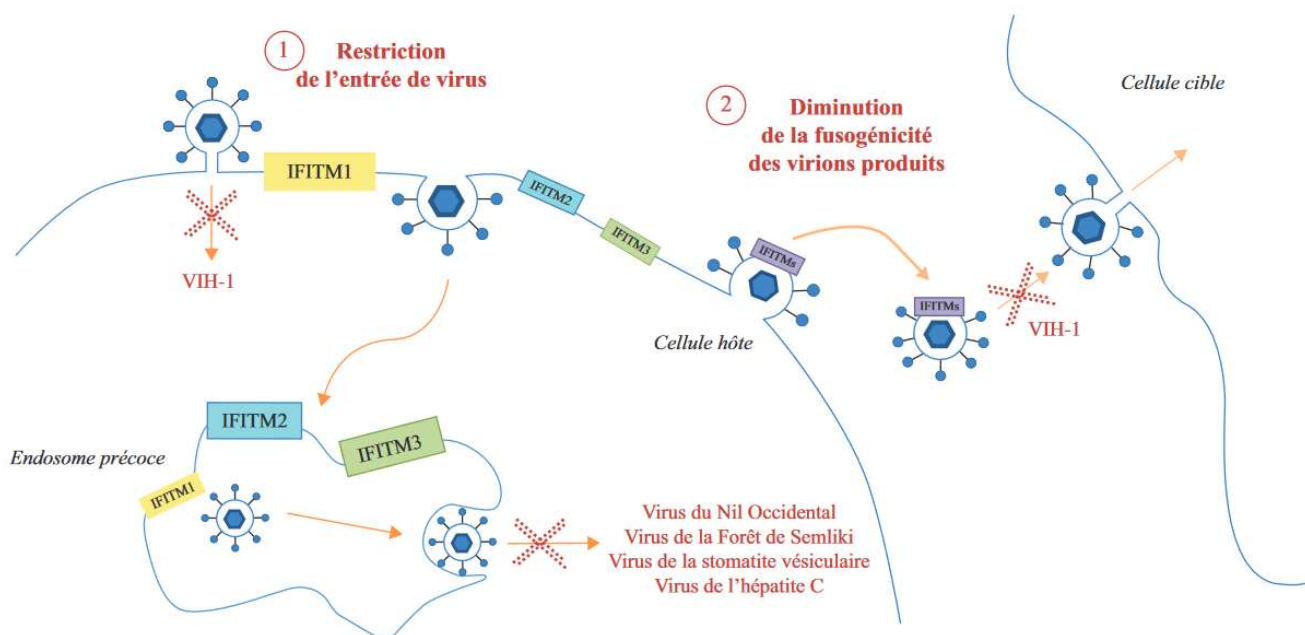


Figure 29 : Représentation schématique des deux voies de restriction virale des protéines IFITM

(1) De part leur présence au niveau des membranes cellulaires des cellules cibles, les protéines IFITM restreignent l'entrée de nombreux virus capable de fusionner au niveau de la membrane plasmique et des endosomes (2) Lors du bourgeonnement viral, les protéines IFITM sont incorporées dans les particules virales néoformées de VIH-1, les rendant moins infectieux (d'après Billet et al., 2015).

Les protéines IFITM sont composées de 107 à 144 aa, ce sont des protéines transmembranaires d'environ 15kDa retrouvées au niveau de la membrane plasmique et/ ou des membranes endosomales. Elles se composent toutes de deux domaines membranaires et de domaines N et C terminaux hypervariables. Il existe des homologies de séquence entre ces protéines, avec 91% d'homologie entre IFITM2 et IFITM3, mais seulement 59% entre IFITM2 et IFITM1 et 83% entre IFITM3 et IFITM1. La différence la plus marquée entre IFITM1 et IFITM2 (ou IFITM3), est l'absence chez IFITM1 d'une vingtaine d'acides aminés en position N-terminale, incluant un motif d'endocytose YEML (Figure 30) (Tartour and Cimarelli, 2015). Cette différence permet d'expliquer la localisation préférentielle de la protéine IFITM1 au niveau de la membrane plasmique tandis que les protéines IFITM2 et IFITM3 sont localisées principalement dans les endosomes. En effet, les protéines IFITM produites au niveau du réticulum endoplasmique, transitent par l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post traductionnelles et peuvent s'oligomériser avant d'atteindre la membrane plasmique. Celle-ci est la destination finale de la protéine IFITM1 alors que les protéines IFITM2 et IFITM3, elles, ne font que transiter par cette membrane pour atteindre leur localisation endosomale. Le motif YEML présent sur IFITM2 et IFITM3 a un rôle central dans cette localisation puisqu'il est capable d'interagir avec la sous unité $\mu 2$ du complexe AP-2 entraînant ainsi leur endocytose. Les propriétés antivirales de la protéine IFITM3 peuvent être modulées par plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la palmitoylation, la

méthylation et l'ubiquitination (Chesarino et al., 2014b; Zani and Yount, 2018). Ces modifications seront décrites de façon plus détaillée dans le paragraphe ci-dessous dédié à cette protéine.

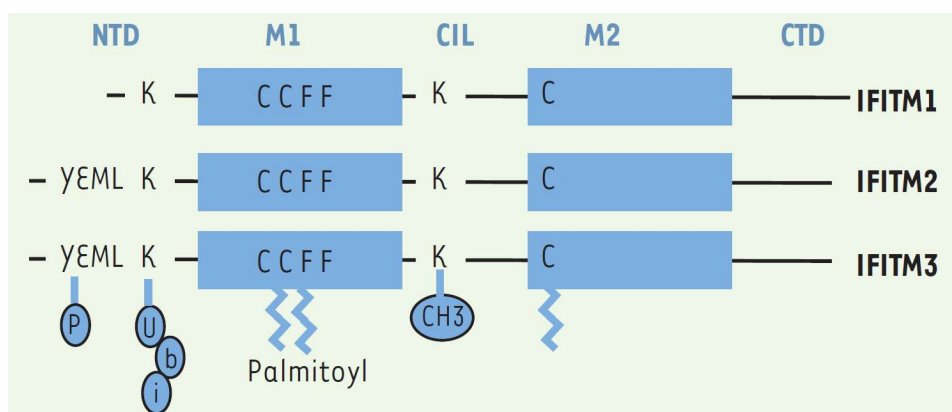


Figure 30 : Schéma de la séquence primaire des IFITM

Représentation schématique des IFITM avec les acides aminés importants et leurs modifications post-traductionnelles. Les acides aminés conservés entre les 3 IFITM sont représentés ; CIL : boucle cytosolique ; CTD : domaine carboxyterminal ; NTD : domaine amino-terminal ; M1 : domaine hydrophobe 1 ; M2 : domaine hydrophobe 2. Le motif YEML présent sur les protéines IFITM2 et IFITM3 peut subir une phosphorylation, la lysine, K, représentée en N terminal des protéines IFITM peut subir une ubiquitinylation, tandis que celle présente au niveau de la CIL peut être méthylée. Certains résidus du domaine M1 peuvent quant à eux subir une palmitoylation (d'après Tartour and Cimarrelli, 2015).

1) Activité anti VIH-1

La capacité des protéines IFITM à inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* est assez unique puisque ces protéines sont capables d'agir à plusieurs étapes du cycle viral. Elles agissent dans les cellules cibles en bloquant l'entrée du virus (Foster et al., 2016; Lu et al., 2011), sur la réplication virale en inhibant la synthèse des protéines virales (Lee et al., 2018) et sur l'infectiosité du virus en s'incorporant dans les virions néoformés (Compton et al., 2014; Foster et al., 2016; Tartour et al., 2014, 2017; Yu et al., 2015; Yu and Liu, 2018a).

a. Effet sur l'entrée

Par des expériences d'extinction ou de surexpression des protéines IFITM, l'effet antiviral de ces protéines a tout d'abord été mis en évidence dans les cellules cibles où il a été démontré qu'elles empêchent l'entrée du virus avant qu'il ne traverse la bicouche lipidique (Lu et al., 2011). Ainsi, Lu et coll. ont montré que les protéines IFITM2 et IFITM3 et dans une moindre mesure IFITM1 étaient capables de réduire la réplication du VIH-1 dans les cellules cibles SupT1 et TZM-bl. En effet, ces premiers travaux ont montré que les protéines IFITM2 et IFITM3, localisées principalement dans les endosomes des cellules cibles, inhibaient la réplication du VIH-1 au cours du processus d'entrée, de façon similaire à ce qui avait été observé pour les autres virus. A l'inverse la protéine IFITM1, localisée essentiellement à la membrane plasmique, n'aurait pas d'effet majeur sur cette étape mais agirait plus tardivement en diminuant la production des particules virales infectieuses. Par la suite,

plusieurs équipes ont recherché l'existence d'un mécanisme d'action global/commun des protéines IFITM sur les différents virus inhibés dont le VIH-1. Il a ainsi pu être démontré que ces protéines agissaient lors de la fusion des virus bien qu'aucun consensus quant à l'étape de fusion bloquée n'existe encore aujourd'hui. Une première étude a d'abord suggéré un blocage au stade d'hémifusion (fusion des hémimembranes externes tandis que les hémimembranes internes restent intactes) (Li et al., 2013), tandis qu'une autre a proposé une inhibition de l'ouverture du pore (Desai et al., 2014a). De même, le mécanisme d'action antivirale responsable de cette inhibition de la fusion reste à ce jour peu clair. Il a été montré qu'une rigidification de la membrane associée (Li et al., 2013) ou non (Lin et al., 2013) à une modification de sa courbure pouvait entraîner une diminution du processus de fusion. Une modification de la composition des membranes cellulaires (accumulation de cholestérol) pourrait également participer à cette inhibition (Amini-Bavil-Olyaei et al., 2013). Ce dernier modèle est toutefois controversé ; plusieurs équipes indépendantes ont ainsi montré que la restriction par IFITM3 est indépendante d'une accumulation de cholestérol au sein des membranes (Appourchaux et al., 2019; Desai et al., 2014b; Wensch et al., 2014). Pour autant, il n'est pas exclu que les protéines IFITMs modulent d'autres types de lipides membranaires.

Récemment, les travaux de Foster et coll. ont suggéré que la sensibilité du VIH-1 à la restriction par les protéines IFITM dépendait de l'utilisation du corécepteur (CCR5 ou CXCR4) et donc de la nature de la glycoprotéine d'enveloppe (Env) exprimée à sa surface, en particulier de sa boucle V3, mais aussi de la localisation des protéines IFITM au sein de la cellule hôte (Foster et al., 2016). Les virus porteurs d'Env à tropisme CCR5 (virus R5) seraient plus résistants aux protéines IFITM2 et IFITM3 alors que les virus exprimant des Env à tropisme CXCR4 (virus X4) seraient plus résistants à la protéine IFITM1. Si la résistance aux protéines IFITM2 et IFITM3 de certains isolats R5, telle que la souche de laboratoire AD8, a pu être confirmée par les travaux de Yu et coll., ces derniers montrent néanmoins qu'en aucun cas IFITM1 n'exerce une activité antivirale sur l'entrée du VIH-1 supérieure à celle des protéines IFITM2 et IFITM3, y compris contre les virus à tropisme R5 (Yu and Liu, 2018b). De façon intéressante, la protéine IFITM3 semble toujours être la protéine présentant la plus forte inhibition sur l'entrée des virus du VIH-1 quel que soit le tropisme du virus (Appourchaux et al., 2019; Chesarino et al., 2017; Lu et al., 2011; Tartour et al., 2017; Yu et al., 2015).

b. Effet sur la réplication

Depuis que l'activité antivirale des protéines IFITM a été découverte, il a souvent été décrit qu'en plus de leur effet sur l'entrée virale, leur surexpression dans les cellules productrices entraîne une diminution de la production de virus et en particulier une diminution de la protéine Gag et des protéines p24 (Chutiwitoonchai et al., 2013; Compton et al., 2016, 2014; Ding et al., 2014; Kane et al., 2016; Tartour et al., 2017, 2014; Wang et al., 2017). Ainsi ces résultats suggèrent que les

protéines IFITM seraient capables de bloquer la réplication du VIH-1 à une autre étape du cycle et donc d'utiliser un mécanisme de restriction supplémentaire indépendant du blocage de l'entrée virale déjà décrit. Plus récemment, Lee et coll. ont cherché à étudier le mécanisme antiviral sous-jacent et ont ainsi pu mettre en évidence que les protéines IFITM inhibaient la synthèse des protéines virales (Lee et al., 2018). En effet, ils ont tout d'abord confirmé que l'expression des protéines IFITM dans les cellules productrices entraînait une diminution d'expression des protéines virales (gp120, p55, p24, Nef et Vpu) et de la production de particules virales. Pour rechercher si les protéines IFITM inhibent la transcription ou bien la stabilité des protéines virales, ils ont analysé le niveau des différents transcrits présents dans les cellules productrices par des techniques de q-RT-PCR sur différentes fractions cellulaires. Ils ont ainsi mis en évidence que les protéines IFITM, en particulier IFITM1 et IFITM2 entraînent une diminution du niveau des transcrits non épissés ou peu épissés dans les polysomes tout en augmentant le niveau de ces transcrits dans les fractions sans ribosome, suggérant donc que les protéines IFITM agissent en excluant spécifiquement les ARNm viraux (peu ou pas épissés, porteurs de motif RRE) des polysomes empêchant ainsi leur traduction. De façon surprenante, la protéine IFITM3, qui a jusque-là été décrite comme la protéine ayant l'activité antivirale la plus importante parmi les protéines IFITM, n'a que peu ou pas d'effet antiviral sur cette étape du cycle viral.

c. Effet de l'incorporation dans les virus

En plus de limiter l'entrée du VIH-1 et d'inhiber la synthèse de ces protéines virales, il a été mis en évidence que les protéines IFITM sont également capables d'agir à une autre étape du cycle viral. En effet, lors du bourgeonnement des virus, elles sont capables de s'incorporer dans les virions néoformés entraînant un défaut d'infectiosité des particules virales (Appourchaux et al., 2019; Chesarino et al., 2017; Compton et al., 2014; Tartour et al., 2017, 2014; Wang et al., 2017; Yu et al., 2015; Yu and Liu, 2018b). En 2014, deux équipes indépendantes montrent que les protéines IFITM1, IFITM2 et IFITM3 sont retrouvées incorporées dans les virions lorsque ces protéines sont exprimées dans les cellules productrices (Compton et al., 2014; Tartour et al., 2014). Ce phénomène d'abord observé en système de transfection dans des lignées cellulaires de type HEK293T ou HeLa-CD4 a ensuite été validé dans des lignées lymphocytaires T CD4⁺ (SupT1), ainsi que dans des cellules primaires de type monocytes-macrophages. Ce phénomène n'était pas un artefact des systèmes expérimentaux utilisés puisque l'inhibition de l'expression des protéines IFITM endogènes par des techniques d'interférence par ARN entraîne une augmentation de l'infectiosité des virus produits, validant le rôle physiologique des protéines IFITM. Ces deux premières études montrent également que l'incorporation des IFITM au sein des virus n'a aucun effet sur la quantité ou la qualité des Env incorporées. De plus, la localisation de ces protéines au sein des membranes cellulaires au niveau de

sites d'assemblage connus du VIH-1 suggère une incorporation passive et non spécifique de ces protéines lors de l'assemblage des virus. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'effet antiviral de large spectre que les protéines IFITM semblent avoir sur de nombreux virus enveloppés. Cependant, en 2015, Yu et coll. bien que validant l'effet antiviral des protéines IFITM dans les cellules productrices, montrent que l'incorporation de ces protéines (en particulier IFITM3) au sein des virus entraîne un défaut de maturation des Env du VIH-1 (Yu et al., 2015). Ils émettent donc l'hypothèse que les protéines IFITM agiraient en bloquant la maturation des Env, diminuant ainsi l'expression des trimères d'Env mature en surface des virions. Cette hypothèse est renforcée par la démonstration d'une interaction spécifique entre les protéines IFITM et Env au sein des cellules productrices.

Bien que le mécanisme d'action de la restriction par les protéines IFITM n'ait pas trouvé de consensus, il est intéressant de noter que toutes ces études montrent que la protéine IFITM3 est celle présentant l'effet antiviral le plus important. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'effet de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur la réplication du VIH-1. C'est pourquoi un paragraphe dédié à la description de cette protéine et à son effet antiviral est présenté ci-après.

2) La protéine IFITM3

La protéine IFITM3 est une protéine exprimée à des niveaux variables dans de nombreux types cellulaires ; elle est particulièrement retrouvée au sein des cellules des voies respiratoires et de la plèvre viscérale (Bailey et al., 2012). Après stimulation par les interférons de type I, elle est fortement induite en particulier dans les cellules immunes, tel que les lymphocytes, faisant ainsi partie de la première ligne de défense du système immunitaire dans la lutte contre les infections virales et certaines bactéries (Anafu et al., 2013; Lin et al., 2013; Ferreira et al., 2013; Ranjbar et al., 2015; Savidis et al., 2016). L'importance physiologique de cette protéine est mise en évidence par l'existence chez certains individus d'un polymorphisme rs12252-T/C au niveau du gène IFITM3 conduisant à la production d'une protéine IFITM3 tronquée de 21 acides aminés en position N-terminale. Ce polymorphisme, rare chez les populations européenne et africaine (2 à 10%) mais assez répandu dans la population asiatique (30%), a été associée aussi bien à une sévérité accrue des symptômes qu'à une progression plus rapide vers des formes graves face à certaines infections virales. Ce phénomène a été démontré chez l'Homme pour le virus Influenza (Chen et al., 2018; Williams et al., 2014), le VIH-1 (Zhang et al., 2015), le virus Hantaan (Xu-Yang et al., 2016) ainsi que dernièrement pour le virus COVID19 (Zhang et al., 2020). Le fait que ce polymorphisme, prédit comme induisant une protéine IFITM3 tronquée, entraîne chez ces individus une sensibilité augmentée à ces infections virales, illustre l'importance physiologique de la protéine IFITM3 comme acteur antiviral majeur de notre système immunitaire.

a. Topologie, localisation et modifications post-traductionnelles

A partir de modèles prédictifs, 3 modèles topologiques ont été proposés par plusieurs équipes (Bailey et al., 2013; Smith et al., 2014). Le premier modèle présente 2 domaines transmembranaires, une boucle intracellulaire (CIL) et des extrémités N et C terminales (NTD et CTD) extracellulaires. Le second modèle présente les domaines NTD, CTD et CIL en intracellulaire. Enfin, le troisième modèle, plus récent, est un mélange des deux premiers avec le NTD et le CIL en position intracellulaire et un domaine transmembranaire plaçant le CTD en extracellulaire (Figure 31).

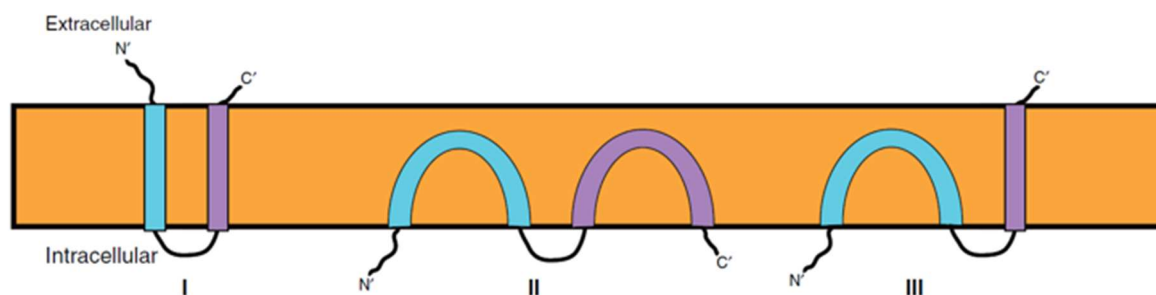


Figure 31 : Représentation des différents modèles topologiques proposés et organisation des domaines de la protéine IFITM3

Modèle (I) avec 2 domaines transmembranaires (TM), et extrémité N et C terminale en extracellulaire avec une boucle intracellulaire (CIL). Modèle (II), sans domaine TM, domaine NTD et CTD en intracellulaire séparé par la CIL. Modèle (III) avec 1 domaine TM, le domaine NTD en intracellulaire et le domaine CTD en extracellulaire (d'après Smith et al., 2014)

Plus récemment, grâce à l'utilisation des techniques de Résonance paramagnétique à électron (EPR ou *Electron Paramagnetic Resonance*) et de Résonance magnétique nucléaire (NMR ou *Nuclear Magnetic Resonance*), le troisième modèle a d'abord été identifié comme étant le plus probable et le plus répandu (Figure 32a) (Ling et al., 2016), avant que Chesarino et coll. prédisent par une approche bio-informatique, l'existence dans le domaine hydrophobe N-terminale, d'une hélice amphipathique (Figure 32b)(Chesarino et al., 2017).

La protéine IFITM3 serait donc une protéine transmembranaire de type II possédant deux domaines membranaires hydrophobes (HD1 et HD2) se composant, l'un d'une hélice α transmembranaire et l'autre d'une hélice amphipathique et d'une petite hélice α formée de seulement quelques résidus, ces deux domaines étant séparés par une boucle intracellulaire.

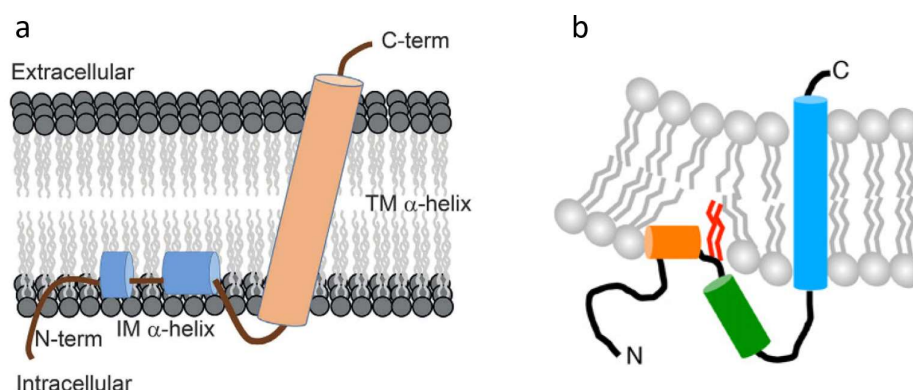


Figure 32 : Structure secondaire prédite pour la protéine IFITM3

(a) Structure des régions hydrophobes de la protéine IFITM3 dérivée des analyses en NMR ; le domaine hydrophobe en N terminal contient deux petites hélices α intramembranaires (bleu) et celui en C terminal contient en hélice α transmembranaire (orange) (d'après Ling et al. 2016). (b) Prédiction bio-informatique de la structure secondaire de la protéine IFITM3, le domaine hydrophobe 1 en N terminal est composé d'une hélice amphipathique (orange) et d'une hélice α (verte) tandis que le domaine hydrophobe 2 en C terminal se compose d'une hélice α transmembranaire (bleue) (d'après Chesarino et al., 2014b).

D'autre part, l'étude des modifications post traductionnelles de la protéine IFITM3 a permis de mieux comprendre son trafic intracellulaire, sa stabilité, son renouvellement et son mécanisme d'action. En effet, la protéine IFITM3 peut subir au moins 4 types de modifications post traductionnelles, la phosphorylation, l'ubiquitination, la palmitoylation et la méthylation (Figure 33).

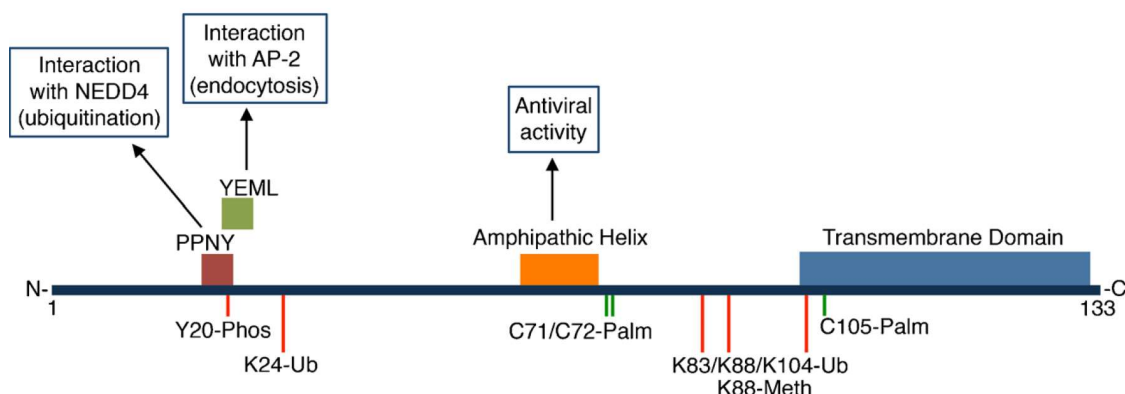


Figure 33 : Représentation schématique des sites potentiels de modification post traductionnelle de la protéine IFITM3 humaine.

La ligne horizontale représente les 133 aa de la protéine IFITM3 humaine de son extrémité N terminale à son extrémité C terminale. Les boîtes colorées représentent des motifs ou domaines structuraux connus et les flèches, les fonctions de ces régions. Les résidus spécifiques connus pour subir des modifications post traductionnelles sont indiqués sous la ligne horizontale. Les traits rouges indiquent une modification régulatrice négative tandis que les lignes vertes indiquent des modifications activatrices. Phos : Phosphorylation, Ub : Ubiquitination, Palm : Palmitoylation et Meth : monométhylation (d'après Zani and Yount, 2018).

Ainsi, le résidu Tyrosine, Y20 au niveau de l'extrémité N terminale de la protéine IFITM3, est susceptible d'être phosphorylé par des tyrosines kinases et en particulier par la kinase cellulaire Fyn de la famille Src. La phosphorylation de ce résidu va bloquer l'interaction de la protéine IFITM3, via son motif 20-YEML-23, avec le complexe AP-2 responsable de l'endocytose de la protéine IFITM3 de la membrane plasmique vers les compartiments endosomaux et lysosomaux (Chesarino et al.,

2014a; Jia et al., 2012). Ce motif d'endocytose est crucial pour la localisation subcellulaire et l'activité antivirale de la protéine IFITM3 (Chesarino et al., 2014b; Zani and Yount, 2018). En effet, si ce motif est muté, la protéine IFITM3 est délocalisée et se retrouve accumulée à la membrane plasmique. La phosphorylation de la protéine IFITM3 est donc un processus dynamique qui permet de réguler son trafic intracellulaire.

L'ubiquitination, consistant en l'ajout d'un polypeptide de 9kDa sur une protéine au niveau d'un résidu lysine, peut avoir lieu sur les 4 lysines de la protéine IFITM3 (K24, K83, K88 et K104) et est principalement médiée par le motif 17-PPNY-20 interagissant avec l'ubiquitine ligase E3 cellulaire NEDD4 (Chesarino et al., 2015, 2014b). L'ubiquitination des protéines IFITM3 permet l'acheminement de celles-ci vers les voies de dégradation cellulaire, c'est donc un processus de régulation négative de la protéine IFITM3. Les différentes lysines ayant un rôle compensatoire, il faut muter les quatre, ou bien muter l'enzyme NEDD4 pour inhiber cette régulation et augmenter la stabilité des protéines IFITM3 (Chesarino et al., 2014b; Zani and Yount, 2018).

La palmitoylation, ou addition enzymatique d'un acide gras de 16 carbones souvent sur des résidus cystéines d'une protéine, est possible sur 3 cystéines très conservées de la protéine IFITM3 en position 71, 72 et 105 (Chesarino et al., 2014b; Yount et al., 2012a). Cette modification lipidique est ajoutée constitutivement de façon irréversible par au moins trois enzymes palmitoyltransférases cellulaires (ZDHHC3, ZDHHC7 et ZDHHC20) (McMichael et al., 2017). Ainsi, près de 100% des protéines IFITM3 sont palmitoylées. Ce type de modification post traductionnelle peut entraîner un attachement membranaire des protéines cytoplasmiques, un ciblage des protéines membranaires vers d'autres compartiments cellulaires ou moduler la stabilité des protéines. La première fonction de la palmitoylation sur C71 et C72 est l'ancrage de l'hélice amphipatique au niveau membranaire, cette modification étant requise pour l'inhibition de la fusion virale par la protéine IFITM3 (Yount et al., 2013, 2012b, 2012a, 2010; Zani and Yount, 2018). Bien que la palmitoylation soit irréversible, des modifications lipidiques alternatives comme des myristoylations (en N terminal) et des prenylations (en C terminal), peuvent restaurer l'affinité de la protéine IFITM3 à la membrane tout comme son effet antiviral (Yount et al., 2012b).

La méthyltransférase cellulaire SET7 est capable de méthyliser la protéine IFITM3 sur sa lysine K88, diminuant son activité antivirale (Shan et al., 2013, p. 7). Cette méthylation peut être supprimée par l'histone dé-méthylase LSD1 qui est recruté au niveau de la protéine IFITM3 lors du traitement interféron (Shan et al., 2017, p. 1). Ainsi, cette modification semble être un mécanisme cellulaire de régulation de l'activité antivirale bien que le mécanisme moléculaire sous-jacent ne soit pas encore connu (Chesarino et al., 2014b; Zani and Yount, 2018).

D'autre part, certains résidus sur le domaine HD2 de la protéine IFITM3 ont également été décrits comme capable d'interagir avec une protéine cellulaire, la protéine VAPA (*Vesicle-Associated membrane Protein-associated A*), impliquée dans le métabolisme du cholestérol.

b. Effet de l'incorporation de la protéine IFITM3 dans les virions VIH-1

Parmi les protéines IFITM étudiées, les premières études ont rapidement identifié la protéine IFITM3 comme étant la protéine de la famille des IFITM avec le plus fort potentiel antiviral à la fois lorsqu'elle est exprimée dans les cellules cibles et dans les cellules productrices (Compton et al., 2014; Tartour et al., 2014; Yu et al., 2015). A noter que l'incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virions néoformés semble avoir un impact plus important sur la transmission et la dissémination du VIH-1 que celui de l'expression de cette protéine dans les cellules cibles non infectées. Depuis, de nombreuses études se sont particulièrement focalisées sur la protéine IFITM3 et l'effet de son incorporation sur les particules virales du VIH-1 et en particulier sur ses glycoprotéines d'enveloppe. En effet, les travaux de Yu et coll. suggéraient une implication de Env dans l'inhibition de l'infectiosité des virions, puisqu'ils ont montré que l'incorporation d'IFITM3 s'accompagne d'un défaut de maturation de Env et d'une diminution de la quantité de gp120 exprimée à leur surface (Yu et al., 2015). D'après Yu et coll., ce défaut de maturation résulterait d'une interaction entre IFITM3 et Env dans les cellules productrices de virions. Néanmoins, il existe des divergences avec les travaux d'autres équipes qui montrent qu'IFITM3 n'impacte pas le niveau d'incorporation de gp120 au sein des virions (Compton et al., 2016, 2014; Foster et al., 2016; Tartour et al., 2014) ou encore que l'effet d'IFITM3 sur l'infectiosité de nombreux autres virus (hors contexte VIH) est indépendant de la glycoprotéine d'enveloppe qu'ils portent à leur surface (Tartour et al., 2017). Dans le cas du VIH-1, la mise en évidence de variants d'Env résistants à la restriction de l'infectiosité des virions par IFITM3 semble néanmoins conforter un rôle déterminant de Env dans la sensibilité des virus à ce facteur de restriction. Il a été démontré en particulier que l'Env de la souche de laboratoire AD8, à tropisme R5, n'était pas affectée par la surexpression de la protéine IFITM3 dans les cellules productrices, les virions produits restant infectieux malgré une incorporation importante d'IFITM3 (Wang et al., 2017). Cette capacité à résister à l'action de la protéine IFITM3 a été attribuée à la boucle variable V3 de la gp120 et semble transférable à d'autres virus, dont la souche de laboratoire NL4-3, à tropisme X4, normalement très sensible à l'incorporation d'IFITM3 (Wang et al., 2017). Néanmoins, dans cette étude, aucun lien direct entre le tropisme du virus et sa sensibilité à IFITM3 n'a été établi. Outre l'importance de la boucle V3, les travaux de Wang et coll. ont mis en évidence une corrélation entre la sensibilité des Env à la protéine IFITM3 et leur sensibilité au CD4 soluble et à l'anticorps neutralisant 17b reconnaissant un épitope CD4 induit, suggérant que la conformation du trimère et l'engagement du CD4 pourraient être des déterminants importants de sensibilité à IFITM3.

(Wang et al., 2017). Bien que l'Env du VIH-1 semble être un déterminant important de la sensibilité à la protéine IFITM3, le mécanisme moléculaire mis en jeu par IFITM3 pour inhiber l'infectiosité des virions via son interaction avec Env n'a pas encore été élucidé.

L'hypothèse basée sur une modulation de la quantité de cholestérol au sein des membranes par IFITM3 a été rejetée récemment par Appourchaux et coll. qui montrent que la protéine IFITM3 n'est en aucun cas responsable d'une modulation du cholestérol que ce soit dans les cellules ou au niveau des membranes virales, même s'il n'est pas exclu que la protéine IFITM3 module d'autres lipides membranaires (Appourchaux et al., 2019). En revanche, l'hypothèse selon laquelle la protéine IFITM3 serait capable *via* son interaction avec Env de moduler la conformation et la stabilité des trimères d'Env a été renforcée dernièrement par Ahi et coll. et par Beitari et coll. (Ahi et al., 2020; Beitari et al., 2020). En utilisant un modèle basé sur un squelette MLV pseudotypé par des Env du VIH-1, les travaux de Ahi et coll. suggèrent que l'effet antiviral de la protéine IFITM3 résulterait de deux mécanismes d'inhibition complémentaires (Ahi et al., 2020). Tout d'abord, l'expression d'IFITM3 dans les cellules productrices diminuerait la quantité d'Env disponible dans les cellules en entraînant leur relocalisation vers les compartiments endolysosomaux pour dégradation. Dans un second temps, la protéine IFITM3 réduirait par un mécanisme non déterminé, la capacité fusogène des Env restantes dans les cellules productrices (Ahi et al., 2020). D'autres part, Beitari et coll. ont mis en évidence que la protéine IFITM3, comme la protéine SERINC5, stabilise les trimères d'Env dans une conformation plus ouverte, résultant en une exposition accrue des sites de fixation aux corécepteurs et aux anticorps habituellement non neutralisants, empêchant ainsi les changements de conformation nécessaire à l'entrée virale (Beitari et al., 2020). Il est intéressant de noter que bien que IFITM3 et SERINC5 partagent des modes de fonctionnement qui semblent similaires face au VIH-1, Beitari et coll. montrent que la modulation de l'ouverture des trimères d'Env permet au virus d'échapper à la restriction par SERINC5, ce qui n'est pas le cas pour IFITM3 (Beitari et al., 2020). Ainsi, l'Env du VIH-1 semble utiliser des stratégies d'échappement différentes pour ces deux facteurs de restriction.

La souche de laboratoire AD8 est résistante à la protéine SERINC5 et à la protéine IFITM3, que cette dernière soit présente dans les cellules cibles ou incorporée au sein des virions, ce qui suggère qu'il existe des mécanismes moléculaires d'échappement de Env communs aux deux facteurs de restriction mais également aux deux modes de restriction de la protéine IFITM3. La nature précise de ces mécanismes reste à ce jour largement méconnue.

OBJECTIF

Dans le contexte scientifique présenté ci-dessus et grâce à l'expertise de notre laboratoire dans l'étude des propriétés de Env, de sa diversité et de ses capacités d'adaptation à l'hôte (Beretta et al., 2018; Bouvin-Pley et al., 2019; Stefic et al., 2019), mon travail a consisté à étudier le rôle de Env dans la sensibilité/résistance du VIH-1 à la protéine IFITM3.

Nous avons fait le choix de travailler sur la protéine IFITM3, car parmi les protéines IFITM présentant une activité antivirale, c'était celle qui semblait exercer la plus forte activité contre le VIH-1. Mon équipe d'accueil travaillant depuis plusieurs années sur les propriétés antigéniques et fonctionnelles des Env d'isolats primaires du VIH-1, nous disposions dans le cadre de ces travaux d'un large éventail de clones d'Env présentant des tropismes différents (CCR5, CXCR4 ou à double tropisme CCR5 et CXCR4) (Beretta et al., 2018; Bouvin-Pley et al., 2019, 2014, 2013; Stefic et al., 2019).

Ainsi, les objectifs de nos travaux étaient de :

- 1) Confirmer que la sensibilité/résistance du VIH-1 à la protéine IFITM3 dépendait de la nature de la glycoprotéine d'Env portée à sa surface.
- 2) Apporter des éléments de compréhension quant aux déterminants moléculaires de Env et en particulier étudier les rôles des boucles variables de Env et du tropisme dans la sensibilité ou la résistance à la protéine IFITM3
- 3) Apporter des éléments de compréhension quant aux mécanismes d'action de la protéine IFITM3 mis en jeu.

Les résultats obtenus, décrits ci-dessous, font l'objet d'un manuscrit actuellement soumis pour publication dans *Journal of Virology*, présenté en annexe 1.

En parallèle à ces travaux j'ai également participé à la finalisation de travaux initiés avant mon arrivée dans l'unité U1259. Ces travaux visaient à comparer le profil d'évolution fonctionnelle de Env depuis la primo-infection jusqu'au stade d'infection chronique chez quatre sujets faisant partie d'une chaîne de transmission et donc infectés par un même virus (ou des variants très proches). L'objectif de ces travaux était de déterminer si sous la pression immunitaire, le profil d'évolution d'un virus donné était ou non restreint par des contraintes fonctionnelles. Ces travaux font l'objet d'un manuscrit actuellement en révision dans *Scientific Reports*, présenté en annexe 2.

MATERIEL ET METHODES

1) Culture cellulaire

Les cellules TZM-bl sont des cellules Hela exprimant les récepteurs CD4 et co-récepteurs CCR5/CXCR4 (NIH AIDS Reagent, Cat. Nb# 8129). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal inactivé, de 25mM d'HEPES et de gentamicine (50 µg / ml).

Les cellules HEK-293T (ATCC® CRL-11268™) sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal inactivé et d'antibiotiques (100 UI de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine).

Les cellules U373-MAGI (NIH AIDS Reagent, Cat. Nb# 3596, 3597) sont des cellules humaines issues de glioblastome de la lignée U373-MG exprimant à leur surface un récepteur CD4 humain ainsi qu'un corécepteur (CXCR4 ou CCR5) (Vodicka et al., 1997). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM avec 10% de sérum de SVF complémenté avec 1µg/mL de puromycine, 0,2 mg/mL de généticine G418 et 0,1 mg/mL d'hygromycine B.

Enfin, les cellules lymphocytaires MT4R5 (NIH AIDS Reagent, Cat. Nb# 120) sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau foetal et d'antibiotiques (100 UI de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine).

2) Plasmides

Les plasmides pcDNA contrôle et comportant le gène codant la protéine IFITM3 marquée à son extrémité N-terminale par le Flag-M2 ont été obtenus auprès du Pr Andrea Cimorelli (CIRI, Lyon). Le vecteur pNL4.3.LUC.R-E- (pNL4-3Δ*env*.luc) codant pour le génome complet de la souche de laboratoire NL4-3 du VIH-1, délétée de son gène *env* et exprimant le gène rapporteur de la luciférase a été obtenu auprès du NIH AIDS Reagent program (NIH, Cat. Nb #3418).

Les plasmides pCI (Promega) codant pour chacun des onze clones d'Env du VIH-1 sélectionnés dans cette étude ont été obtenus antérieurement au laboratoire (Beretta et al., 2018; Bouvin-Pley et al., 2013).

3) Production des virus pseudotypés

La veille de la transfection, 5.10^6 cellules HEK-293T sontensemencées dans des flasques de 75cm² puis 24 heures plus tard, les cellules sont co-transfectées avec 8µg de vecteur pNL4.3Δ*env*-luc+ (contenant le génome complet de la souche adaptée de laboratoire NL4.3 délétée du gène *env* et contenant le gène rapporteur *luc*), 4µg du vecteur pCI contenant le gène *env* d'intérêt (pCI-*env*), ainsi

que par 1 µg du plasmide d'expression pcDNA vide ou codant pour la protéine IFITM3, en utilisant l'agent transfectant FUGENE-6 selon les recommandations du fabricant (Promega). Les virus pseudotypés sont récupérés 72h après la transfection par récolte et filtration du surnageant cellulaire (0,45 µm). Une partie du surnageant est conservée à -80°C, tandis qu'une autre partie est purifiée et concentrée par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20% à 87000 g (Rotor SW41, Beckman) pendant 1.5 heures à 4°C. Le culot de particules virales est solubilisé à 4°C pendant une nuit dans 100 µl de phosphate-buffered saline (PBS) supplémenté par 1% de Triton X-100 et des antiprotéases. Ces produits d'ultracentrifugation sont ensuite utilisés pour des expériences d'immunoprécipitation ou pour une analyse du contenu viral classique par western blot. Les quantités de virus sont évaluées par mesure de l'activité de transcription inverse en utilisant le kit « Reverse transcriptase Assay, colorimetric Kit » (11468120910, Roche). Les titres viraux des stocks de virus pseudotypés sont évalués en infectant les cellules TZM-bl par une méthode de dilution limite du stock viral (Montefiori). 48 heures après l'infection, la TCID₅₀ (*Tissue Culture Infective Dose 50*) correspondant à l'infection de 50 % des cellules est évaluée par la formule de Reed-Muench (REED and MUENCH, 1938).

4) Gradient iodixanol

Les particules virales purifiées et concentrées après ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20% sont resuspendues dans du PBS, puis sont déposées sur un gradient linéaire d'iodixanol composé de 9 fractions de densité différentes (6 à 18% d'OPTIPREP, D1556 Sigma) avant de subir une nouvelle ultracentrifugation à 87000 g (Rotor SW41, Beckman) pendant 1 heure et 30 minutes. Les fractions sont ensuite récupérées délicatement et transvasées dans des ultramicrotubes 1,5 ml (Thermo Scientific, NC, USA) puis de nouveau ultracentrifugées 48 minutes à 266000 g (Rotor F50L, Beckman), afin d'être concentrées, les culots provenant de chaque fraction sont ensuite resuspendus dans 30 µl de tampon de lyse (Triton 1% + inhibiteurs de protéases). Les lysats sont ensuite dénaturés à 96°C pendant 3 minutes en présence de Laemmli et β-mercapto-éthanol avant d'être analysés par western blot. Les quantités de protéines de capsid p24, et de protéine IFITM3 sont quantifiées par mesure de l'intensité des bandes (densitométrie) grâce au logiciel ImageQuant (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

5) Marquage Immunogold et observation au microscope électronique à transmission

Des grilles de Nickel sont déposées sur une goutte de 40 µl d'un surnageant viral purifié et concentré après ultracentrifugation et repris dans 100 µl d'une solution de paraformaldéhyde 4%. Les grilles sont incubées 3 minutes avec l'échantillon puis sont rincées par passage sur des gouttes d'eau stérile (2 x 2 minutes + 1 x 5 minutes) afin d'éliminer le PFA restant. Après ces lavages, les grilles sont

incubées pendant 1 heure avec un mix contenant les anticorps primaires anti-Env dilué au 150^{ième} (2G12) et anti-Flag-M2 dilué au 200^{ième} (F7425) dans du PBS. Les grilles sont ensuite rincées 6 fois par passages successifs dans des gouttes de PBS (6 x 5minutes) avant d'être incubées 45 minutes avec le mix contenant les anticorps secondaires dilué au 30^{ième} dans du PBS : Goat anti-human couplés aux billes d'or 10 nm et goat anti-rabbit couplés aux billes d'or 6 nm (Aurion, Wageningen, Pays-Bas). Après 6 nouveaux rinçages de 5 minutes en PBS et 3 rinçages supplémentaires de 5 minutes en eau stérile, le contrastant Acétate d'uranyl est déposé sur les grilles. Les grilles sont ensuite observées au Microscope électronique à transmission (JEOL JEM-1011, plateforme IBiSA, Tours)

6) Infectiosité virale

L'inoculum d'infection est normalisé après dosage de l'activité de la transcriptase inverse contenue dans les surnageants viraux et l'infectiosité est mesurée 48h post-infection dans les cellules cibles TZM-bl ou 72h post-infection dans les cellules non adhérentes MT4R5. Ainsi une quantité normalisée de virus est déposée en plaque 96 puits pour infecter 1×10^4 cellules TZM-bl ou 6×10^4 cellules MT4R5 en présence de 37,5 µg/mL de DEAE-Dextran. Les infections sont réalisées en quadruplicate dans au minimum deux expériences indépendantes. Les niveaux d'infection exprimés en RLU (Unités de Luminescence Relatives) sont évalués par mesure de l'activité luciférase des lysats cellulaires après ajout du Bright-Glo luciferase assay (Promega) et lecture avec le luminomètre Centro LB 960 (Berthold Technologies). L'infectivité relative est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'infectivité} = \frac{\text{Moyenne des RLU du virus avec IFITM 3}}{\text{Moyenne des RLU du virus sans IFITM 3}} \times 100.$$

7) Caractérisation du tropisme viral

Le tropisme des virus pseudotypés exprimant les différentes Env est évalué par un test d'infectivité dans les cellules U373-MAGI exprimant l'un ou l'autre des corécepteurs du VIH-1, le CCR5 (CD4+/U373/CCR5) ou le CXCR4 (CD4+/U373/CXCR4). La veille, $1,4 \times 10^4$ cellules MAGI sont ensemencées par puit de plaque P96. 24 h plus tard, elles sont mises en contact pendant 2 heures avec une quantité normalisée de virus à 37°C puis du milieu DMEM complémenté par 5% de SVF et 30 µg/ml de DEAE-Dextran est ajouté. L'expérience est réalisée en quadruplicate. 48h post-infection, l'activité luciférase est évaluée à partir des lysats cellulaires obtenus après ajout du Bright-Glo luciferase assay (Promega). La lecture se fait comme précédemment avec le luminomètre Centro LB 960. Pour chaque virus, l'utilisation des corécepteurs est mesurée selon la formule :

$$\text{Ratio R5} = \frac{\text{Moyenne RLU cellules MAGI} - \text{R5}}{\text{Moyenne RLU cellules MAGI} - \text{R5} + \text{Moyenne RLU cellules MAGI} - \text{X4}}$$

8) Test de neutralisation

La sensibilité à la neutralisation des virus pseudotypés produits en absence (pcDNA) ou en présence de la protéine IFITM3 a été évaluée en présence d'un panel d'anticorps monoclonaux largement neutralisants HuMoNAbs (*Human Monoclonal Neutralizing Antibodies*). Ces anticorps, provenant du NIH AIDS Program Reagent, ciblent différents épitopes à la surface de l'enveloppe virale. Ainsi, le PG9, PG16 et le PGT145 (respectivement Cat. Nb #12149, #12150 et #12703) ciblent les boucles V1V2, le PGT128 et le 1010-74 (respectivement Cat. Nb #13352 et #12477) ciblent la boucle V3, le 3BNC117 (Cat. Nb #12474) cible le site de fixation au CD4 ; le 4E10, le 10E8 et le 2F5 (respectivement Cat. Nb #10091, #12194 et #1475) ciblent la région MPER et enfin, le 35O22 (Cat. Nb # 12586) et le 8ANC195 cible l'interface gp120/gp41. La sensibilité des virus à la neutralisation par chacun de ces anticorps a été évaluée en duplicate en cellules TZM-bl. Une quantité normalisée de virus à 1000TCID₅₀ est incubée avec chaque anticorps pendant 1h à 37°C, puis 1x10⁴ cellules TZM-bl par puits sont ajoutées en présence de 30 µg/ml DEAE-dextran. Quarante-huit heures plus tard, les niveaux d'infection RLU sont évalués par mesure de l'activité luciférase, comme décrit précédemment. Les valeurs d'IC₅₀, correspondant à la concentration en anticorps permettant d'inhiber 50% de niveau de RLU, sont calculées.

9) Sensibilité aux inhibiteurs d'entrée

Plusieurs inhibiteurs d'entrée ont été étudiés en présence des virus pseudotypés : MVC, CD4 soluble et T20. Le Maraviroc ou MVC (Cat Nb. #11580, NIH AIDS reagent program), est un antagoniste allostérique non compétitif du corécepteur CCR5, qui après fixation sur le corécepteur modifie sa conformation et inhibe ainsi la fixation des glycoprotéines d'enveloppe au corécepteur. La sensibilité des virus à ces inhibiteurs d'entrée est analysée en quadruplicate en présence des cellules TZM-bl. La veille, 8x10³ cellules TZM-bl sontensemencées par puits de plaque P96. 24 heures plus tard, le surnageant cellulaire est enlevé et les dilutions en cascade de MVC (concentrations allant de 6µM à 0.3nM) sont incubées avec les cellules pendant 30 minutes. Après incubation des cellules avec l'inhibiteur, une quantité normalisée de virus à 1000TCID₅₀/ml est ajoutée dans chaque puits en présence de 30 µg/ml DEAE-dextran. Quarante-huit heures plus tard, les niveaux d'infection sont évalués par mesure de l'activité luciférase, comme décrit précédemment.

La sensibilité des virus pseudotypés a également été étudiée en duplicate dans les cellules TZM-bl en présence d'une forme soluble du CD4, composée seulement de ces deux premiers domaines, le CD4_{183S} (Cat Nb. #7356, NIH AIDS reagent program) et l'enfuvirtide ou T20 (Cat Nb. #12732, NIH AIDS reagent program). Le CD4_{183S} se lie au domaine de fixation au CD4 de la gp120 et inhibe la fixation de l'enveloppe au récepteur CD4. L'enfuvirtide est un peptide capable de fixer le domaine

HR1 de la gp41 empêchant ainsi les changements conformationnels nécessaires à la fusion virale. Une quantité normalisée de virus à 1000TCID₅₀/ml est incubée le T20 et le CD4183s pendant 1h à 37°C, suivie de l'ajout de 1x10⁴ cellules TZM-bl en présence de 30 µg/ml DEAE-dextran. Quarante-huit heures plus tard, les niveaux d'infection sont évalués par mesure de l'activité luciférase, comme décrit précédemment. Les valeurs d'IC₅₀, correspondants à la concentration en inhibiteurs permettant d'inhiber 50% de niveau de RLU, sont calculées.

10) Construction de gènes *env* chimériques avec échanges V1V2 et / ou V3

Les constructions d'Env chimériques ont été générées en échangeant les régions des gènes *env* codant pour les boucles V1V2 et / ou les boucles V3 entre des Env conférant une sensibilité virale (NL4-3, 11c6, 249N3) ou une résistance (AD8, 2c4, 249V4) à IFITM3. Les séquences pCI-*env*ΔV1V2 ou pCI-*env*ΔV3 et les séquences des boucles V1V2 ou V3 ont été amplifiées par PCR avec des amorces chevauchantes en utilisant l'enzyme Q5 qui est une ADN polymérase de haute fidélité (New England Biolabs, USA). Après avoir vérifié la taille des fragments obtenus (environ 6500pb pour l'Env entière délétée de ses boucles V1V2 et/ou V3, 220pb pour les boucles V1V2 et 110pb pour la boucle V3) par électrophorèse sur gels d'agarose, nous avons ensuite traité les produits PCR avec une endonucléase de restriction, l'enzyme DpnI, permettant la digestion de l'ADN parental méthylé, puis nous avons assemblés les différents fragments à l'aide du *Gibson assembly cloning kit*, selon les instructions du fabricant (New England Biolabs, USA). Les séquences des constructions d'Env obtenues ont été vérifiées par séquençage Sanger avant utilisation (BigDye sequencing).

11) Immunoprécipitation

Afin d'évaluer s'il existe des interactions entre les protéines IFITM3 et l'Env du VIH-1 au sein des cellules productrices, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le vecteur pNL4-3-delta-env, pCI-Env et un vecteur pcDNA exprimant le gène *ifitm3* marqué par un Flag. 32 heures post transfection, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées dans du tampon RIPA (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS) sur de la glace. Les cellules clarifiées sont ensuite incubées sur roue à 4°C pendant une nuit avec des billes de Sépharose (rec-Protein G-Sepharose® 4B Conjugate, Invitrogen, Courtaboeuf, France) couplées avec des anticorps anti-Flag (Sigma, F7425) ou un antisérum ciblant la gp120 des Env du VIH-1 (NIH AIDS reagent, Cat. Number #288) afin d'immunoprécipiter respectivement IFITM3 et Env. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec du PBS puis chauffées à 96°C en présence de Laemmli et de 1% β-mercaptoethanol. Après une centrifugation de 30 secondes afin de séparer les billes (au fond) des protéines immunoprécipitées (le surnageant), les immunocomplexes formés sont analysés par western blot.

12) Western blot

Les protéines immunoprécipitées ou les particules virales (produits d'ultracentrifugation) sont dénaturées par chauffage à 96°C pendant 5 minutes puis les lysats sont déposés pour migration selon leur poids moléculaire sur gel SDS-PAGE 8-16% (*polyacrylamide gel electrophoresis*, Eurogentec, Liège, Belgium). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose avec un système de transfert semi-sec (Eurogentec). Après saturation des membranes dans du TBS-Tween20-lait 2%, celles-ci sont incubées avec les anticorps primaires, anti-p24 (ab53841), anti-gp41(2F5, NIH AIDS reagent program, Cat. Nb #1475), anti-gp120 (ab21179), et anti-FLAG-M2 (Sigma, F1804) ou anti-IFITM3 (produit en lapin, ou en souris, respectivement, 11714-1-AP et 66081-1-Ig, Proteintech) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées plusieurs fois à l'aide d'une solution de TBS-Tween20-0.03% puis incubées avec les anticorps secondaires couplés HRP appropriés dans du TBS-tween20-lait 2%, sous agitation et à température ambiante. Les anticorps secondaires marqué-HRP, Rabbit anti-Goat (ab6741), Goat anti-Human (627120), Rat anti-Mouse (1144-05), ont respectivement été obtenus chez Abcam, In vitrogen (Thermofisher scientific) et SouthernBiotech (SouthernBiotech, Birmingham, USA). Enfin, les membranes sont incubées avec le substrat Pierce ECL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) puis les signaux sont acquis avec le système ImageQuant LAS 500. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageQuant TL8.1 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

13) Marquage immunofluorescent

Après disposition au fond des boîtes de Pétri (90mm de diamètre) de lamelles pré-incubées avec une solution de 0.1% (w/v) poly-L-lysine (Sigma), 3.5×10^6 cellules HEK293T ont étéensemencées dans ces boîtes. 24h plus tard, les cellules sont transfectées afin de produire des virus pseudotypés par des Env spécifiques en présence (IFITM3) ou en absence de la protéine IFITM3 (pcDNA). 32 heures post transfection, les lamelles sont récupérées puis les cellules sont fixées dans 4% de paraformaldehyde/PBS, lavées dans une solution de PBS/glycine 10mM, puis perméabilisées par incubation avec une solution de 0.1% Triton-X-100/ PBS pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide de combinaison d'anticorps, ciblant l'Env du VIH-1 (2G12, humain, NIH AIDS), la protéine IFITM3 (anticorps produit en lapin ou en souris, proteintech) et des protéines spécifiques de certains compartiments cellulaires, comme l'ATPase pour la membrane plasmique, le GolgB1 pour l'appareil de Golgi ou encore la Calnexine pour le réticulum (produit en lapin ou souris, choix en fonction de l'anticorps anti-IFITM3 utilisé). Ces marquages sont révélés après incubation des cellules marquées avec un anticorps secondaire approprié, conjugué à des fluorophores : AlexaFluor 488, 594 et 647 (Molecular Probes, Invitrogen). Les cellules sont ensuite montées sur des lames en utilisant un milieu de montage (BrightMount, ab103746, Abcam).

14) Microscopie confocale

Les images ont été capturées à l'aide du microscope confocal inversé Leica TCS SP8 g-STED 3X 12 équipé d'un objectif à immersion de 63×1.4NA (HXC PL 13 APO 63x/1.40 OIL CS) (Leica, Wetzlar, Allemagne). L'analyse des cellules entières a été permise par une acquisition en z-stack des cellules, avec une trentaine d'acquisition par condition. Avant de pouvoir réaliser l'analyse de colocalisation, les images ont été détourées à l'aide du logiciel ImageJ, afin d'analyser seulement les cellules ayant subi la triple transfection et ne pas induire de biais dans nos données. Les analyses de colocalisations ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel Imaris, qui nous a permis d'obtenir les valeurs des coefficients de colocalisation de Pearson entre 2 voire 3 protéines marquées différentes.

15) Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA), avec des tests paramétriques ou non paramétriques tel que le test de Wilcoxon, le test de Student ou le test de corrélation de Spearman. Les données utilisées pour les analyses proviennent toutes d'au moins 3 expériences indépendantes.

RESULTATS

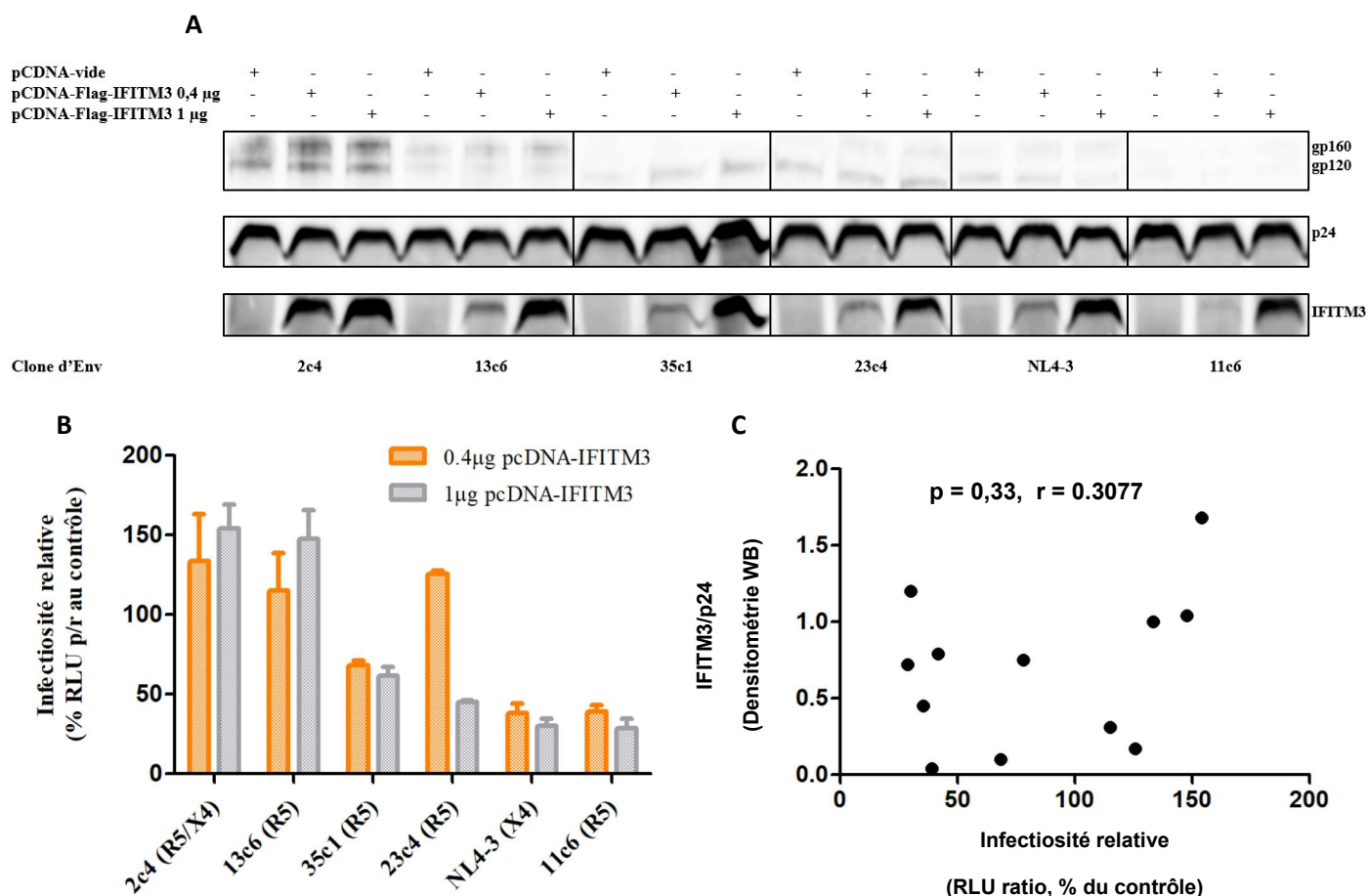


Figure 34 : Mise au point du modèle d'incorporation d'IFITM3 au sein des virus

(A) Des cellules HEK293T ont été co-transfectées par 8µg de pNL4-3ΔEnv.luc, 4µg pCI-env et 0,4 ou 1µg de pcDNA-ifitm3-Flag ou de pcDNA vide. Les virus présents dans le surnageant cellulaire ont été récoltés 72h post transfection puis purifiés par ultracentrifugation sur cousin de sucrose. Le contenu protéique des virus a ensuite été examiné par western Blot. (B) Les inocula viraux ont été normalisés après mesure de l'activité de la transcriptase inverse et l'infectiosité des virus a été évaluée en mesurant l'activité luciférase (RLU) 48h post-infection dans les cellules cibles TZM-bl. L'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur l'infectiosité de chaque virus a été évaluée en calculant l'infectiosité relative des virus ayant incorporé IFITM3 par rapport au virus contrôle produits sans IFITM3 (ratio de RLU en pourcentage). (C) Absence de corrélation (Spearman) entre l'infectiosité relative (% du virus contrôle) et la quantité d'IFITM3 (densitométrie) incorporée dans les virus pseudotypés.

Partie 1 : Etude de l'incorporation des protéines IFITM3 au sein des virions

1) Vérification du modèle d'incorporation des protéines IFITM3

Afin d'étudier l'effet de l'incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virions sur leur infectiosité, des virus pseudotypés sont produits en cellules HEK293T. Ces cellules exprimant de faibles niveaux de protéines IFITM3 (Tartour et al., 2014), il est nécessaire de surexprimer cette protéine de façon ectopique. Pour cela nous disposons au laboratoire d'un vecteur d'expression pcDNA contenant le gène *ifitm3* avec un Flag en N-terminal (obtenu auprès de A Cimarrelli, CIRI, Lyon). Ainsi, pour la production des virus pseudotypés, nous réalisons une triple transfection de cellules HEK293T par un vecteur d'expression exprimant le clone d'Env d'intérêt (pCI-*env*), un vecteur d'expression contenant le génome complet délété du gène *env* de la souche de laboratoire NL4-3 (pNL4-3 Δ *env.luc*) et pcDNA-Flag-*ifitm3* ou pcDNA-vide.

Tout d'abord, nous avons évalué la quantité de vecteur pcDNA-Flag-*ifitm3* à transfecter afin d'obtenir un niveau d'incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virus détectable par western blot et modulant leur infectiosité de façon différentielle selon le clone d'*env* utilisé pour les pseudotyper. Nous avons testé les quantités de 0.4 μ g et 1 μ g de vecteur pcDNA-Flag-*ifitm3* et produit des virus pseudotypés par 6 Env différentes. L'analyse par western blot du contenu protéique des virus purifiés à partir du surnageant cellulaire nous montre que tous les virus ont incorporé la protéine IFITM3 à un niveau dépendant de la quantité de vecteur pcDNA-Flag-*ifitm3* (Figure 34A). L'impact de cette incorporation sur l'infectiosité des virus varie selon les Env, et ceci quelle que soit la quantité de vecteur utilisée (Figure 34B). Bien que, à quantité égale de vecteur pcDNA-Flag-*ifitm3* utilisée, de légères variations dans la quantité de protéines IFITM3 incorporées soient observées selon les Env, aucune corrélation n'est observée entre la quantité de protéine IFITM3 incorporée au sein des virions et son effet sur l'infectiosité des virus (Figure 34C).

La protéine IFITM3 ayant été décrite comme retrouvée sécrétée, associée à des exosomes dans le milieu extracellulaire (Tartour et al., 2014; Yu et al., 2015; Zhu et al., 2015), nous avons voulu vérifier que le niveau d'incorporation des protéines IFITM3 au sein des virions n'était pas surestimé par leur association avec des exosomes co-purifiés avec les virus. Pour cela, nous avons tout d'abord regardé si la protéine IFITM3 est retrouvée dans le surnageant cellulaire lorsqu'elle est exprimée de façon transitoire seule (transfection des cellules par pcDNA-Flag-*ifitm3*) ou en présence de virions (co-transfection des cellules par pcDNA-Flag-*ifitm3* et pNL4-3 Δ *env.luc*). L'expression ectopique de la protéine IFITM3 seule dans les cellules HEK293T ne nous permet pas d'observer de protéine

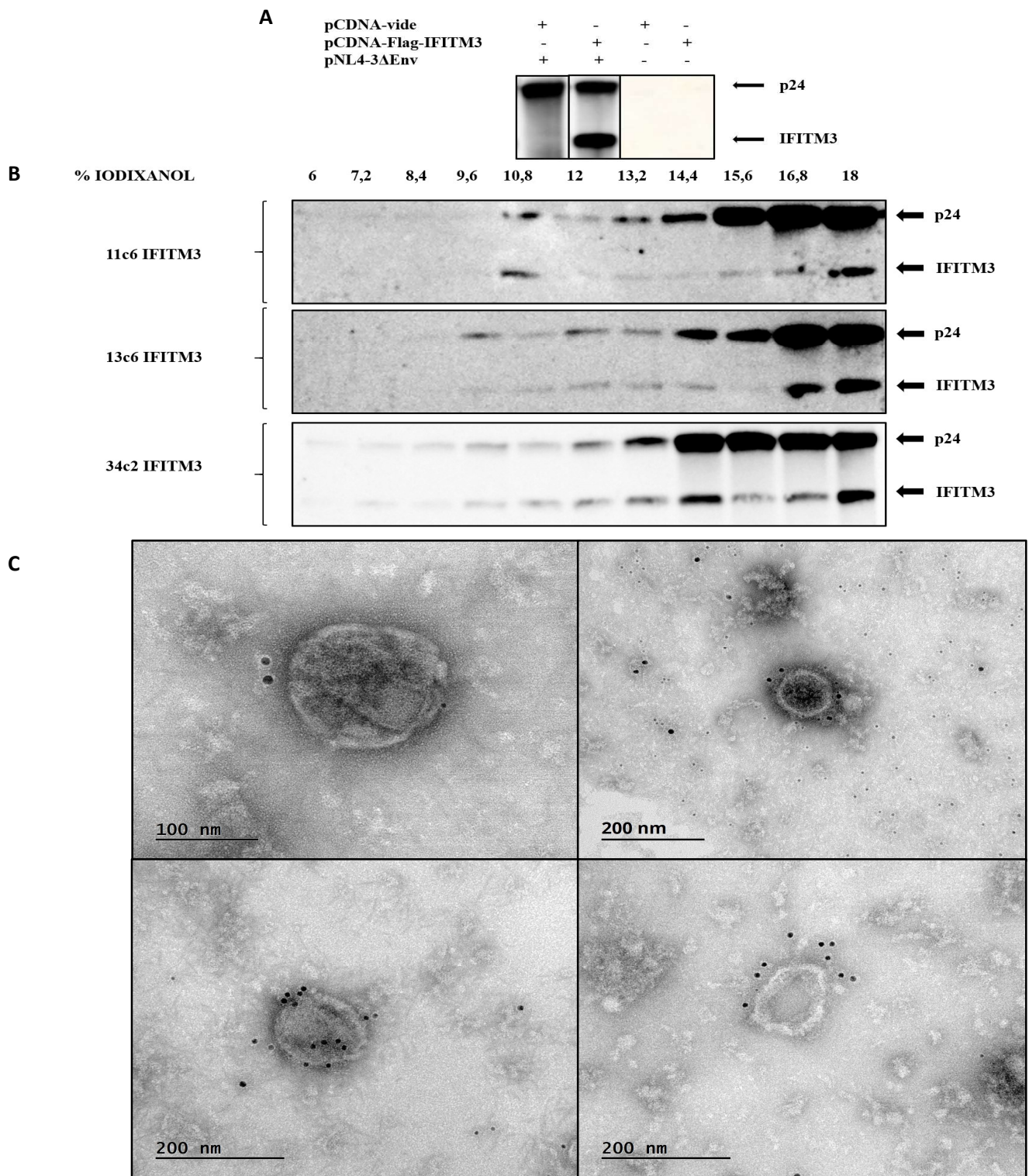


Figure 35 : Vérification de l'incorporation des protéines IFITM3 au sein des virus

(A) Des cellules HEK293T ont été transfectées par pcDNA-*ifitm3*-Flag ou pcDNA vide, seul ou en présence de pNL4-3Δ*env.luc*. Les virus contenus dans les surnageants de transfection ont été récupérés et purifiés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose puis examinés par western Blot. (B) Des cellules HEK293T ont été co-transfectées par pcDNA-*ifitm3*-Flag, pNL4-3Δ*env.luc* et pCI-*env* (clone *env* 11c6, 13c6 ou 34c2). Les virus contenus dans les surnageants de transfection ont été récupérés et ultracentrifugés sur un gradient de iodixanol allant de 6 à 18%. Le contenu protéique de chaque fraction a ensuite été examiné par Western Blot (C) Observation en MET de surnageant viraux concentré après marquage immunogold avec des billes de 6μm couplé à des anticorps anti Env du VIH-1 et des billes de 10μm couplé à des anticorps anti-Flag.

IFITM3 dans le surnageant ; en revanche, la co-expression du génome viral même délété de son enveloppe, conduit à leur détection (Figure 35A). La protéine IFITM3 ne semble pas associée à des exosomes lorsque les cellules ne sont pas dans un état de stress ou de défense mais la production de virions dans ces cellules semble conduire à une sécrétion d'IFITM3 dans le milieu extracellulaire. Afin de rechercher si la protéine IFITM3 présente dans le surnageant est associée ou non aux virions, ces derniers ont été purifiés sur coussin de sucrose puis soumis à une ultracentrifugation en gradient de densité (iodixanol). Le contenu protéique des différentes fractions purifiées a ensuite été étudié par western blot. Nous retrouvons les protéines IFITM3 au sein des même fractions que les protéines de capsid p24, en majorité dans les fractions 13,2 à 18% d'iodixanol, nous confirmant que la grande majorité des protéines IFITM3 sont associées aux particules virales (Figure 35B).

En parallèle, nous avons également observé les virus purifiés à partir de surnageant en microscopie électronique à transmission (MET) après marquage immunogold des Env et des protéines IFITM3 (Figure 35C). Nous observons que la majorité des protéines IFITM3 est associée aux particules virales. Lorsqu'elles ne le sont pas, elles sont plutôt retrouvées au niveau de débris membranaires mais pas particulièrement associées à des exosomes (Figure 35C). L'état de stress des cellules induit par la production de virus semble donc entraîner une libération aléatoire de protéines IFITM3 associées à des débris membranaires et cellulaires mais ce phénomène étant minime et non associé à des exosomes, nous ne considérons pas que cela puisse induire un biais majeur aussi bien dans l'estimation de la quantité de protéines IFITM3 incorporée que dans l'effet sur l'infectiosité.

2) Etude de l'effet de l'incorporation d'IFITM3

Après avoir validé notre modèle, nous avons choisi 11 clones d'Env, 9 provenant d'isolats primaires de patients en primo-infection ou en infection chronique et 2 souches de laboratoire, NL4-3 et AD8, présentant des tropismes différents (Tableau 1).

Env clones	Tropism
AD8, laboratory strain	R5
NL4-3, laboratory strain	X4
2c4, primary isolate, primary infection	X4R5
11c6, primary isolate, primary infection	R5
13c6, primary isolate, primary infection	R5
23c4, primary isolate, primary infection	R5
34c2, primary isolate, primary infection	R5
35c1, primary isolate, primary infection	R5
248-5, primary isolate, primary infection	R5
249N3, primary isolate, chronic infection	R5
249V4, primary isolate, chronic infection	X4R5

Tableau 1 : Caractéristiques des clones Env sélectionnés dans notre étude

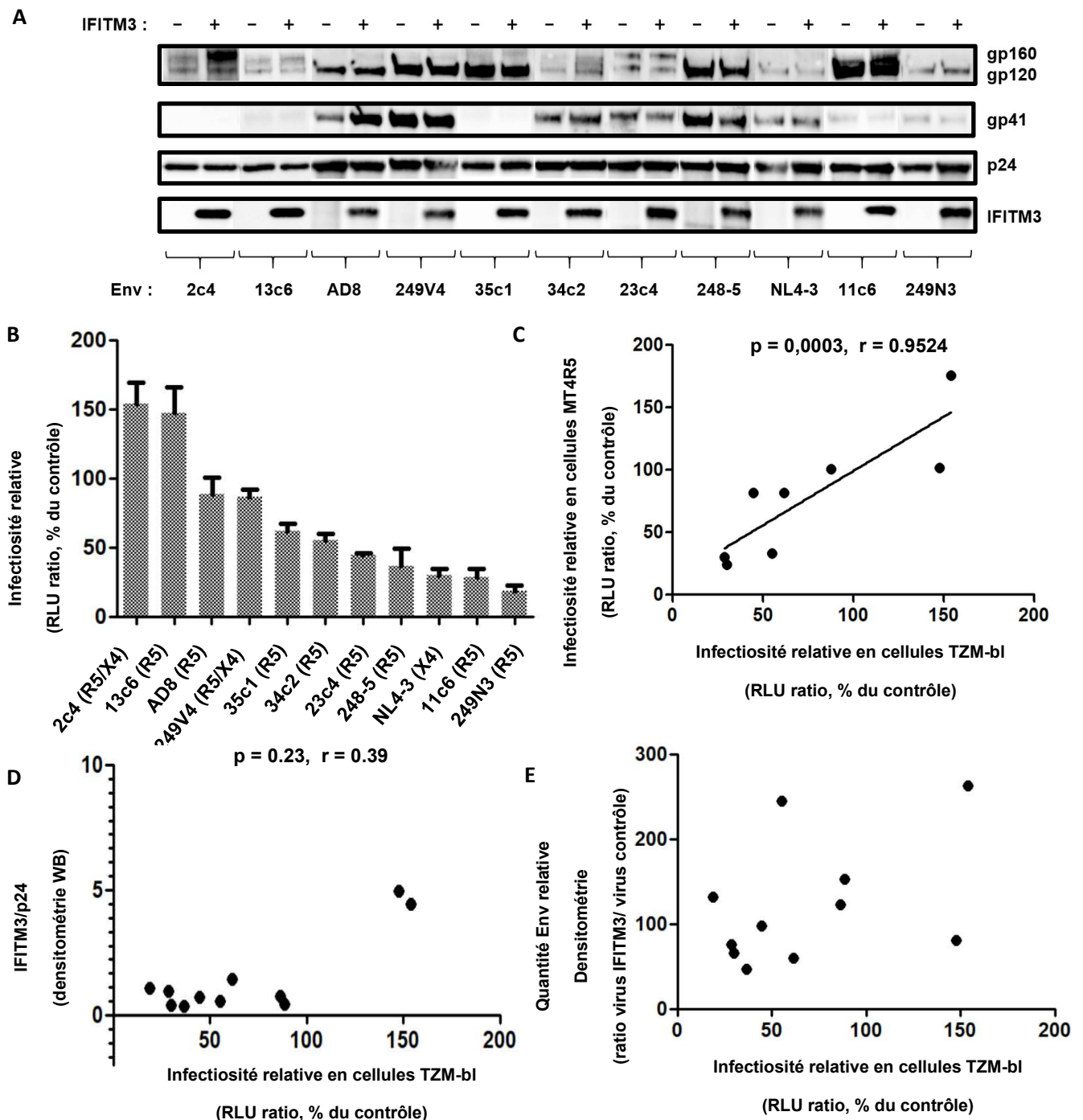


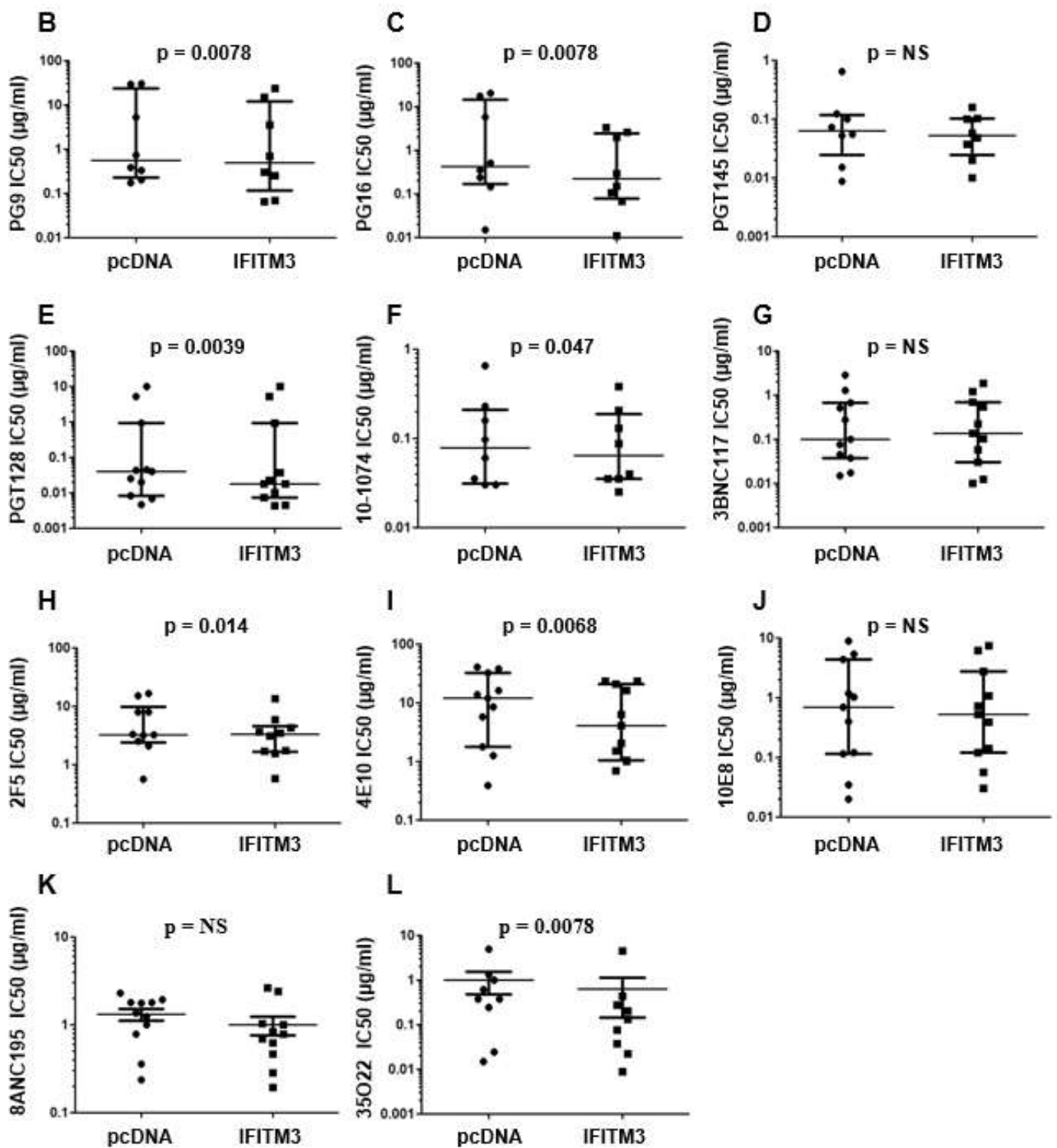
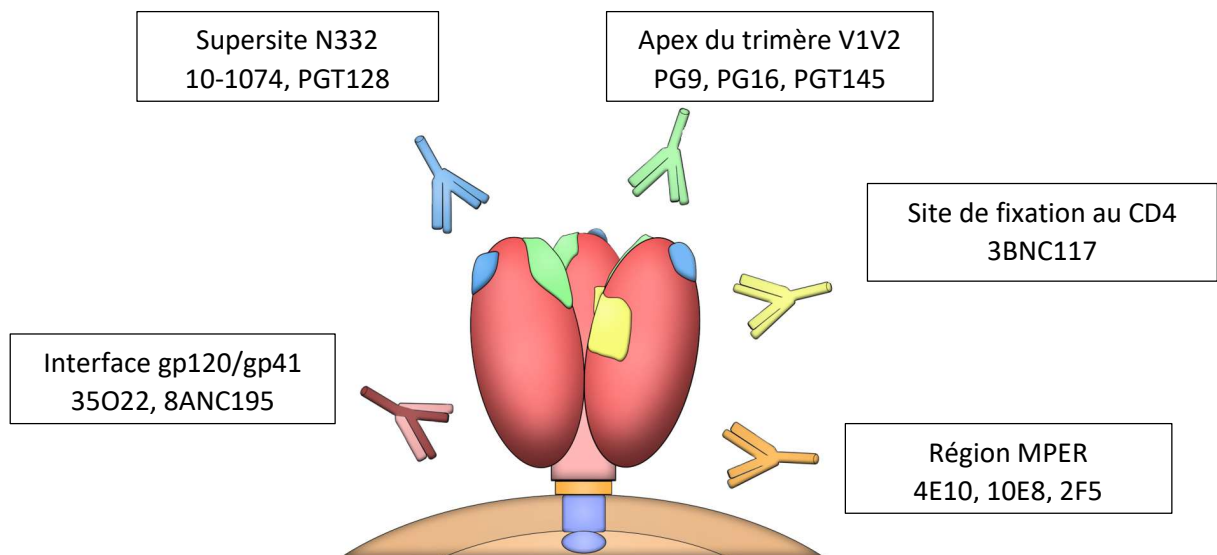
Figure 36 : Effet de l'incorporation des protéines IFITM3 sur l'infectiosité des virus

(A) Des cellules HEK293T ont été co-transfectées par 8µg de pNL4-3ΔEnv.luc, 4µg pCI-env et 1µg de pcDNA-*ifitm3*-Flag ou de pcDNA vide. Les virus présents dans le surnageant cellulaire ont été récoltés 72h post transfection puis purifiés par ultracentrifugation sur cousin de sucrose. Le contenu protéique des virus a ensuite été examiné par western Blot. (B) Les inocula viraux ont été normalisés après mesure de l'activité de la transcriptase inverse et l'infectiosité des virus a été évaluée en mesurant l'activité luciférase (RLU) 48h post-infection dans les cellules cibles TZM-bl. L'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur l'infectiosité de chaque virus a été évaluée en calculant l'infectiosité relative des virus ayant incorporé IFITM3 par rapport au virus contrôle produits sans IFITM3 (ratio de RLU en pourcentage) (C) Corrélation de Spearman positive et statistiquement significative entre l'infectiosité relative des virus pseudotypés en cellules TZM-bl et celle en cellules MT4R5. (D-E) Absence de corrélation entre l'infectiosité relative des virus (ratio RLU) et la quantité de protéine IFITM3 incorporée (densitométrie) (D) ou la quantité d'Env relative en présence d'IFITM3.

Ces Env ont ensuite été utilisées afin de pseudotyper des virus produits en absence et en présence de la protéine IFITM3. Les virions produits sont récoltés dans le surnageant de culture 72h post-transfection puis purifiés et concentrés par ultracentrifugation avant d'être quantifiés par dosage de l'activité de transcriptase inverse (*Reverse transcriptase* ou RT), puis normalisé avant l'évaluation de leur infectiosité et de leur contenu protéique par western blot. Tous les virus produits en présence d'IFITM3 ont incorporé des niveaux détectables de la protéine IFITM3 et, contrairement à ce qui avait été décrit dans la littérature (Yu et al., 2015), cette incorporation ne semble pas avoir d'effet sur le clivage du précurseur gp160 (Figure 36A). En effet, bien que la proportion gp160/gp120 soit variable d'un virus à l'autre, elle ne varie pas ou peu après incorporation de la protéine IFITM3.

Nous avons ensuite comparé l'infectiosité des virus pseudotypés ayant incorporé la protéine IFITM3 ou non, dans les cellules cibles TZM-bl en cycle unique d'infection. L'inoculum d'infection a été normalisé grâce à la quantification de l'activité RT contenue dans les surnageants de transfection et l'infectiosité a été mesurée 48h post transfection. Parmi les 11 virus pseudotypés, 7 ont été considérés comme sensibles à l'incorporation d'IFITM3 (Env 35c1, 34c2, 23c4, 248-5, NL4-3, 11c6 et 249N3), leur infectiosité étant significativement diminuée en présence d'IFITM3 par rapport au virus contrôle tandis que les 4 autres ont été considérés comme résistants (Env 2c4, 13c6, AD8, 249V4), avec peu ou pas d'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur leur infectiosité (Figure 36B). A noter qu'un impact similaire de la protéine IFITM3 a également été observé sur l'infectiosité des virus en lignée lymphocytaire MT4R5 ; une corrélation positive et statistiquement significative (Spearman, $p = 0.0003$; $r = 0.9524$) a ainsi été mise en évidence entre l'infectiosité relative de nos virus en cellules TZM-bl et en cellules MT4R5 (Figure 36C). Parmi les clones d'Env testés, il est intéressant de noter que le clone sensible 249N3 provient du même isolat primaire de patient que le clone résistant 249V4.

Comme précédemment, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre l'infectiosité relative des virus (infectiosité en présence d'IFITM3 versus sans IFITM3) et la quantité de protéine IFITM3 incorporée au sein des virions (Figure 36D). De même, nous ne trouvons aucune corrélation entre l'infectiosité relative des virus et la quantité relative d'Env présente à la surface des virus (Figure 36E). La sensibilité ou résistance des virus à la restriction par IFITM3 semble donc uniquement dépendante de la nature de l'Env portée à leur surface. A noter également, que contrairement à ce qui avait été décrit dans la littérature pour la sensibilité des virus à la restriction par IFITM3 dans les cellules cibles (Foster et al., 2016), nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre le tropisme des Env et leur phénotype de sensibilité à la protéine IFITM3 lorsque celle-ci est présente dans les cellules productrices. En effet, certaines Env R5 (AD8, 13c6) ou X4R5 (2c4) sont résistantes alors que d'autres R5 (11c6, 248-5) ou X4R5 (249N3) sont sensibles.



Afin d'apporter un éclairage quant au mécanisme d'action de la protéine IFITM3, nous avons cherché à déterminer si en sa présence, les virus présentaient des variations de sensibilité à certains anticorps largement neutralisants, des bNAbs. Si tel était le cas, cela pourrait témoigner d'un impact de la protéine IFITM3 sur l'exposition des épitopes ciblés à la surface des virions et donc sur la conformation des trimères d'Env. Nous avons donc testé un éventail d'anticorps monoclonaux humains largement neutralisants (HuMobNAbs) ciblant différentes régions fonctionnelles de l'Env telles que les boucles V1V2, la boucle V3, le site de fixation au CD4, la région MPER ou encore l'interface gp120/gp41 (Figure 37). Nous avons observé que l'incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virus pseudotypés les sensibilise à l'action inhibitrice de la plupart des anticorps testés. En effet, parmi les 11 anticorps utilisés, une diminution significative des valeurs d'IC50 (concentration d'anticorps permettant une inhibition de l'infection de 50%) a été observée pour 7 d'entre eux. Les anticorps pour lesquels une augmentation de la sensibilité a été observée sont les anticorps PG9 et PG16 ciblant la V1V2 (Figure 37B et 37C), PGT128 et 10-1074 ciblant la V3 (Figure 37E et 37F), le 2F5 et le 4E10 ciblant la région MPER (Figure 37H et 37I) et le 35O22 ciblant l'interface gp120/gp41 (Figure 37L). Les effets sur la sensibilité à la neutralisation concernent la majorité des épitopes testés ce qui suggère un effet d'IFITM3 sur la conformation globale des Env.

Pour compléter ces données, nous avons également mesuré l'impact de la protéine IFITM3 sur la sensibilité des virus à différents inhibiteurs d'entrée, tels qu'un inhibiteur d'attachement au récepteur CD4, le sCD4-183 (forme soluble du CD4), un inhibiteur de fusion, l'enfuvirtide ou T20 et un inhibiteur d'attachement au corécepteur CCR5, le maraviroc (MVC) (Figure 38). Nous n'avons pas observé de variation de sensibilité des virus au sCD4-183 ou au T20 en présence d'IFITM3, alors qu'une diminution significative des valeurs d'IC50 a été observée pour le maraviroc (Figure 38C, $P = 0.014$). Cette augmentation significative de la sensibilité des virus au MVC en présence d'IFITM3 suggère que l'incorporation de cette protéine pourrait modifier la conformation des trimères d'enveloppe et moduler l'interaction des virus R5 ou X4R5 avec le corécepteur CCR5.

Nous avons ensuite cherché à identifier si certaines propriétés permettaient de différencier les virus sensibles des virus résistants à IFITM3. Nous avons donc évalué si l'augmentation de la sensibilité observée pour certains MobNAbs et pour le maraviroc est liée à la sensibilité des virus à IFITM3. La seule différence observée entre les virus sensibles et les virus résistants concerne l'anticorps PG16 ciblant la région V1V2. En présence d'IFITM3, les virus sensibles à IFITM3 sont plus sensibilisés à l'action de cet anticorps que les virus résistants à IFITM3. Une corrélation statistiquement significative a été trouvée entre la sensibilité des virus à IFITM3 et l'augmentation de la sensibilité de ces virus à la neutralisation par PG16 ($P = 0.0065$, $r = 0.86$) (Figure 39).

Figure 37 : Impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur la sensibilité des virus pseudotypés à certains bNAbs

(A) Représentation schématique des épitopes ciblés par les anticorps neutralisants utilisés. (B) Comparaison de la sensibilité des virus pseudotypés, produits en présence (IFITM3) et en absence (pcDNA) d'IFITM3, à la neutralisation par des bNAbs ciblant la V1V2 (panels B à D), la V3 (panels E et F), le site de fixation au CD4 (panel F), la région MPER (panels H à J) et l'interface gp120/gp41 (panels K et L). Les dot plots représentent la distribution des valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibant 50% de l'infectiosité des virus, exprimée en mg/ml) pour chaque bNAbs dans les deux groupes de virus; les lignes horizontales représentent le 10^{ème} percentile, la médiane et le 90^{ème} percentile. La significativité statistique des différences observées a été évaluée par un test de Wilcoxon.

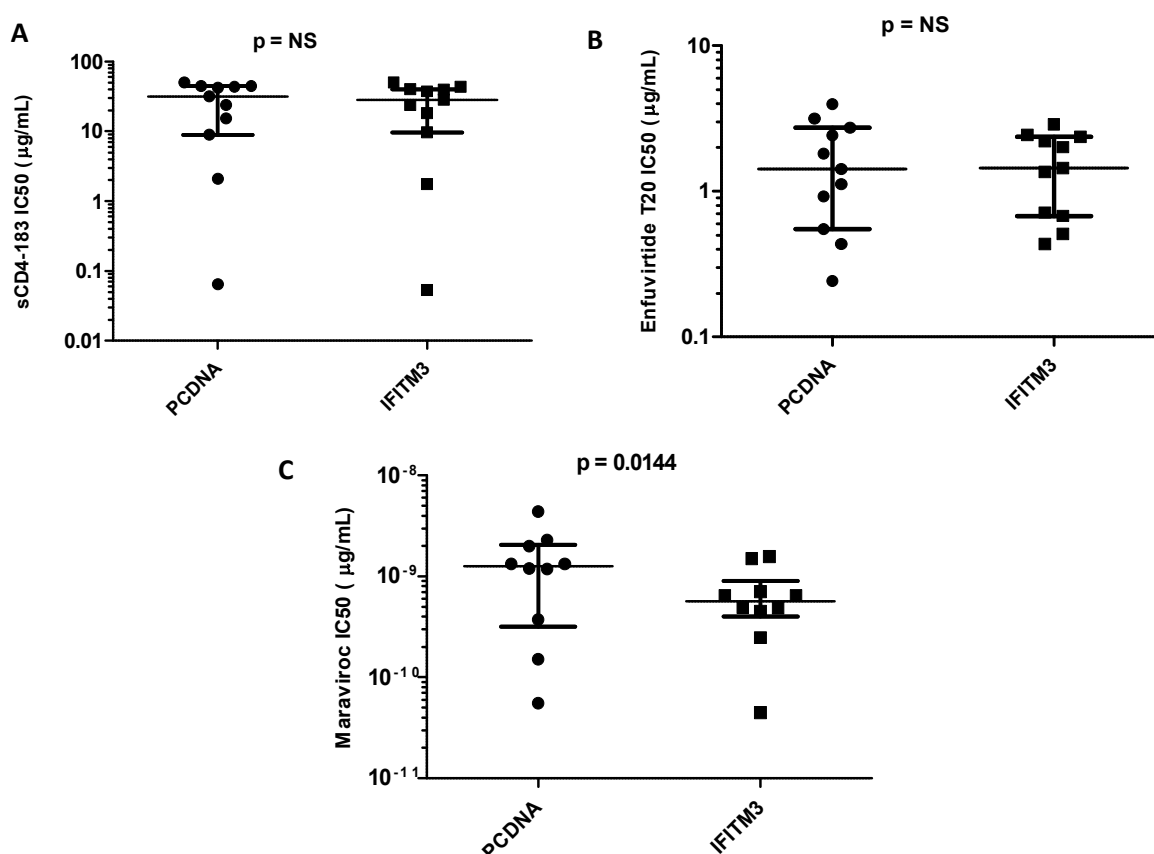


Figure 38 : Impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur la sensibilité des virus pseudotypés à différents inhibiteurs d'entrée

Comparaison de la sensibilité des virus pseudotypés, produits en présence (IFITM3) et en absence d'IFITM3 (pcDNA), aux inhibiteurs d'entrée suivant : (A) le CD4-183s, forme soluble du CD4, qui inhibe la fixation du virus au récepteur ; (B) l'enfuvirtide ou T20, inhibiteur de fusion virale et (C) le maraviroc qui est un inhibe la fixation des virus au CCR5. Les dot plots représentent la distribution des valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibant 50% de l'infectiosité des virus, exprimée en mg/ml) pour chaque inhibiteur d'entrée dans les deux groupes de virus; les lignes horizontales représentent le 10^{ème} percentile, la médiane et le 90^{ème} percentile. La significativité statistique des différences observées a été évalué par un test de Wilcoxon

Ces résultats suggèrent que l'incorporation d'IFITM3 favorise l'exposition de l'épitope V1V2 glycan-dépendant à la surface des virus sensibles à IFITM3.

Ainsi, contrairement à ce qui avait été décrit par Wang et coll., nous n'avons pas trouvé de lien entre la sensibilité des virus à IFITM3 et leur sensibilité au CD4 soluble (Wang et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec le dernier article de Beitari et coll. qui montrent qu'il existe un lien entre sensibilité des virus à SERINC5 et leur sensibilité au CD4 soluble, mais que ce n'est pas le cas pour la sensibilité des virus à IFITM3.

3) Etude des déterminants moléculaires de Env

La mise en évidence de corrélations significatives entre la sensibilité des virus à la restriction par IFITM3 et la variation de sensibilité à l'anticorps PG16, ciblant un épitope glycan-dépendant au niveau de la région V1V2, nous permet de poser l'hypothèse que ces boucles variables V1V2 situées à l'apex du trimère pourraient moduler la sensibilité des Env à la restriction par IFITM3.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré des constructions d'Env chimériques dans lesquelles les boucles variables V1V2 d'Env de virus sensibles à IFITM3 ont été échangées par celles d'Env de virus résistants à IFITM3 et vice versa (Figure 40A). Nous avons généré trois constructions à partir de l'Env du virus résistant AD8, dans laquelle les boucles V1V2 ont été remplacées par celles des Env des 3 virus sensibles NL4-3, 249N3 et 11c6. Les virus pseudotypés par les Env chimériques résultantes sont tous devenus très sensibles à IFITM3 avec des infectiosités relatives diminuant de 88 à 13 % pour AD8-V1V2(NL4-3), à 7 % pour AD8-V1V2(249N) et à 12 % pour AD8-V1V2(11c6) (Figure 40B). De la même façon, nous avons remplacé les boucles variables V1V2 de l'Env du virus sensible NL4-3 par celles des Env des virus résistants AD8, 2c4 et 249V4 mais les virus pseudotypés exprimant ces constructions se sont révélés non infectieux (données non montrées). Nous avons donc utilisé comme squelette, l'Env d'un autre virus sensible, le virus 249N3, dans laquelle la substitution des boucles V1V2 nous a permis cette fois d'obtenir des virus pseudotypés infectieux. Contrairement à l'effet important et homogène obtenu pour les 3 constructions chimériques obtenues à partir de l'Env du virus résistant AD8 (Figure 40B), la substitution des boucles V1V2 dans l'Env du virus sensible 249N3 a un impact plus variable avec une augmentation de l'infectiosité relative de 19 % à 105 % pour 249N3-V1V2(AD8) mais seulement de 19 à 33 % pour 249N3-V1V2(249V4) et même une légère diminution à 8% pour 249N3-V1V2(2c4) (Figure 40C). Ces derniers résultats suggèrent que bien que les boucles variables V1V2 semblent jouer un rôle important dans la modulation de la sensibilité des virus à IFITM3, d'autres déterminants moléculaires pourraient être impliqués. Nous avons donc posé l'hypothèse que la boucle V3 pourrait jouer un rôle complémentaire aux boucles V1V2 dans la modulation de la

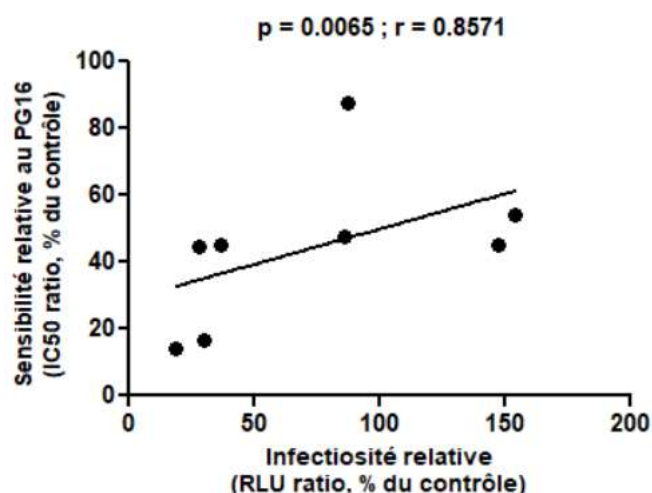


Figure 39 : Corrélation entre la sensibilité des virus pseudotypés à IFITM3 et leur augmentation de sensibilité à PG16

L'impact de l'incorporation d'IFITM3 sur l'augmentation de la sensibilité à la neutralisation a été évalué en calculant, sous forme de pourcentage, le ratio des valeurs d'IC50 entre les virus produits en absence d'IFITM3 (pcDNA) et en sa présence (IFITM3).

A

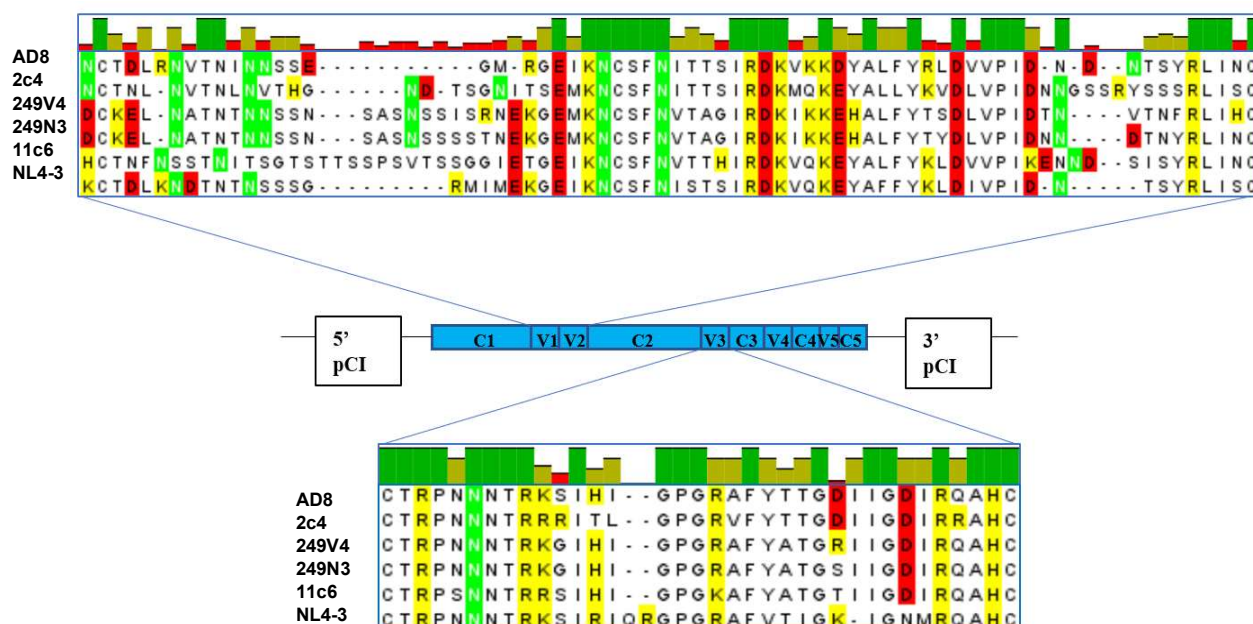


Figure 40 : Impact des boucles V1V2 et V3 de Env sur la sensibilité des virus à IFITM3

(A) Alignement des séquences en acides aminés des boucles V1V2 et V3 d'Env de virus sensibles (249N3, 11c6 and NL4-3) et de virus résistants à IFITM3 (AD8, 2c4 and 249V4). Les acides aminés chargés positivement sont en rouge, ceux chargés négativement en jaune et les sites potentiels de N-glycosylation en vert.

sensibilité des Env à IFITM3. En effet, la boucle V3 est très proche des boucles V1V2 au sein du trimère d'Env, au niveau de son apex et il a été montré que certaines substitutions dans la boucle V3 seraient responsable d'une augmentation de la résistance virale à la neutralisation par l'anticorps PG16 (Walker et al., 2009). De plus, les travaux de Wang et coll. ont récemment suggéré que la boucle V3 serait un déterminant majeur de Env modulant la sensibilité du virus NL4-3 à la restriction par IFITM3 (Wang et al., 2017).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons généré de nouvelles constructions d'Env chimériques dans lesquelles les boucles V3 ont été échangées entre Env sensibles et résistantes (Figure 40A). Nous avons tout d'abord remplacé la boucle V3 de l'Env du virus résistant AD8 par celle des Env des virus sensibles NL4-3, 249N3 et 11c6. La substitution de la boucle V3 de l'Env du virus AD8 par celle de l'Env du virus NL4-3 n'a pas permis de générer des virus pseudotypés infectieux ; ainsi seulement deux constructions ont pu être évaluées. Les virus pseudotypés porteurs des deux Env chimériques fonctionnelles ont montré une augmentation significative de leur sensibilité à IFITM3 par rapport au virus exprimant l'Env parentale AD8, avec une diminution de l'infectiosité relative de 88 à 41% pour les deux constructions, AD8-V3(11c6) et AD8-V3(249N3) (Figure 40D). De la même façon, nous avons remplacé la boucle V3 de l'Env du virus sensible NL4-3 celle des Env des virus résistants AD8, 2c4 et 249V4 (Figure 40A). Comme cela avait déjà été montré par Wang et coll, le virus exprimant l'Env NL4-3-V3(AD8) montre une augmentation de sa résistance à IFITM3 à un niveau similaire à celui du virus exprimant l'Env parentale AD8, avec une augmentation de son infectiosité relative de 30 à 118% (Figure 40E) (Wang et al., 2017). En revanche, les virus porteurs des Env NL4-3-V3(2c4) et NL4-3-V3(249V4) montrent une augmentation de leur infectiosité relative plus modérée atteignant seulement 60 et 51% respectivement. Ces données montrent que la boucle V3, comme les boucles V1V2, est un déterminant important de la modulation de la sensibilité des virus à IFITM3.

Les substitutions des boucles V1V2 ou V3 ayant parfois un impact partiel dans la modulation de la sensibilité des virus à IFITM3, nous avons ensuite combiné les substitutions des boucles V1V2 et V3. Nous avons tout d'abord remplacé les boucles V1V2 et V3 de l'Env du virus résistant AD8, par celles des Env des virus sensibles NL4-3, 249N3 et 11c6 puis, inversement, nous avons remplacé les boucles V1V2 et V3 de l'Env du virus sensible NL4-3 par celles des Env des virus résistants AD8, 2c4 et 249V4 (Figure 40A). Les substitutions combinées des boucles V1V2 et V3 dans AD8 ont entraîné la production de virus pseudotypés présentant des infectiosités relatives considérablement diminuées et semblables à celles des virus sensibles parentaux, passant de 88% à 23% pour AD8-V1V2V3(NL4-3), à 25% pour AD8-V1V2V3(249N3) et à 35% pour AD8-V1V2V3(11c6) (Figure 40F). De façon similaire, deux des trois constructions réalisées à partir de l'Env NL4-3 ont permis la

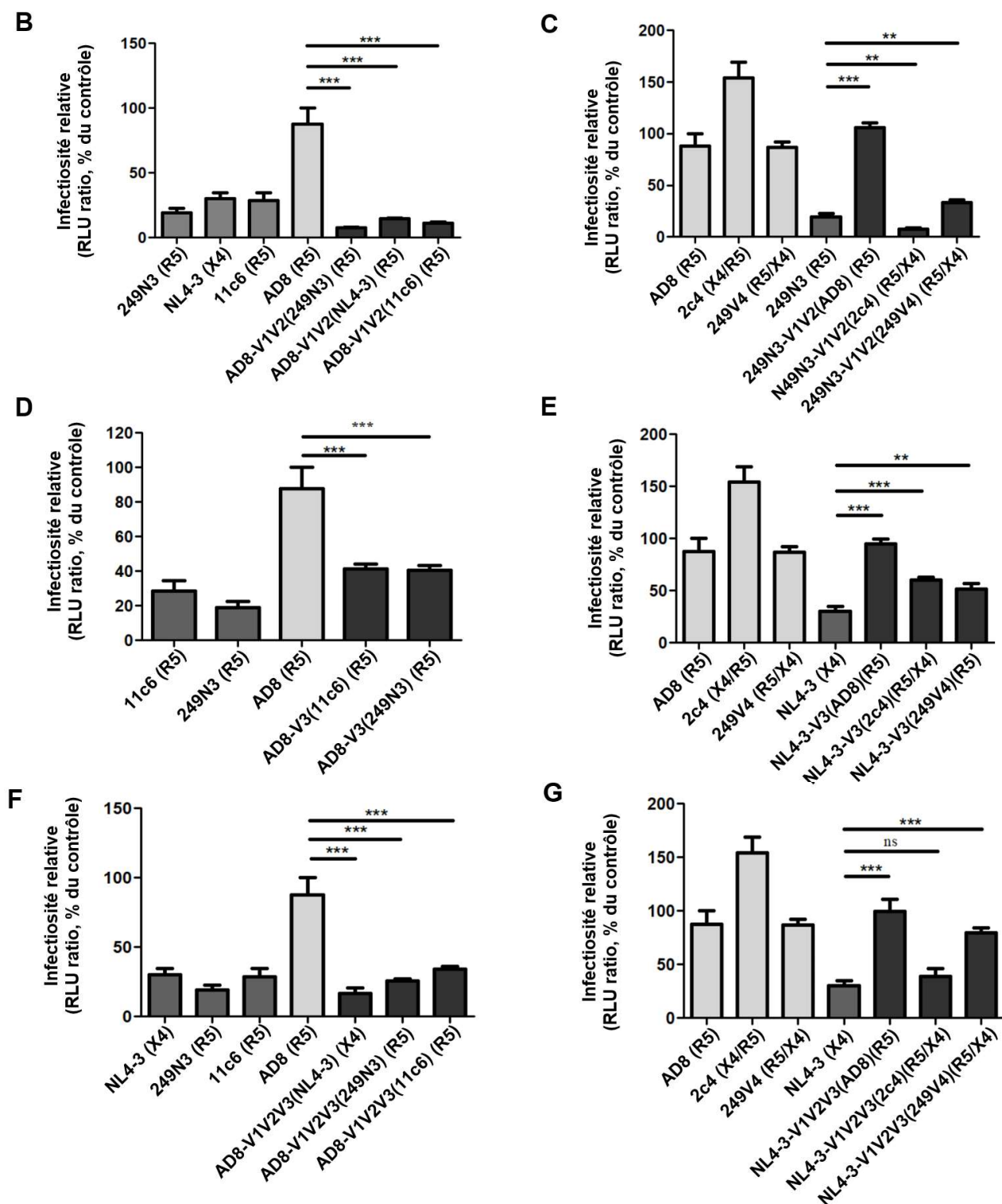


Figure 40 (suite) : Impact des boucles V1V2 et V3 de Env sur la sensibilité des virus à IFITM3

(B to G) Les virus sont pseudotypés par les Env parentales or chimériques et ont été produits en présence ou en absence de la protéine IFITM3 en cotransfectant des cellules HEK293T avec pNL4-3 Δ env.luc, pCI-env (parentale ou chimérique) et soit pcDNA-ifitm3-Flag ou pcDNA vide. Les virus présents dans le surnageant cellulaire ont été récoltés 72h post transfection puis purifiés par ultracentrifugation sur cousin de sucrose. Les inocula viraux ont été normalisés après mesure de l'activité de la transcriptase inverse et l'infectiosité des virus a été évaluée en mesurant l'activité luciférase (RLU) 48h post-infection dans les cellules cibles TZM-bl. L'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur l'infectiosité de chaque virus a été évaluée en calculant l'infectiosité relative des virus ayant incorporé IFITM3 par rapport au virus contrôle produits sans IFITM3 (ratio de RLU en pourcentage). Les Env chimériques ont été générés en échangeant les boucles V1V2 et/ou V3 de la façon suivante : (B) les boucles V1V2 des Env des virus sensibles ont été incorporées dans l'Env résistante du virus résistant AD8, (C) les boucles V1-V2 des Env des virus résistants ont été incorporées dans

l'Env du virus sensible 249N3, (D) les boucles V3 des Env des virus sensibles ont été incorporées dans l'Env du virus résistant AD8, (E) les boucles V3 des Env des virus résistants ont été incorporées dans l'Env du virus sensible NL4-3 ; (F) les boucles V1V2 et V3 des Env des virus sensibles ont été incorporées dans l'Env du virus résistant AD8; (G) les boucles V1V2 et V3 des Env des virus résistants ont été incorporées dans l'Env du virus sensible NL4-3. La significativité des différences de sensibilité observées entre les virus pseudotypés par les Env parentales et par les Env chimériques a été évaluée par un test statistique de Student.

production de virus pseudotypés présentant des infectiosités relatives augmentées atteignant des niveaux semblables à celui des virus résistants parentaux, passant de 30% à 120% pour NL4-3-V1V2V3(AD8) et à 87% pour NL4-3-V1V2V3(249V4) (Figure 40G). En revanche, la dernière construction réalisée à partir de l'Env du virus sensible NL4-3 et dans laquelle les boucles V1V2 et V3 ont été remplacées par celles de l'Env du virus résistant 2c4, ne montre qu'un effet modeste et non significatif sur la sensibilité à IFITM3, suggérant que pour cette Env particulière d'autres déterminants moléculaires doivent être impliqués dans la résistance à IFITM3.

L'ensemble de ces données confirme que les boucles variables V1V2 et V3 de Env ont des rôles complémentaires dans la modulation de la sensibilité des virus à IFITM3. Cela est particulièrement illustré par les boucles variables V1V2 et V3 de l'Env du virus résistant 249V4 qui augmentent modérément la résistance des virus sensibles lorsqu'elles sont introduites séparément, alors que introduites de façon combinée l'augmentent de façon considérable, jusqu'à atteindre le niveau de résistance du virus parental 249V4.

Pour autant, aucune séquence signature nous permettant de distinguer les Env sensibles des Env résistantes à IFITM3 n'a pu être identifiée au sein des boucles V1V2 et V3. De même, le nombre de sites potentiels de N-glycosylation (PNGS) ainsi que le nombre de résidus chargés sont similaires dans les deux groupes (Figure 40A).

Nous avons étendu notre analyse de corrélation entre la sensibilité des virus à IFITM3 et l'augmentation de la sensibilité à l'anticorps PG16 aux virus pseudotypés par les Env chimériques, en évaluant la sensibilité de l'ensemble des virus en présence et en absence de la protéine IFITM3. Après avoir éliminé deux constructions très résistantes à PG16 (IC50 supérieure à la plus haute concentration utilisée), l'analyse confirme que l'incorporation d'IFITM3 dans les particules virales sensibilise les virus à l'action inhibitrice de PG16, avec une diminution des IC50 qui corrèle avec la sensibilité des virus à IFITM3 (Figure 41).

Enfin, nous avons de nouveau recherché un lien entre le phénotype de sensibilité des virus à IFITM3 et leur tropisme, en déterminant le tropisme des Env chimériques par la mesure de leur capacité à infecter des cellules CD4⁺ U373 MAGI exprimant soit le corécepteur CXCR4 ou CCR5.

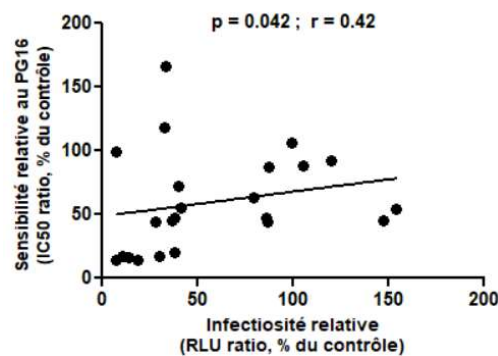
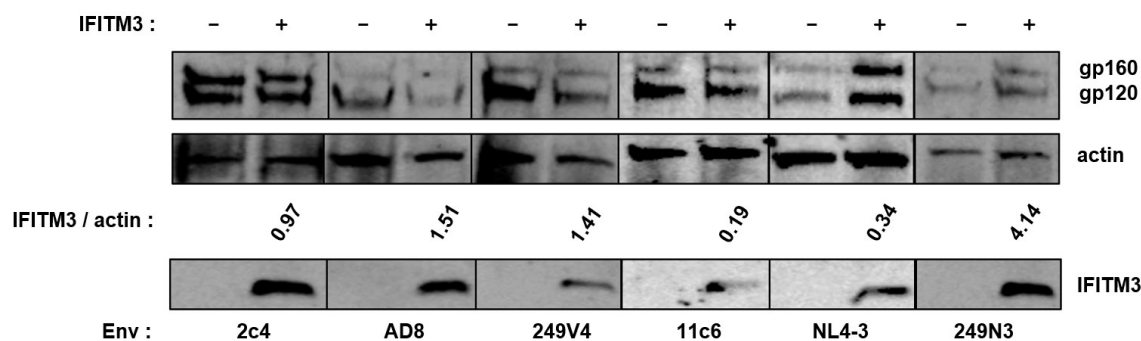


Figure 41: Corrélation entre la sensibilité des virus pseudotypés par les Env parentales et chimériques à la restriction par IFITM3 et l'augmentation de la sensibilité à PG16

L'impact de l'incorporation d'IFITM3 sur l'augmentation de la sensibilité à la neutralisation a été évalué en calculant, sous forme de pourcentage, le ratio des valeurs d'IC50 entre les virus produits en absence d'IFITM3 (pcDNA) et en sa présence (IFITM3).

A



B

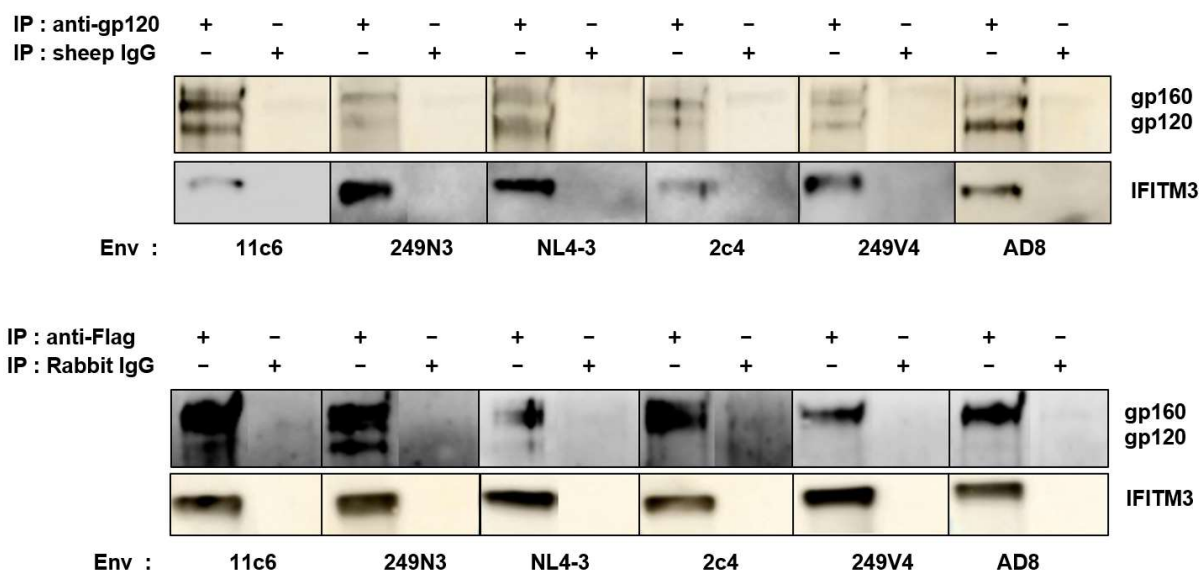


Figure 42 : Interaction entre Env et IFITM3 dans les cellules productrices

(A) Des cellules HEK293T ont été cotransfecté avec pNL4-3 Δ env-luc, pCI-env et pcDNA-ifitm3-Flag ou pcDNA vide. Les cellules ont ensuite été lysées 32 heures post-transfection dans du tampon RIPA. La quantité d'Env et de protéine IFITM3 a été évaluée par estern blot en utilisant des anticorps anti-gp120 et anti-Flag-M2. La β -actine a été utilisée comme contrôle endogène. Les ratios IFITM3/actine ont été calculés en mesurant l'intensité des bandes d'IFITM3 et d'actine à l'aide du logiciel ImageQuant TL8.1 (GE Healthcare).

(B) Les lysats ont ensuite été immunoprécipités avec un antiserum de mouton anti-gp120 ou un isotype contrôle IgG de mouton (panel du haut) et avec un anticorps anti-Flag ou un isotype contrôle de lapin (panel du bas). Les proteines immunoprécipitées ont ensuite été soumises à un western blot comme en (A).

Comme pour les Env parentales, nous n'avons trouvé aucun lien entre le phénotype de sensibilité à IFITM3 et le tropisme des Env chimériques (Figure 40B à 40G).

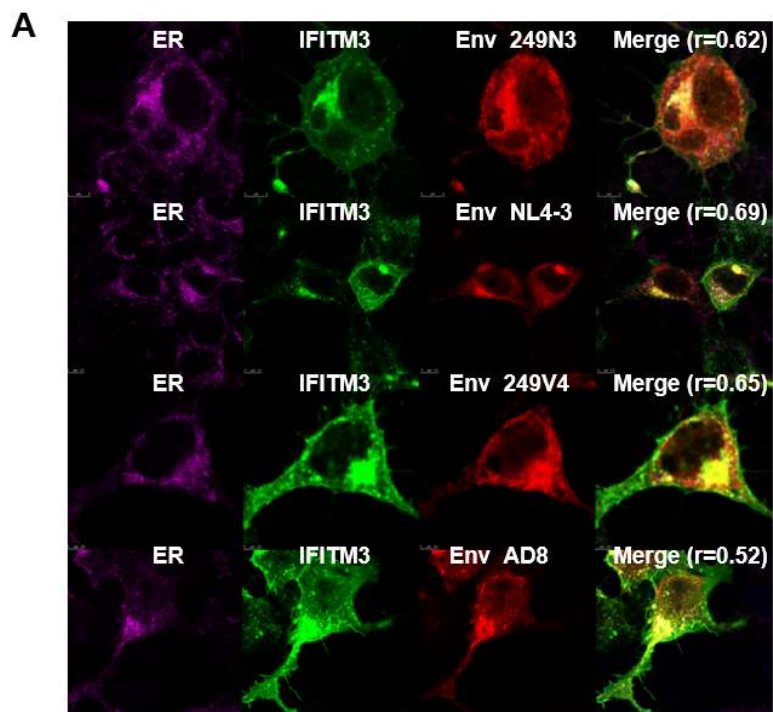
Partie 2 : Etude de l'interaction de la protéine IFITM3 avec Env dans les cellules productrices

1) Caractérisation de l'interaction entre IFITM3 et Env

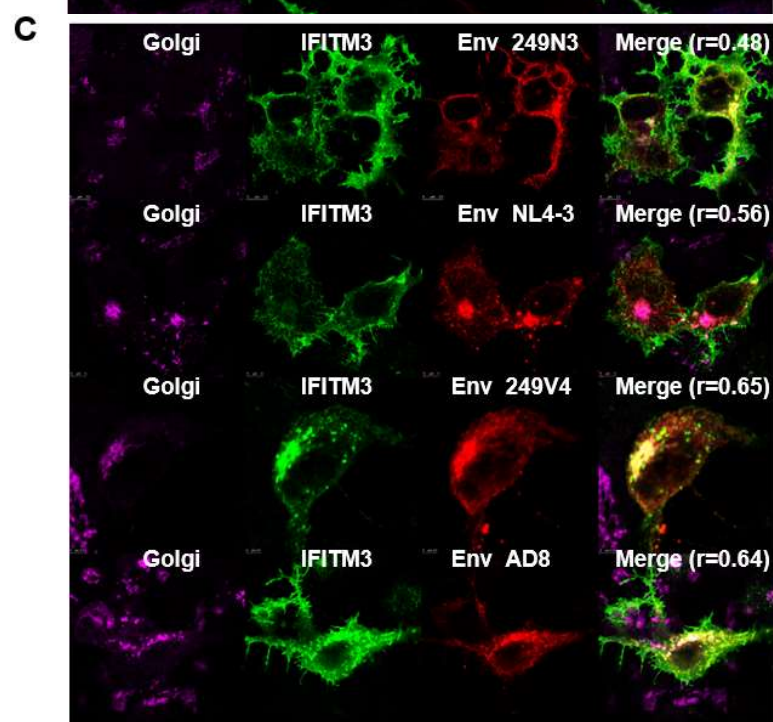
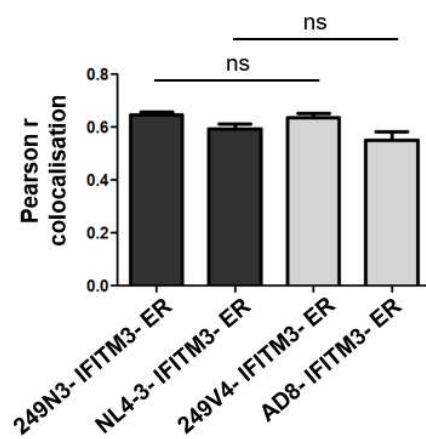
Une interaction physique a été décrite dans la littérature entre Env et la protéine IFITM3 dans les cellules productrices HEK293T. Nous avons donc voulu vérifier l'existence de cette interaction et rechercher s'il existe des différences d'interaction entre les virus sensibles et résistants à IFITM3. Pour cela nous avons co-transfecté des cellules HEK293T comme précédemment avec les vecteurs pCI exprimant les Env des virus AD8, 2c4 ou 249V4 résistants à IFITM3 ou celles des virus 11c6, 249N3 ou NL4-3 sensibles à IFITM3, ainsi que le vecteur pNL4-3 Δ env.luc et le vecteur pCDNA contenant ou non le gène *ifitm3*.

Le contenu protéique des lysats cellulaires préparés 32 h post-transfection a été évalué par western blot. Comme observé dans les particules virales (Figure 36A), l'expression d'IFITM3 dans les cellules productrices varie légèrement entre les différentes transfections en cellules HEK293T mais ne semble pas avoir d'effet significatif sur la production et la maturation des Env testées (Figure 42A).

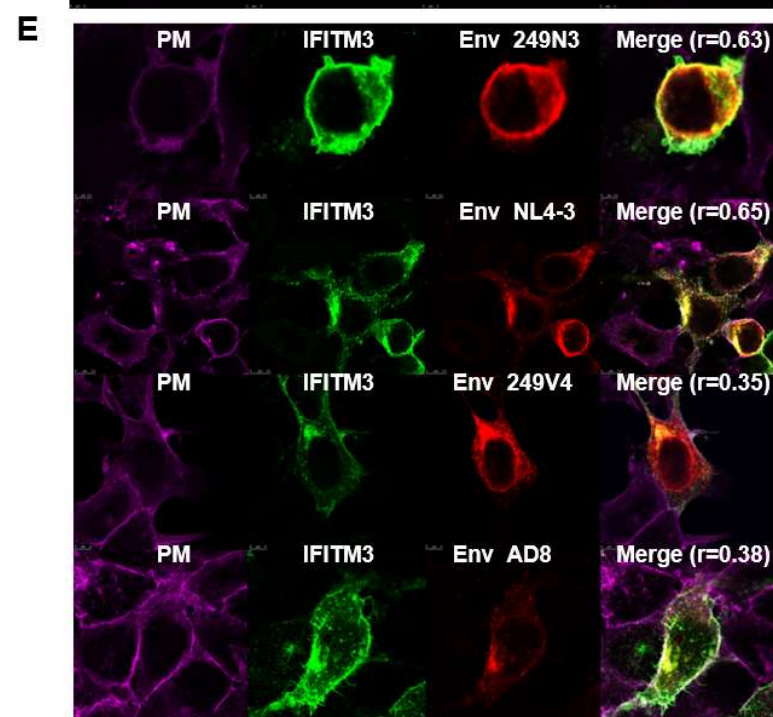
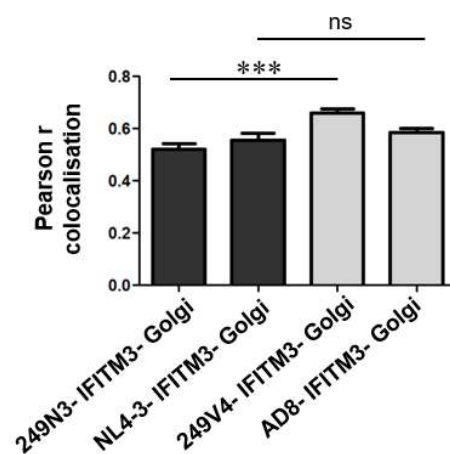
Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunoprécipitation sur ces lysats cellulaires avec soit un sérum anti-gp120 ou un anticorps anti-Flag. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été analysées par western blot (Figure 42B). Nous avons observé que quel que soit l'Env testée, le sérum anti-gp120 entraîne l'immunoprécipitation de la gp120 et de son précurseur, la gp160, ainsi que la co-immunoprécipitation de la protéine IFITM3 (Figure 42B, panel du haut). En revanche, lorsque l'immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps anti-Flag, des différences sont observées en fonction du phénotype de sensibilité de l'Env testée à la restriction par IFITM3. Ainsi, pour les Env sensibles, seul le précurseur gp160 est co-immunoprécipité avec la protéine IFITM3 alors que pour les Env résistantes, le précurseur gp160 et la sous-unité mature gp120 sont co-immunoprécipités avec IFITM3 (Figure 42B, panel du bas). Ces résultats suggèrent que les Env sensibles interagissent avec la protéine IFITM3 aussi bien sous leur forme précurseur que sous leur forme mature. En revanche, l'interaction des Env résistantes avec la protéine IFITM3 semble inhibée après leur maturation au sein de l'appareil de Golgi.



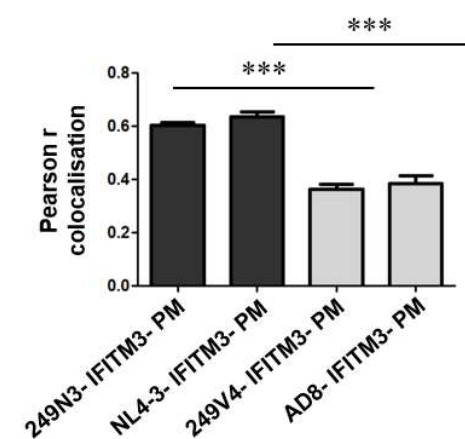
B



D



F



2) Suivi de la localisation des protéines IFITM3 et Env au sein des cellules productrices

Pour étayer ces hypothèses, nous avons suivi la localisation des Env de 2 virus sensibles (NL4-3, 249N3) ou de 2 virus résistants (AD8, 249V4) et de la protéine IFITM3 au sein des cellules productrices en microscopie confocale après immuno-marquage des protéines d'intérêt et de marqueurs des différents compartiments cellulaires. 32 heures après la co-transfection des cellules HEK293T par chaque pCI-*env*, pNL4-3Δ*env.luc* et pcDNA-Flag-*ifitm3*, les cellules ont été fixées puis marquées par un anticorps anti-IFITM3, un anticorps anti-Env et un anticorps ciblant le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique. Les anticorps ont ensuite été incubés avec des anticorps secondaires conjugués à différents fluorochromes : AlexaFluor 488 (vert) pour la protéine IFITM3, AlexaFluor 594 (rouge) pour l'Env du VIH-1 et AlexaFluor 647 (violet) pour les compartiments cellulaires. Pour chaque condition, l'analyse d'une trentaine d'acquisition en z-stack à l'aide du logiciel Imaris nous a permis de calculer les coefficients moyens de colocalisation de Pearson.

Une forte colocalisation a été observée entre les Env et IFITM3 au niveau du réticulum endoplasmique (Figure 43A et 43B) et l'appareil de Golgi (Figure 43C et 43D) quelle que soit l'Env étudiée. L'analyse des coefficients de colocalisation de Pearson ne démontre pas de différence majeure dans le degré de colocalisation entre les Env et IFITM3 dans ces deux compartiments, excepté pour l'Env du virus résistant 249V4 qui montre une colocalisation plus importante avec IFITM3 dans l'appareil de Golgi que l'Env du virus sensible 249N3 (Coefficient de Pearson $r = 0.66$ pour 249V4 contre $r = 0.52$ pour 249N3), bien que la colocalisation Env-IFITM3 reste importante même pour le virus sensible (Coefficient de Pearson > 0.50 , figure 43D et 43E). En revanche, une différence majeure a été observée entre les Env des virus sensibles et résistants à IFITM3 au niveau de la membrane plasmique avec une colocalisation très forte entre IFITM3 et les Env des virus sensibles 249N3 (Coefficient de Pearson $r = 0.60$) et NL4-3 (Coefficient de Pearson $r = 0.64$) mais pas ou très peu de colocalisation pour les Env des virus résistants 249V4 (Coefficient de Pearson $r = 0.36$) et AD8 (Coefficient de Pearson $r = 0.38$) (Figure 43C et 43D).

Ces résultats suggèrent que la protéine IFITM3 interagit avec les Env des virus sensibles depuis leur synthèse au niveau du RE, pendant leur migration et leur maturation à travers l'appareil de Golgi, jusqu'à leur arrivée au site d'assemblage des virus au niveau de la membrane plasmique. En revanche, l'interaction entre IFITM3 et les Env des virus résistants semble inhibée après la maturation des Env lors de leur passage dans l'appareil de Golgi.

Figure 43 : Analyse en microscopie confocale de l'expression de Env et IFITM3 dans des cellules productrices de virus sensibles ou résistants à IFITM3.

Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec pNL4-3 $\Delta env.luc$, pcDNA-*ifitm3*-Flag et pCI-*env* exprimant puis 32 h post transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées en utilisant des anticorps ciblant le réticulum endoplasmique (A), l'appareil de Golgi (B) ou la membrane plasmique (C) (première colonne), la protéine IFITM3 (deuxième colonne) et l'Env du VIH-1 (troisième colonne). Ces marquages ont ensuite été révélés par des anticorps secondaires appropriés conjugués à des fluorophores : AlexaFluor488 (vert) pour IFITM3, AlexaFluor594 (rouge) pour Env et AlexaFluor647 (violet) pour les compartiments cellulaires. Les images ont été capturées avec le microscope confocal Leica TCS SP8 g-STED. L'analyse des cellules entières a été réalisée par l'acquisition d'une trentaine de z-stack. Les histogrammes représentent le coefficient de colocalisation de Pearson calculé à l'aide du logiciel Imaris afin de quantifier la triple colocalisation entre chaque Env, la protéine IFITM3 et soit le réticulum endoplasmique (D), l'appareil de Golgi (E) ou le membrane plasmique (F). La significativité des différences de colocalisation a été évaluée par un test statistique de student.

DISCUSSION

La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (Env) est la seule protéine virale présente à la surface des virions. Cela fait d'elle une cible majeure de la réponse humorale adaptative de l'hôte conduisant à la production d'anticorps neutralisants (AcN) (Moore, 2018a). De plus en plus d'études montrent que Env est non seulement la cible majeure de l'immunité adaptative dépendante des anticorps mais aussi une cible importante de l'immunité innée. En effet, il a récemment été décrit tout un arsenal de protéines antivirales ou facteurs de restriction qui agissent sur Env, soit en limitant sa synthèse (ERManI) (Zhou et al., 2015), en dérégulant sa glycosylation (GBP5) (Krapp et al., 2016), son clivage (GBP5, 90K) (Lodermeyer et al., 2013) ou encore son incorporation dans les virions (MARCH1/2/8) (Tada et al., 2015; Y. Zhang et al., 2019). Certaines de ces protéines (SERINC5 ou IFITM2/3) sont aussi capables de s'incorporer dans les virus pour bloquer la fusion lors de leur entrée dans des cellules cibles (Sood et al., 2017; Tartour et al., 2014). Induites pour la plupart par les interférons (IFN) de type I (encodées par des ISGs, *Interferon Stimulated Genes*), les protéines de l'immunité innée constituent la première ligne de défense contre les infections virales. Dans le cas du VIH-1, la persistance de l'infection se caractérise par un état d'activation immunitaire permanent avec une production importante d'IFN de type I, y compris pendant la phase chronique d'infection, se traduisant ainsi par une expression prolongée des protéines encodées par les ISGs.

Bien que Env soit une cible majeure de la réponse immunitaire, sa diversité lui confère une capacité d'évolution et d'adaptation extraordinaire. Les mécanismes d'échappement de Env à la réponse humorale neutralisante ont été très largement documentés (Bouvin-Pley et al., 2013, 2014, 2019; Manish Sagar et al., 2006; Stefic et al., 2019; van Gils et al., 2011; Wei et al., 2003a) mais ceux-ci restent peu explorés vis-à-vis des protéines de l'immunité innée. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la protéine antivirale IFITM3 et en particulier à sa capacité à restreindre l'infectiosité des virions néoformés. Bien que cette protéine ait fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, son mécanisme d'action reste controversé (Ahi et al., 2020; Appourchaux et al., 2019; Compton et al., 2014; Tartour et al., 2017, 2014; Wang et al., 2017). Si certains travaux suggèrent une action spécifique de la protéine IFITM3 sur l'incorporation et /ou la stabilité des Env au sein des particules de VIH (Wang et al., 2017; Yu and Liu, 2018b), d'autres prônent un mécanisme d'action plus général sur la composition membranaire des virions qui permettrait d'expliquer le large spectre de virus ciblés par la protéine IFITM3 (Ahi et al., 2020; Appourchaux et al., 2019; Tartour et al., 2017).

Pour examiner le rôle de Env dans la capacité du virus à échapper à la restriction de l'infection par la protéine IFITM3, nous avons tout d'abord mis au point notre système expérimental et vérifié la bonne incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virions néoformés. Nous avons ensuite évalué l'impact de la nature de l'Env exprimée à la surface des virions sur leur sensibilité à la protéine

IFITM3. Pour cela, nous avons comparé la sensibilité de virus pseudotypés exprimant 11 clones d'Env différents à l'incorporation de la protéine IFITM3. Nous avons observé que l'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 sur l'infectiosité des virus était variable et dépendait de la nature de l'Env exprimée. Contrairement à ce qui avait été démontré par certaines équipes (Ahi et al., 2020; Wang et al., 2017; Yu et al., 2015) mais en accord avec d'autres (Compton et al., 2014; Foster et al., 2016; Tartour et al., 2017, 2014), l'incorporation d'IFITM3 au sein des virus sensibles ne semblait pas avoir un impact direct sur la quantité et / ou la maturation des Env incorporées. Même si selon la nature de l'Env exprimée, des variations de proportions gp160/gp120 étaient observées, la protéine IFITM3 ne semblait pas avoir un impact majeur sur cette proportion. Malgré l'absence d'impact de la protéine IFITM3 sur la maturation des Env, les virus pseudotypés par les Env des souches de laboratoire NL4-3 et AD8 présentaient des niveaux de sensibilité / résistance à la protéine IFITM3 similaires à ceux décrits dans la littérature, à savoir une grande sensibilité pour la souche NL4-3 contrairement à la souche AD8, résistante. Dans notre modèle expérimental, les virus ont tous le même squelette (génom NL4-3) et ne diffèrent que par l'Env exprimée à leur surface, alors que dans les travaux antérieurs, des virus réplcatifs exprimant le génome entier des souches de laboratoire NL4-3 et AD8 étaient utilisés. Il est donc possible qu'une autre protéine virale, comme la matrice par exemple, connue pour être impliquée dans la régulation de l'incorporation des Env (Beaumont et al., 2009), puisse intervenir dans ce mécanisme touchant la maturation des Env. Il semble néanmoins peu probable, au vu de nos résultats, qu'un défaut de maturation des Env soit le principal mécanisme de sensibilité des virus à la protéine IFITM3. Ceci est conforté par le fait qu'aucune corrélation n'ait pu être observée entre la sensibilité des virus à la protéine IFITM3 et les quantités de protéine IFITM3 ou d'Env incorporées au sein des virions.

Afin d'évaluer l'impact de l'incorporation de la protéine IFITM3 au sein des virions sur la conformation des Env, des tests de sensibilité des virions produits en présence ou non de la protéine IFITM3 à différents AcN et inhibiteurs d'entrée ont été réalisés. De façon intéressante, les virus ayant incorporé la protéine IFITM3 devenaient légèrement plus sensibles à différents AcN testés et au Maraviroc ciblant le corécepteur cellulaire CCR5. Ces données suggèrent que la présence d'IFITM3 modifie subtilement la conformation globale des Env et possiblement leur flexibilité. Ces changements pourraient donc modifier l'interaction des virus présentant un tropisme R5 ou X4R5 avec le corécepteur CCR5. Il subsiste encore actuellement un débat concernant l'implication du tropisme des Env dans la sensibilité des virus à la restriction par IFITM3 (Foster et al., 2016; Wang et al., 2017; Yu and Liu, 2018b) ; il est donc intéressant de noter que dans notre étude, aucun lien n'a pu être trouvé entre la sensibilité des virus à IFITM3 et le tropisme des Env ou l'augmentation de sensibilité des virus au MVC. Contrairement aux travaux de Wang et coll. nous n'avons pas observé

de différence de sensibilité au CD4 soluble et à l'AcN ciblant le site de fixation au CD4 des virus produits en présence d'IFITM3 par rapport aux virus contrôles (Wang et al., 2017). Cependant, dans la dernière étude de Beitari et coll. qui compare la pression exercée par SERINC et IFITM3 sur Env, aucun lien entre l'utilisation du CD4 et la sensibilité à IFITM3 n'avait pu être mis en évidence (Beitari et al., 2020). La diminution de la capacité infectieuse des virions après incorporation de la protéine IFITM3 repose sur l'hypothèse d'une diminution de la fusogénicité des virions (Compton et al., 2014; Foster et al., 2016; Tartour et al., 2017; Wang et al., 2017; Yu et al., 2015). Nous avons testé la sensibilité des virus au T20, un inhibiteur de fusion qui empêche le repliement des domaines HR1 et HR2 de la gp41, mais aucune différence de sensibilité au T20 n'a été trouvée en présence d'IFITM3. Bien que ces premières données ne nous aient pas permis de mettre en évidence un effet d'IFITM3 sur la fusion virale, une mesure directe de la fusion par des expériences de type Vpr-BLam devra être réalisée.

Nous avons ensuite recherché si certaines propriétés permettaient de différencier les virus sensibles ou résistants à IFITM3. Nous avons ainsi mis en évidence qu'en présence d'IFITM3, les virus sensibles à IFITM3 étaient plus sensibilisés à l'action de l'anticorps PG16 que les virus résistants. Ces données suggèrent que la présence d'IFITM3 dans les virus sensibles modifie la conformation des Env entraînant une augmentation de l'exposition de l'épitope glycane-dépendant au niveau de la région V1V2 ciblé par PG16 (Walker et al., 2009). Bien que la comparaison des boucles variables V1V2 des Env de virus sensibles et résistants à IFITM3 ne nous ait pas permis de mettre en évidence de signature moléculaire permettant de les distinguer, nous avons émis l'hypothèse que ces boucles puissent moduler la sensibilité des virus à IFITM3. Par la construction d'Env chimériques nous avons effectivement pu montrer que les boucles V1V2 en association avec V3 étaient des déterminants importants de sensibilité à IFITM3. Ces données confirmaient les travaux de Wang et coll. qui ont montré l'importance de V3 dans la régulation de la sensibilité des virus à IFITM3 sans pour autant exclure l'intervention d'autres déterminants (Wang et al., 2017). Le rôle complémentaire des boucles V1V2 et V3 hautement glycosylées n'est pas surprenant, étant donné que l'assemblage des sous-unités gp120 en trimères implique des interactions entre ces 2 régions. Cette organisation expose plusieurs résidus basiques au sommet du trimère qui sont des cibles importantes pour PG16. A noter également que l'étude du tropisme des virus exprimant les Env parentales et chimériques n'a pas permis de mettre en évidence un lien entre l'utilisation de l'un ou l'autre co-récepteur et le phénotype de sensibilité / résistance à IFITM3. Un plus large éventail de virus X4 serait nécessaire pour confirmer ces données puisque les virus étudiés présentaient majoritairement un tropisme R5 ou X4R5.

Plusieurs études ayant rapporté l'existence d'une interaction physique entre IFITM3 et Env au sein des cellules productrices (Beitari et al., 2020; Yu and Liu, 2018b), nous avons vérifié l'existence de cette interaction et recherché s'il existait des différences d'interaction entre les virus sensibles et résistants à IFITM3. Par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules productrices de virions, nous avons constaté qu'IFITM3 interagissait à la fois avec le précurseur et les formes matures des Env des virus sensibles à l'IFITM3, mais avec seulement la forme précurseur des virus résistants à l'IFITM3. Ces résultats ont été confirmés par le suivi de la colocalisation des protéines IFITM3 et Env dans les cellules productrices de virions. Nous avons observé une colocalisation de la protéine IFITM3 avec les Env issues de virus sensibles, depuis la synthèse de ces protéines dans le réticulum endoplasmique, lors de leur trafic à travers le complexe de Golgi, jusqu'à leur arrivée à la membrane plasmique. En revanche, la colocalisation de la protéine IFITM3 avec les Env des virus résistants à IFITM3 était diminuée après le passage de Env à travers l'appareil de Golgi.

Ensemble, ces résultats suggèrent que IFITM3 interagit avec le trimère d'Env mature des virus sensibles à IFITM3, stabilisant le trimère dans un état conformationnel exposant l'épitope PG16, empêchant ainsi les changements conformationnels requis pour l'engagement des récepteur et corécepteur(s) et la fusion des membranes virale et cellulaire. En revanche, les modifications post-traductionnelles subies par le trimère d'Env de virus résistants à IFITM3 bloqueraient l'accès de la protéine IFITM3 à son site de liaison, rendant ainsi le trimère Env fonctionnel. L'accès d'IFITM3 à son site de liaison sur le trimère d'Env pourrait être modulé par la nature des boucles V1V2 et V3, connues pour subir d'importantes modifications post-traductionnelles. La localisation du site de liaison IFITM3 sur le trimère Env doit encore être déterminée. Il pourrait être présent dans les régions conservées des boucles V1V2 et / ou V3, mais dans ce cas, comme IFITM3 sensibilise les virus à l'action inhibitrice de PG16, il ne faudrait pas que la liaison d'IFITM3 empêche la fixation de PG16. Il est donc plus probable que la protéine IFITM3 se lie sur le trimère d'Env en dehors des boucles V1V2 et V3, mais que l'accès à son site de liaison soit régulé par ces domaines hautement glycosylés.

Plusieurs travaux antérieurs ont mis en évidence le large spectre de virus ciblés par les protéines IFITM ; ils suggèrent que les protéines IFITM agissent par un mécanisme non-spécifique en modifiant les propriétés fusogènes des membranes cellulaires et virales (Ahi et al., 2020; Appourchaux et al., 2019; Rahman et al., 2020). Nos résultats montrent que dans le cas du VIH-1, ce mécanisme n'est vraisemblablement pas suffisant. L'incorporation d'IFITM3 au sein des cellules productrices de virions semble avoir un effet global modéré sur la conformation des Env. Cet effet pourrait être une conséquence indirecte des modifications de fluidité membranaire induites par la présence de la protéine IFITM3 au sein des membranes. L'impact de ces modifications semble

néanmoins modéré puisque l'infectiosité de certains virus n'est pas affectée par la présence de la protéine IFITM3. Nos données montrent que pour restreindre l'infectiosité des virus, la protéine IFITM3 interagit spécifiquement avec Env au sein des cellules productrices de virions. Toutefois les modifications post-traductionnelles subies par certaines Env permettent au virus d'y échapper.

Les mécanismes de restriction utilisés par la protéine IFITM3 peuvent être mis en parallèle avec ceux d'une autre protéine antivirale du VIH-1, la protéine transmembranaire SERINC5 pour laquelle au moins deux façons de restreindre le VIH-1 ont été démontrés. Le premier mécanisme, décrit récemment, est peu spécifique. L'insertion de SERINC5 au sein des membranes entraînerait la dissociation de clusters d'Env, empêchant ainsi l'infectiosité des virus (Chen et al., 2020). Le second impliquerait une interaction spécifique entre SERINC5 et Env. Cette interaction serait dépendante de l'état conformationnel du trimère d'Env et de son interaction avec le CD4 (Beitari et al., 2020; Staropoli et al., 2019). Il est intéressant de noter que les virus NL4-3 et AD8 sont respectivement sensible et résistant aux deux facteurs de restriction IFITM3 et SERINC5, suggérant que des déterminants moléculaires de sensibilité ou résistance puissent être partagés. Pour autant, les mécanismes mis en jeu semblent différents, puisque l'interaction entre IFITM3 et Env ne semble pas dépendante du récepteur CD4 alors que ce point semble critique pour la restriction par SERINC5.

En conclusion, les données présentées ici mettent en évidence le rôle important de Env dans la modulation de la sensibilité du VIH-1 à l'inhibition de l'infection par IFITM3. Ils fournissent de nouvelles informations sur le mécanisme par lequel Env peut échapper à ce facteur de restriction.

PERSPECTIVES

Exposée à la surface du virus, Env est la cible privilégiée des anticorps neutralisants (AcN) et de plusieurs protéines de l'immunité innée ou facteurs de restriction. Cependant, une fois l'infection établie, on sait depuis plusieurs années que les AcN favorisent l'apparition de variants d'échappement et ne permettent pas de contrôler la réplication virale. De la même façon, nous venons de montrer que certains variants sont capables d'échapper à la restriction de l'infection par la protéine de l'immunité innée IFITM3. Si les capacités évolutives et adaptatives de Env sont considérables, elles doivent néanmoins être limitées dans une certaine mesure par des contraintes fonctionnelles. Cette hypothèse est confortée par les travaux récents de notre équipe présentés en annexe 2 (et auxquels j'ai participé sur certains aspects techniques), qui montrent que chez des sujets faisant partie d'une chaîne de transmission et qui ont donc été infectés par un même souche virale ou par des variants extrêmement proches, la glycoprotéine d'enveloppe du virus sous pression par la réponse immunitaire évolue de façon similaire chez les différents sujets tant d'un point de vue fonctionnel que moléculaire.

La pression exercée par les AcN sur Env est bien documentée et celle exercée par les facteurs de restriction a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années. Toutefois, dans un contexte d'infection naturelle, la façon dont ces facteurs coopèrent *in vivo* entre eux et avec les AcN, une fois la réponse immune adaptative mise en place, n'a pas été explorée. Nous ne savons pas, de tous les facteurs de restriction capables d'agir sur Env, quel est celui ou quels sont ceux qui exerce(nt) la plus forte pression sur Env. Nous ne savons pas non plus si l'échappement du virus à un facteur de restriction donné est limité par sa nécessité à résister à la réponse neutralisante de l'hôte ou inversement. Il serait intéressant d'aborder cette question en examinant chez quelques sujets infectés par le VIH (non traités) le profil d'évolution de leur quasi-espèce en terme de sensibilité/résistance aux différents facteurs de restriction (GPB5, ErManI, 90K, MARCH8, SERINC5 et IFITM3) et aux AcN (autologues et bNAbs), et ce dans des systèmes de culture cellulaire pertinents physiologiquement comme des lignées de lymphocytes CD4⁺ ou des lymphocytes T CD4⁺ primaires. Ce travail devrait permettre de mieux comprendre quelle pression exerce chaque facteur de restriction sur Env, conjointement à celle exercée par les AcN, et quel est son impact sur l'évolution de Env.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd El-Wahab, E.W., Smyth, R.P., Mailler, E., Bernacchi, S., Vivet-Boudou, V., Hijnen, M., Jossinet, F., Mak, J., Paillart, J.-C., Marquet, R., 2014. Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor. *Nat. Commun.* 5, 4304. <https://doi.org/10.1038/ncomms5304>
- Abraham, L., Fackler, O.T., 2012. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* 10, 39. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-39>
- Ahi, Y.S., Yimer, D., Shi, G., Majdoul, S., Rahman, K., Rein, A., Compton, A.A., 2020. IFITM3 Reduces Retroviral Envelope Abundance and Function and Is Counteracted by glycoGag. *mBio* 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.03088-19>
- Aiken, C., 2015. Antiviral action countered by Nef. *Nature* 526, 202–203. <https://doi.org/10.1038/nature15637>
- Aiken, C., 2009. Cell-free assays for HIV-1 uncoating. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 485, 41–53. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-170-3_4
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., Trono, D., 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853–864. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90360-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90360-3)
- Alter, G., Moody, M.A., 2010. The Humoral Response to HIV-1: New Insights, Renewed Focus. *J. Infect. Dis.* 202, S315–S322. <https://doi.org/10.1086/655654>
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y.J., Lee, J.H., Shi, M., Huang, I.-C., Farzan, M., Jung, J.U., 2013. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 13, 452–464. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006>
- Anafu, A.A., Bowen, C.H., Chin, C.R., Brass, A.L., Holm, G.H., 2013. Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry. *J. Biol. Chem.* 288, 17261–17271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438515>
- Ananthaswamy, N., Fang, Q., AlSalmi, W., Jain, S., Chen, Z., Klose, T., Sun, Y., Liu, Y., Mahalingam, M., Chand, S., Tovanabuttra, S., Robb, M.L., Rossmann, M.G., Rao, V.B., 2019. A sequestered fusion peptide in the structure of an HIV-1 transmitted founder envelope trimer. *Nat. Commun.* 10, 873. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08825-7>
- Appourchaux, R., Delpeuch, M., Zhong, L., Burlaud-Gaillard, J., Tartour, K., Savidis, G., Brass, A., Etienne, L., Roingeard, P., Cimorelli, A., 2019. Functional Mapping of Regions Involved in the Negative Imprinting of Virion Particle Infectivity and in Target Cell Protection by Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 against HIV-1. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.01716-18>
- Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-96>
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C.C., Censoplano, N., Chung, E., Reitano, K.N., Kottlil, S., Goode, D.J., Fauci, A.S., 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9, 301–309. <https://doi.org/10.1038/ni1566>
- Bailey, C.C., Huang, I.-C., Kam, C., Farzan, M., 2012. Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PLoS Pathog.* 8, e1002909. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002909>
- Bailey, C.C., Kondur, H.R., Huang, I.-C., Farzan, M., 2013. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein. *J. Biol. Chem.* 288, 32184–32193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514356>
- Barin, F., M'Boup, S., Denis, F., Kanki, P., Allan, J.S., Lee, T.H., Essex, M., 1985. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1387–1389. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92556-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92556-5)
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Beaumont, E., Vendrame, D., Verrier, B., Roch, E., Biron, F., Barin, F., Mammano, F., Brand, D., 2009. Matrix and Envelope Coevolution Revealed in a Patient Monitored since Primary Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 83, 9875–9889. <https://doi.org/10.1128/JVI.01213-09>
- Beitari, S., Ding, S., Pan, Q., Finzi, A., Liang, C., 2017. Effect of HIV-1 Env on SERINC5 Antagonism. *J. Virol.* 91, e02214-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02214-16>

- Beitari, S., Pan, Q., Finzi, A., Liang, C., 2020. Differential pressures of SERINC5 and IFITM3 on HIV-1 envelope glycoprotein over the course of HIV-1 infection. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.00514-20>
- Bell, N.M., Lever, A.M.L., 2013. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* 21, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006>
- Beretta, M., 2018. Etude des propriétés fonctionnelles de la glycoprotéine d'enveloppe des variants transmis du VIH-1 et de leur évolution à l'échelle individuelle et populationnelle., Thèse.
- Beretta, M., Moreau, A., Bouvin-Pley, M., Essat, A., Goujard, C., Chaix, M.-L., Hue, S., Meyer, L., Barin, F., Braibant, M., ANRS 06 Primo Cohort, 2018. Phenotypic properties of envelope glycoproteins of transmitted HIV-1 variants from patients belonging to transmission chains. *AIDS Lond. Engl.* 32, 1917–1926. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001906>
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B.L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M.C., Benarous, R., 1999. Interactions of the Cytoplasmic Domains of Human and Simian Retroviral Transmembrane Proteins with Components of the Clathrin Adaptor Complexes Modulate Intracellular and Cell Surface Expression of Envelope Glycoproteins. *J. Virol.* 73, 1350.
- Billet, Alex A. Compton, Olivier Schwartz, 2015. La famille des protéines IFITM: effets antiviraux et fonctions cellulaires. *Virologie.* <https://doi.org/10.1684/vir.2015.0625>
- Blanco-Rodriguez, G., Gazi, A., Monel, B., Frabetti, S., Scoca, V., Mueller, F., Schwartz, O., Krijnse-Locker, J., Charneau, P., Di Nunzio, F., 2020. Remodeling of the Core Leads HIV-1 Preintegration Complex into the Nucleus of Human Lymphocytes. *J. Virol.* 94, e00135-20, [/jvi/94/11/JVI.00135-20.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.00135-20). <https://doi.org/10.1128/JVI.00135-20>
- Blattner, C., Lee, J.H., Sliepen, K., Derking, R., Falkowska, E., de la Peña, A.T., Cupo, A., Julien, J.-P., van Gils, M., Lee, P.S., Peng, W., Paulson, J.C., Poignard, P., Burton, D.R., Moore, J.P., Sanders, R.W., Wilson, I.A., Ward, A.B., 2014. Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 Env trimers. *Immunity* 40, 669–680. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.008>
- Bonsignori, M., Hwang, K.-K., Chen, X., Tsao, C.-Y., Morris, L., Gray, E., Marshall, D.J., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E., Sinangil, F., Pancera, M., Yongping, Y., Zhang, B., Zhu, J., Kwong, P.D., O'Dell, S., Mascola, J.R., Wu, L., Nabel, G.J., Phogat, S., Seaman, M.S., Whitesides, J.F., Moody, M.A., Kelsoe, G., Yang, X., Sodroski, J., Shaw, G.M., Montefiori, D.C., Kepler, T.B., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Liao, H.-X., Haynes, B.F., 2011. Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. *J. Virol.* 85, 9998–10009. <https://doi.org/10.1128/JVI.05045-11>
- Bonsignori, M., Montefiori, D.C., Wu, X., Chen, X., Hwang, K.-K., Tsao, C.-Y., Kozink, D.M., Parks, R.J., Tomaras, G.D., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E., Kwong, P.D., Kepler, T.B., Liao, H.-X., Mascola, J.R., Haynes, B.F., 2012. Two Distinct Broadly Neutralizing Antibody Specificities of Different Clonal Lineages in a Single HIV-1-Infected Donor: Implications for Vaccine Design. *J. Virol.* 86, 4688. <https://doi.org/10.1128/JVI.07163-11>
- Bouvin-Pley, M., Beretta, M., Moreau, A., Roch, E., Essat, A., Goujard, C., Chaix, M.-L., Moiré, N., Martin, L., Meyer, L., Barin, F., Braibant, M., 2019. Evolution of the Envelope Glycoprotein of HIV-1 Clade B toward Higher Infectious Properties over the Course of the Epidemic. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.01171-18>
- Bouvin-Pley, M., Morgand, M., Meyer, L., Goujard, C., Moreau, A., Mouquet, H., Nussenzweig, M., Pace, C., Ho, D., Bjorkman, P.J., Baty, D., Chames, P., Pancera, M., Kwong, P.D., Poignard, P., Barin, F., Braibant, M., 2014. Drift of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 toward increased neutralization resistance over the course of the epidemic: a comprehensive study using the most potent and broadly neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.* 88, 13910–13917. <https://doi.org/10.1128/JVI.02083-14>
- Bouvin-Pley, M., Morgand, M., Moreau, A., Jestin, P., Simonnet, C., Tran, L., Goujard, C., Meyer, L., Barin, F., Braibant, M., 2013. Evidence for a continuous drift of the HIV-1 species towards higher resistance to neutralizing antibodies over the course of the epidemic. *PLoS Pathog.* 9, e1003477. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003477>
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D.J., Xavier, R.J., Farzan, M., Elledge, S.J., 2009. The IFITM proteins

- mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>
- Braun, E., Hotter, D., Koepke, L., Zech, F., Groß, R., Sparrer, K.M.J., Müller, J.A., Pfaller, C.K., Heusinger, E., Wombacher, R., Sutter, K., Dittmer, U., Winkler, M., Simmons, G., Jakobsen, M.R., Conzelmann, K.-K., Pöhlmann, S., Münch, J., Fackler, O.T., Kirchhoff, F., Sauter, D., 2019. Guanylate-Binding Proteins 2 and 5 Exert Broad Antiviral Activity by Inhibiting Furin-Mediated Processing of Viral Envelope Proteins. *Cell Rep.* 27, 2092–2104.e10. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.063>
- Briggs, J.A.G., Kräusslich, H.-G., 2011. The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 410, 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.021>
- Bukrinsky, M., 2004. A hard way to the nucleus. *Mol. Med. Camb. Mass* 10, 1–5.
- Bunnik, E.M., Pisas, L., van Nuenen, A.C., Schuitemaker, H., 2008. Autologous Neutralizing Humoral Immunity and Evolution of the Viral Envelope in the Course of Subtype B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 82, 7932–7941. <https://doi.org/10.1128/JVI.00757-08>
- Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.-S., Pathak, V.K., 2020. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 5486–5493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920631117>
- Burrer, R., Haessig-Einius, S., Aubertin, A.-M., Moog, C., 2005. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology* 333, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.034>
- Burton, D.R., Mascola, J.R., 2015. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 16, 571–576. <https://doi.org/10.1038/ni.3158>
- Calarese, D.A., Scanlan, C.N., Zwick, M.B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Roux, K.H., Kelly, J.W., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Katinger, H., Burton, D.R., Wilson, I.A., 2003. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300, 2065–2071. <https://doi.org/10.1126/science.1083182>
- Campbell, E.M., Hope, T.J., 2015. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 471–483. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3503>
- Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H., Zolla-Pazner, S., 2007a. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 415–426. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.0130>
- Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H., Zolla-Pazner, S., 2007b. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 415–426. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.0130>
- Carlton, J.G., Martin-Serrano, J., 2009. The ESCRT machinery: new functions in viral and cellular biology. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 195–199. <https://doi.org/10.1042/BST0370195>
- Cerutti, N., Loredó-Varela, J.L., Caillat, C., Weissenhorn, W., 2017. Antigp41 membrane proximal external region antibodies and the art of using the membrane for neutralization. *Curr. Opin. HIV AIDS* 12, 250–256. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000364>
- Chaillon, A., Braibant, M., Moreau, T., Thenin, S., Moreau, A., Autran, B., Barin, F., 2011. The V1V2 Domain and an N-Linked Glycosylation Site in the V3 Loop of the HIV-1 Envelope Glycoprotein Modulate Neutralization Sensitivity to the Human Broadly Neutralizing Antibody 2G12. *J. Virol.* 85, 3642–3648. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-10>
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., Kim, P.S., 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263–273. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80205-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80205-6)
- Chan, S.Y., Speck, R.F., Power, C., Gaffen, S.L., Chesebro, B., Goldsmith, M.A., 1999. V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as a coreceptor in tissue infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 73, 2350–2358.
- Checkley, M.A., Luttge, B.G., Freed, E.O., 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J. Mol. Biol.* 410, 582–608. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042>
- Chen, J., Dang, Q., Unutmaz, D., Pathak, V.K., Maldarelli, F., Powell, D., Hu, W.-S., 2005. Mechanisms of nonrandom human immunodeficiency virus type 1 infection and double infection: preference in virus entry is important but is not the sole factor. *J. Virol.* 79, 4140–4149. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4140-4149.2005>

- Chen, M., Svicher, V., Artese, A., Costa, G., Alteri, C., Ortuso, F., Parrotta, L., Liu, Y., Liu, C., Perno, C.F., Alcaro, S., Zhang, J., 2013. Detecting and understanding genetic and structural features in HIV-1 B subtype V3 underlying HIV-1 co-receptor usage. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 451–460. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt002>
- Chen, R., Li, M., Zhang, Y., Zhou, Q., Shu, H.-B., 2012. The E3 ubiquitin ligase MARCH8 negatively regulates IL-1-induced NF- κ B activation by targeting the IL1RAP coreceptor for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14128–14133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205246109>
- Chen, T., Xiao, M., Yang, J., Chen, Y.K., Bai, T., Tang, X.J., Shu, Y.L., 2018. Association between rs12252 and influenza susceptibility and severity: an updated meta-analysis. *Epidemiol. Infect.* 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002832>
- Chen, Y.-C., Sood, C., Marin, M., Aaron, J., Gratton, E., Salaita, K., Melikyan, G.B., 2020. Super-Resolution Fluorescence Imaging Reveals That Serine Incorporator Protein 5 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Fusion by Disrupting Envelope Glycoprotein Clusters. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02699>
- Chesarino, N.M., Compton, A.A., McMichael, T.M., Kenney, A.D., Zhang, L., Soewarna, V., Davis, M., Schwartz, O., Yount, J.S., 2017. IFITM 3 requires an amphipathic helix for antiviral activity. *EMBO Rep.* 18, 1740–1751. <https://doi.org/10.15252/embr.201744100>
- Chesarino, N.M., McMichael, T.M., Hach, J.C., Yount, J.S., 2014a. Phosphorylation of the antiviral protein interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) dually regulates its endocytosis and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 289, 11986–11992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557694>
- Chesarino, N.M., McMichael, T.M., Yount, J.S., 2015. E3 Ubiquitin Ligase NEDD4 Promotes Influenza Virus Infection by Decreasing Levels of the Antiviral Protein IFITM3. *PLoS Pathog.* 11, e1005095. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005095>
- Chesarino, N.M., McMichael, T.M., Yount, J.S., 2014b. Regulation of the trafficking and antiviral activity of IFITM3 by post-translational modifications. *Future Microbiol.* 9, 1151–1163. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.65>
- Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., Suzu, S., 2013. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* 15, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.12.003>
- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., Alizon, M., 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324, 691–695. <https://doi.org/10.1038/324691a0>
- Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., Haynes, B.F., 2011. Acute HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1943–1954. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1011874>
- Compton, A.A., Bruel, T., Porrot, F., Mallet, A., Sachse, M., Euvrard, M., Liang, C., Casartelli, N., Schwartz, O., 2014. IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* 16, 736–747. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.001>
- Compton, A.A., Roy, N., Porrot, F., Billet, A., Casartelli, N., Yount, J.S., Liang, C., Schwartz, O., 2016. Natural mutations in *IFITM3* modulate post-translational regulation and toggle antiviral specificity. *EMBO Rep.* 17, 1657–1671. <https://doi.org/10.15252/embr.201642771>
- Cordonnier, A., Montagnier, L., Emerman, M., 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 340, 571–574. <https://doi.org/10.1038/340571a0>
- Crooks, E.T., Moore, P.L., Franti, M., Cayan, C.S., Zhu, P., Jiang, P., de Vries, R.P., Wiley, C., Zharkikh, I., Schülke, N., Roux, K.H., Montefiori, D.C., Burton, D.R., Binley, J.M., 2007. A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology* 366, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.033>
- Cuevas, J.M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J., Sanjuán, R., 2015. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol.* 13, e1002251. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251>
- D'arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., Madinda, N.F., Robbins, M.M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V.A., Sharp, P.M., Hahn, B.H., Delaporte, E., Mpoudi Ngole, E., Peeters, M., 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1343–1352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502022112>

- Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., Haseltine, W.A., 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 44, 941–947. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90017-6)
- De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N., Summers, M.F., 1998. Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279, 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.384>
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., Willems, B., 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* 64, 1207–1216.
- de Taeye, S.W., Ozorowski, G., Torrents de la Peña, A., Guttman, M., Julien, J.-P., van den Kerkhof, T.L.G.M., Burger, J.A., Pritchard, L.K., Pugach, P., Yasmeen, A., Crampton, J., Hu, J., Bontjer, I., Torres, J.L., Arendt, H., DeStefano, J., Koff, W.C., Schuitemaker, H., Eggink, D., Berkhout, B., Dean, H., LaBranche, C., Crotty, S., Crispin, M., Montefiori, D.C., Klasse, P.J., Lee, K.K., Moore, J.P., Wilson, I.A., Ward, A.B., Sanders, R.W., 2015. Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Envelope Trimers with Reduced Exposure of Non-neutralizing Epitopes. *Cell* 163, 1702–1715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.056>
- Delahunty, M.D., Rhee, I., Freed, E.O., Bonifacino, J.S., 1996. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 218, 94–102. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0169>
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., Mouscadet, J.-F., 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114>
- Desai, T.M., Marin, M., Chin, C.R., Savidis, G., Brass, A.L., Melikyan, G.B., 2014a. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog.* 10, e1004048. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004048>
- Desai, T.M., Marin, M., Chin, C.R., Savidis, G., Brass, A.L., Melikyan, G.B., 2014b. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog.* 10, e1004048. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004048>
- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., Campbell, E.M., 2020. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat. Microbiol.* 5, 1088–1095. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0735-8>
- Diamond, M.S., Farzan, M., 2013. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 46–57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>
- Ding, S., Pan, Q., Liu, S.-L., Liang, C., 2014. HIV-1 mutates to evade IFITM1 restriction. *Virology* 454–455, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.020>
- Dingens, A.S., Acharya, P., Haddox, H.K., Rawi, R., Xu, K., Chuang, G.-Y., Wei, H., Zhang, B., Mascola, J.R., Carragher, B., Potter, C.S., Overbaugh, J., Kwong, P.D., Bloom, J.D., 2018. Complete functional mapping of infection- and vaccine-elicited antibodies against the fusion peptide of HIV. *PLoS Pathog.* 14, e1007159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007159>
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., Doms, R.W., 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149–1158. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81314-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81314-8)
- Doria-Rose, N.A., Georgiev, I., O'Dell, S., Chuang, G.-Y., Staupe, R.P., McLellan, J.S., Gorman, J., Pancera, M., Bonsignori, M., Haynes, B.F., Burton, D.R., Koff, W.C., Kwong, P.D., Mascola, J.R., 2012. A short segment of the HIV-1 gp120 V1/V2 region is a major determinant of resistance to V1/V2 neutralizing antibodies. *J. Virol.* 86, 8319–8323. <https://doi.org/10.1128/JVI.00696-12>
- Doria-Rose, N.A., Schramm, C.A., Gorman, J., Moore, P.L., Bhiman, J.N., DeKosky, B.J., Ernandes, M.J., Georgiev, I.S., Kim, H.J., Pancera, M., Staupe, R.P., Altae-Tran, H.R., Bailer, R.T., Crooks, E.T., Cupo, A., Druz, A., Garrett, N.J., Hoi, K.H., Kong, R., Louder, M.K., Longo, N.S., McKee, K., Nonyane, M., O'Dell, S., Roark, R.S., Rudicell, R.S., Schmidt, S.D., Sheward, D.J., Soto, C., Wibmer, C.K., Yang, Y., Zhang, Z., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin, J.C., Binley, J.M., Sanders, R.W., Wilson, I.A., Moore, J.P., Ward, A.B., Georgiou, G., Williamson, C., Abdool Karim, S.S., Morris, L., Kwong, P.D., Shapiro, L., Mascola, J.R., 2014. Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. *Nature* 509, 55–62. <https://doi.org/10.1038/nature13036>

- Doyle, C., Strominger, J.L., 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330, 256–259. <https://doi.org/10.1038/330256a0>
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., Paxton, W.A., 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667–673. <https://doi.org/10.1038/381667a0>
- Dubé, M., Bego, M.G., Paquay, C., Cohen, É.A., 2010. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7, 114. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-114>
- Dvorin, J.D., Malim, M.H., 2003. Intracellular trafficking of HIV-1 cores: journey to the center of the cell. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 281, 179–208. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19012-4_5
- Esté, J.A., Telenti, A., 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet Lond. Engl.* 370, 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61052-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61052-6)
- Euler, Z., van den Kerkhof, T.L.G.M., van Gils, M.J., Burger, J.A., Edo-Matas, D., Phung, P., Wrin, T., Schuitemaker, H., 2012. Longitudinal Analysis of Early HIV-1-Specific Neutralizing Activity in an Elite Neutralizer and in Five Patients Who Developed Cross-Reactive Neutralizing Activity. *J. Virol.* 86, 2045. <https://doi.org/10.1128/JVI.06091-11>
- Fackler, O., 2015. Spotlight on HIV-1 Nef: SERINC3 and SERINC5 Identified as Restriction Factors Antagonized by the Pathogenesis Factor. *Viruses* 7, 6730–6738. <https://doi.org/10.3390/v7122970>
- Falkowska, E., Le, K.M., Ramos, A., Doores, K.J., Lee, J.H., Blattner, C., Ramirez, A., Derking, R., van Gils, M.J., Liang, C.-H., McBride, R., von Bredow, B., Shivatare, S.S., Wu, C.-Y., Chan-Hui, P.-Y., Liu, Y., Feizi, T., Zwick, M.B., Koff, W.C., Seaman, M.S., Swiderek, K., Moore, J.P., Evans, D., Paulson, J.C., Wong, C.-H., Ward, A.B., Wilson, I.A., Sanders, R.W., Poignard, P., Burton, D.R., 2014. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity* 40, 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.009>
- Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O.G., Lemey, P., 2014. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.1256739>
- Feeley, E.M., Sims, J.S., John, S.P., Chin, C.R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G.D., Ryan, B.J., Donis, R.O., Elledge, S.J., Brass, A.L., 2011. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog.* 7, e1002337. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002337>
- Feng, M., Bell, D.R., Kang, H., Shao, Q., Zhou, R., 2019. Exploration of HIV-1 fusion peptide-antibody VRC34.01 binding reveals fundamental neutralization sites. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 21, 18569–18576. <https://doi.org/10.1039/c9cp02909e>
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877. <https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872>
- Feng, Y., Zhang, F., Lokey, L.K., Chastain, J.L., Lakkis, L., Eberhart, D., Warren, S.T., 1995. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* 268, 731–734. <https://doi.org/10.1126/science.7732383>
- Fernandes, J., Jayaraman, B., Frankel, A., 2012. The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biol.* 9, 6–11. <https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18178>
- Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrandt, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H., Busch, M.P., 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* 17, 1871–1879. <https://doi.org/10.1097/00002030-200309050-00005>
- Firrito, C., Bertelli, C., Vanzo, T., Chande, A., Pizzato, M., 2018. SERINC5 as a New Restriction Factor for Human Immunodeficiency Virus and Murine Leukemia Virus. *Annu. Rev. Virol.* 5, 323–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043308>
- Foster, T.L., Wilson, H., Iyer, S.S., Coss, K., Doores, K., Smith, S., Kellam, P., Finzi, A., Borrow, P., Hahn, B.H., Neil, S.J.D., 2016. Resistance of Transmitted Founder HIV-1 to IFITM-Mediated Restriction. *Cell Host Microbe* 20, 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.006>
- Frankel, A.D., Young, J.A., 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.1>

- Freed, E.O., 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
- Freed, E.O., 2001. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 13–33. <https://doi.org/10.1023/a:1021070512287>
- Freed, E.O., Delwart, E.L., Buchschacher, G.L., Panganiban, A.T., 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 70–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.70>
- Freed, E.O., Myers, D.J., Risser, R., 1991. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J. Virol.* 65, 190–194.
- Freed, E.O., Myers, D.J., Risser, R., 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* 63, 4670–4675.
- Frey, G., Peng, H., Rits-Volloch, S., Morelli, M., Cheng, Y., Chen, B., 2008. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3739–3744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800255105>
- Friedman, R.L., Manly, S.P., McMahon, M., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1984. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38, 745–755.
- Frost, S. D. W., Liu, Y., Pond, S.L.K., Chappey, C., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Little, S.J., Richman, D.D., 2005. Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Envelope Variation and Neutralizing Antibody Responses during Transmission of HIV-1 Subtype B. *J. Virol.* 79, 6523–6527. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6523-6527.2005>
- Frost, Simon D. W., Wrin, T., Smith, D.M., Kosakovsky Pond, S.L., Liu, Y., Paxinos, E., Chappey, C., Galovich, J., Beauchaine, J., Petropoulos, C.J., Little, S.J., Richman, D.D., 2005. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18514–18519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504658102>
- Fujita, H., Iwabuchi, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y., 2013. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126, 2798–2809. <https://doi.org/10.1242/jcs.119909>
- Gallaher, W.R., Ball, J.M., Garry, R.F., Griffin, M.C., Montelaro, R.C., 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 431–440. <https://doi.org/10.1089/aid.1989.5.431>
- Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I., Hill, C.P., 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278, 849–853. <https://doi.org/10.1126/science.278.5339.849>
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duynhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80694-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80694-7)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90873-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90873-8)
- Ghimire, D., Rai, M., Gaur, R., 2018. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* 99, 435–446. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001026>
- Gilbert, M.T.P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T.J., Pitchenik, A.E., Worobey, M., 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18566–18570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705329104>
- Gomes, B., Gonçalves, S., Disalvo, A., Hollmann, A., Santos, N.C., 2018. Effect of 25-hydroxycholesterol in viral membrane fusion: Insights on HIV inhibition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860, 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.02.001>
- Gonzalez-Enriquez, G.V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Torres-Mendoza, B.M., 2017. SERINC as a Restriction Factor to Inhibit Viral Infectivity and the Interaction with HIV. *J. Immunol. Res.* 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/1548905>
- Grandgenett, D.P., Pandey, K.K., Bera, S., Aihara, H., 2015. Multifunctional facets of retrovirus integrase. *World J. Biol. Chem.* 6, 83–94. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.83>

- Gray, E.S., Moody, M.A., Wibmer, C.K., Chen, X., Marshall, D., Amos, J., Moore, P.L., Foulger, A., Yu, J.-S., Lambson, B., Abdool Karim, S., Whitesides, J., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., Morris, L., Liao, H.-X., 2011. Isolation of a monoclonal antibody that targets the alpha-2 helix of gp120 and represents the initial autologous neutralizing-antibody response in an HIV-1 subtype C-infected individual. *J. Virol.* 85, 7719–7729. <https://doi.org/10.1128/JVI.00563-11>
- Gray, E.S., Moore, P.L., Choge, I.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G.M., Karim, S.S.A., Williamson, C., Morris, L., 2007. Neutralizing Antibody Responses in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *J. Virol.* 81, 6187–6196. <https://doi.org/10.1128/JVI.00239-07>
- Grewe, C., Beck, A., Gelderblom, H.R., 1990. HIV: early virus-cell interactions. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3, 965–974.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., Picker, L.J., 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* 12, 289–295. <https://doi.org/10.1038/nm1380>
- Guenaga, J., de Val, N., Tran, K., Feng, Y., Satchwell, K., Ward, A.B., Wyatt, R.T., 2015. Well-ordered trimeric HIV-1 subtype B and C soluble spike mimetics generated by negative selection display native-like properties. *PLoS Pathog.* 11, e1004570. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004570>
- Guenzel, C.A., Hérate, C., Benichou, S., 2014. HIV-1 Vpr—a still “enigmatic multitasker.” *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00127>
- Guerrero, S., Batisse, J., Libre, C., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.-C., 2015. HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses* 7, 199–218. <https://doi.org/10.3390/v7010199>
- Guttman, M., Garcia, N.K., Cupo, A., Matsui, T., Julien, J.-P., Sanders, R.W., Wilson, I.A., Moore, J.P., Lee, K.K., 2014. CD4-induced activation in a soluble HIV-1 Env trimer. *Struct. Lond. Engl.* 1993 22, 974–984. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.05.001>
- Harris, A., Borgnia, M.J., Shi, D., Bartesaghi, A., He, H., Pejchal, R., Kang, Y.K., Depetris, R., Marozsan, A.J., Sanders, R.W., Klasse, P.J., Milne, J.L.S., Wilson, I.A., Olson, W.C., Moore, J.P., Subramaniam, S., 2011. Trimeric HIV-1 glycoprotein gp140 immunogens and native HIV-1 envelope glycoproteins display the same closed and open quaternary molecular architectures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11440–11445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101414108>
- Hartley, O., Klasse, P.J., Sattentau, Q.J., Moore, J.P., 2005. V3: HIV’s switch-hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 171–189. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.171>
- Hawkes, D., Jones, K.L., Smyth, R.P., Pereira, C.F., Bittman, R., Jaworowski, A., Mak, J., 2015. Properties of HIV-1 associated cholesterol in addition to raft formation are important for virus infection. *Virus Res.* 210, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.06.023>
- Heller, W.T., Rai, D.K., 2017. Changes in lipid bilayer structure caused by the helix-to-sheet transition of an HIV-1 gp41 fusion peptide derivative. *Chem. Phys. Lipids* 203, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.01.004>
- Hemelaar, J., 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med.* 18, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., Johnson, P.R., 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392. <https://doi.org/10.1038/339389a0>
- Hladik, F., McElrath, M.J., 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 447–457. <https://doi.org/10.1038/nri2302>
- Hotter, D., Sauter, D., Kirchhoff, F., 2017. Guanylate binding protein 5: Impairing virion infectivity by targeting retroviral envelope glycoproteins. *Small GTPases* 8, 31–37. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1189990>
- Hu, W.-S., Hughes, S.H., 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Huang, C., Tang, M., Zhang, M.-Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., Dimitrov, D.S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I.A., Wyatt, R., Kwong, P.D., 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310, 1025–1028. <https://doi.org/10.1126/science.1118398>
- Huang, C.-C., Lam, S.N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S.-H., Hussan, S.S.-U., Stanfield, R.L., Robinson, J., Sodroski, J., Wilson, I.A., Wyatt, R., Bewley, C.A., Kwong, P.D., 2007. Structures of the CCR5 N

- terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* 317, 1930–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1145373>
- Huang, J., Kang, B.H., Ishida, E., Zhou, T., Griesman, T., Sheng, Z., Wu, F., Doria-Rose, N.A., Zhang, B., McKee, K., O'Dell, S., Chuang, G.-Y., Druz, A., Georgiev, I.S., Schramm, C.A., Zheng, A., Joyce, M.G., Asokan, M., Ransier, A., Darko, S., Migueles, S.A., Bailer, R.T., Louder, M.K., Alam, S.M., Parks, R., Kelsoe, G., Von Holle, T., Haynes, B.F., Douek, D.C., Hirsch, V., Seaman, M.S., Shapiro, L., Mascola, J.R., Kwong, P.D., Connors, M., 2016. Identification of a CD4-Binding-Site Antibody to HIV that Evolved Near-Pan Neutralization Breadth. *Immunity* 45, 1108–1121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.027>
- Huang, J., Kang, B.H., Pancera, M., Lee, J.H., Tong, T., Feng, Y., Imamichi, H., Georgiev, I.S., Chuang, G.-Y., Druz, A., Doria-Rose, N.A., Laub, L., Sliepen, K., van Gils, M.J., de la Peña, A.T., Derking, R., Klasse, P.-J., Migueles, S.A., Bailer, R.T., Alam, M., Pugach, P., Haynes, B.F., Wyatt, R.T., Sanders, R.W., Binley, J.M., Ward, A.B., Mascola, J.R., Kwong, P.D., Connors, M., 2014. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. *Nature* 515, 138–142. <https://doi.org/10.1038/nature13601>
- Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M.K., Doria-Rose, N.A., Longo, N.S., Imamichi, H., Bailer, R.T., Chakrabarti, B., Sharma, S.K., Alam, S.M., Wang, T., Yang, Y., Zhang, B., Migueles, S.A., Wyatt, R., Haynes, B.F., Kwong, P.D., Mascola, J.R., Connors, M., 2012. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491, 406–412. <https://doi.org/10.1038/nature11544>
- Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A., Freed, E.O., 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 69, 6810–6818.
- Huber, M., Trkola, A., 2007. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J. Intern. Med.* 262, 5–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01819.x>
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., Wain-Hobson, S., 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345, 356. <https://doi.org/10.1038/345356a0>
- Hulme, A.E., Kelley, Z., Foley, D., Hope, T.J., 2015. Complementary Assays Reveal a Low Level of CA Associated with Viral Complexes in the Nuclei of HIV-1-Infected Cells. *J. Virol.* 89, 5350–5361. <https://doi.org/10.1128/JVI.00476-15>
- Hwang, S.S., Boyle, T.J., Lyerly, H.K., Cullen, B.R., 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253, 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.1905842>
- Jansson, M., Popovic, M., Karlsson, A., Cocchi, F., Rossi, P., Albert, J., Wigzell, H., 1996. Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15382–15387. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15382>
- Jia, R., Pan, Q., Ding, S., Rong, L., Liu, S.-L., Geng, Y., Qiao, W., Liang, C., 2012. The N-terminal region of IFITM3 modulates its antiviral activity by regulating IFITM3 cellular localization. *J. Virol.* 86, 13697–13707. <https://doi.org/10.1128/JVI.01828-12>
- Jones, N.A., Wei, X., Flower, D.R., Wong, M., Michor, F., Saag, M.S., Hahn, B.H., Nowak, M.A., Shaw, G.M., Borrow, P., 2004. Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from the Primary CD8⁺ Cytotoxic T Lymphocyte Response. *J. Exp. Med.* 200, 1243–1256. <https://doi.org/10.1084/jem.20040511>
- Julien, J.-P., Cupo, A., Sok, D., Stanfield, R.L., Lyumkis, D., Deller, M.C., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Ward, A.B., Wilson, I.A., 2013a. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1477–1483. <https://doi.org/10.1126/science.1245625>
- Julien, J.-P., Lee, J.H., Cupo, A., Murin, C.D., Derking, R., Hoffenberg, S., Caulfield, M.J., King, C.R., Marozsan, A.J., Klasse, P.J., Sanders, R.W., Moore, J.P., Wilson, I.A., Ward, A.B., 2013b. Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4351–4356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217537110>
- Julien, J.-P., Lee, P.S., Wilson, I.A., 2012. Structural insights into key sites of vulnerability on HIV-1 Env and influenza HA. *Immunol. Rev.* 250, 180–198. <https://doi.org/10.1111/imr.12005>
- Kane, M., Zang, T.M., Rihn, S.J., Zhang, F., Kueck, T., Alim, M., Schoggins, J., Rice, C.M., Wilson, S.J., Bieniasz, P.D., 2016. Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host Microbe* 20, 392–405. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.005>
- Karn, J., Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006916. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>

- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.-H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner, W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7552–7557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802203105>
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F.Y., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523–526. <https://doi.org/10.1126/science.1126531>
- Kim, B.-H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J., MacMicking, J.D., 2012. IFN-Inducible GTPases in Host Cell Defense. *Cell Host Microbe* 12, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.007>
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., Montagnier, L., 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312, 767–768. <https://doi.org/10.1038/312767a0>
- Klein, K.C., Reed, J.C., Lingappa, J.R., 2007. Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag. *AIDS Rev.* 9, 150–161.
- Kondo, E., Göttinger, H.G., 1996. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 70, 159–164.
- Kondo, N., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., Matsuda, Z., 2010. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion are inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol. Chem.* 285, 14681–14688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067090>
- Kong, L., Lee, J.H., Doores, K.J., Murin, C.D., Julien, J.-P., McBride, R., Liu, Y., Marozsan, A., Cupo, A., Klasse, P.-J., Hoffenberg, S., Caulfield, M., King, C.R., Hua, Y., Le, K.M., Khayat, R., Deller, M.C., Clayton, T., Tien, H., Feizi, T., Sanders, R.W., Paulson, J.C., Moore, J.P., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., Wilson, I.A., 2013. Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 796–803. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2594>
- Kong, R., Xu, K., Zhou, T., Acharya, P., Lemmin, T., Liu, K., Ozorowski, G., Soto, C., Taft, J.D., Bailer, R.T., Cale, E.M., Chen, L., Choi, C.W., Chuang, G.-Y., Doria-Rose, N.A., Druz, A., Georgiev, I.S., Gorman, J., Huang, J., Joyce, M.G., Louder, M.K., Ma, X., McKee, K., O'Dell, S., Pancera, M., Yang, Y., Blanchard, S.C., Mothes, W., Burton, D.R., Koff, W.C., Connors, M., Ward, A.B., Kwong, P.D., Mascola, J.R., 2016. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. *Science* 352, 828–833. <https://doi.org/10.1126/science.aae0474>
- Krapp, C., Hotter, D., Gawanbacht, A., McLaren, P.J., Kluge, S.F., Stürzel, C.M., Mack, K., Reith, E., Engelhart, S., Ciuffi, A., Hornung, V., Sauter, D., Telenti, A., Kirchhoff, F., 2016. Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host Microbe* 19, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.019>
- Kwon, Y.D., Finzi, A., Wu, X., Dogo-Isonagie, C., Lee, L.K., Moore, L.R., Schmidt, S.D., Stuckey, J., Yang, Y., Zhou, T., Zhu, J., Vivic, D.A., Debnath, A.K., Shapiro, L., Bewley, C.A., Mascola, J.R., Sodroski, J.G., Kwong, P.D., 2012. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5663–5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112391109>
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W.A., 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–659. <https://doi.org/10.1038/31405>
- Lai, A.L., Freed, J.H., 2014. HIV gp41 Fusion Peptide Increases Membrane Ordering in a Cholesterol-Dependent Fashion. *Biophys. J.* 106, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.027>
- Lee, J.H., Ozorowski, G., Ward, A.B., 2016. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 351, 1043–1048. <https://doi.org/10.1126/science.aad2450>
- Lee, W.-Y.J., Fu, R.M., Liang, C., Sloan, R.D., 2018. IFITM proteins inhibit HIV-1 protein synthesis. *Sci. Rep.* 8, 14551. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32785-5>
- Lehmann-Che, J., Saïb, A., 2004. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. *AIDS Rev.* 6, 199–207.

- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., Gregory, T.J., 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265, 10373–10382.
- Li, H., Bar, K.J., Wang, S., Decker, J.M., Chen, Y., Sun, C., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Learn, G.H., Morgan, C.J., Schumacher, J.E., Hraber, P., Giorgi, E.E., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Perelson, A.S., Eron, J.J., Cohen, M.S., Hicks, C.B., Haynes, B.F., Markowitz, M., Keele, B.F., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2010. High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS Pathog.* 6, e1000890. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000890>
- Li, H., Dou, J., Ding, L., Spearman, P., 2007. Myristoylation is required for human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag multimerization in mammalian cells. *J. Virol.* 81, 12899–12910. <https://doi.org/10.1128/JVI.01280-07>
- Li, K., Markosyan, R.M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J.C., Gratton, E., Cohen, F.S., Liu, S.-L., 2013. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PLoS Pathog.* 9, e1003124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>
- Lin, T.-Y., Chin, C.R., Everitt, A.R., Clare, S., Ferreira, J.M., Savidis, G., Aker, A.M., John, S.P., Sarlah, D., Carreira, E.M., Elledge, S.J., Kellam, P., Brass, A.L., 2013. Amphotericin B increases influenza A virus infection by preventing IFITM3-mediated restriction. *Cell Rep.* 5, 895–908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.033>
- 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. <https://doi.org/10.2174/156652407780059177>
- Ling, S., Zhang, C., Wang, W., Cai, X., Yu, L., Wu, F., Zhang, L., Tian, C., 2016. Combined approaches of EPR and NMR illustrate only one transmembrane helix in the human IFITM3. *Sci. Rep.* 6, 24029. <https://doi.org/10.1038/srep24029>
- Liu, H., Jain, R., Guan, J., Vuong, V., Ishido, S., La Gruta, N.L., Gray, D.H., Villadangos, J.A., Mintern, J.D., 2016. Ubiquitin ligase MARCH 8 cooperates with CD83 to control surface MHC II expression in thymic epithelium and CD4 T cell selection. *J. Exp. Med.* 213, 1695–1703. <https://doi.org/10.1084/jem.20160312>
- Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Sapiro, G., Subramaniam, S., 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455, 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature07159>
- Liu, P., Overman, R.G., Yates, N.L., Alam, S.M., Vandergrift, N., Chen, Y., Graw, F., Freel, S.A., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., Montefiori, D.C., Gao, F., Perelson, A.S., Cohen, M.S., Haynes, B.F., Tomaras, G.D., 2011. Dynamic Antibody Specificities and Virion Concentrations in Circulating Immune Complexes in Acute to Chronic HIV-1 Infection. *J. Virol.* 85, 11196–11207. <https://doi.org/10.1128/JVI.05601-11>
- Liu, R., Wu, J., Shao, R., Xue, Y., 2014. Mechanism and factors that control HIV-1 transcription and latency activation. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 15, 455–465. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400059>
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., Freiberg, A.N., Su, L., Lee, B., Cheng, G., 2013. Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* 38, 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>
- Lodermeyer, V., Ssebyatika, G., Passos, V., Ponnurangam, A., Malassa, A., Ewald, E., Stürzel, C.M., Kirchhoff, F., Rotger, M., Falk, C.S., Telenti, A., Krey, T., Goffinet, C., 2018. The Antiviral Activity of the Cellular Glycoprotein LGALS3BP/90K Is Species Specific. *J. Virol.* 92, e00226-18, /jvi/92/14/e00226-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JVI.00226-18>
- Lodermeyer, V., Suhr, K., Schrott, N., Kolbe, C., Stürzel, C.M., Krnavek, D., Münch, J., Dietz, C., Waldmann, T., Kirchhoff, F., Goffinet, C., 2013. 90K, an interferon-stimulated gene product, reduces the infectivity of HIV-1. *Retrovirology* 10, 111. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-111>
- Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S.-L., Liang, C., 2011. The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *J. Virol.* 85, 2126–2137. <https://doi.org/10.1128/JVI.01531-10>
- Lu, M., Blacklow, S.C., Kim, P.S., 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1075–1082. <https://doi.org/10.1038/nsb1295-1075>
- Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., Campbell, E.M., 2014. HIV-1 uncoating is facilitated by dynein and kinesin 1. *J. Virol.* 88, 13613–13625. <https://doi.org/10.1128/JVI.02219-14>

- Lyumkis, D., Julien, J.-P., de Val, N., Cupo, A., Potter, C.S., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Carragher, B., Wilson, I.A., Ward, A.B., 2013. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1484–1490. <https://doi.org/10.1126/science.1245627>
- Maillot, B., Lévy, N., Eiler, S., Crucifix, C., Granger, F., Richert, L., Didier, P., Godet, J., Pradeau-Aubretton, K., Emiliani, S., Nazabal, A., Lesbats, P., Parissi, V., Mely, Y., Moras, D., Schultz, P., Ruff, M., 2013. Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PLoS One* 8, e60734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060734>
- Malikov, V., Naghavi, M.H., 2017. Localized Phosphorylation of a Kinesin-1 Adaptor by a Capsid-Associated Kinase Regulates HIV-1 Motility and Uncoating. *Cell Rep.* 20, 2792–2799. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.076>
- Mamede, J.I., Cianci, G.C., Anderson, M.R., Hope, T.J., 2017. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7169–E7178. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706245114>
- Mateu, M.G., 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J.* 276, 6098–6109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07313.x>
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., Hope, T.J., 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300, 1295–1297. <https://doi.org/10.1126/science.1084238>
- McLaren, P.J., Gawanbacht, A., Pyndiah, N., Krapp, C., Hotter, D., Kluge, S.F., Götz, N., Heilmann, J., Mack, K., Sauter, D., Thompson, D., Perreaud, J., Rausell, A., Munoz, M., Ciuffi, A., Kirchhoff, F., Telenti, A., 2015. Identification of potential HIV restriction factors by combining evolutionary genomic signatures with functional analyses. *Retrovirology* 12, 41. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0165-5>
- McLellan, J.S., Pancera, M., Carrico, C., Gorman, J., Julien, J.-P., Khayat, R., Louder, R., Pejchal, R., Sastry, M., Dai, K., O'Dell, S., Patel, N., Shahzad-ul-Hussan, S., Yang, Y., Zhang, B., Zhou, T., Zhu, J., Boyington, J.C., Chuang, G.-Y., Diwanji, D., Georgiev, I., Kwon, Y.D., Lee, D., Louder, M.K., Moquin, S., Schmidt, S.D., Yang, Z.-Y., Bonsignori, M., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E., Haynes, B.F., Burton, D.R., Koff, W.C., Walker, L.M., Phogat, S., Wyatt, R., Orwenyo, J., Wang, L.-X., Arthos, J., Bewley, C.A., Mascola, J.R., Nabel, G.J., Schief, W.R., Ward, A.B., Wilson, I.A., Kwong, P.D., 2011. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480, 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature10696>
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., Haynes, B.F., 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 11–23. <https://doi.org/10.1038/nri2674>
- McMichael, T.M., Zhang, L., Chemudupati, M., Hach, J.C., Kenney, A.D., Hang, H.C., Yount, J.S., 2017. The palmitoyltransferase ZDHHC20 enhances interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) palmitoylation and antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 292, 21517–21526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800482>
- Melikyan, G.B., 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 5, 111. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-111>
- Moog, C., Fleury, H.J., Pellegrin, I., Kirn, A., Aubertin, A.M., 1997. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 71, 3734–3741.
- Moore, P.L., 2018a. The Neutralizing Antibody Response to the HIV-1 Env Protein. *Curr. HIV Res.* 16, 21–28. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666171124122044>
- Moore, P.L., 2018b. The Neutralizing Antibody Response to the HIV-1 Env Protein. *Curr. HIV Res.* 16, 21–28. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666171124122044>
- Moore, P.L., Crooks, E.T., Porter, L., Zhu, P., Cayan, C.S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M.B., Franti, M., Morris, L., Roux, K.H., Burton, D.R., Binley, J.M., 2006. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 80, 2515–2528. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2515-2528.2006>
- Moore, P.L., Ranchobe, N., Lambson, B.E., Gray, E.S., Cave, E., Abrahams, M.-R., Bandawe, G., Mlisana, K., Abdool Karim, S.S., Williamson, C., Morris, L., CAPRISA 002 Study, NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI), 2009. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in

- early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000598. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000598>
- Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J.F., Halper-Stromberg, A., Gnanapragasam, P.N.P., Spencer, D.I.R., Seaman, M.S., Schuitemaker, H., Feizi, T., Nussenzweig, M.C., Bjorkman, P.J., 2012. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3268–3277. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217207109>
- Mourez, T., Simon, F., Plantier, J.-C., 2013. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 448–461. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-13>
- Murakami, T., 2012. Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions. *Mol. Biol. Int.* 2012, 682850. <https://doi.org/10.1155/2012/682850>
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rüker, F., Katinger, H., 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6642–6647.
- Natoli, C., Dianzani, F., Mazzotta, F., Balocchi, E., Pierotti, P., Antonelli, G., Iacobelli, S., 1993. 90K protein: a new predictor marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 370–375.
- Neumann, E., Khawaja, K., Müller-Ladner, U., 2014. G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 429–436. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.62>
- Obermeier, M., Symons, J., Wensing, A.M.J., 2012. HIV population genotypic tropism testing and its clinical significance. *Curr. Opin. HIV AIDS* 7, 470–477. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328356eaa7>
- O'Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K., Zack, J.A., Chen, I.S., 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348, 69–73. <https://doi.org/10.1038/348069a0>
- Ono, A., Freed, E.O., 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13925–13930. <https://doi.org/10.1073/pnas.241320298>
- Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.-E.A., Chen, L., Huang, C., Kong, L., Kwon, Y.D., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J.E., Schief, W.R., Sodroski, J., Wyatt, R., Kwong, P.D., 2010. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1166–1171. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911004107>
- Pancera, M., Zhou, T., Druz, A., Georgiev, I.S., Soto, C., Gorman, J., Huang, J., Acharya, P., Chuang, G.-Y., Ofek, G., Stewart-Jones, G.B.E., Stuckey, J., Bailer, R.T., Joyce, M.G., Louder, M.K., Tumba, N., Yang, Y., Zhang, B., Cohen, M.S., Haynes, B.F., Mascola, J.R., Morris, L., Munro, J.B., Blanchard, S.C., Mothes, W., Connors, M., Kwong, P.D., 2014a. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature* 514, 455–461. <https://doi.org/10.1038/nature13808>
- Pancera, M., Zhou, T., Druz, A., Georgiev, I.S., Soto, C., Gorman, J., Huang, J., Acharya, P., Chuang, G.-Y., Ofek, G., Stewart-Jones, G.B.E., Stuckey, J., Bailer, R.T., Joyce, M.G., Louder, M.K., Tumba, N., Yang, Y., Zhang, B., Cohen, M.S., Haynes, B.F., Mascola, J.R., Morris, L., Munro, J.B., Blanchard, S.C., Mothes, W., Connors, M., Kwong, P.D., 2014b. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature* 514, 455–461. <https://doi.org/10.1038/nature13808>
- Pantophlet, R., Burton, D.R., 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 739–769. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090557>
- Passos, V., Zillinger, T., Casartelli, N., Wachs, A.S., Xu, S., Malassa, A., Steppich, K., Schilling, H., Franz, S., Todt, D., Steinmann, E., Sutter, K., Dittmer, U., Bohne, J., Schwartz, O., Barchet, W., Goffinet, C., 2019. Characterization of Endogenous SERINC5 Protein as Anti-HIV-1 Factor. *J. Virol.* 93, e01221-19, <https://doi.org/10.1128/JVI.01221-19>
- Pastore, C., Nedellec, R., Ramos, A., Pontow, S., Ratner, L., Mosier, D.E., 2006. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J. Virol.* 80, 750–758. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.750-758.2006>
- Peeters, M., Honoré, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R.W., Delaporte, E., 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS Lond. Engl.* 3, 625–630. <https://doi.org/10.1097/00002030-198910000-00001>
- Peeters, M., Jung, M., Ayoub, A., 2013. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 885–896. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.825443>

- Pejchal, R., Doores, K.J., Walker, L.M., Khayat, R., Huang, P.-S., Wang, S.-K., Stanfield, R.L., Julien, J.-P., Ramos, A., Crispin, M., Depetris, R., Katpally, U., Marozsan, A., Cupo, A., Malveste, S., Liu, Y., McBride, R., Ito, Y., Sanders, R.W., Ogohara, C., Paulson, J.C., Feizi, T., Scanlan, C.N., Wong, C.-H., Moore, J.P., Olson, W.C., Ward, A.B., Poignard, P., Schief, W.R., Burton, D.R., Wilson, I.A., 2011. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* 334, 1097–1103. <https://doi.org/10.1126/science.1213256>
- Perreira, J.M., Chin, C.R., Feeley, E.M., Brass, A.L., 2013. IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses. *J. Mol. Biol.* 425, 4937–4955. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.024>
- Peterlin, B.M., Trono, D., 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 97–107. <https://doi.org/10.1038/nri998>
- Peterson, A., Seed, B., 1988. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* 54, 65–72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90180-8)
- Ping, L.-H., Joseph, S.B., Anderson, J.A., Abrahams, M.-R., Salazar-Gonzalez, J.F., Kincer, L.P., Treurnicht, F.K., Arney, L., Ojeda, S., Zhang, M., Keys, J., Potter, E.L., Chu, H., Moore, P., Salazar, M.G., Iyer, S., Jabara, C., Kirchherr, J., Mapanje, C., Ngandu, N., Seoighe, C., Hoffman, I., Gao, F., Tang, Y., Labranche, C., Lee, B., Saville, A., Vermeulen, M., Fiscus, S., Morris, L., Karim, S.A., Haynes, B.F., Shaw, G.M., Korber, B.T., Hahn, B.H., Cohen, M.S., Montefiori, D., Williamson, C., Swanstrom, R., CAPRISA Acute Infection Study and the Center for HIV-AIDS Vaccine Immunology Consortium, 2013. Comparison of viral Env proteins from acute and chronic infections with subtype C human immunodeficiency virus type 1 identifies differences in glycosylation and CCR5 utilization and suggests a new strategy for immunogen design. *J. Virol.* 87, 7218–7233. <https://doi.org/10.1128/JVI.03577-12>
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
- Postler, T.S., Desrosiers, R.C., 2013. The tale of the long tail: the cytoplasmic domain of HIV-1 gp41. *J. Virol.* 87, 2–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-12>
- Pugach, P., Ozorowski, G., Cupo, A., Ringe, R., Yasmeen, A., de Val, N., Derking, R., Kim, H.J., Korzun, J., Golabek, M., de Los Reyes, K., Ketas, T.J., Julien, J.-P., Burton, D.R., Wilson, I.A., Sanders, R.W., Klasse, P.J., Ward, A.B., Moore, J.P., 2015. A native-like SOSIP.664 trimer based on an HIV-1 subtype B env gene. *J. Virol.* 89, 3380–3395. <https://doi.org/10.1128/JVI.03473-14>
- Rahman, K., Coomer, C.A., Majdoul, S., Ding, S., Padilla-Parra, S., Compton, A.A., 2020. Homology-guided identification of a conserved motif linking the antiviral functions of IFITM3 to its oligomeric state (preprint). *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.096891>
- Ramirez, B.C., Simon-Loriere, E., Galetto, R., Negroni, M., 2008. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res.* 134, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.01.007>
- Ranjbar, S., Haridas, V., Jasenosky, L.D., Falvo, J.V., Goldfeld, A.E., 2015. A Role for IFITM Proteins in Restriction of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Rep.* 13, 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.048>
- Raska, M., Takahashi, K., Czernekova, L., Zachova, K., Hall, S., Moldoveanu, Z., Elliott, M.C., Wilson, L., Brown, R., Jancova, D., Barnes, S., Vrbkova, J., Tomana, M., Smith, P.D., Mestecky, J., Renfrow, M.B., Novak, J., 2010. Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J. Biol. Chem.* 285, 20860–20869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085472>
- Reading, S.A., Dimmock, N.J., 2007. Neutralization of animal virus infectivity by antibody. *Arch. Virol.* 152, 1047–1059. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0923-8>
- REED, L.J., MUENCH, H., 1938. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., Petropoulos, C.J., 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4144–4149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630530100>
- Rizzuto, C.D., Wyatt, R., Hernández-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A., Sodroski, J., 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280, 1949–1953. <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1949>

- Roben, P., Moore, J.P., Thali, M., Sodroski, J., Barbas, C.F., Burton, D.R., 1994. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68, 4821–4828.
- Rong, R., Bibollet-Ruche, F., Mulenga, J., Allen, S., Blackwell, J.L., Derdeyn, C.A., 2007. Role of V1V2 and Other Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Domains in Resistance to Autologous Neutralization during Clade C Infection. *J. Virol.* 81, 1350–1359. <https://doi.org/10.1128/JVI.01839-06>
- Rong, R., Li, B., Lynch, R.M., Haaland, R.E., Murphy, M.K., Mulenga, J., Allen, S.A., Pinter, A., Shaw, G.M., Hunter, E., Robinson, J.E., Gnanakaran, S., Derdeyn, C.A., 2009. Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog.* 5, e1000594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000594>
- 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, 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature15399>
- Rowland-Jones, S.L., 2003. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat. Rev. Immunol.* 3, 343–348. <https://doi.org/10.1038/nri1058>
- Rusert, P., Kouyos, R.D., Kadelka, C., Ebner, H., Schanz, M., Huber, M., Braun, D.L., Hozé, N., Scherrer, A., Magnus, C., Weber, J., Uhr, T., Cippa, V., Thorball, C.W., Kuster, H., Cavassini, M., Bernasconi, E., Hoffmann, M., Calmy, A., Battegay, M., Rauch, A., Yerly, S., Aubert, V., Klimkait, T., Böni, J., Fellay, J., Regoes, R.R., Günthard, H.F., Trkola, A., Swiss HIV Cohort Study, 2016. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nat. Med.* 22, 1260–1267. <https://doi.org/10.1038/nm.4187>
- Sagar, Manish, Wu, X., Lee, S., Overbaugh, J., 2006. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* 80, 9586–9598. <https://doi.org/10.1128/JVI.00141-06>
- Sagar, M., Wu, X., Lee, S., Overbaugh, J., 2006. Human Immunodeficiency Virus Type 1 V1-V2 Envelope Loop Sequences Expand and Add Glycosylation Sites over the Course of Infection, and These Modifications Affect Antibody Neutralization Sensitivity. *J. Virol.* 80, 9586–9598. <https://doi.org/10.1128/JVI.00141-06>
- Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Keele, B.F., Learn, G.H., Giorgi, E.E., Li, H., Decker, J.M., Wang, S., Baalwa, J., Kraus, M.H., Parrish, N.F., Shaw, K.S., Guffey, M.B., Bar, K.J., Davis, K.L., Ochsenbauer-Jambor, C., Kappes, J.C., Saag, M.S., Cohen, M.S., Mulenga, J., Derdeyn, C.A., Allen, S., Hunter, E., Markowitz, M., Hraber, P., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Haynes, B.F., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2009. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 1273–1289. <https://doi.org/10.1084/jem.20090378>
- Salter, J.D., Morales, G.A., Smith, H.C., 2014. Structural insights for HIV-1 therapeutic strategies targeting Vif. *Trends Biochem. Sci.* 39, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.001>
- Samji, T., Hong, S., Means, R.E., 2014. The Membrane Associated RING-CH Proteins: A Family of E3 Ligases with Diverse Roles through the Cell. *Int. Sch. Res. Not.* 2014, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2014/637295>
- Sanders, R.W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeen, A., de Val, N., Kim, H.J., Blattner, C., de la Peña, A.T., Korzun, J., Golabek, M., de Los Reyes, K., Ketas, T.J., van Gils, M.J., King, C.R., Wilson, I.A., Ward, A.B., Klasse, P.J., Moore, J.P., 2013. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 9, e1003618. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003618>
- Sanders, R.W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K.O., Kwong, P.D., Moore, J.P., 2002. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* 76, 7293–7305. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.14.7293-7305.2002>
- Savidis, G., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Meraner, P., Guo, Z., Green, S., Brass, A.L., 2016. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Rep.* 15, 2323–2330. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.074>

- Scharf, L., Scheid, J.F., Lee, J.H., West, A.P., Chen, C., Gao, H., Gnanapragasam, P.N.P., Mares, R., Seaman, M.S., Ward, A.B., Nussenzweig, M.C., Bjorkman, P.J., 2014. Antibody 8ANC195 reveals a site of broad vulnerability on the HIV-1 envelope spike. *Cell Rep.* 7, 785–795. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.001>
- Scharf, L., Wang, H., Gao, H., Chen, S., McDowall, A.W., Bjorkman, P.J., 2015. Broadly Neutralizing Antibody 8ANC195 Recognizes Closed and Open States of HIV-1 Env. *Cell* 162, 1379–1390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.035>
- Scheid, J.F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T.Y.K., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinzon, K., Hurley, A., Myung, S., Boulad, F., Poignard, P., Burton, D.R., Pereyra, F., Ho, D.D., Walker, B.D., Seaman, M.S., Bjorkman, P.J., Chait, B.T., Nussenzweig, M.C., 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333, 1633–1637. <https://doi.org/10.1126/science.1207227>
- Schulte, B., Selyutina, A., Opp, S., Herschhorn, A., Sodroski, J.G., Pizzato, M., Diaz-Griffero, F., 2018. Localization to detergent-resistant membranes and HIV-1 core entry inhibition correlate with HIV-1 restriction by SERINC5. *Virology* 515, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.005>
- Selyutina, A., Persaud, M., Simons, L.M., Bulnes-Ramos, A., Buffone, C., Martinez-Lopez, A., Scoca, V., Di Nunzio, F., Hiatt, J., Marson, A., Krogan, N.J., Hultquist, J.F., Diaz-Griffero, F., 2020. Cyclophilin A Prevents HIV-1 Restriction in Lymphocytes by Blocking Human TRIM5 α Binding to the Viral Core. *Cell Rep.* 30, 3766–3777.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.100>
- Shaik, M.M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., Chen, B., 2019. Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature* 565, 318–323. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0804-9>
- Shan, J., Zhao, B., Shan, Z., Nie, J., Deng, R., Xiong, R., Tsun, A., Pan, W., Zhao, H., Chen, L., Jin, Y., Qian, Z., Lui, K., Liang, R., Li, D., Sun, B., Lavillette, D., Xu, K., Li, B., 2017. Histone demethylase LSD1 restricts influenza A virus infection by erasing IFITM3-K88 monomethylation. *PLoS Pathog.* 13, e1006773. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006773>
- Shan, Z., Han, Q., Nie, J., Cao, X., Chen, Z., Yin, S., Gao, Y., Lin, F., Zhou, X., Xu, K., Fan, H., Qian, Z., Sun, B., Zhong, J., Li, B., Tsun, A., 2013. Negative regulation of interferon-induced transmembrane protein 3 by SET7-mediated lysine monomethylation. *J. Biol. Chem.* 288, 35093–35103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511949>
- Shang, L., Yue, L., Hunter, E., 2008. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J. Virol.* 82, 5417–5428. <https://doi.org/10.1128/JVI.02666-07>
- Sharma, S., Lewinski, M.K., Guatelli, J., 2018. An N-Glycosylated Form of SERINC5 Is Specifically Incorporated into HIV-1 Virions. *J. Virol.* 92, e00753-18, /jvi/92/22/e00753-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JVI.00753-18>
- Shaw, G.M., Hunter, E., 2012. HIV transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Shepherd, J.C., Jacobson, L.P., Qiao, W., Jamieson, B.D., Phair, J.P., Piazza, P., Quinn, T.C., Margolick, J.B., 2008. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study. *J. Infect. Dis.* 198, 1104–1112. <https://doi.org/10.1086/591623>
- Sherman, M.P., de Noronha, C.M.C., Heusch, M.I., Greene, S., Greene, W.C., 2001. Nucleocytoplasmic Shuttling by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr. *J. Virol.* 75, 1522–1532. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1522-1532.2001>
- Sidney, J., Southwood, S., Pasquetto, V., Sette, A., 2003. Simultaneous Prediction of Binding Capacity for Multiple Molecules of the HLA B44 Supertype. *J. Immunol.* 171, 5964–5974. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5964>
- Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, G., Birungi, J., Pozniak, A., McPhee, D.A., Manigart, O., Karita, E., Inwoley, A., Jaoko, W., Dehovitz, J., Bekker, L.-G., Pitisuttithum, P., Paris, R., Walker, L.M., Poignard, P., Wrin, T., Fast, P.E., Burton, D.R., Koff, W.C., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* 83, 7337–7348. <https://doi.org/10.1128/JVI.00110-09>

- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., Brun-Vézinet, F., 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1032–1037. <https://doi.org/10.1038/2017>
- Sliepen, K., Han, B.W., Bontjer, I., Mooij, P., Garces, F., Behrens, A.-J., Rantalainen, K., Kumar, S., Sarkar, A., Brouwer, P.J.M., Hua, Y., Tolazzi, M., Schermer, E., Torres, J.L., Ozorowski, G., van der Woude, P., de la Peña, A.T., van Breemen, M.J., Camacho-Sánchez, J.M., Burger, J.A., Medina-Ramírez, M., González, N., Alami, J., LaBranche, C., Scarlatti, G., van Gils, M.J., Crispin, M., Montefiori, D.C., Ward, A.B., Koopman, G., Moore, J.P., Shattock, R.J., Bogers, W.M., Wilson, I.A., Sanders, R.W., 2019. Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence. *Nat. Commun.* 10, 2355. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10262-5>
- Smith, S., Weston, S., Kellam, P., Marsh, M., 2014. IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Curr. Opin. Virol.* 4, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.11.004>
- Smyth, R.P., Davenport, M.P., Mak, J., 2012. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* 169, 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.015>
- Sood, C., Marin, M., Chande, A., Pizzato, M., Melikyan, G.B., 2017. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 292, 6014–6026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.777714>
- Staropoli, I., Dufloo, J., Ducher, A., Commere, P.-H., Sartori-Rupp, A., Novault, S., Bruel, T., Lorin, V., Mouquet, H., Schwartz, O., Casartelli, N., 2019. Flow Cytometry Analysis of HIV-1 Env Conformations at the Surface of Infected Cells and Virions: Role of Nef, CD4, and SERINC5. *J. Virol.* 94, e01783-19, [/jvi/94/6/JVI.01783-19.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.01783-19). <https://doi.org/10.1128/JVI.01783-19>
- Stefic, K., Bouvin-Pley, M., Braibant, M., Barin, F., 2019. Impact of HIV-1 Diversity on Its Sensitivity to Neutralization. *Vaccines* 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030074>
- Stewart-Jones, G.B.E., Soto, C., Lemmin, T., Chuang, G.-Y., Druz, A., Kong, R., Thomas, P.V., Wagh, K., Zhou, T., Behrens, A.-J., Bylund, T., Choi, C.W., Davison, J.R., Georgiev, I.S., Joyce, M.G., Kwon, Y.D., Pancera, M., Taft, J., Yang, Y., Zhang, B., Shivatare, S.S., Shivatare, V.S., Lee, C.-C.D., Wu, C.-Y., Bewley, C.A., Burton, D.R., Koff, W.C., Connors, M., Crispin, M., Baxa, U., Korber, B.T., Wong, C.-H., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2016. Trimeric HIV-1-Env Structures Define Glycan Shields from Clades A, B, and G. *Cell* 165, 813–826. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.010>
- Su, B., Moog, C., 2014. Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front. Immunol.* 5, 289. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00289>
- Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., Hare, D.R., 1992. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 1, 563–574. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010502>
- Sundquist, W.I., Kräusslich, H.-G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Suzuki, Y., Craigie, R., 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 187–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1579>
- Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Tobiume, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S., Fujita, H., Tokunaga, K., 2015. MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat. Med.* 21, 1502–1507. <https://doi.org/10.1038/nm.3956>
- Tamamis, P., Floudas, C.A., 2014. Elucidating a key anti-HIV-1 and cancer-associated axis: the structure of CCL5 (Rantes) in complex with CCR5. *Sci. Rep.* 4, 5447. <https://doi.org/10.1038/srep05447>
- Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S., Lu, M., 1997. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12303. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12303>
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, Jian, Chen, Z., Han, G.W., Kufareva, I., Li, T., Ma, L., Fenalti, G., Li, Jing, Zhang, W., Xie, X., Yang, H., Jiang, H., Cherezov, V., Liu, H., Stevens, R.C., Zhao, Q., Wu, B., 2013. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 341, 1387–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1241475>
- Tang, H., Robinson, J.E., Gnanakaran, S., Li, M., Rosenberg, E.S., Perez, L.G., Haynes, B.F., Liao, H.-X., LaBranche, C.C., Korber, B.T., Montefiori, D.C., 2011. epitopes immediately below the base of the V3

- loop of gp120 as targets for the initial autologous neutralizing antibody response in two HIV-1 subtype B-infected individuals. *J. Virol.* 85, 9286–9299. <https://doi.org/10.1128/JVI.02286-10>
- Tartour, K., Appourchaux, R., Gaillard, J., Nguyen, X.-N., Durand, S., Turpin, J., Beaumont, E., Roch, E., Berger, G., Mahieux, R., Brand, D., Roingeard, P., Cimarelli, A., 2014. IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* 11, 103. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0103-y>
- Tartour, K., Cimarelli, A., 2015. Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *médecine/sciences* 31, 377–382. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104011>
- Tartour, K., Nguyen, X.-N., Appourchaux, R., Assil, S., Barateau, V., Bloyet, L.-M., Burlaud Gaillard, J., Confort, M.-P., Escudero-Perez, B., Gruffat, H., Hong, S.S., Moroso, M., Reynard, O., Reynard, S., Decembre, E., Ftaich, N., Rossi, A., Wu, N., Arnaud, F., Baize, S., Dreux, M., Gerlier, D., Paranhos-Baccala, G., Volchkov, V., Roingeard, P., Cimarelli, A., 2017. Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. *PLoS Pathog.* 13, e1006610. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006610>
- Tebit, D.M., Arts, E.J., 2011. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect. Dis.* 11, 45–56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70186-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9)
- Tedbury, P.R., Sarafianos, S.G., 2017. Exposing HIV's weaknesses. *J. Biol. Chem.* 292, 6027–6028. <https://doi.org/10.1074/jbc.H117.777714>
- Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., Cohen, M., Eron, J., Hicks, C.B., Liao, H.-X., Self, S.G., Landucci, G., Forthal, D.N., Weinhold, K.J., Keele, B.F., Hahn, B.H., Greenberg, M.L., Morris, L., Karim, S.S.A., Blattner, W.A., Montefiori, D.C., Shaw, G.M., Perelson, A.S., Haynes, B.F., 2008. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. *J. Virol.* 82, 12449–12463. <https://doi.org/10.1128/JVI.01708-08>
- Tran, E.E.H., Borgnia, M.J., Kuybeda, O., Schauder, D.M., Bartesaghi, A., Frank, G.A., Sapiro, G., Milne, J.L.S., Subramaniam, S., 2012. Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation. *PLoS Pathog.* 8, e1002797. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002797>
- Trautz, B., Wiedemann, H., Luchtenborg, C., Pierini, V., Kranich, J., Glass, B., Kräusslich, H.-G., Brocker, T., Pizzato, M., Ruggieri, A., Brügger, B., Fackler, O.T., 2017. The host-cell restriction factor SERINC5 restricts HIV-1 infectivity without altering the lipid composition and organization of viral particles. *J. Biol. Chem.* 292, 13702–13713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797332>
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., Katinger, H., 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1100–1108.
- Usami, Y., Wu, Y., Göttlinger, H.G., 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526, 218–223. <https://doi.org/10.1038/nature15400>
- van de Kooij, B., Verbrugge, I., de Vries, E., Gijzen, M., Montserrat, V., Maas, C., Neefjes, J., Borst, J., 2013. Ubiquitination by the Membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) Ligase Controls Steady-state Cell Surface Expression of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Receptor 1. *J. Biol. Chem.* 288, 6617–6628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448209>
- van Gils, M.J., Bunnik, E.M., Boeser-Nunnink, B.D., Burger, J.A., Terlouw-Klein, M., Verwer, N., Schuitemaker, H., 2011. Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 85, 6986–6995. <https://doi.org/10.1128/JVI.00268-11>
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Neel, C., Lafay, B., Keele, B.F., Shaw, K.S., Takehisa, J., Kraus, M.H., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Yangda, B., Sharp, P.M., Mpoudi-Ngole, E., Delaporte, E., Hahn, B.H., Peeters, M., 2007. Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 368, 155–171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.018>
- Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., Charpentier, C., 2016. Hiv-2 molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 46, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.010>

- Vodicka, M.A., Goh, W.C., Wu, L.I., Rogel, M.E., Bartz, S.R., Schweickart, V.L., Raport, C.J., Emerman, M., 1997. Indicator cell lines for detection of primary strains of human and simian immunodeficiency viruses. *Virology* 233, 193–198. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8606>
- Walker, B.D., 2007. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top. HIV Med. Publ. Int. AIDS Soc. USA* 15, 134–136.
- Walker, L.M., Burton, D.R., 2018. Passive immunotherapy of viral infections: “super-antibodies” enter the fray. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 297–308. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.148>
- Walker, L.M., Huber, M., Doores, K.J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., Wang, S.-K., Ramos, A., Chan-Hui, P.-Y., Moyle, M., Mitcham, J.L., Hammond, P.W., Olsen, O.A., Phung, P., Fling, S., Wong, C.-H., Phogat, S., Wrin, T., Simek, M.D., Protocol G Principal Investigators, Koff, W.C., Wilson, I.A., Burton, D.R., Poignard, P., 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477, 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature10373>
- Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrin, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., Lehrman, J.K., Priddy, F.H., Olsen, O.A., Frey, S.M., Hammond, P.W., Protocol G Principal Investigators, Kaminsky, S., Zamb, T., Moyle, M., Koff, W.C., Poignard, P., Burton, D.R., 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326, 285–289. <https://doi.org/10.1126/science.1178746>
- Wang, J., Crawford, K., Yuan, M., Wang, H., Gorry, P.R., Gabuzda, D., 2002. Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines. *J. Infect. Dis.* 185, 885–897. <https://doi.org/10.1086/339522>
- Wang, Y., Pan, Q., Ding, S., Wang, Z., Yu, J., Finzi, A., Liu, S.-L., Liang, C., 2017. The V3 Loop of HIV-1 Env Determines Viral Susceptibility to IFITM3 Impairment of Viral Infectivity. *J. Virol.* 91, e02441-16, e02441-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02441-16>
- Warren, K., Wei, T., Li, D., Qin, F., Warrilow, D., Lin, M.-H., Sivakumaran, H., Apolloni, A., Abbott, C.M., Jones, A., Anderson, J.L., Harrich, D., 2012. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9587–9592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204673109>
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D., Shaw, G.M., 2003a. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312. <https://doi.org/10.1038/nature01470>
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D., Shaw, G.M., 2003b. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312. <https://doi.org/10.1038/nature01470>
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426–430. <https://doi.org/10.1038/387426a0>
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., Doms, R.W., 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Willey, R.L., Rutledge, R.A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C.E., Martin, M.A., 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5038–5042. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.14.5038>
- Williams, D.E.J., Wu, W.-L., Grotefend, C.R., Radic, V., Chung, C., Chung, Y.-H., Farzan, M., Huang, I.-C., 2014. IFITM3 polymorphism rs12252-C restricts influenza A viruses. *PLoS One* 9, e110096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110096>
- Wrensch, F., Winkler, M., Pöhlmann, S., 2014. IFITM proteins inhibit entry driven by the MERS-coronavirus spike protein: evidence for cholesterol-independent mechanisms. *Viruses* 6, 3683–3698. <https://doi.org/10.3390/v6093683>
- Wu, X., Yang, Z.-Y., Li, Y., Hogerkerp, C.-M., Schief, W.R., Seaman, M.S., Zhou, T., Schmidt, S.D., Wu, L., Xu, L., Longo, N.S., McKee, K., O’Dell, S., Louder, M.K., Wycuff, D.L., Feng, Y., Nason, M., Doria-Rose, N., Connors, M., Kwong, P.D., Roederer, M., Wyatt, R.T., Nabel, G.J., Mascola, J.R., 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329, 856–861. <https://doi.org/10.1126/science.1187659>

- Wu, X., Zhou, T., Zhu, J., Zhang, B., Georgiev, I., Wang, C., Chen, X., Longo, N.S., Louder, M., McKee, K., O'Dell, S., Perfetto, S., Schmidt, S.D., Shi, W., Wu, L., Yang, Y., Yang, Z.-Y., Yang, Z., Zhang, Z., Bonsignori, M., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E., Haynes, B.F., Simek, M., Burton, D.R., Koff, W.C., Doria-Rose, N.A., Connors, M., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin, J.C., Nabel, G.J., Roederer, M., Shapiro, L., Kwong, P.D., Mascola, J.R., 2011. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333, 1593–1602. <https://doi.org/10.1126/science.1207532>
- Xu-Yang, Z., Pei-Yu, B., Chuan-Tao, Y., Wei, Y., Hong-Wei, M., Kang, T., Chun-Mei, Z., Ying-Feng, L., Xin, W., Ping-Zhong, W., Chang-Xing, H., Xue-Fan, B., Ying, Z., Zhan-Sheng, J., 2016. Interferon-Induced Transmembrane Protein 3 Inhibits Hantaan Virus Infection, and Its Single Nucleotide Polymorphism rs12252 Influences the Severity of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Front. Immunol.* 7, 535. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00535>
- Yamada, E., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Misawa, N., Koyanagi, Y., Sato, K., 2015. Impacts of Humanized Mouse Models on the Investigation of HIV-1 Infection: Illuminating the Roles of Viral Accessory Proteins in Vivo. *Viruses* 7, 1373–1390. <https://doi.org/10.3390/v7031373>
- Yang, S.-T., Kiessling, V., Simmons, J.A., White, J.M., Tamm, L.K., 2015. HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. *Nat. Chem. Biol.* 11, 424–431. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1800>
- Yolitz, J., Schwing, C., Chang, J., Van Ryk, D., Nawaz, F., Wei, D., Cicala, C., Arthos, J., Fauci, A.S., 2018. Signal peptide of HIV envelope protein impacts glycosylation and antigenicity of gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2443–2448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722627115>
- Yount, J.S., Charron, G., Hang, H.C., 2012a. Bioorthogonal proteomics of 15-hexadecynyloxyacetic acid chemical reporter reveals preferential targeting of fatty acid modified proteins and biosynthetic enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.062>
- Yount, J.S., Karssemeijer, R.A., Hang, H.C., 2012b. S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *J. Biol. Chem.* 287, 19631–19641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362095>
- Yount, J.S., Moltedo, B., Yang, Y.-Y., Charron, G., Moran, T.M., López, C.B., Hang, H.C., 2010. Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat. Chem. Biol.* 6, 610–614. <https://doi.org/10.1038/nchembio.405>
- Yount, J.S., Zhang, M.M., Hang, H.C., 2013. Emerging roles for protein S-palmitoylation in immunity from chemical proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.008>
- Yu, J., Li, M., Wilkins, J., Ding, S., Swartz, T.H., Esposito, A.M., Zheng, Y.-M., Freed, E.O., Liang, C., Chen, B.K., Liu, S.-L., 2015. IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell Rep.* 13, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.055>
- Yu, J., Liu, S.-L., 2018a. The Inhibition of HIV-1 Entry Imposed by Interferon Inducible Transmembrane Proteins Is Independent of Co-Receptor Usage. *Viruses* 10, 413. <https://doi.org/10.3390/v10080413>
- Yu, J., Liu, S.-L., 2018b. The Inhibition of HIV-1 Entry Imposed by Interferon Inducible Transmembrane Proteins Is Independent of Co-Receptor Usage. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10080413>
- Yuan, M., Cottrell, C.A., Ozorowski, G., van Gils, M.J., Kumar, S., Wu, N.C., Sarkar, A., Torres, J.L., de Val, N., Copps, J., Moore, J.P., Sanders, R.W., Ward, A.B., Wilson, I.A., 2019. Conformational Plasticity in the HIV-1 Fusion Peptide Facilitates Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies. *Cell Host Microbe* 25, 873–883.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.011>
- Zani, A., Yount, J.S., 2018. Antiviral Protection by IFITM3 In Vivo. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 5, 229–237. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0103-0>
- Zhang, X., Shi, J., Qiu, X., Chai, Q., Frabutt, D.A., Schwartz, R.C., Zheng, Y.-H., 2019. CD4 Expression and Env Conformation Are Critical for HIV-1 Restriction by SERINC5. *J. Virol.* 93, e00544-19, [/jvi/93/14/JVI.00544-19.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.00544-19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00544-19>
- Zhang, Y., Lu, J., Liu, X., 2018. MARCH2 is upregulated in HIV-1 infection and inhibits HIV-1 production through envelope protein translocation or degradation. *Virology* 518, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.02.003>
- Zhang, Y., Makvandi-Nejad, S., Qin, L., Zhao, Y., Zhang, T., Wang, L., Repapi, E., Taylor, S., McMichael, A., Li, N., Dong, T., Wu, H., 2015. Interferon-induced transmembrane protein-3 rs12252-C is associated

- with rapid progression of acute HIV-1 infection in Chinese MSM cohort. *AIDS Lond. Engl.* 29, 889–894. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000632>
- Zhang, Y., Qin, L., Zhao, Y., Zhang, P., Xu, B., Li, K., Liang, L., Zhang, C., Dai, Y., Feng, Y., Sun, J., Hu, Z., Xiang, H., Knight, J.C., Dong, T., Jin, R., 2020. Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with disease severity in COVID-19. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa224>
- Zhang, Y., Tada, T., Ozono, S., Yao, W., Tanaka, M., Yamaoka, S., Kishigami, S., Fujita, H., Tokunaga, K., 2019. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 1 and 2 are MARCH family members that inhibit HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 294, 3397–3405. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.005907>
- Zhou, H.-Z., Xu, H.-F., Xin, X.-M., Guan, X.-R., Zhou, J., 2011. Position 22 of the V3 loop is associated with co-receptor usage and disease progression in HIV-1 subtype B isolates. *Curr. HIV Res.* 9, 636–641. <https://doi.org/10.2174/157016211798998727>
- Zhou, T., Frabutt, D.A., Moremen, K.W., Zheng, Y.-H., 2015. ERManI (Endoplasmic Reticulum Class I α -Mannosidase) Is Required for HIV-1 Envelope Glycoprotein Degradation via Endoplasmic Reticulum-associated Protein Degradation Pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 22184–22192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.675207>
- Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y.D., Scheid, J.F., Shi, W., Xu, L., Yang, Y., Zhu, J., Nussenzweig, M.C., Sodroski, J., Shapiro, L., Nabel, G.J., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2010. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329, 811–817. <https://doi.org/10.1126/science.1192819>
- Zhou, T., Zhu, J., Wu, X., Moquin, S., Zhang, B., Acharya, P., Georgiev, I.S., Altae-Tran, H.R., Chuang, G.-Y., Joyce, M.G., Kwon, Y.D., Longo, N.S., Louder, M.K., Luongo, T., McKee, K., Schramm, C.A., Skinner, J., Yang, Y., Yang, Z., Zhang, Z., Zheng, A., Bonsignori, M., Haynes, B.F., Scheid, J.F., Nussenzweig, M.C., Simek, M., Burton, D.R., Koff, W.C., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin, J.C., Connors, M., Shapiro, L., Nabel, G.J., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2013. Multidonor analysis reveals structural elements, genetic determinants, and maturation pathway for HIV-1 neutralization by VRC01-class antibodies. *Immunity* 39, 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.012>
- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A., Roux, K.H., 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634931100>
- Zhu, X., He, Z., Yuan, J., Wen, W., Huang, X., Hu, Y., Lin, C., Pan, J., Li, R., Deng, H., Liao, S., Zhou, R., Wu, J., Li, J., Li, M., 2015. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell. Microbiol.* 17, 105–118. <https://doi.org/10.1111/cmi.12339>
- Zhuang, J., Jetzt, A.E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., Preston, B.D., Dougherty, J.P., 2002. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J. Virol.* 76, 11273–11282. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002>
- Zolla-Pazner, S., 2004. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 199–210. <https://doi.org/10.1038/nri1307>
- Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R., Parren, P.W., 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75, 10892–10905. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10892-10905.2001>

ANNEXE 1

Escape of HIV-1 envelope glycoprotein from the restriction of infection by IFITM3

Running title: HIV-1 Env escape from IFITM3

Aurélie Drouin^a, Julie Migraine^a, Marie-Alice Durand^a, Alain Moreau^a, Julien Burlaud-Gaillard^{a,b},
Maxime Beretta^{a,Δ}, Philippe Roingeard^{a,b}, Mélanie Bouvin-Pley^a and Martine Braibant^a

Manuscrit soumis au *Journal of Virology*

Escape of HIV-1 envelope glycoprotein from the restriction of infection by IFITM3

Running title: HIV-1 Env escape from IFITM3

Aurélie Drouin^a, Julie Migraine^a, Marie-Alice Durand^a, Alain Moreau^a, Julien Burlaud-Gaillard^{a,b},
Maxime Beretta^{a,Δ}, Philippe Roingeard^{a,b}, Mélanie Bouvin-Pley^a and Martine Braibant^a

^a Université de Tours et CHRU de Tours, Inserm U1259, Tours, France;

^b Université de Tours et CHRU de Tours, Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique, Tours,
France

^Δ Present address: Institut Pasteur, Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology,
Paris, France

[#] Corresponding author: braibant@med.univ-tours.fr

Summary word count: 137

SUMMARY

Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) is a cellular factor that reduces HIV-1 infectivity by an incompletely understood mechanism. This study aimed to elucidate the role of the HIV-1 envelope glycoprotein (Env) in determining viral susceptibility to IFITM3. We found that viruses differing only in the Env expressed on their surface had different sensitivities to IFITM3. By comparing the Env proteins of viruses that were highly sensitive or resistant to IFITM3, we obtained new insight in the mechanisms by which HIV-1 escapes this protein. We showed that IFITM3 interacts with the Env of sensitive viruses in virion-producing cells, inducing conformational changes that may decrease viral infectivity. However, this antiviral action is modulated by the nature of the Env, particularly the V1V2 and V3 loops, which may be able to escape this interaction after processing in the Golgi apparatus.

INTRODUCTION

The interferon-induced transmembrane (IFITM) proteins are a family of highly related proteins with two hydrophobic membrane domains connected by a conserved intracellular loop, and variable N- and C-terminal domains. In humans, this family contains five expressed proteins, three of which (IFITM1, IFITM2 and IFITM3) are strongly upregulated by type I interferons and have been shown to inhibit diverse viruses, including influenza A virus (1,2), hepatitis C virus (3), Ebola virus (4,5), SARS coronavirus (4), MERS coronavirus (6), dengue virus (1,7), Zika virus (8), Marburg virus (4), West Nile virus (1,7), Rift Valley fever virus (9), Hantaan virus (9,10) and HIV-1 (11-13) (reviewed in 14 and 15).

In the case of HIV-1, IFITM proteins have been shown to target the viral life cycle at three different steps. The first antiviral mechanism of IFITM proteins to be described occurs in the target cells, where IFITM proteins act as a barrier against viral invasion by inhibiting viral fusion at the plasma or endosomal membranes of the cell (11, 16-22). IFITM proteins are thought to mediate changes in the physical properties of host cell membranes, but the mechanism involved remains a matter of debate (6, 19, 23, 24). It has been suggested that IFITM proteins prevent HIV-1 entry into cells by a mechanisms dependent on virus coreceptor use and, thus, on the nature of the viral envelope glycoprotein (Env), with CCR5-tropic (R5) strains more sensitive to IFITM1 and CXCR4-tropic (X4) strains more sensitive to IFITM2 and IFITM3 (20).

The second antiviral mechanism involving IFITMs occurs in virus-producing cells. In these cells, IFITMs, particularly IFITM3, have been shown to colocalize with the structural proteins of developing virions, resulting in their incorporation into the nascent viral particles, leading to a decrease in the infectivity of these particles in target cells (12,13). This mechanism, initially described for HIV-1, has since been extended to other viruses (25). It remains unclear whether the decrease in the infectivity of nascent viruses is due to the physical incorporation of IFITM proteins into viral particles or to a specific action of IFITM proteins in virion-producing cells during late events in the HIV-1 life cycle. The second of these hypotheses was supported by results from a study

reporting that interactions between IFITM3 and Env in virus-producing cells inhibited the proteolytic cleavage of the gp160 Env precursor, thereby decreasing the amount of mature gp120/gp41 Env incorporated in virions (26). A second study reported that the defective proteolytic processing of Env was due to an IFITM3-driven rerouting of Env trafficking to the lysosomes for degradation (27). However, the processing defect of Env remains a matter of debate, as other studies observed no change in the amount of Env incorporated into virions following the overproduction of IFITM proteins (13, 20, 25, 28). Nevertheless, several HIV-1 strains appear to be refractory to IFITM3-mediated inhibition despite its incorporation into viral particles, and this resistance phenotype has been reported to be determined by Env, particularly by the V3 loop of the gp120 surface subunit (29). Thus, Env appears to be an important determinant of sensitivity to IFITM3, but the way in which IFITM3 affects the functional properties of Env remains poorly understood.

Finally, a third antiviral mechanism by which IFITM proteins may restrict viral infection was recently discovered (30). IFITM proteins can inhibit HIV-1 protein synthesis by preferentially excluding viral mRNA transcripts from polysomes. Interestingly, the viral accessory protein Nef helps to overcome this restriction.

In this study, we investigated the disruption of Env function by IFITM3 further. We evaluated the impact of IFITM3 in virus-producing cells on the infectivity of HIV-1-pseudotyped viruses carrying various Env proteins derived from primary isolates or laboratory strains. We found that IFITM3 interacted with Env, causing conformational changes that might decrease viral infectivity. However, this antiviral action was governed by the nature of the Env protein, particularly by its V1V2 and V3 regions, which may be able to escape this interaction after maturation in the Golgi.

RESULTS

The sensitivity of Env-pseudotyped viruses to IFITM3 is dependent on Env

We selected a panel of 11 X4, R5 and X4R5 Env clones from previous studies (31,32). This selection included two Env clones from the laboratory strains NL4-3 (X4) and AD8 (R5) and nine Env clones (7 X5 and 2 X4R5) derived from primary isolates obtained from individuals with acute or chronic

HIV-1 clade B infections (Table S1). Env-pseudotyped viruses expressing full-length Env clones were produced as previously described, by transfecting HEK293T cells with an *env*-deleted NL4-3 backbone plasmid (pNL4.3.LUC.R-E-) and an *env* expression vector (pCI-*env*) (31). We determined sensitivity to IFITM3-mediated inhibition in conditions in which this protein was present in virus-producing cells and incorporated into viral particles, by ectopically overproducing this protein in HEK293T cells through cotransfection with a third plasmid encoding a Flag-tagged IFITM3 protein (pcDNA-*ifitm3*-Flag).

The protein content of Env-pseudotyped viruses produced in the presence or absence of IFITM3 was evaluated by western blotting after purification of viral supernatants of transfected HEK293T cells by centrifugation through a sucrose cushion (see Figure 1A). When IFITM3 was present in virus-producing cells, it was detected in the viral particles released, regardless of the Env clone used for pseudotyping, albeit at variable levels. The levels of gp160 Env precursor and gp120/gp41 mature Env subunit varied considerably between viruses, but no major change was observed on IFITM3 expression (Figure 1A).

We compared the capacity of each Env-pseudotyped virus produced in the presence or absence of IFITM3 to infect TZM-bl target cells (HeLa CD4⁺ CCR5⁺ CXCR4⁺) in a single round of infection. Viral inputs were normalized according to reverse transcriptase (RT) activity and infectivity was evaluated 48 h post-infection by measuring luciferase activity (RLU). IFITM3 decreased the infectivity of seven Env-pseudotyped viruses (35c1, 34c2, 23c4, 248-5, NL4-3, 11c6 and 249N3) to 19% to 62% of the level of infectivity of control viruses produced in the absence of IFITM3. By contrast, IFITM3 did not affect the infectivity of the other four viruses (2c4, 13c6, AD8 and 249V4), which had infectivities similar to or higher than those of control viruses in the absence of IFITM3 (Figure 1B). The variability of IFITM3 incorporation into viruses was quantified by densitometry and was not correlated with the inhibition of viral infectivity by IFITM3 (Figure 1C). This finding suggests that the IFITM3 resistance/sensitivity of viruses was determined by the nature of the Env protein. However, no link could be found between this phenotype and the tropism of Env clones.

IFITM3 incorporation into viral particles increases their sensitivity to several neutralizing antibodies

We explored the mechanism by which IFITM3 exerts its antiviral activity, by measuring the effect of this protein on the sensitivity of viral particles to a panel of well-characterized human monoclonal broadly neutralizing antibodies (HuMobNAbs) targeting functional regions of Env, such as the V1V2-glycan epitope, the V3-glycan epitope, the CD4 binding site of gp120, the membrane proximal external region (MPER) of gp41 and the gp120/gp41 interface. We found that IFITM3 incorporation sensitized pseudotyped viruses to the inhibitory action of most HuMobNAbs, resulting in a statistically significant decrease in half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for seven of these antibodies (Figure 2). The antibodies for which sensitivity increased included PG9 and PG16, which target the V1V2-glycan epitope (Figure 2A and 2B) (33, 34), PGT128 and 10-1074 directed against the V3-glycan epitope (Figure 2D and 2E) (34, 35), 2F5 and 4E10 targeting MPER (Figure 2G and 2H) (37-41) and 35O22 directed against the gp120/gp41 interface (Figure 2K) (43). This effect concerned most of the epitopes tested, suggesting an effect of IFITM3 on the conformation of Env.

IFITM3-sensitive viruses are more sensitized to the inhibitory action of PG16 than IFITM3-resistant viruses, in the presence of IFITM3

We investigated the properties differentiating IFITM3-sensitive from IFITM3-resistant viruses, by determining whether the increase in sensitivity to neutralizing antibodies observed in the presence of IFITM3 was linked to viral sensitivity to IFITM3. The only difference found between IFITM3-sensitive and resistant viruses concerned the broadly neutralizing antibody (bNAb) PG16. In the presence of IFITM3, IFITM3-sensitive viruses were more sensitized to this bNAb than IFITM3-resistant viruses. A statistically significant correlation was found between the sensitivity of the pseudotyped viruses to IFITM3 and the increase in the sensitivity of these viruses to PG16 (Figure 3), suggesting that IFITM3 promoted exposure of the glycan-V1V2 epitope in IFITM3-sensitive viruses.

The V1V2 and V3 loops of Env determine viral sensitivity to IFITM3

We investigated the possible role of the V1V2 loop of Env targeted by PG16 in modulating the sensitivity of Env-pseudotyped viruses to IFITM3, by generating chimeric Env proteins, in which the V1V2 loops of Env proteins from IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant viruses were exchanged. We replaced the V1V2 loop of the IFITM3-resistant AD8 Env-pseudotyped virus with that of the sensitive NL4-3, 249N3 or 11c6 virus (Figure 4A). The resulting chimeric Env-pseudotyped viruses were highly sensitive to IFITM3, which decreased their relative infectivity from 88% to 13% for AD8-V1V2(NL4-3), 7% for AD8-V1V2(249N3) and 12 % for AD8-V1V2(11c6) (Figure 4B). Conversely, the NL4-3 Env, conferring sensitivity to IFITM3, was modified to incorporate the V1V2 loop of resistant AD8, 2c4 or 249V4 viruses, but, unfortunately, the viruses containing these substitutions were non-infectious (data not shown). We therefore replaced the NL4-3 Env backbone with that of the 249N3 Env, to generate infectious chimeric Env-pseudotyped viruses (Figure 4A). However, the impact of the change differed considerably between the three V1V2 loops, with an increase in relative infectivity from 19% to 105% for 249N3-V1V2(AD8) but to only 33% for 249N3-V1V2(249V4), and with a moderate decrease, to 8%, observed for 249N3-V1V2(2c4) (Figure 4C). These results suggested a possible role for other determinants, depending on the context of the Env clone considered.

We hypothesized that the V3 loop of Env might play a role complementary to that of V1V2 in determining the sensitivity of viruses to IFITM3, for several reasons. The V3 loop is located close to the V1V2 domain, at the apex of the Env trimer (44,45), and certain V3 loop substitutions have been shown to significantly increase viral resistance to PG16 (33). In addition, the V3 loop was recently reported to be a major determinant of the modulation, by Env, of the sensitivity of the NL4-3 laboratory strain to IFITM3 (29). We addressed this question by generating chimeric Env proteins in which the V3 loops of IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant viruses were exchanged. We replaced the V3 loop of the resistant AD8 Env-pseudotyped virus with that of the sensitive NL4-3, 249N3 or 11c6 viruses (Figure 4A). The NL4-3 V3 loop substitution resulted in a non-infectious virus. We

therefore evaluated the impact of the 249N3 and 11c6 substitutions only. Both viruses were more sensitive to IFITM3 than the parental AD8 virus, with a decrease in relative infectivity from 88% to 41% for both AD8-V3(11c6) and AD8-V3(249N3) (Figure 4D). Conversely, the NL4-3 Env conferring viral sensitivity to IFITM3 was modified to contain the V3 loop of the resistant AD8, 2c4 or 249V4 viruses (Figure 4A). The AD8 V3 loop increased the resistance of the NL4-3 virus to that of the AD8 virus, as previously reported (29), with an increase in relative infectivity from 30% to 118% for NL4-3-V3(AD8), whereas the 2c4 and 249V4 V3 loops had a much more moderate impact on the sensitivity of the NL4-3 virus, increasing relative infectivity to only 60% for NL4-3-V3(2c4) and 51% for NL4-3-V3(249V4) (Figure 4E). Together, these data indicate that both the V1V2 and V3 loops are important determinants of the modulation of viral sensitivity to IFITM3 by Env.

We then combined substitutions of V1V2 and V3 loops, based on the hypothesis that the partial impact observed for certain Env proteins during the independent replacement of these loops might be increased by replacing both loops simultaneously. We therefore replaced the V1V2 and V3 loops of AD8 with those of NL4-3, 249N3 or 11c6, and, conversely, the V1V2 and V3 loops of NL4-3 with those of AD8, 2c4 or 249V4. For the three combined substitutions in AD8, relative infectivity decreased considerably, from 88% to levels similar to those in the parental sensitive viruses: 23% for AD8-V1V2V3(NL4-3), 25% for AD8-V1V2V3(249N3) and 35% for AD8-V1V2V3(11c6) (Figure 4F). Similarly, two of the three combined substitutions in NL4-3 increased the resistance of the NL4-3 virus from 30% to levels similar to those in parental resistant viruses: 120% for NL4-3-V1V2V3(AD8) and 87% for NL4-3-V1V2V3(249V4) (Figure 4G). However, the last substitution in NL4-3, involving the V1V2 and V3 loops of 2c4, had a modest, statistically non-significant, impact on the sensitivity to IFITM3 of NL4-3, suggesting that the resistance of 2c4 involves other determinants. Together, these data confirmed that the V1V2 and V3 domains have complementary effects on the modulation of viral sensitivity to IFITM3. This is highlighted, particularly, by the V1V2 and V3 domains of the 249V4 virus resistant to IFITM3 which increased the resistance of a sensitive virus only moderately when introduced separately, but to a much greater extent, reaching

levels similar to those in the parental 249V4 virus, when introduced together. However, close inspections of the amino-acid sequences of the V1V2 and V3 loops did not identify specific sequence signatures that could be used to distinguish between IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant viruses. The numbers of both potential N-glycosylation sites and of charged residues were similar in the two groups (Figure 4A).

We extended our analysis of the correlation between viral sensitivity to IFITM3 and the increase in sensitivity to PG16 to the chimeric viruses, by assessing the sensitivity of all these viruses to PG16 in the presence and absence of IFITM3. After discarding two constructs highly resistant to PG16 (IC_{50} above the highest concentration of PG16 used), the analysis, confirmed that the incorporation of IFITM3 into the viral particle sensitized the virus to the inhibitory action PG16, with decreases in the IC_{50} of PG16 correlated with sensitivity to IFITM3 (Figure 5).

Finally, we addressed the question of a putative link between the IFITM3 sensitivity phenotype of viruses and their tropism, by determining the coreceptor use of chimeric Env-pseudotyped viruses by measuring their ability to infect $CD4^+$ U373 MAGI cells expressing either the CXCR4 or CCR5 coreceptor. However, as with the parental viruses, we found no link between IFITM3 sensitivity phenotype and the tropism of chimeric Env proteins (Figure 4B to 4G).

IFITM3 interacts with the gp120 surface subunit of IFITM3-sensitive viruses

Previous studies have reported the existence of a physical interaction between Env and IFITM3 in virion-producing cells (26). We sought to confirm the existence of this interaction and to explore whether differences in interactions could be observed between IFITM3-resistant and IFITM3-sensitive viruses, with three IFITM3-resistant Env proteins (AD8, 2c4 and 249V4) and three IFITM3-sensitive Env proteins (NL4-3, 11c6 and 249N3). HEK293T cells were cotransfected as described above with the pNL4.3.LUC.R-E- vector and each pCI-*env* in the presence or absence of IFITM3 (pcDNA-*ifitm3*-Flag or empty pcDNA). Cell lysates were obtained 32 hours after transfection and used for western blots to evaluate the production and processing of Env and the production of IFITM3 (Figure 6A). As observed in viral particles, IFITM3 expression levels varied

slightly across experiments in cells transfected with pCDNA-*ifitm3*-Flag. However, IFITM3 levels had no significant effect on the production and processing of Env. Cells lysates were then subjected to immunoprecipitation with an anti-gp120 serum or with an anti-Flag antibody, and the immunoprecipitated proteins were subjected to western blotting (Figure 6B). We found that, regardless of the Env tested, the anti-gp120 serum precipitated gp120 and its precursor gp160, and co-immunoprecipitated IFITM3. By contrast, when immunoprecipitation was performed with the anti-Flag antibody, differences were observed between IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant Env proteins. For IFITM3-resistant Env proteins, only the gp160 precursor was co-immunoprecipitated with IFITM3, whereas, for IFITM3-sensitive Env proteins, both the gp160 precursor and the gp120 mature subunit were co-immunoprecipitated. This suggests that, for IFITM3-resistant Env proteins, the interaction between Env and IFITM3 in virus-producing cells may be impaired following the processing of Env in the Golgi apparatus.

To support this hypothesis, we used confocal immunofluorescence microscopy to track the colocalization of IFITM3 and Env in cells producing two IFITM3-resistant viruses (AD8 and 249V4) and two IFITM3-sensitive viruses (NL4-3 and 249N3). HEK293T cells were transfected with each pCI-*env*, the pNL4-3Δ*env.luc* vector and the pCDNA vector containing the *ifitm3* gene. Thirty-two hours post-transfection, the cells were labeled with an anti-IFITM3 antibody, an anti-Env antibody and an antibody targeting the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus or the plasma membrane. Antibody binding was detected by incubation with secondary antibodies conjugated to different fluorochromes: AlexaFluor 488 (green) for the IFITM3 protein, AlexaFluor 594 (red) for Env and AlexaFluor 647 (purple) for cellular compartments. In each set of conditions, we obtained about 30 z-stack acquisitions, from which Imaris software calculated the mean Pearson's colocalization coefficient. We observed strong colocalization of Env and IFITM3 in the endoplasmic reticulum (Figure 7A) and Golgi apparatus (Figure 7B), regardless of the Env protein studied. An analysis of Pearson colocalization coefficients showed no major difference in the degree of Env-IFITM3 colocalization in these two compartments, except for the IFITM3-resistant 249V4 virus, which

displayed higher levels of colocalization than the IFITM3-sensitive 249N3 virus in the Golgi apparatus, although colocalization remained strong even for the sensitive virus (Figure 7D and 7E). Interestingly, a major difference in Env-IFITM3 colocalization was observed at the plasma membrane, where strong Env-IFITM3 colocalization was observed for the two IFITM3-sensitive viruses (NL4-3 and 249N3) but very weak colocalization was observed for the two resistant viruses (AD8 and 249V4) (Figure 7C). This observation was confirmed by a comparison of mean Pearson's colocalization coefficients: 0.64 and 0.60 for NL4-3 and 249N3, respectively, but only 0.38 and 0.36 for AD8 and 249V4, respectively (Figure 7F). Together, these results suggest that IFITM3 interacts with IFITM3-sensitive Env proteins from their synthesis in the endoplasmic reticulum, and during their transport to the Golgi complex, right up to their arrival on the plasma membrane at viral particle assembly sites, whereas the interaction between IFITM3 and resistant Env proteins is impaired or less frequent after Env processing in the Golgi apparatus.

DISCUSSION

Several reports have suggested that Env may be an important determinant of the sensitivity of HIV-1 to IFITM3. However, it remains unclear how IFITM3 affects the functionality of Env. We addressed this question here, by comparing Env-pseudotyped viruses with different sensitivities to IFITM3 incorporation into the virion. Using viruses differing solely in terms of the Env clone expressed at their surface, we showed that the nature of the Env protein determined viral sensitivity to IFITM3, independently of the level of IFITM3 incorporation into virions. Previous studies have highlighted the broad spectrum of viruses targeted by IFITM proteins, suggesting that IFITM proteins act by altering the fusogenic properties of cellular or viral membranes through a non-specific generic mechanism. However, the protection provided by specific Env proteins suggests that, in HIV, this mechanism may be overcome or may be insufficient to prevent infection. Consistent with some (13,20,25,28), but not all (26,27) previous reports, we detected no major differences in Env levels or process between virions that did and did not contain IFITM3. We therefore investigated possible changes to the conformation of Env. Using neutralizing antibodies targeting various conformational

epitopes, we found that, regardless of their sensitivity to IFITM3, Env-pseudotyped viruses had a moderately higher sensitivity to most of these antibodies in the presence of IFITM3. This result may reflect subtle changes to the conformation of Env, possibly induced by changes in the physical properties of membranes, as previously suggested (23). However, despite these changes, some Env-pseudotyped viruses were resistant to the IFITM3-mediated inhibition of infection. Interestingly, the increase in viral sensitivity to one of these antibodies, PG16, could be used to differentiate between IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant viruses, as viruses sensitive to IFITM3 displayed a greater increase in sensitivity to this antibody in the presence of IFITM3. This finding suggests that IFITM3 may promote the exposure of the N-glycan V1V2 epitope targeted by PG16 at the surface of viruses sensitive to IFITM3. By constructing chimeric Env proteins, we showed that the V1V2 loop encompassing the PG16 epitope and the V3 loop were important molecular determinants of viral sensitivity to IFITM3, and sensitization to PG16. These data confirm previous studies identifying the V3 loop as one of the determinants of viral sensitivity to the inhibition of infection by IFITM3 (29). The complementary role of these two highly glycosylated regions is not surprising, given that the assembly of gp120 subunits into trimers involve interactions at the apex between the V1V2 and V3 loops (44,45), and this organization exposes several basic residues at the trimer apex that serve as important targets for PG16 (45). V3 determines the choice of coreceptor, CCR5 or CXCR4, but no direct link was found between viral coreceptor use and sensitivity to IFITM3, with a wide range of sensitivities observed in both R5 and dual-tropic X4R5 viruses. However, given the conflicting reports concerning this point (20, 29, 46), a study including a larger panel of X4 coreceptor-using viruses is required to determine whether sensitivity to IFITM3 is affected by viral coreceptor use.

We hypothesized that the exposure of the PG16 epitope of IFITM3-sensitive viruses might be favored by a specific interaction between IFITM3 and the mature trimer. The existence of a physical interaction between Env and IFITM3 has been reported in virion-producing cells (26). We therefore explored whether this interaction differed between IFITM3-resistant and IFITM3-sensitive viruses. In co-immunoprecipitation experiments on virion-producing cells, we found that IFITM3 interacted

with both the precursor and mature forms of Env of IFITM3-sensitive viruses, but with only the precursor form of IFITM3-resistant viruses. These results were confirmed by tracking the colocalization of IFITM3 and Env in virion-producing cells. We observed a colocalization of IFITM3 with Env proteins from sensitive viruses, from the synthesis of these proteins in the endoplasmic reticulum, and during their trafficking through the Golgi complex, right up to their arrival at the plasma membrane. By contrast, the colocalization of IFITM3 and Env proteins from IFITM3-resistant viruses decreased after the passage of Env through the Golgi apparatus.

Together, these findings suggest that IFITM3 interacts with the mature Env trimer of IFITM3-sensitive viruses, stabilizing a conformational state of the trimer in which the PG16 epitope is exposed, thereby preventing the conformational changes required for receptor or coreceptor engagement and fusion between the viral and cell membranes. By contrast, the posttranslational modifications undergone by the Env trimer of viruses resistant to IFITM3 would block the access of IFITM3 to its binding site, rendering the Env trimer functional. The access of IFITM3 to its binding site on the Env trimer could be modulated by the nature of the V1V2 and V3 loops, known to undergo important post-translational modifications. However, given the high diversity of Env sequences, a close inspection of the amino-acid sequences of the V1V2 and V3 loops did not reveal specific sequence signatures distinguishing between IFITM3-sensitive and IFITM3-resistant viruses. Several different changes in these regions may, therefore, be involved. The localization of the IFITM3 binding site on the Env trimer has yet to be determined. It may be present in conserved regions within the V1V2 and/or V3 loops, but in this case, as IFITM3 sensitizes viruses to the inhibitory action of PG16, the binding of IFITM3 cannot impede the binding of PG16. IFITM3 binding therefore probably occurs outside of the V1V2 and V3 loops, but the access of IFITM3 to the binding site may be regulated by these highly glycosylated domains, as previously reported for the access of some neutralizing antibodies to epitopes (47).

In conclusion, the data presented here highlight the important role of Env in modulating the sensitivity of HIV-1 to the inhibition of infection by IFITM3. They provide new information about the mechanism by which Env may escape this restriction factor.

MATERIALS AND METHODS

Production of Env-pseudotyped viruses

Env-pseudotyped viruses were produced by cotransfecting 5×10^6 HEK293T cells with 4 μ g of one of the various pCI-*env*, 8 μ g of pNL4.3 Δ *env.luc* (48) and either 1 μ g of empty pcDNA (control virus) or 1 μ g of pcDNA-*ifitm3*-Flag in the presence of FuGene-6 transfection reagent (Promega). The viruses present in the supernatants of the cells were quantified after 72 h of culture, by assessing reverse transcriptase activity with an assay kit (Roche). They were harvested, purified by filtration (filter with 0.45 μ m pores) and stored as aliquots at -80°C. For the analysis of viral protein content, the supernatants of 293T cell cultures were overlaid on a 20% sucrose cushion, and centrifuged at 87,000 x g for 1.5 h at 4°C. The viral pellets obtained were solubilized by overnight incubation at 4°C in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail. The resulting suspension was then subjected to western blotting.

Viral infectivity

We assessed the infectivity of Env-pseudotyped viruses produced in the presence or absence of IFITM3 in quadruplicate, by infecting 1×10^4 TZM-bl target cells. Viral inputs were normalized on the basis of reverse transcriptase activity, and infectivity was evaluated 48 h after infection, by measuring the luciferase activity (RLU) of cell lysates in Bright-Glo luciferase assays (Promega) with a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies).

Determination of coreceptor usage

Coreceptor usage was determined using U373 MAGI cells stably expressing CD4 and either CCR5 (CD4/U373/CCR5) or CXCR4 (CD4/U373/CXCR4). Each well of a 96-well plate was seeded with an aliquot of 1.5×10^4 cells the day before infection. Cells were infected with 25 μ l of pseudotyped virus corresponding to an amount normalized according to reverse transcriptase activity (1000 ng),

for 2 h at 37°C. We then added 175 µl DMEM supplemented with 20 µg/ml DEAE-dextran and 5% FBS; 48 h after infection, luciferase activity was measured and viral tropism determined.

Neutralization assay

The sensitivity of Env-pseudotyped viruses to neutralization was assessed in TZM-bl cells with the HuMobNAbs PG9, PG16, PGT145, PGT128, 10-1074, 3BNC117, 2F5, 4E10, 10E8, 8ANC195 and 35O22 (NIH AIDS Reagent Program), as previously described (31,32).

Construction of chimeric *env* genes with V1V2 and/or V3 exchanges

Chimeric *env* genes were constructed by exchanging the regions of *env* genes encoding V1V2 and/or the V3 loops conferring viral sensitivity (NL4-3, 11c6, 249N3) or resistance (AD8, 2c4, 249V4) to IFITM3. We first amplified pCI-*env*ΔV1V2 or pCI-*env*ΔV3 and V1V2 or V3 sequences by PCR with overlapping primers and Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, USA). We checked, by electrophoresis in agarose gels, that the amplified fragments were the correct size. We then treated the PCR products with the restriction endonuclease *DpnI*, to digest the methylated parental DNA, and assembled them with the Gibson assembly cloning kit, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, USA). We checked that the sequence of the *env* constructs was correct, by Sanger sequencing.

Immunoprecipitation assay

We investigated interactions between IFITM3 and HIV-1 Env in virus-producing cells, by cotransfecting 5x10⁶ HEK293T cells with 8 µg of pNL43Δ*env-luc*, 4 µg of pCI-*env*, and 1 µg of pcDNA-*ifitm3*-Flag. Thirty-two hours post-transfection, the cells were washed in PBS, and lysed in RIPA buffer (1 x PBS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 and 0.05% SDS) on ice. Clarified cell lysates were then incubated with Sepharose beads (rec-Protein G-Sepharose® 4B Conjugate, Invitrogen, Courtaboeuf, France) conjugated with either an anti-Flag antibody (F7425, Sigma) or an antiserum against HIV-1 gp120 (NIH AIDS Reagent Program), for the immunoprecipitation of IFITM3 and Env, respectively. The beads were incubated overnight at 4°C with gentle shaking, washed five times in PBS and then heated in Laemmli buffer supplemented with

1% β -mercaptoethanol to separate the beads and immunoprecipitated proteins, which were examined by western blotting.

Western blotting

Immunoprecipitated proteins or viral particles (obtained by ultracentrifugation) were denatured by heating and fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8-16% gradient, Eurogentec, Liège, Belgium). The separated proteins were then transferred to nitrocellulose membranes by semi-dry blotting (Eurogentec). The membranes were incubated with anti-HIV-1 p24 (ab53841, Abcam), anti-gp120 (ab21179, Abcam), anti-gp41 (2F5, NIH AIDS Reagent program) or anti-FLAG-M2 (F1804, Sigma) primary antibodies, thoroughly washed, and incubated with rabbit anti-goat (ab6741, Abcam), goat anti-human (627120, Thermo Fisher Scientific) or rat anti-mouse (1144-05, Southern Biotech) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. Finally, membranes were incubated with HRP substrates for chemiluminescence (Pierce ECL Plus or Super Signal West Femto, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Signals were acquired with the ImageQuant LAS 500 system and analyzed with ImageQuant TL8.1 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) or ImageJ software.

Immunofluorescence staining

About 3.5×10^6 HEK293T cells were used to seed 90 mm-diameter Petri dishes containing coverslips precoated with 0.1% (w/v) poly-L-lysine (Sigma). The cells were incubated for 24 h and were then transfected as described above. After incubation for 32 h, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, washed with 10 mM glycine in PBS, and permeabilized in 0.1% Triton-X-100 in PBS for 15 minutes. The cells were then incubated with antibodies targeting HIV-1 Env (2G12, NIH AIDS Reagent Program) (37), IFITM3 (11714-1-AP or 66081-1-Ig, Proteintech) and one of following cell markers: the sodium/potassium ATPase for the plasma membrane (ab76020, Abcam), the GolgB1 protein for the Golgi apparatus (HPA011008, Sigma) or calnexin for the endoplasmic reticulum (Santa Cruz Biotechnology, sc70481, mouse). Primary antibody binding was detected by incubation with appropriate secondary antibodies conjugated to AlexaFluor488 for

IFITM3 (green), AlexaFluor594 for Env (red) or AlexaFluor647 for cell markers (purple) (Molecular Probes, Invitrogen). Cells were then mounted on glass slides in an aqueous mounting medium for fluorescence staining (BrightMount, ab103746, Abcam).

Confocal microscopy

Images were captured with a Leica TCS SP8 g-STED inverted confocal microscope equipped with a 63×1.4 NA oil immersion objective (HXC PL 13 APO 63x/1.40 OIL CS) (Leica, Wetzlar, Germany). The entire cell was analyzed by z-stack acquisition, with 30 z-stacks acquired for each set of conditions. Before colocalization analysis, a single cell was cut off for the quantification, with Imaris software, of colocalization between the various labeled proteins.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed in GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA), with Wilcoxon's tests, Student's *t*-tests and Spearman's correlation tests. Data from at least three independent experiments were used for the analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Sidaction (Paris, France). Aurélie Drouin was supported by doctoral fellowships from Sidaction and the *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites* (ANRS, Paris, France). The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4.3.LUC.R-E- from N. Landau; TZM-bl cells from J. C. Kappes, X. Wu, and Tranzyme Inc.; U373-MAGI-CXCR4 and U373-MAGI-CCR5 cells from Dr Michael Emerman; anti-HIV-1 gp120 monoclonal antibody (PG9, PG16, PGT145 and PGT128) from IAVI; anti-HIV-1 gp120 monoclonal antibody (10-1074 and 3BNC117) from Dr. Michel C. Nussenzweig; anti-HIV-1 gp41 monoclonal antibody (2F5 and 4E10) and anti-HIV-1 gp120 monoclonal antibody (2G12) from Polymun Scientific; anti-HIV-1 gp41 monoclonal antibody (10E8) from Dr. Mark Connors; anti-HIV-1 gp41/gp120 monoclonal antibody (35O22) from Drs. Jinghe Huang and Mark Connors. We thank Dr. Pamela Bjorkman for providing us with the monoclonal antibody 8ANC195 and Dr Andréa Cimorelli for the pcDNA-*ifitm3*-Flag.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD, PR, MBP and MBr conceived and designed the experiments. AD, JM, MAD, AM, JBG and MBe performed the experiments. AD and MBr analyzed the data and wrote the article. All authors contributed to editing the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Impact of IFITM3 on the infectivity of Env-pseudotyped viruses. (A) The viruses present in the cell supernatant were purified 72 hours after the cotransfection of HEK293T cells with pNL4-3 Δ *env.luc*, pCI-*env* and pcDNA-*ifitm3*-Flag or empty pcDNA. They were concentrated by ultracentrifugation on a sucrose cushion, lysed and examined by western blotting. (B) Viral inputs were normalized according to reverse transcriptase activity and infectivity was evaluated 48 h post-infection, by measuring luciferase activity (RLU). The impact of IFITM3 on the infectivity of each virus was evaluated by calculating the RLU ratio between IFITM3-bearing viruses and IFITM3-free (control) viruses, expressed as a percentage. (C) Absence of correlation (Spearman) between relative infectivity (% of control level) and amount of IFITM3 (densitometry) incorporated into Env-pseudotyped viruses.

Figure 2. Comparison of the neutralization sensitivity of Env-pseudotyped viruses produced in the presence (IFITM3) or absence (pcDNA) of IFITM3 by bNAbs targeting the V1V2-glycan epitope (panels A to C), the V3-glycan epitope (panels D and E), the CD4 binding site (panel F), the MPER (panels G to I) and the gp120/gp41 interface (panels K and L). Dot plots show the distribution of IC₅₀ (50% inhibitory concentrations, expressed in μ g/ml) values for each bNAbs within the two groups of viruses; the horizontal lines represent the 10th percentile, the median and the 90th percentile. The significance of the observed differences was evaluated in a Wilcoxon test.

Figure 3. Correlation between the sensitivity of Env-pseudotyped viruses to IFITM3 and their increase in sensitivity to PG16 in the presence of IFITM3. The impact of IFITM3 on the increase in sensitivity to PG16 was evaluated by calculating the ratio of PG16 IC₅₀ values between IFITM3-bearing viruses and IFITM3-free viruses (control viruses), expressed as a percentage.

Figure 4. Impact of the V1V2 and V3 loops of Env proteins on viral sensitivity to IFITM3. (A) Alignment of the amino-acid sequences of the V1V2 and V3 loops of the Env proteins of IFITM3-sensitive (249N3, 11c6 and NL4-3) and IFITM3-resistant (AD8, 2c4 and 249V4) viruses. Positively charged amino acids are shown in red, negatively charged residues in yellow and potential N-glycosylation sites in green. (B to G) Env-pseudotyped viruses expressing parental or chimeric Env were produced in the presence or absence of IFITM3 by cotransfecting HEK293T cells with pNL4-3 Δ env.luc, pCI-env (parental or chimeric) and pcDNA-*ifitm3*-Flag or empty pcDNA. The viruses present in cell supernatants were harvested, their levels were normalized on the basis of reverse transcriptase (RT) activity and their infectivity was evaluated 48 h post-infection, by measuring luciferase activity (RLU). The impact of IFITM3 on the infectivity of each virus was evaluated by calculating the RLU ratio between IFITM3-bearing viruses and IFITM3-free viruses (control viruses), expressed as a percentage. Chimeric Env proteins were produced by exchanging V1V2 and/or V3 loops as follows: (B) V1V2 loops from Env proteins from IFITM3-sensitive viruses were incorporated into the Env of the resistant AD8 virus, (C) V1-V2 loops from the Env proteins of IFITM3-resistant viruses were incorporated into the Env of the sensitive 249N3 virus, (D) V3 loops from the Env proteins of IFITM3-sensitive viruses were incorporated into the Env of the resistant AD8 virus, (E) V3 loops from Env proteins of IFITM3-resistant viruses were incorporated into the Env of the sensitive NL4-3 virus; (F) V1V2 and V3 loops from the Env proteins of sensitive viruses were incorporated into the Env of the resistant AD8 virus; (G) V1V2 and V3 loops from the Env of resistant viruses were incorporated into the Env of the sensitive NL4-3 virus. The statistical significance of differences in sensitivity to IFITM3 between parental and chimeric Env-pseudotyped viruses was evaluated in Student's *t*-tests.

Figure 5. Correlation between the sensitivity of chimeric and parental Env-pseudotyped viruses to IFITM3 and their increase in sensitivity to PG16 in the presence of IFITM3.

Figure 6. Interaction of IFITM3 and Env in virion-producing cells. (A) HEK293T cells were cotransfected with pNL4-3 Δ *env-luc*, pCI-*env* and pcDNA-*ifitm3*-Flag or empty pcDNA. Cells were lysed 32 hours post-transfection, by incubation in membrane-disrupting RIPA buffer. The levels of HIV-1 Env and IFITM3 in cell lysates were assessed by western blotting with anti-gp120 and anti-Flag antibodies, respectively. β -actin levels were used as a loading control. IFITM3/actin ratios were determined by quantifying the intensities of the IFITM3 and actin bands with ImageQuant TL8.1 software (GE Healthcare). (B) Lysates were immunoprecipitated with an antiserum against HIV-1 gp120 or a sheep IgG isotype control (top panel) and with an anti-Flag antibody or a rabbit IgG isotype control (bottom panel). Immunoprecipitated proteins were subjected to western blotting, as in (A).

Figure 7. Confocal microscopy analysis of IFITM3 and Env expression in cells producing IFITM3-resistant and IFITM3-sensitive viruses. HEK293T cells were transiently cotransfected with pNL4-3 Δ *env.luc*, pCI-*env* and pcDNA-*ifitm3*-Flag. The cells were fixed 32 hours post-transfection, permeabilized and labeled with an anti-IFITM3 antibody, an anti-Env antibody and an antibody targeting the endoplasmic reticulum (panel A), the Golgi apparatus (panel C) or the plasma membrane (panel E). Antibody binding was detected by incubation with secondary antibodies conjugated to different fluorochromes: AlexaFluor 488 (green) for IFITM3, AlexaFluor 594 (red) for Env and AlexaFluor 647 (purple) for the cellular compartments. Images were acquired with a Leica TCS SP8 g-STED confocal microscope. The entire cell was analyzed by z-stack acquisition; $\pm$ 30 z-stacks were acquired for each set of conditions. The histograms show mean Pearson's colocalization coefficients calculated with Imaris Software, quantifying the triple colocalization of Env, IFITM3 and cell components: the endoplasmic reticulum (ER) (panel B), the Golgi apparatus (panel D) or the plasma membrane (PM) (panel F). The statistical significance of the mean Pearson's colocalization coefficients was evaluated in Student's *t*-tests.

REFERENCES

1. Brass A.L., Huang I.-E., Benita Y., John S.P., Krishnan M.N., Feeley E.M., Ryan B.J., Weyer J.L., van der Weyden L., Fikrig E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243-1254.
2. Bailey C.C., Huang I.-C., Kam C., Farzan M. (2012). Ifitm3 limits the severity of acute influenza in mice. *PloS Pathog.* 8, e1002909.
3. Wilkins C., Woodward J., Lau D.T.-Y., Barnes A., Joyce M., McFarlane N., McKeating J.A., Tyrrell D.L., Gale Jr M. (2013). IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 57, 461-469.
4. Huang I.-C., Bailey C.C., Weyer J.L., Radoshitzky S.R., Becker M.M., Chiang J.J., Brass A.L., Ahmed A.A., Chi X., Dong L., et al. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PloS Pathog.* 7, e1001258.
5. Wrensch F., Karsten C.B., Gnirss K., Hoffmann M., Lu K., Takada A., Winkler M., Simmons G., Pöhlmann S. (2015). Interferon-induced transmembrane protein-mediated inhibition of host cell entry of ebolaviruses. *J. Infect. Dis.* 212, S210-S218.
6. Wrensch F., Winkler M., Pöhlmann S. (2014). IFITM proteins inhibit entry driven by the MERS-coronavirus spike protein: evidence for cholesterol independent mechanisms. *Viruses* 6, 3683-3898.
7. Jiang D., Weidner J.M., Qing M., Pan X.-B., Guo H., Xu C., Zhang X., Birk A., Chang J., Shi P.-Y., et al. (2010). Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit West Nile virus and dengue virus infections. *J. Virol.* 84, 8332-8341.
8. Savidis G., Perreira J.M., Portmann J.M., Meraner P., Guo Z., Green S., Brass A.L. (2016). The IFITMs inhibit Zika virus replication. *Cell Rep.* 15, 2323-2330.
9. Mudhasani R., Tran J.P., Retterer C., Radoshitzky S.R., Kota K.P., Altamura L.A., Smith J.M., Packard B.Z., Kuhn J.H., Costantino J., et al. (2013). IFITM-2 and IFITM-3 but not IFITM-1 restrict Rift Valley fever virus. *J. Virol.* 87, 8451-8464.

10. Xu-Yang Z., Pei-Yu B., Chuan-Tao Y., Wei Y., Hong-Wei M., Kang T., Chun-Mei Z., Ying-Feng L., Xin W., Ping-Zhong W., et al. (2016). Interferon-induced transmembrane protein 3 inhibits Hantaan virus infection, and its single nucleotide polymorphism rs12252 influences the severity of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Front. Immunol.* 7, 535.
11. Lu J., Pan Q., Rong L., Liu S.-L., Liang C. (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J. Virol.* 85, 2126-2137.
12. Compton A.A., Bruel T., Porrot F., Mallet A., Sachse M., Euvrard M., Liang C., Casartelli N., Schwartz O. (2014). IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* 16, 736-747.
13. Tartour K., Appourchaux R., Gaillard J., Nguyen X.-N., Durand S., Turpin J., Beaumont E., Roch E., Berger G., Mahieux R., et al. (2014). IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* 11, 103.
14. Liao Y., Goraya M.U., Yuan X., Zhang B., Chiu S.-H., Chen J.-L. (2019). Functional involvement of interferon-inducible transmembrane proteins in antiviral immunity. *Front. Microbiol.* 10, 1097.
15. Zhao X., Li J., Winkler C.A., An P., Guo J.-T. (2019). IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections. *Front. Microbiol.* 9, 3228.
16. John S.P., Chin C.R., Perreira J.M., Feeley E.M., Aker A.M., Savidis G., Smith S.E., Elia A.E.H., Everitt A.R., Vora M., et al. (2013). The CD225 domain of IFITM3 is required for both IFITM protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication. *J. Virol.* 87, 7837-7852.
17. Li K., Markosyan R.M., Zheng Y.-M., Golfetto O., Bungart B., Li M., Ding S., He Y., Liang C., Lee J.C., et al. (2013). IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PloS Pathog.* 9, e1003124.
18. Lin T.-S., Chin C.R., Everitt A.R., Clare S., Perreira J.M., Savidis G., Aker A.M., John S.P., Sarlah D., Carreira E.M., et al. (2013). Amphotericin B increases influenza A virus infection by preventing IFITM3-mediated restriction. *Cell Rep.* 5, 895-908.

19. Desai T.M., Marin M., Chin C.R., Savidis G., Brass A.L., Melikyan G.B. (2014). IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PloS Pathog.* *10*, e1004048.
20. Foster T.L., Wilson H., Iyer S.S., Coss K., Doores K., Smith S., Kellam P., Finzi A., Borrow P., Hahn B.H., et al. (2016). Resistance of transmitted founder HIV-1 to IFITM-mediated restriction. *Cell Host Microbe* *20*, 429-442.
21. Spence J.S., He R., Hoffmann H.-H., Das T., Thinon E., Rice C.M., Peng T., Chandran K., Hang H.C. (2019). IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nat. Chem. Biol.* *15*, 259-268.
22. Suddala K.C., Lee C.C., Meraner P., Marin M., Markosyan R.M., Desai T.M., Cohen F.S., Brass A.L., Melikyan G.B. (2019). Interferon-induced transmembrane protein 3 blocks fusion of sensitive but not resistant viruses by partitioning into virus carrying endosomes. *PloS Pathog.* *15*, e1007532.
23. Amini-Bavil-Olyaei S., Choi Y.J., Lee J.H., Shi M., Huang I.-C., Farzan M., Jung J.U. (2013). The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* *13*, 452-464.
24. Appourchaux R., Delpeuch M., Zhong L., Burlaud-Gaillard J., Tartour K., Savidis G., Brass A., Etienne L., Roingeard P., Cimorelli A. (2019). Functional mapping of regions involved in the negative imprinting of virion particle infectivity and in target cell protection by interferon-induced transmembrane protein 3 against HIV-1. *J. Virol.* *93*, e01716-18.
25. Tartour K., Nguyen X.-N., Appourchaux R., Assil S., Barateau V., Bloyet L.-M., Burlaud-Gaillard J., Confort M.-P., Escudero-Perez B., Gruffat H., et al. (2017). Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. *PloS Pathog.* *13*, e1006610.

26. Yu J., Li M., Wilkins J., Ding S., Swartz T.H., Esposito A.M., Zheng Y.-M., Freed E.O., Liang C., Chen B.K., et al. (2015). IFITM proteins restrict HIV-1 infection by antagonizing the envelope glycoprotein. *Cell Rep.* *13*, 145-156.
27. Ahi Y.S., Yimer D., Shi G., Majdoul S., Rahman K., Rein A., Compton A.A. (2020). IFITM3 reduces retroviral envelope abundance and function and is counteracted by glycoGag. *mBio* *11*, e03088-19.
28. Compton A.A., Roy N., Porrot F., Billet A., Casartelli N., Yount J.S., Liang C., Schwartz O. (2016). Natural mutations in IFITM3 modulate post-translational regulation and toggle antiviral specificity. *EMBO Rep.* *17*, 1657-1671.
29. Wang Y., Pan Q., Ding S., Wang Z., Yu J., Finzi A., Liu S.-L., Liang C. (2017). The V3 loop of HIV-1 Env determines viral susceptibility to IFITM3 impairment of viral infectivity. *J. Virol.* *91*, e02441-16.
30. Lee W.-Y.J., Fu R.M., Liang C., Sloan R.D. (2018). IFITM proteins inhibit HIV-1 protein synthesis. *Sci. Rep.* *8*, 14551.
31. Bouvin-Pley M., Morgand M., Moreau A., Jestin P., Simonnet C., Tran L., Goujard C., Meyer L., Barin F., Braibant M. (2013). Evidence for a continuous drift of the HIV-1 species toward higher resistance to neutralizing antibodies over the course of the epidemic. *PLoS Pathog.* *9*, e1003477.
32. Beretta M., Moreau A., Bouvin-Pley M., Essat A., Goujard C., Chaix M.L., Hue S., Meyer L., Barin F., Braibant M. (2018). Phenotypic properties of envelope glycoproteins of transmitted HIV-1 variants from patients belonging to transmission chains. *AIDS* *32*, 1917-1926.
33. Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., et al. (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* *326*, 285-289.
34. Walker L.M., Huber M., Doores K.J., Falkowska E., Pejchal R., Julien J.P., Wang S.K., Ramos A., Chan-Hui P.Y., Moyle M., et al. (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* *477*, 466-470.

35. Shingai M., Nishimura Y., Klein F., Mouquet H., Donau O.K., Plishka R., Buckler-White A., Seaman M., Piatak M.Jr., Lifson J.D., et al. (2013). Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* 503, 277-280.
36. Scheid J.F., Mouquet H., Ueberheide B., Diskin R., Klein F., Oliveira T.Y., Pietzsch J., Fenyo D., Abadir A., Velinzon K., et al. (2011). Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333, 1633-1637.
37. Buchacher A., Predl R., Strutzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Tauer C., Steindl F., Jungbauer A., et al. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 359-369.
38. Purtscher M., Trkola A., Grassauer A., Schulz P.M., Klima A., Dopper S., Gruber G., Buchacher A., Muster T., Katinger H. (1996). Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS* 10, 587-593.
39. Purtscher M., Trkola A., Gruber G., Buchacher A., Predl R., Steindl F., Tauer C., Berger R., Barrett N., Jungbauer A., et al. (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1651-1658.
40. Stiegler G., Kunert R., Purtscher M., Wolbank S., Voglauer R., Steindl F., Katinger H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1757-1765.
41. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamachi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., et al. (2012). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491, 406-412.
42. Scharf L., Scheid J.F., Lee J.H., West A.P. Jr, Chen C., Gao H., Gnanapragasam P.N., Mares R., Seaman M.S., Ward A.B., et al. (2014). Antibody 8ANC195 reveals a site of broad vulnerability on the HIV-1 envelope spike. *Cell Rep.* 7, 785–795.
43. Huang J., Kang B.H., Pancera M., Lee J.H., Tong T., Feng Y., Imamichi H., Georgiev I.S., Chuang G.Y., Druz A., et al. (2014). Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41–gp120 interface. *Nature* 515, 138-142.

44. Julien J.P., Cupo A., Sok D., Stanfield R.L., Lyumkis D., Deller M.C., Klasse P.J., Burton D.R., Sanders R.W., Moore J.P., et al. (2013). Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342,1477-1483.
45. Lyumkis D., Julien J.P., de Val N., Cupo A., Potter C.S., Klasse P.J., Burton D.R., Sanders R.W., Moore J.P., Carragher B., et al. (2013). Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1484-1490
46. Yu J., Liu S.L. (2018). The inhibition of HIV-1 entry imposed by interferon inducible transmembrane proteins is independent of co-receptor usage. *Viruses* 10, 413.
47. Pinter A., Honnen W.J., He Y., Gorny M.K., Zolla-Pazner S., Kayman S.C. (2004). The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J. Virol.* 78, 5205-5215.
48. Connor R.I., Chen B.K., Choe S., Landau N.R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206, 935-944.

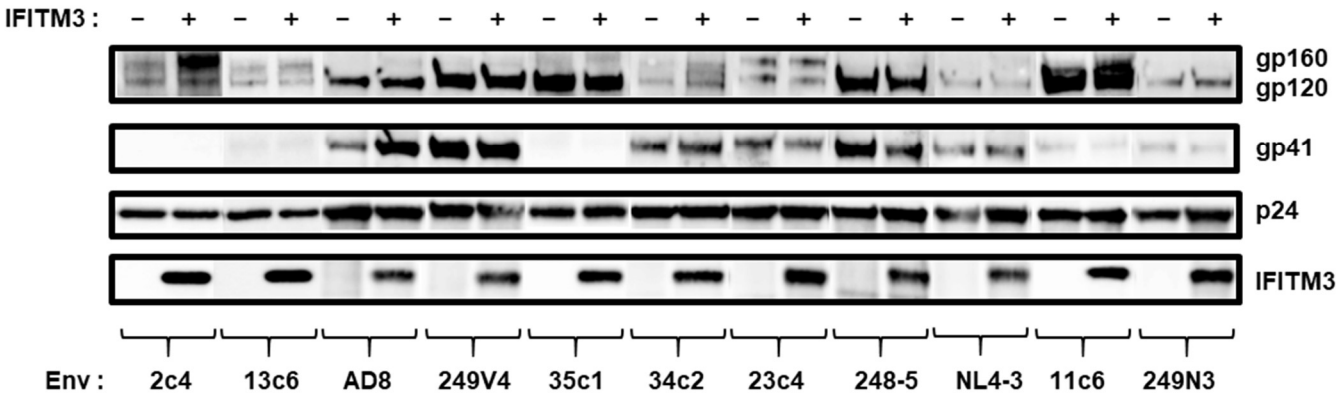
SUPPLEMENTAL INFORMATION

Table S1: Env clones derived from primary isolates obtained from individuals with acute or chronic HIV-1 clade B infections

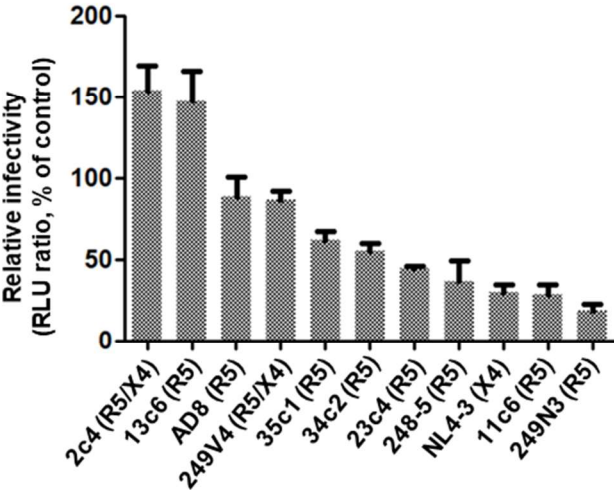
ID patient	Stage of infection	Env clone	Tropism	Reference
60204	Acute	2c4	X4R5	(31)
750202	Acute	11c6	R5	(31)
750710	Acute	13c6	R5	(31)
330424	Acute	23c4	R5	(31)
770203	Acute	34c2	R5	(31)
840104	Acute	35c1	R5	(31)
590112	Acute	248-5	R5	(32)
590112	Chronic	249N3	R5	(32)
590112	Chronic	249V4	X4R5	(32)

FIGURES

A



B



C

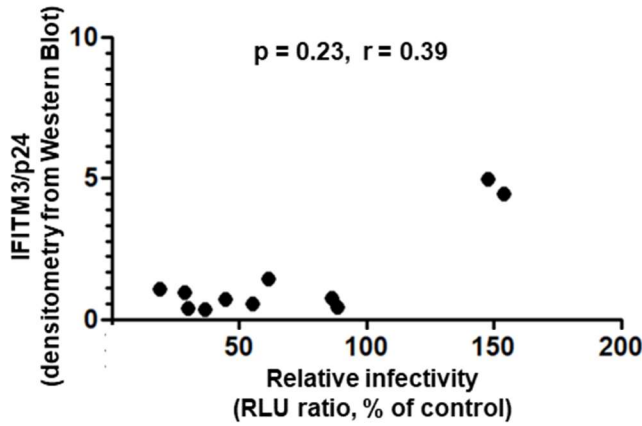


Figure 1

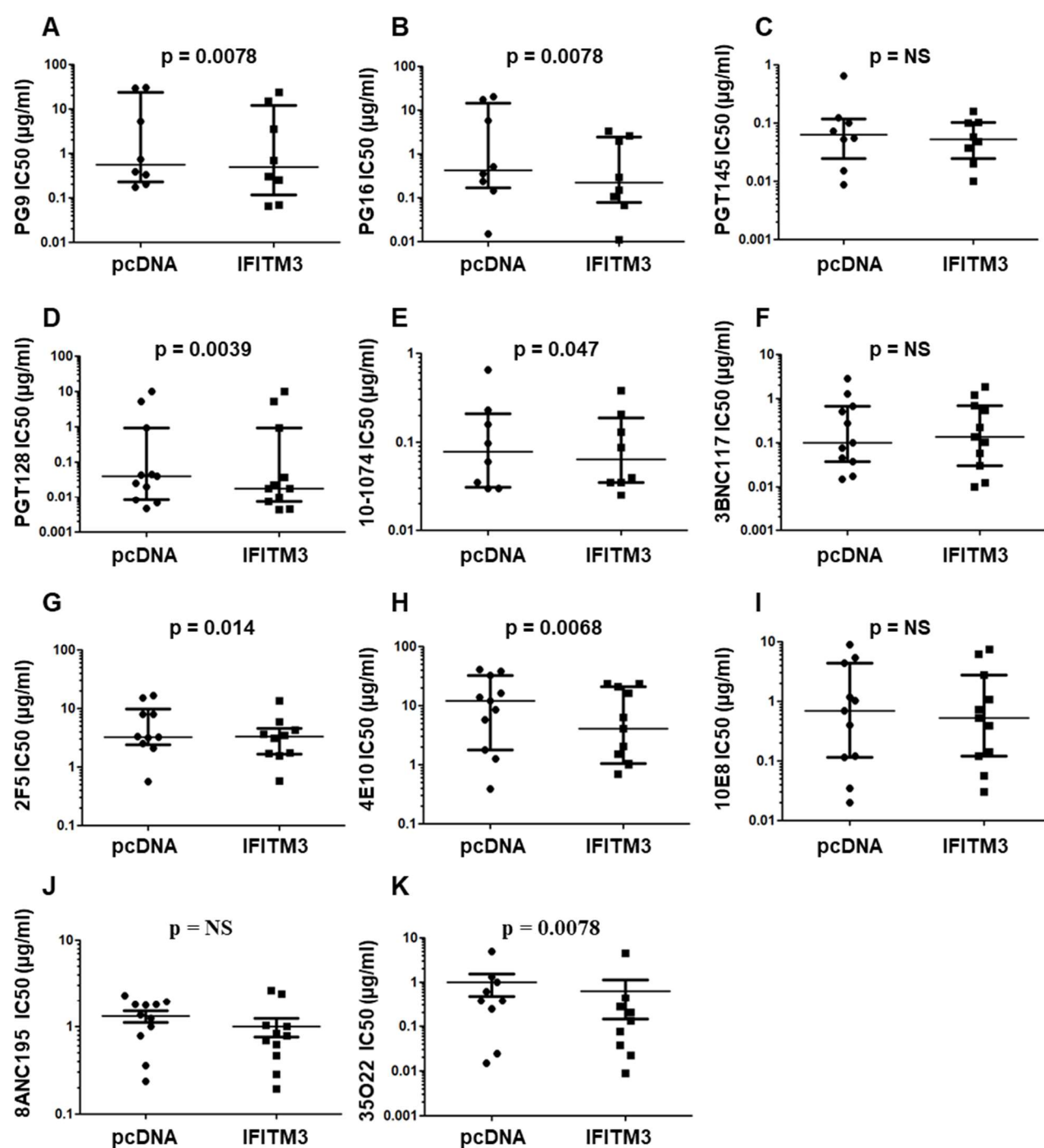


Figure 2

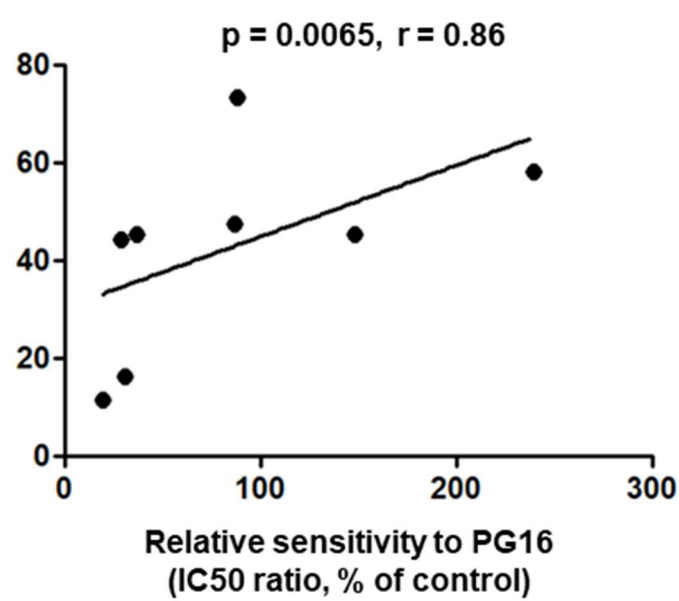


Figure 3

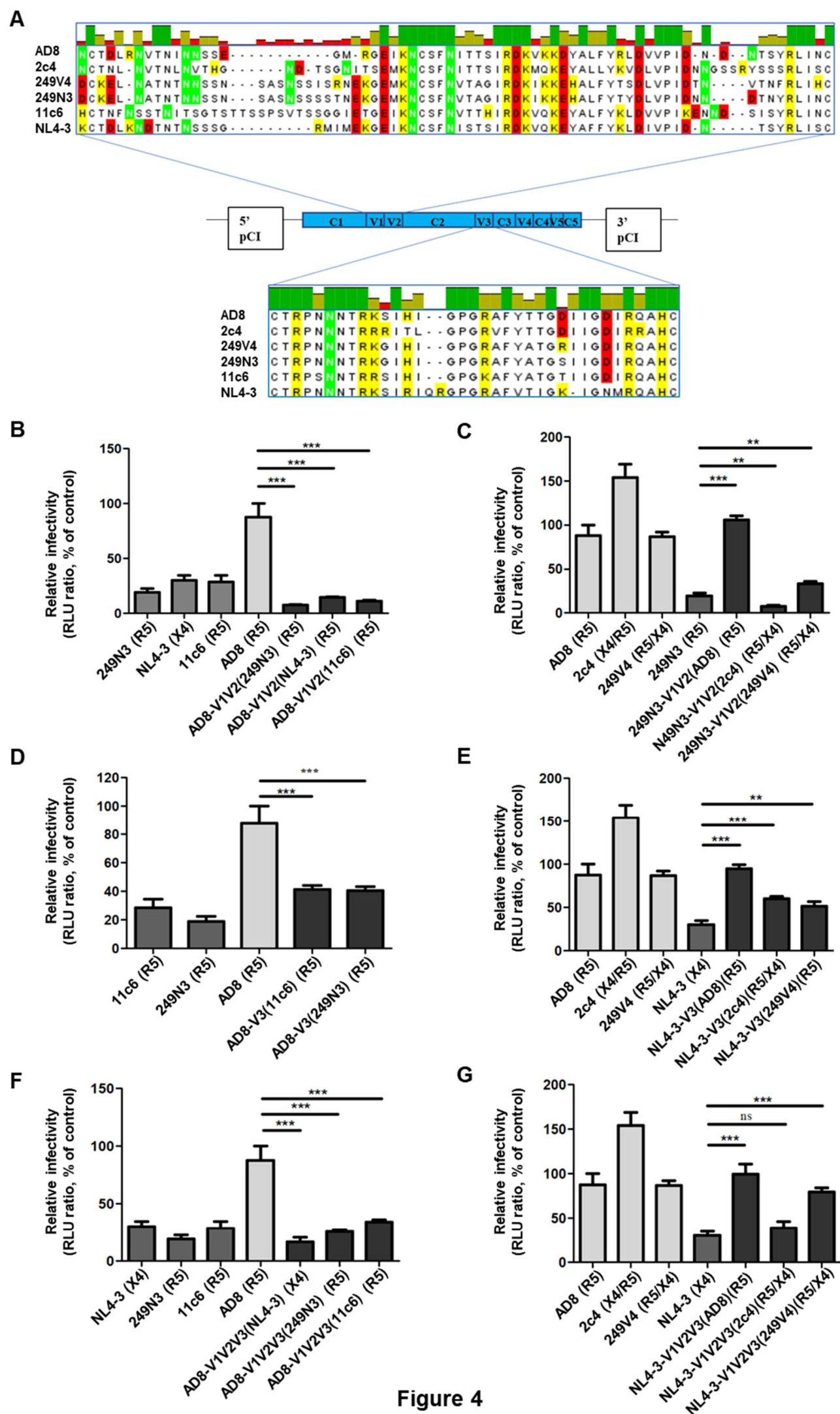


Figure 4

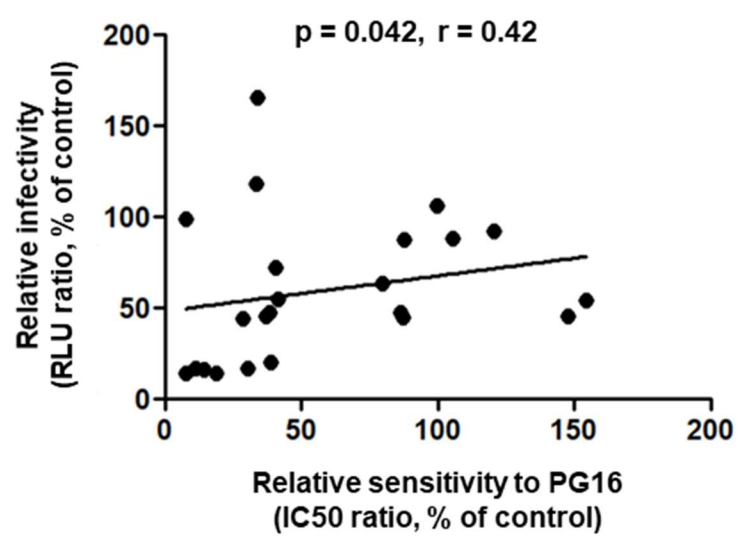
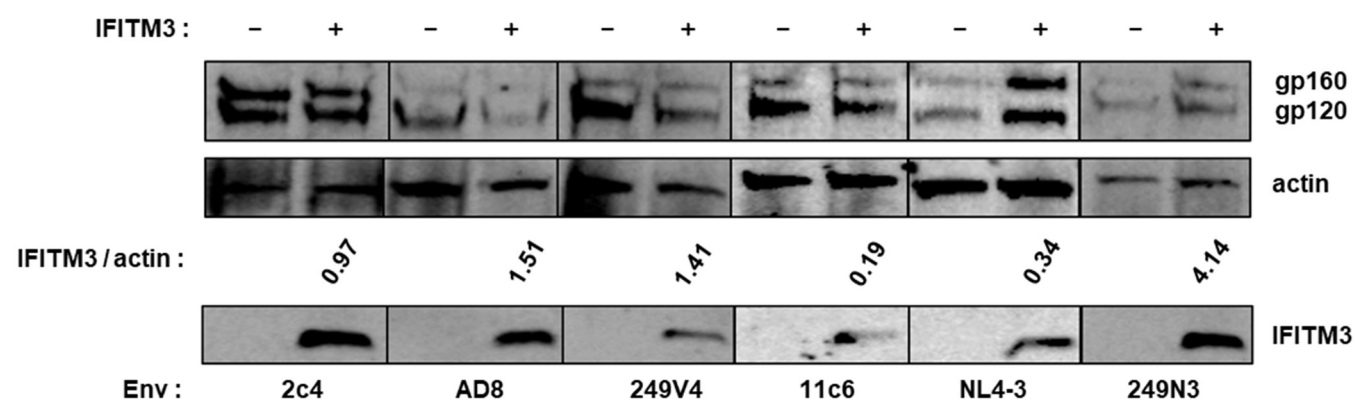


Figure 5

A



B

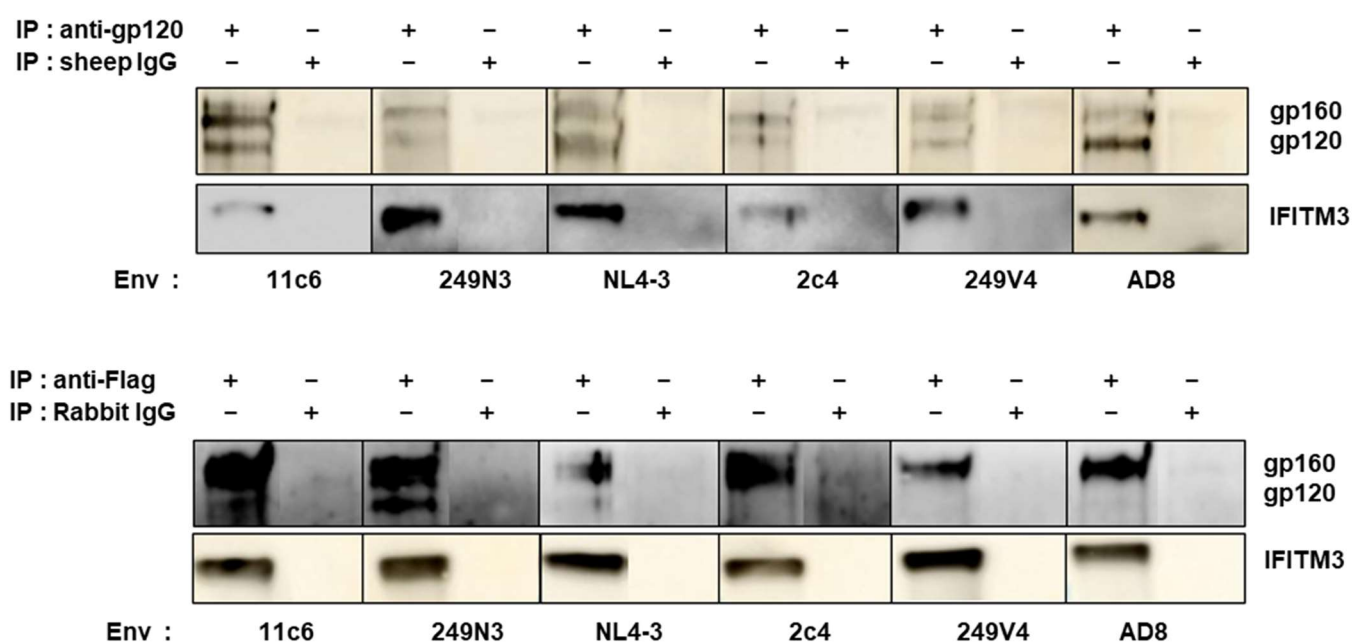


Figure 6

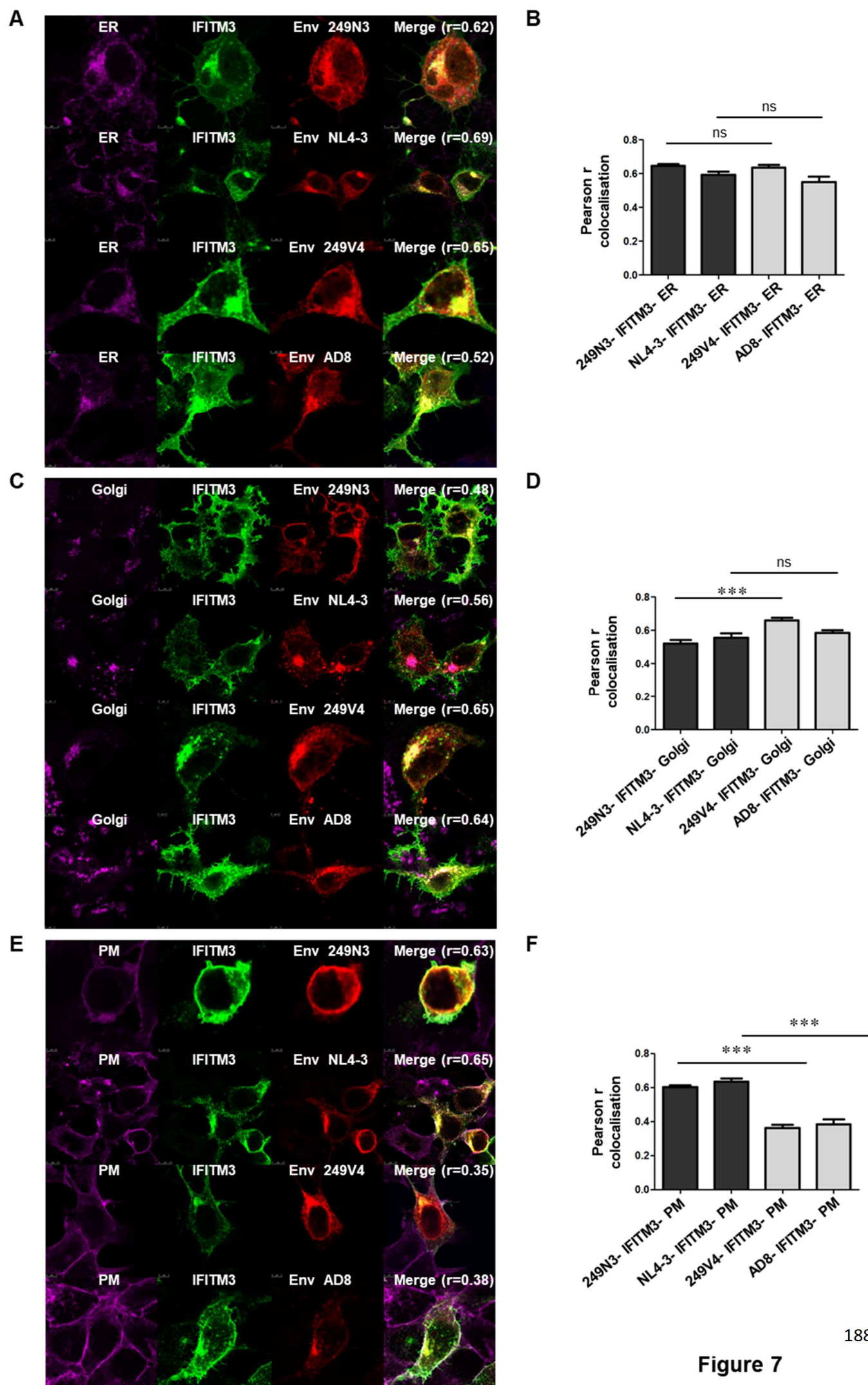


Figure 7

ANNEXE 2

Common evolutionary features of the envelope glycoprotein of HIV-1 in patients belonging to a transmission chain

Running title: HIV-1 Env evolution in a transmission chain

Maxime BERETTA^{1Δ}, Julie MIGRAINE¹, Alain MOREAU¹, Asma ESSAT², Cécile GOUJARD^{2,3},
Marie-Laure CHAIX^{4,5}, Aurélie DROUIN¹, Mélanie BOUVIN-PLEY¹, Laurence MEYER^{2,3}, Francis
BARIN^{1,6} and Martine BRAIBANT^{1*}.

Manuscrit en révision dans *Scientific Reports*

La diversité du VIH-1, en particulier de sa glycoprotéine d'enveloppe (Env), est principalement une conséquence de la pression de sélection exercée par la réponse immunitaire au cours de l'infection (Moore, 2018b). De nombreuses études ont analysé l'évolution génétique de Env face à la pression humorale neutralisante (S. D. W. Frost et al., 2005; Rong et al., 2007; M. Sagar et al., 2006; Wei et al., 2003b). Toutefois, les conséquences de cette évolution sur les propriétés fonctionnelles de Env n'ont été que peu étudiées. Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évolution de Env au cours de l'infection et nous avons cherché à savoir si celle-ci est conduite par des contraintes fonctionnelles. Pour cela, la diversité génétique, les propriétés antigéniques et fonctionnelles de Env chez 4 patients infectés, appartenant à une même chaîne de transmission, ont été étudiées. Des prélèvements précoces (< 3 mois post-infection) et tardifs (18 ou 24 mois post-infection) de ces 4 patients infectés par des virus très proches génétiquement ont été étudiés.

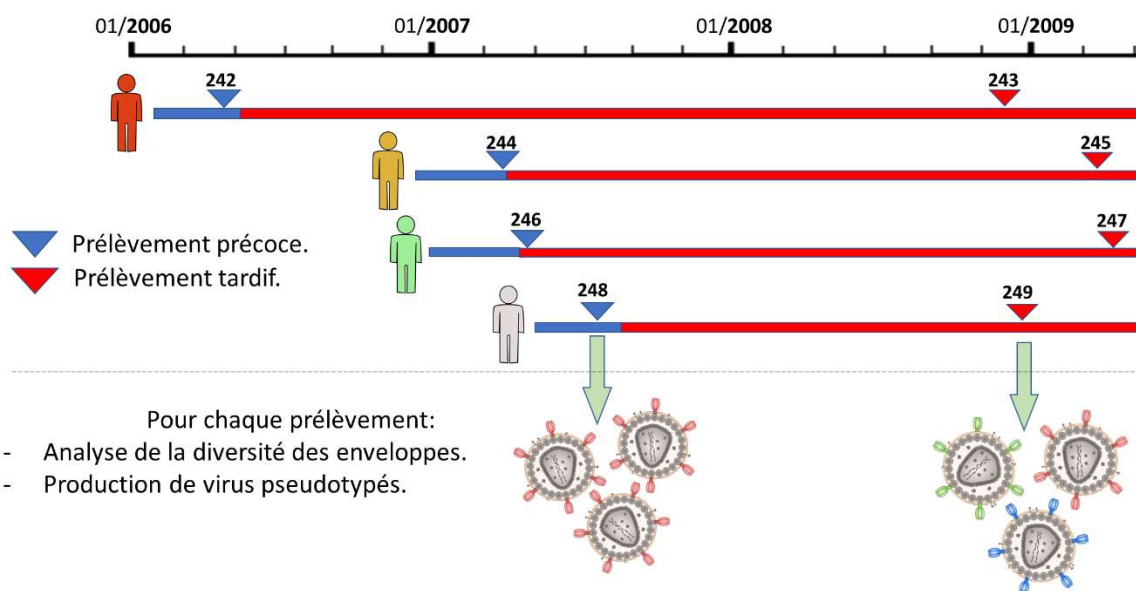


Figure 44. Représentation du cluster de transmission étudié et les différents prélèvements.

A partir de chaque prélèvement précoce et tardif, un séquençage des gènes *env* par NGS a été réalisé afin d'analyser la diversité de la quasi-espèce. Les enveloppes ont ensuite été exprimé dans un modèle de virus pseudotypés afin d'étudier leurs propriétés biologiques.

Nous avons observé une forte augmentation de la diversité de Env au stade chronique d'infection chez les 4 patients. Cette augmentation de diversité coïncidait avec la forte réponse neutralisante autologue développée par chacun d'entre eux. De façon intéressante, une évolution parallèle des propriétés infectieuses des quasi-espèces virales infectant chaque patient a pu être mise en évidence avec une augmentation de la sensibilité des virus au T20, d'une augmentation de la résistance aux analogues du CD4 (CD4s, M48U1) et aux anticorps neutralisants ciblant la V3. Cette évolution commune était associée à des modifications identiques sur les séquences des Env, au niveau de la V3, du peptide de fusion et du domaine HR2 de la gp41. Cette étude a permis pour la première fois

d'observer une évolution commune des propriétés fonctionnelles de la glycoprotéine d'enveloppe chez quatre patients infectés par un virus très proche génétiquement. Cette évolution coïncidait avec l'échappement viral à la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants et l'apparition de mutations identiques dans des régions fonctionnelles de la glycoprotéine d'enveloppe. Ces résultats suggèrent que les capacités d'adaptation à l'hôte de la glycoprotéine d'enveloppe sont restreintes par des contraintes fonctionnelles qui dirigent son évolution.

Common evolutionary features of the envelope glycoprotein of HIV-1 in patients belonging to a transmission chain

Running title: HIV-1 Env evolution in a transmission chain

Maxime BERETTA^{1Δ}, Julie MIGRAINE¹, Alain MOREAU¹, Asma ESSAT², Cécile GOUJARD^{2,3}, Marie-Laure CHAIX^{4,5}, Aurélie DROUIN¹, Mélanie BOUVIN-PLEY¹, Laurence MEYER^{2,3}, Francis BARIN^{1,6} and Martine BRAIBANT^{1*}.

¹ Université de Tours et CHRU de Tours, Inserm U1259, Tours, France;

² Université Paris Sud, Université Paris Saclay, CESP Inserm U1018, Le Kremlin-Bicêtre, France;

³ AP-HP Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France;

⁴ Université de Paris, Inserm U944, Paris, France;

⁵ AP-HP, Hôpital Saint Louis, Laboratoire de Virologie, Paris, France;

⁶ CHRU de Tours, CNR VIH, Tours, France

^Δ Present address: Institut Pasteur, Laboratory of Humoral Immunology, Department of Immunology, Paris, France

* Corresponding author: braibant@med.univ-tours.fr

Abstract word count: 196

Main text word count: 4706

Methods word count: 1678

ABSTRACT

The diversity of the HIV-1 envelope glycoproteins (Env) is largely a consequence of the pressure exerted by the adaptive immune response to infection. While it was generally assumed that the neutralizing antibody (NAb) response depended mainly on the infected individual, the concept that virus-related factors could be important in inducing this response has recently emerged. Here, we analyzed the influence of the infecting viral strain in shaping NAb responses in four HIV-1 infected subjects belonging to a transmission chain. We also explored the impact of NAb responses on the functional evolution of the viral quasispecies. The four patients developed a strong autologous neutralizing antibody response that drove viral escape and coincided with a parallel evolution of their infecting quasispecies towards increasing infectious properties, increasing susceptibility to T20 and increasing resistance to both CD4 analogs and V3 loop-directed NAbs. This evolution was associated with identical Env sequence changes at several positions in the V3 loop, the fusion peptide and the HR2 domain of gp41. The common evolutionary pattern of Env in different hosts suggests that the capacity of a given Env to adapt to changing environments may be restricted by functional constraints that limit its evolutionary landscape.

INTRODUCTION

During the natural course of infection, typically a single or a limited number of transmitted-founder (T/F) viruses establish infection¹⁻⁶. After an exponential growth of the viral population, the viral load declines to a steady state referred as the viral set-point, where it remains throughout the chronic phase of infection until progression to AIDS. During the chronic infection, HIV-1 is maintained as a continuously evolving quasispecies population, with diversification driven by both humoral and cellular adaptive immune responses. Among the HIV-1 proteins, the envelope glycoprotein (Env), which mediates entry into host cells, is the most diverse. This diversity is largely a consequence of the pressure exerted by the neutralizing antibody (NAb) response⁷. In general, neutralizing antibodies (NAbs) begin to develop a few weeks post-infection⁸⁻¹¹. These initial NAbs are in most cases strain-specific and mainly target variable regions of the envelope glycoprotein, such as V1V2, V3, V4 and C3 (albeit relatively variable despite its designation as a conserved region)¹²⁻¹⁴. They exert a pressure that rapidly selects for viral escape variants with mutations, insertions, deletions and shifting of glycans¹⁵⁻²⁰. As viral escape occurs, new antibodies develop to target emerging escape variants, resulting in a continuous evolving viral population^{14,21}. In a small subset of cases, this will lead after years of infection to the development of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) able to block infection by heterologous viruses belonging to various subtypes *in vitro*²²⁻²⁴. The reasons why some individuals develop bNAbs remain unclear but years of persistent viral stimulation seem in most cases to be necessary for their generation²⁵⁻²⁷. Occasionally broadly neutralizing responses have nevertheless been reported in early periods of infection²⁸⁻²⁹. Unfortunately subjects who develop bNAbs have no clinical benefit because some viral variants are able to escape them even if they target conserved epitopes³⁰⁻³⁵. Nevertheless, bNAbs are considered necessary for an effective preventive HIV-1 vaccine and the identification of bNAbs with exceptional breadth and potency has led to a renewal in the field of HIV vaccine research³⁶⁻⁴⁰. In addition to the humoral pressure, envelope-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses restricted by HLA class I alleles may

also exert an active immune selection pressure, even if accessory/regulatory (e.g. Nef) and Gag proteins are the most targeted by the T-cell response⁴¹⁻⁴⁵.

Recently, the analysis of the antibody responses of HIV-1 infected individuals identified as transmission pairs within the Swiss cohort suggested that the NAb response could be imprinted by the nature of the infecting strain⁴⁶. This new concept is crucial for the design of effective immunogens able to induce similar bNAbs responses across vaccinees. In this context, the purpose of our study was to study if this virus-dictated heritability of NAb responses could be observed in four HIV-1 infected subjects belonging to a transmission chain, and to what extent the NAb response impacts the functional Env properties of the evolving viral quasispecies. If we can assume that mutations resulting in a significant viral fitness cost do not persist, is the persisting evolving population restricted by functional constraints? We addressed this question by analyzing the genetic, antigenic and functional evolution of Envs representative of the viral quasispecies infecting each subject. This approach gave us the opportunity to investigate if under the NAb pressure, similar Env evolution patterns were detectable in different hosts. In this case, this would mean that the evolutionary landscape of Envs might be more restricted than previously thought. A better knowledge of mutable sites versus those vulnerable to mutations will help to the rational design of Env immunogens for effective vaccines.

RESULTS

Studied population.

The four selected patients expressed various HLA class I alleles, except B*44 which was shared by three of four patients (Supplementary Table S1). All patients have been infected with genetically close viruses of clade B between January 2006 and April 2007. For each patient, two plasma samples were selected, one collected less than 4 months post-infection (early sample) and the other collected 18 or 24 months later (late sample). All patients were antiretroviral-naïve, except patient 3 who received a treatment consisting of the combination Tenofovir-Emtricitabine-Efavirenz only 4 months

before (December 2008) the late plasma sample collection.

Comparison of early and late *env* sequences.

The *env* consensus sequences of the viral quasiespecies infecting each patient at the early and late stage of infection were determined by NGS analyses. We compared the 8 sequences to the most closely related *env* sequences available in GenBank. Phylogenetic analysis confirmed that the *env* sequences from the 4 selected patients grouped into the same cluster (bootstrap value of 100%) (Fig. 1). As expected, based on the genetic distances, early *env* sequences were closer to the hypothesized most recent common ancestor of the cluster than the late *env* sequences, confirming substantial viral evolution overtime in each patient (Fig. 1). Furthermore, the Shannon entropy measures of NGS-generated sequences, representing the overall genetic diversity within each viral quasiespecies, were higher in late than early samples, except for patient 3 who received an antiretroviral treatment four months before late sampling (Fig. 1).

Patients developed neutralizing antibody responses that drove the selection of escape variants.

We produced Env-pseudotyped viruses expressing the envelope glycoproteins representative of the viral quasiespecies present in each patient at the early (early viruses) and late (chronic viruses) stage of infection and compared their sensitivity to neutralization by autologous early and late plasma samples. The late plasma sample of patient 3 was not tested due to the presence of antiretroviral drugs. As expected, no autologous neutralizing activity was detected in plasma samples collected early after infection (not shown). In contrast, a high autologous neutralizing activity was detected in late plasma samples of patients 1, 2 and 4 against their early variants (Fig. 2a,b). However, also as expected, chronic viruses contemporaneous of late plasma samples were much less sensitive to autologous neutralization than early viruses (two-way ANOVA, $P < 0.0001$, $P = 0.007$ and $P = 0.0004$ for viruses of patient 1, 2 and 4 respectively), indicative of changes in the viral envelope glycoproteins which rendered viruses more resistant to autologous neutralization.

It has been described that an increase in both length and number of PNGS of gp120, particularly in the variable regions, was associated with the evolution of HIV-1 towards an increasing resistance to

neutralization^{2,6,47-48}. We therefore looked at these regions in Env consensus sequences of each patient (Supplementary Table S2). However, no significant common differences were observed between early and late sequences, suggesting that in our study these features were not the main determinant of sensitivity/resistance to neutralization.

We next compared the sensitivity of early and chronic viruses to heterologous neutralization by early and late plasma samples from the other patients of the cluster. Again, no heterologous neutralizing activity was detected in plasma samples collected early after infection (not shown). However, late plasma samples of patients 1, 2 and 4 were able to neutralize the heterologous early viruses (Fig. 2c-h). This was not surprising given the genetically close relationship between early viruses of this transmission cluster. Interestingly, as observed with autologous neutralization but to a lesser extent, chronic viruses were less sensitive to heterologous neutralization than were early viruses, suggesting that the four patients developed similar neutralizing antibody responses driving the selection of variants that might share some antibody escape mechanisms (Fig. 2c-h). To support this hypothesis, we compared the antibody responses of patients 1, 2 and 4 by assessing the neutralizing activity of their late plasma samples against a panel of 26 heterologous clade B Env-pseudotyped viruses, derived from both laboratory adapted strains and primary isolates (Fig. 3a)⁴⁹⁻⁵⁰. Their neutralization pattern was compared with that of a subtype B chronically infected patient (patient 680206), randomly chosen among patients enrolled in the ANRS PRIMO cohort who did not belong to the transmission cluster⁴⁹. Although plasmas of patients 1, 2 and 4 displayed poor neutralizing titers against most heterologous strains, they shared similar neutralization profiles as shown by the hierarchical clustering of neutralizing titers which grouped plasmas 1, 2 and 4 in a same cluster (Fig. 3a). The similar neutralization profile of plasmas 1, 2 and 4 was also supported by statistically significant pairwise correlations between their neutralizing titers (Spearman correlations, P -values ranging from <0.0001 to 0.002), contrasting with the plasma of patient 680206 whose antibody titers did not correlate with any other plasma ($P \geq 0.2$) (Fig. 3b). This observation supported the influence of the viral strain in shaping antibody responses, as recently reported by Kouyos *et al*⁴⁶. However,

late plasma from a given individual did not (or weakly) neutralize its own late variants (Fig. 2a,b) but was still able to neutralize late variants from other individuals of the cluster (Fig. 2c-h), meaning that a part of the selective pressure was different between individuals and that some NAb targeted the virus differently.

Early viruses were more sensitive to neutralization by antibodies targeting the V3 region than chronic viruses

We compared the antigenic drift of Env by measuring the sensitivity of early and chronic viruses to a panel of well characterized human monoclonal broadly neutralizing antibodies (HuMobNAbs) that target the six sites of vulnerability of HIV-1 Env, i.e the CD4 binding site⁵¹⁻⁵², the V1V2-glycan epitope⁵³⁻⁵⁴, the V3-glycan epitope⁵⁴⁻⁵⁵, the membrane proximal external region (MPER) of gp41⁵⁶, the gp120-gp41 interface⁵⁷ and the fusion peptide⁵⁸⁻⁵⁹. Except for PG9 and VRC34.01 that target the V1/V2 epitope and the fusion peptide, respectively, all HuMobNAbs were efficient against both early and chronic viruses (Table 1). An additional residue in the fusion peptide (between positions 514 and 515 of the HXB2 envelope sequence) present in the viral quasispecies of the four patients should be responsible for their resistance to VRC34.01⁵⁸ (see later, Fig. 6c). Concerning PG9, the most sensitive virus was the chronic virus of patient 2. It was the only virus that contains all key residues targeted by PG9, including a Tyr residue at position 173 in V2. The presence of an His residue in all other viruses suggested that this change may be involved in their higher resistance⁶⁰ (Supplementary Fig. S1). The most potent HuMobNAbs targeted the V3 region and the CD4 binding site. The evolution of neutralization profiles from the early to the chronic phase of infection was patient-dependent for most antibodies with a significant increase of resistance to 3BNC117 and NIH45-46G54W that target the CD4-binding site for patient 4 and a decrease of resistance to PG9 that targets V1V2 for patients 2 and 4, suggesting that the selective pressure on these regions are different among patients. In contrast, the two HuMobNAbs that target the V3 region, 10-1074 and PGT121, were more potent against early than chronic viruses in three or four patients for 10-1074 (two-way ANOVA, $P=0.005$, $P=0.03$ and $P=0.02$ for viruses of patient 1, 2 and 3 respectively) and

in the four patients for PGT121 (two-way ANOVA, $P=0.001$, $P=0.007$, $P=0.01$ and $P=0.03$ for viruses of patient 1 to 4 respectively) (Table 1, Fig. 4a,b). This observation suggests that the V3 region evolved similarly in the four patients. The analysis of V3 sequences obtained by ultra-deep sequencing of the viral quasiespecies infecting each subject during the early and chronic phases of infection confirmed this hypothesis (Fig. 4c). The N332 and N301 glycan sites and the $^{324}\text{G(D/N)}\text{IR}^{327}$ motif which are the main determinants of sensitivity to V3-targeting HuMobNAbs are present in both early and chronic viruses^{54,61-63}. However, the $^{324}\text{G(D/N)}\text{IR}^{327}$ motif evolved similarly in the four patients; most variants of the early quasiespecies harbored an Asn residue at position 325 that evolved to an Asp residue during the chronic phase of infection. In close proximity to this motif, a Ser residue at position 321 highly conserved in the viral quasiespecies of the four patients during the early phase of infection evolved to an Arg residue in three of them during the chronic phase of infection.

Chronic viruses evolved toward a dual tropism in two patients.

The HIV-1 envelope V3 region is the major determinant of viral tropism⁶⁴⁻⁶⁵. The presence of positively charged amino acids at positions 11 or 25 of the V3 loop (positions 307 or 321 in the HXB2 full-length envelope sequence) has been shown to be predictive of a CXCR4 co-receptor usage⁶⁶. We determined the tropism of early and chronic viruses by measuring their ability to infect CD4^+ U373 MAGI cells expressing either the CXCR4 or CCR5 co-receptor (Fig. 4d). As expected early viruses of all patients infected exclusively $\text{CD4}^+/\text{CCR5}^+$ U373 MAGI cells (RLU<100 in $\text{CD4}^+/\text{CXCR4}^+$ U373 MAGI cells). In contrast, chronic viruses of patients 3 and 4 were able to infect both $\text{CD4}^+/\text{CCR5}^+$ and $\text{CD4}^+/\text{CXCR4}^+$ U373 MAGI cells, in accordance with the presence of a positively charged Arg residue at position 321 (position 25 of the V3 loop) in most variants of their infecting quasiespecies (Fig. 4c,d). However, despite the presence of this Arg residue, viral variants of the chronic quasiespecies of patient 2 were not able to use the CXCR4 co-receptor, probably due to the presence of a compensatory negatively charged Glu residue at position 320⁶⁷ (Fig. 4c,d). We then compared the efficiency of CCR5 usage of early and chronic pseudotyped viruses by infecting TZM-

bl cells (CD4+/CCR5+/CXCR4+ HeLa cells) in the presence of decreasing concentrations (6000 nM to 0.3 nM) of the CCR5 antagonist maraviroc (MVC). Both early and chronic viruses were highly susceptible to MVC, with IC₅₀ values under 1.5 nM and maximal percent inhibition (MPI) values above 95%, except for chronic viruses of patients 3 and 4 that displayed lower MPI values of respectively 89.5% and 82% due to their capacity to use the alternate co-receptor CXCR4 (Fig 4e,f).

Early viruses were more sensitive to the CD4 miniprotein M48U1 than chronic viruses

We compared the efficiency of CD4 receptor usage of early and late viruses through their sensitivity to two CD4 analogs, i.e sCD4, a soluble form of CD4 composed of the four extracellular domains of CD4 and M48U1, a CD4 mimetic miniprotein⁶⁸⁻⁶⁹. Early and chronic viruses were highly resistant to sCD4 with IC₅₀ values >10 µg/mL contrasting with their sensitivity to M48U1 with IC₅₀ values <1 µg/mL (Fig. 5a-d). In the four patients, early viruses were more sensitive than chronic viruses to M48U1, suggesting a similar evolution of the CD4 binding site towards a lower CD4 affinity of their envelope glycoprotein (two-way ANOVA, $P=0.01$, $P=0.05$, $P=0.02$ and $P=0.005$ for viruses of patients 1, 2, 3 and 4 respectively) (Fig. 5a,b). Probably due to their high resistance to sCD4, this evolution was not observed using this inhibitor, except for viruses of patient 4, to which early variants were the most sensitive (two-way ANOVA, $P=0.02$) (Fig. 5c,d). We compared residues of the Phe-43 cavity and those known to interact with CD4 and/or M48U1 in the envelope sequences of the viral quasispecies infecting each subject during the early and chronic phases of infection but we were unable to identify molecular determinants that might be responsible of these differences^{68,70-71} (Supplementary Figure S2). Focusing on PNGS (including those present in constant regions), no major changes could be observed except for the inconstant presence of PNGS at position 341, but unrelated to the sensitivity level to M48U1 (Supplementary Figure S2).

Early viruses were more resistant to the fusion inhibitor enfuvirtide than chronic viruses.

We compared Env-pseudotyped early and chronic viruses for their sensitivity to the fusion inhibitor enfuvirtide (ENF). By mimicking the HR2 domain of gp41, ENF binds to the HR1 domain of gp41, which becomes exposed after CD4/coreceptor engagement. A higher resistance to this fusion

inhibitor may thus reflect a lower capacity of the molecule to interact with HR1 or indirectly faster conformational changes in the envelope glycoprotein that drive the membrane fusion reaction. In the four patients, early viruses were more resistant to ENF than chronic viruses (Fig. 6a,b). Except for viral variants of patient 1, these differences were statistically significant (two-way ANOVA, $P=0.05$, $P=0.01$ and $P=0.03$ for viruses of patients 2, 3 and 4 respectively) (Fig. 6a). By comparing the gp41 amino acid sequences of the quasiespecies infecting each subject during the early and chronic phases of infection, we observed two changes that might contribute to this difference of sensitivity (Fig. 6c). All variants of the early quasiespecies harbored a Cys residue in the HR2 domain (position 640 in the HXB2 envelope sequence) that evolved more or less dramatically in the four patients to a Gly residue during the chronic phase of infection. Interestingly, a Thr residue in the fusion peptide (insertion between positions 514 and 515 of the HXB2 envelope sequence) present in the viral quasiespecies of the four patients during the early phase of infection evolved to a Met residue in the three patients who presented a significant change of sensitivity to ENF during the chronic phase of infection.

Early viruses were less infectious and incorporated less envelope glycoproteins

We compared the capacity of early and chronic viruses to infect TZM-bl cells in a single round of infection. Infectivity level of each pseudotyped virus, whose input was normalized for p24 amount, was evaluated 48h post-infection by measuring the luciferase activity (RLU). In the four patients, we observed that early viruses were less infectious than chronic viruses (Wilcoxon test, $P=0.008$) (Fig. 7a). A similar trend was observed in CD4⁺/CCR5⁺ U373 MAGI cells (Fig. 4d). This was surprising given their sensitivity to entry inhibitors suggesting that chronic viruses were less able to bind CD4 and engage the fusion process than early viruses. We thus examined by ELISA whether chronic viruses packaged more envelope glycoproteins than early viruses. For each patient, we observed that early viruses harbored less gp120 than chronic viruses (Fig. 7a). This observation suggested that the decrease of functionality of chronic viruses might have been compensated by an increase of the envelope glycoprotein level into the chronic viruses. However, the Env-pseudotyped viruses used

were generated in a NL4-3 background from the entire *env* genes including the region encoding the cytoplasmic tail. Since the interplay between the cytoplasmic tails of gp41 and their matching matrix proteins (MA) might be less efficient, possibly affecting the envelope glycoproteins incorporation, we replaced the NL4-3 matrix of the viral background by the matrix of the variant infecting each patient during the early and chronic phases of infection to generate Env-MA-pseudotyped viruses harboring envelope glycoproteins and their matching matrix proteins. By comparing the matrix sequences infecting each subject during the early and chronic phases of infection, we observed at position 43 the evolution of a Glu residue to a His residue in three patients, the matrix of the fourth patient harboring already this His residue during the early phase of infection (Fig. 7b). Nevertheless, using Env-MA-pseudotyped viruses, we observed similarly that early viruses were less infectious (Wilcoxon test, $P=0.008$) and harbored less gp120 than chronic viruses (Fig. 7c), suggesting that the infectiousness characteristics were not due to a mismatch between Env and MA.

Given that TZM-bl cells express high levels of CD4⁷², we further checked whether the difference in infectivity between early and chronic viruses was also observed in macrophages that express a low density of CD4⁷³. If so, this would be indicative of a common evolution of the infecting virus towards a lower dependence of CD4. Monocyte-derived macrophages (MDM) were infected in a single round of infection by early and chronic Env-pseudotyped viruses and infectivity level was evaluated 48h post-infection by measuring the luciferase activity (RLU). As expected, luciferase activity levels were lower in primary MDM than in the TZM-bl cell line. However, similarly to what we observed in TZM-bl cells, early viruses were less infectious than chronic viruses in the four patients (Wilcoxon test, $P=0.008$) (Fig. 7d).

DISCUSSION

Transmission of HIV-1 involves a bottleneck in which generally a single HIV-1 variant from a diverse viral population in the transmitting partner establishes infection in the new host. From the time of infection, HIV genetic diversity emerges rapidly. However, the persisting HIV-1 population

is strongly influenced by immune pressures imposed by its host. To what extent the nature of the virus imprints the immune response and influences its functional evolution to adapt optimally to its host remains unanswered. We analyzed the NAb response and its impact on the evolution of genetic, antigenic and functional properties of envelope glycoproteins in four HIV-1-infected patients belonging to a transmission cluster. This allowed us to investigate if closely related envelope glycoproteins induced similar NAb responses and evolved similarly in different hosts.

We first analyzed the genetic diversity of the HIV-1 quasispecies present in early and late samples using an approach based on NGS. As expected we found that the HIV-1 quasispecies diversity increased from early to late samples in the three untreated patients, contrasting with the fourth patient treated 4 months before collecting the late sample in whom the quasispecies diversity remained stable. However, this low diversity did not mean that the virus did not evolve since the consensus NGS *env* sequence derived from its late sample, like those of the other patients, was genetically more distant from the hypothesized most common ancestor than that derived from its early sample.

The envelope glycoprotein evolution coincided with the capacity of the virus to escape to the pressure exerted by a strong autologous neutralizing response detected in late samples. This evolution allowed also, to a lesser extent, to the virus of a given patient to become more resistant to the heterologous neutralizing responses developed by the other patients of the cluster. This suggested that, if the virus evolved specifically in response to the pressure exerted by its host, some common neutralization escape mechanisms might also be shared. This means that some region of Env may be under the selective pressure exerted by similar NAb responses developed in the four patients. This hypothesis was supported by similar neutralization patterns of their late plasma samples against a panel of 26 heterologous clade B HIV-1 strains, supporting the recent notion that some viral infecting strain may be able to imprint a similar NAb response in different hosts⁴⁶. However, the late plasma from a given individual was still able to neutralize chronic variants from other individuals of the cluster, but showed little or no neutralization of autologous chronic variants. This suggested that

even if patients developed shared NAb responses, a part of the selective pressure might be different between individuals.

We compared the antigenic profiles of the early and chronic envelope glycoproteins of each patient by measuring their sensitivity to a panel of representative HuMobNAbs targeting six regions of vulnerability of the HIV-1 envelope. We hypothesized that if some of these functionally important regions were under the pressure of a similar neutralizing response developed in each patient, their evolution could have a similar impact on the functionality of the envelope glycoproteins. The evolution of sensitivity between early and late viruses was patient-dependent for most HuMobNAbs, supporting the hypothesis that a part of the selective pressure might be different between individuals. However, those targeting V3, PGT121 and 10-1074, were slightly more potent against early viruses than chronic viruses in the four patients, suggesting a similar antibody pressure on this region of Env. Although the main determinants of sensitivity to these antibodies were present both in early and chronic Envs^{54,61, 74-76}, two identical mutations, S321R and N325D were observed in the V3 region of chronic viruses from respectively 3 or 4 patients. These two residues, particularly S321R, were previously shown to be associated with the capacity to use the CXCR4 co-receptor⁶⁶. Accordingly, we observed that all early viruses were CCR5-tropic whereas chronic viruses from 2 patients were able to use the CXCR4 co-receptor. As expected, chronic viruses from these two patients were less sensitive to the CCR5 antagonist MVC. This parallel evolution of V3 with some identical mutations occurring in different patients suggests that in addition to the selective pressure of neutralizing antibodies, the persistence of the virus into its host during late stages of disease may be subject to functional constraints.

To further explore this hypothesis, we analyzed the evolution of other envelope functional properties focusing on cell-entry efficacy and interaction with the CD4 receptor. By comparing viruses for their sensitivity to the fusion inhibitor enfuvirtide, we observed that early viruses were more resistant to ENF than chronic viruses. Given the absence of changes in the HR1 domain of the gp41 in chronic Env compared to early Env, this parallel evolution towards a higher sensitivity to ENF may thus

reflect a lower capacity of fusion. Accordingly, two mutations that may influence the fusion capacity of Env, C640G and T514bisM, were found respectively in the HR2 region of all chronic Env and in the fusion peptide of chronic Env from 3 patients. As these two residues were not described to be part of epitopes restricted by the HLA class I alleles expressed by the four patients⁷⁷⁻⁷⁸(Jones et al., 2004; Sidney et al., 2003), their parallel evolution probably resulted from a selective pressure exerted by the neutralizing response on the Env gp41 subunit. In favor of this hypothesis, the fusion peptide of gp41 was recently highlighted as a new vulnerability site on the envelope glycoprotein of HIV-1⁵⁸. However, the use of bNAbs VRC34.01 and PGT51 that target the fusion peptide did not allow us to highlight this pressure. Probably due to the presence of an additional residue between positions 514 and 515 in the fusion peptide, both early and chronic viruses were shown to be resistant to VRC34.01⁵⁸. All viruses were sensitive to PGT151 but no significant evolution could be observed from the early to the chronic phase of infection. This suggested that the epitope specificity targeted by the antibody response developed in the four patients might be different from that of this bNAb.

We also compared the sensitivity of viruses to a CD4 mimetic miniprotein (M48U1) and observed an increasing resistance from early to chronic viruses suggesting that viruses evolved to a lower capacity to bind CD4. Despite this observation, we were unable to identify molecular determinants in Env sequences that might be responsible of these differences.

In contrast to the results of sensitivity to inhibitors suggesting that chronic viruses were less able to bind CD4 and engage the fusion process than early viruses, we observed that chronic viruses were more infectious than early viruses not only in TZM-bl cells expressing high CD4 levels (similarly to CD4⁺ T cells) but also in MDM expressing low CD4 levels. This observation is associated with an increase of the envelope glycoprotein level into the chronic viruses compared to early viruses. These results suggested that the decrease of functionality of Env regarding the use of CD4 might have been compensated or even reversed by two possible non-mutually exclusive mechanisms, i.e an increase of Env levels to favor the interaction with CD4 and/or a use of co-receptor(s) independently of CD4. In the context of viral evolution within infected individuals, this adaptation (in addition to the

capacity to use the co-receptor CXCR4) might reflect the need for chronic viruses to sustain their replication in other target cells than CD4⁺/CCR5⁺ T cells when these become limiting.

Together, our results demonstrated for the first time the parallel evolution of functional properties of the envelope glycoprotein of HIV-1 in four patients infected with genetically close viruses. This evolution coincided with the viral escape from a strong autologous neutralizing antibody response developed by each patient and the occurrence of several identical mutations (S321R, N325D, T514bisM and C640G) in envelope glycoproteins of their infecting quasiespecies. To strength the concept of a common evolutionary pattern of the same or a similar infecting strain in different hosts, it would be interesting to examine the frequency of these mutations in a control group of 4-5 subjects infected by subtype B viruses, followed at similar early and chronic time points, but who did not belong to a transmission cluster. Among available Env sequences present in databases, the best way to address this question was to compare the Env sequences of transmitter and recipient pairs, focusing on transmission events that occurred during the chronic phase of infection of transmitters. So, we compared Env of recipients with acute infection with Env of chronically infected transmitters in five previously characterized transmission pairs of the Swiss Cohort (T1-R1, T2-R2, T3-R3, T4-R4 and T5-R5 pairs, described in the paper of Oberle et al⁷⁹) and did not observe identical mutations in any of the pairs. Thus, the common evolutionary pattern of Env observed in the different hosts seems to be specific of the infecting strain. This suggests that under the selective pressure of NAb, the capacity of Env to adapt to changing environments may be restricted by functional constraints that limit its evolutionary landscape.

MATERIAL AND METHODS

Study population

Plasma samples collected were collected from four patients enrolled in the ANRS PRIMO cohort⁸⁰. The patients were Caucasian men who have sex with men (MSM), infected by a clade B strain between 2006 and 2007 (Supplementary Table S1). They belong to a transmission cluster identified

by a strong similarity of the *pol* gene (genetic distance < 0.015 substitution/site) and phylogenetic analyses (bootstrap of the cluster 100%)⁸¹. Although we can assume that the viruses belong to a same transmission chain based on molecular evidences, we do not have epidemiological data suggesting that there are direct links such as donor/receiver pairs within them. The estimated date of infection was defined as the date of symptom onset minus 15 days for patients with symptomatic primary infection, or, for asymptomatic patients, the date of the incomplete western blot (presence of antibodies to gp160 and P24) minus 1 month or the midpoint between a negative and a positive ELISA result⁸⁰. Early plasma samples were collected less than 4 months post-infection. Late plasma samples were collected 18 to 24 months after the first sampling of each patient. Except patient 3, who initiated treatment 4 months before the late sample, all patients were antiretroviral-naïve at the time of sampling. National ethics committee approvals were obtained for the cohort [Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) Paris-Cochin and Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France III]. All research was performed in accordance with relevant guidelines and regulations and all patients gave written informed consent to participate.

Human monocytes were isolated from the buffy coat collected from an HIV-1-negative blood donor of the regional blood transfusion center (Etablissement Français du Sang, Tours, France) according to the ethics rules described in the official agreement (CA-PLER-2015 162).

Production of pseudotyped viruses, titration, and analysis of their Env content

Env-pseudotyped viruses expressing full-length Env variants representative of the viral quasiespecies infecting each patient were produced as described previously⁴⁹. Briefly, HIV-1 RNA was extracted from plasma using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen). Full-length (gp160) *env* genes were amplified by nested reverse transcriptase PCR (RT-PCR) using group M *env*-specific degenerated primers and cloned into the mammalian expression vector pCI. The resulting pCI-*env* plasmids representing the amplified virus populations were propagated by transformation of Electromax DH5α electrocompetent *Escherichia coli* (Invitrogen). Env-pseudotyped viruses were produced by

cotransfecting 3×10^6 293T cells with 4 µg of each patient-derived pCI-*env* library and 8 µg of pNL4.3.LUC.R-E-⁸² using FuGene-6 transfection reagent (Promega). Viruses contained in supernatants of 293T cell cultures were harvested 72 h later, purified by filtration (0.45-µm filter), and stored as aliquots at -80°C . For the analysis of the Env content, viral particles were overlaid on a 20% sucrose cushion and pelleted at $87,000 \times g$ for 1.5 h at 4°C . Viral pellets were solubilized overnight at 4°C in 100 µl PBS supplemented with 1% Triton X-100 and an antiprotease cocktail. P24 antigen content was determined by ELISA (INNOTEST® HIV Antigen mAb; Innogenetics). The Env ELISA was performed in Nunc Maxisorp plates (Dutscher) as previously described^{72,83}. A pool of three HuMoNAbs (PGT145, b12, PGT128) was used for the detection of Env captured on D7324 (Aalto Bioreagents Ltd., Dublin, Ireland)-coated microplates. Dilutions of purified gp120IIIB (Advanced Bioscience Laboratories) were used to construct a standard curve.

Part of the *gag* gene encoding the matrix protein (MA) of the viral quasispecies infecting each patient at the early and late phases of infection were amplified by nested RT-PCR and cloned to replace NL4-3 matrix of the pNL4.3.LUC.R-E backbone, as previously described⁸⁴. For each patient, one early- and one late- MA clone whose sequence was identical to that obtained by sequencing the bulk *gag* PCR products by the Sanger method were selected. Env-MA-pseudotyped viruses were produced by co-transfecting 293T cells with patient-derived pCI-*env* and patient *matrix* pNL4.3.LUC.R-E- modified, as described previously⁴⁹.

Titration of viral productions was performed by infecting 1×10^4 TZM-bl cells, with serial fivefold dilutions of viral supernatants in quadruplicate, in the presence of 30 µg/ml DEAE-dextran⁸⁵. Infection levels were determined after 48 h by measuring the luciferase activity of cell lysates using the Bright-Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies). Wells producing relative luminescence units (RLU) >2.5 times the background were scored as positive. The TCID₅₀ was calculated according the Reed and Muench formula⁸⁶ using the Excel macro found at <https://www.hiv.lanl.gov/content/nab-reference-strains/html/home.htm>.

Viral infectivity in TZM-bl cells

Viral infectivity was determined in quadruplicate in TZM-bl cells. Samples of 100 μ L virus stock, normalized to 25 ng P24 were added to 100 μ L culture medium. Aliquots of 1×10^4 TZM-bl cells were added to viruses in the presence of 30 μ g/mL DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48 h by measuring the luciferase activity of cell lysates using the Bright-Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies).

Viral infectivity in monocyte-derived macrophages

Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by negative selection using the EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion (Stemcell technologies, Inc). Monocyte-derived macrophages (MDM) were obtained by allowing harvested monocytes to differentiate into macrophages for 7 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/mL human M-CSF (Miltenyi Biotec). Viral infectivity was determined in eight replicates in MDM. Aliquots of 1.5×10^5 cells were plated the day prior to infection. Cells contained in 100 μ L culture medium were infected with samples of 100 μ L virus stock, normalized to 25 ng P24. Infection levels were determined after 48 h by measuring the luciferase activity of cell lysates using the Bright-Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies).

Neutralization assay

The sensitivity to neutralization of pseudotyped viruses was assessed in TZM-bl cells in two independent experiments performed in duplicate, as described previously^{49,83,85}. After titration, pseudotyped virus stocks were diluted to obtain 400 TCID₅₀/mL in growth medium. Aliquots of 50 μ L were then incubated for 1 h at 37°C with 50 μ L of three-fold serial dilutions of either heat inactivated serum samples or HuMoNAbs PG9, PGT145, NIH45-46^{G54W}, 3BNC117, 10-1074, PGT121, 10E8, 8ANC195 and VRC34.01 (IAVI, NIH AIDS Reagent Program and VRC). The virus-antibody mixture was then used to infect 1×10^4 TZM-bl cells in the presence of 30 μ g/mL DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48 h by measuring the luciferase activities of cell lysates. Results were expressed as mean values. ID₅₀ or IC₅₀ values were respectively defined as the reciprocal of the serum dilution or the antibody concentration required to reduce RLUs by 50%.

These 50% inhibitory dilution or 50% inhibitory concentration values were calculated by linear interpolation, taking into account two observations (i.e., the last serum dilution or HuMoNAb concentration resulting in a decrease in viral infectivity of at least 50% and the first dilution resulting in a decrease in viral infectivity of less than 50%).

Determination of co-receptor usage

Co-receptor usage was determined using U373 MAGI cells (NIH AIDS Reagent Program) stably expressing CD4 and either CCR5 or CXCR4, as described previously⁸⁷.

Inhibition of entry by Enfuvirtide, CCR5 antagonists, and CD4 analogs

TZM-bl cells were used in duplicate to assess the sensitivity of pseudotyped viruses to the fusion inhibitor enfuvirtide (T20), the CCR5 antagonist maraviroc (MVC), and the CD4 inhibitors sCD4 and M48U1 (provided by L. Martin, CEA, Gif sur Yvette, France), as previously described⁷⁵. After titration, pseudotyped virus stocks were diluted to obtain 400 TCID₅₀/mL in growth medium. Aliquots of 50 µL were then incubated for 1 h at 37°C with 50 µL of three-fold serial dilutions of T20, sCD4 or M48U1 (10 µg/mL to 0.0046 µg/mL). The virus-inhibitor mixture was then used to infect 1×10^4 TZM-bl cells in the presence of 30 µg/mL DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48 h by measuring the luciferase activities of cell lysates. IC₅₀ values were defined as the inhibitor concentration reducing RLUs by 50%. Results were expressed as mean duplicate values.

For MVC, 8×10^3 TZM-bl cells per well were plated the day before infection. Cells were first treated for 1 h at 37°C with 150 µL three-fold serial dilutions of MVC (6 µM to 0.3 nM) before adding 50 µL pseudotyped viruses normalized to 400 TCID₅₀/mL. One hundred microliters DMEM medium, supplemented with 30 µg/mL DEAE-dextran, were then added to the cells. Luciferase activity was measured 48 h after infection as described above. CCR5 antagonist susceptibility was expressed as the maximal percent inhibition (MPI) and IC₅₀ values.

Sequence analysis

To analyze the *env* diversity of the viral population in each sample, paired-end sequencing was performed on a MiSeq platform (Illumina), as previously described⁸⁸. 1ng of DNA per sample was necessary to build the sequencing library according to the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, USA). Illumina sequencer output files matching 151 base-pair sequencing reads were processed using the “Biomina Galaxy platform”⁸⁹ after verifying read quality (FastQC algorithm). De novo assembly was performed using the Trinity program and reads were mapped with “Burrows-Wheeler Aligner” (BWA). Finally, nucleotide analyses were done using the Mpileup program. The Shannon entropy was defined as the mean nucleotide diversity at each position of the entire population, excluding gaps. All sequences have been submitted to GenBank and assigned accession numbers SRX6979911 to SRX6979918. NGS Consensus Nucleotide sequences were aligned using CLUSTALW and manually edited. Potential N-linked glycosylation sites (PNGS) were identified using the N-Glycosite tool at the HIV LANL database website (<http://www.hiv.lanl.gov>) and amino acid positions were identified by the use of standard HXB2 numbering. An *env* maximum likelihood tree was computed with RAxML using a GTRGAMMA model of nucleotide substitutions with 1,000 bootstrap replicates. For each sequence, we conducted a BLAST search to identify the most closely related sequences available in the HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov/>). After excluding duplicate sequences, these sequences were downloaded and included in the phylogenetic analysis.

All *matrix* PCR products were sequenced according to the Dye Terminator cycle sequencing protocol (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). All sequences have been submitted to GenBank and assigned accession numbers MN565580 to MN565587. Nucleotide sequences were aligned using CLUSTALW and manually edited. Amino acid positions were identified by the use of standard HXB2 numbering.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites (ANRS, Paris, France). Maxime Beretta was supported by doctoral fellowships from INSERM, the Région Centre and Sidaction (France). We thank the patients and clinicians who participated in the ANRS PRIMO CO6 cohorts. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4.3.LUC.R-E- from N. Landau ; TZM-bl cells from J. C. Kappes, X. Wu, and Tranzyme Inc.; Maraviroc (Cat #11580) ; sCD4 from Progenics; U373-MAGI-CXCR4 and U373-MAGI-CCR5 cells from Dr Michael Emerman; anti-HIV-1 gp120 Monoclonal (PG9, and PGT145) from IAVI ; anti-HIV-1 gp120 Monoclonal (10-1074 and 3BNC117) from Dr. Michel C. Nussenzweig ; anti-HIV-1 gp41 Monoclonal (10E8) from Dr. Mark Connors ; anti-HIV-1 gp41/gp120 Monoclonal (35O22) from Drs. Jinghe Huang and Mark Connors; anti-HIV-1 gp120 Monoclonal (NIH45-46 G54W) from Dr. Pamela Bjorkman ; anti-HIV-1 gp120 Monoclonal (PGT121) from IAVI. We thank Dr. Pamela Bjorkman for providing us with the monoclonal antibody 8ANC195, Dr. Peter Kwong for the monoclonal antibody VRC34.01 and Dr Hugo Mouquet & Valérie Lorin for the monoclonal antibody PGT151.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.Be, M.B.-P., F.B. and M.Br. conceived and designed the experiments. M.Be., J.M., A.M., and A.D. performed the experiments. M.Be. and M.Br. analyzed the data and wrote the article. A.E., C.G., M.-L.C., and L.M. selected and characterized the patient samples. All authors contributed to editing the manuscript.

REFERENCES

1. Zhu, T. *et al.* Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.* **70**, 3098–3107 (1996).
2. Derdeyn, C. A. *et al.* Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* **303**, 2016–2019 (2004).

3. Sagar, M. *et al.* Identification of modifiable factors that affect the genetic diversity of the transmitted HIV-1 population. *AIDS* **18**, 615–619 (2004).
4. Keele, B. F. *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7552–7557 (2008).
5. Abrahams, M. R. *et al.* Quantitating the multiplicity of infection with Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J. Virol.* **83**, 3556–3567 (2009).
6. Sagar, M. *et al.* Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J. Infect. Dis.* **199**, 580–589 (2009).
7. Moore, P. L. The neutralizing antibody response to the HIV-1 Env protein. *Curr. HIV Res.* **16**, 21–28 (2018).
8. Li, B. *et al.* Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C Human Immunodeficiency Virus type 1. *J. Virol.* **80**, 5211–5218 (2006).
9. Gray, E. S. *et al.* Neutralizing antibody responses in acute Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype C infection. *J. Virol.* **81**, 6187–6196 (2007).
10. Bunnick, E. M., Pisas, L., van Nuenen, A. C. & Schuitemaker, H. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **82**, 7932–7941 (2008).
11. Bar, K.J. *et al.* Early Low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PloS Pathog.* **8**, e1002721 (2012).
12. Moore, P. L. *et al.* The C3-V4 region is a major target of autologous neutralizing antibodies in Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype C infection. *J. Virol.* **82**, 1860–1869 (2008).
13. Moore, P. L., Gray, E. S. & Morris, L. Specificity of the autologous neutralizing antibody response. *Curr. Opin. HIV AIDS* **4**, 358–363 (2009).
14. Moore, P. L. *et al.* Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000598 (2009).
15. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4144–4149 (2003).
16. Wei, X. *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307–312 (2003).
17. Dacheux, L. *et al.* Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J. Virol.* **78**, 12625–12637 (2004).

18. Frost, S. D. W. *et al.* Characterization of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B. *J. Virol.* **79**, 6523–6527 (2005).
19. Sagar, M., Wu, X., Lee, S. & Overbaugh, J. Human Immunodeficiency Virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* **80**, 9586–9598 (2006).
20. Rong, R. *et al.* Role of V1V2 and other Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J. Virol.* **81**, 1350–1359 (2007).
21. Bar, K. J. *et al.* Early low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PLoS Pathog.* **8**, e1002721 (2012).
22. Gray, E. S. *et al.* The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4⁺ T cell decline and high viral load during acute infection. *J. Virol.* **85**, 4828–4840 (2011).
23. Wibmer, C. K. *et al.* Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003738 (2013).
24. Hraber, P. *et al.* Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. *AIDS* **28**, 163–169 (2014).
25. Braibant, M. *et al.* Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* **20**, 1923–1930 (2006).
26. Sather, D. N. *et al.* Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *J. Virol.* **83**, 757–769 (2009).
27. Rusert, P. *et al.* Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nature Med.* **22**, 1260–1267 (2016).
28. Sanchez-Merino, V. *et al.* Detection of broadly neutralizing activity within the first months of HIV-1 infection. *J. Virol.* **90**, 5231–5245 (2016).
29. Simonich, C. A. *et al.* HIV-1 neutralizing antibodies with limited hypermutation from an infant. *Cell* **166**, 77–87 (2016).
30. Braibant, M. *et al.* Characteristics of the env genes of HIV type 1 quasispecies in long-term nonprogressors with broadly neutralizing antibodies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **47**, 274–284 (2008).

31. Piantadosi, A. *et al.* Breadth of neutralizing antibody response to Human Immunodeficiency Virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. *J. Virol.* **83**, 10269–10274 (2009).
32. van Gils, M. J. *et al.* Rapid escape from preserved cross-reactive neutralizing humoral immunity without loss of viral fitness in HIV-1-infected progressors and long-term nonprogressors. *J. Virol.* **84**, 3576–3585 (2010).
33. Chaillon, A. *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) continues to evolve in presence of broadly neutralizing antibodies more than ten years after infection. *PLoS One* **7**, e44163 (2012).
34. Wu, F. *et al.* Sequential evolution and escape from neutralization of Simian Immunodeficiency Virus SIVsmE660 clones in rhesus macaques. *J. Virol.* **86**, 8835–8847 (2012).
35. Moore, P. L. *et al.* Multiple pathways of escape from HIV broadly cross-neutralizing V2-dependent antibodies. *J. Virol.* **87**, 4882–4894 (2013).
36. Andrabi, R., Bhiman, J. N. & Burton, D. R. Strategies for a multi-stage neutralizing antibody-based HIV vaccine. *Curr. Opin. Immunol.* **53**, 143–151 (2018).
37. Sok, D. & Burton D. R. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nat. Immunol.* **19**, 1179–1188 (2018).
38. Subbaraman, H., Schanz, M. & Trkola, A. Broadly neutralizing antibodies: What is needed to move from a rare event in HIV-1 infection to vaccine efficacy? *Retrovirology* **15**, 52 (2018).
39. van Chooten, J. & van Gils, M. J. HIV-1 immunogens and strategies to drive antibody responses towards neutralization breadth. *Retrovirology* **15**, 74 (2018).
40. McGuire, A. T. Targeting broadly neutralizing antibody precursors: a naïve approach to vaccine design. *Curr. Opin. HIV AIDS* **14**, 294–301 (2019).
41. Yusim, K. *et al.* Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *J. Virol.* **76**, 8757–8768 (2002).
42. Liu, Y. *et al.* Evolution of Human Immunodeficiency Virus type 1 cytotoxic T-lymphocyte epitopes: fitness-balanced escape. *J. Virol.* **81**, 12179–12188 (2007).
43. Rousseau, C. M. *et al.* HLA class I-driven evolution of Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype C proteome: immune escape and viral load. *J. Virol.* **82**, 6434–6446 (2008).
44. Wang, Y. E. *et al.* Protective HLA class I alleles that restrict acute-phase CD8⁺ T-cell responses are associated with viral escape mutations located in highly conserved regions of Human Immunodeficiency Virus type 1. *J. Virol.* **83**, 1845–1855 (2009).

45. John, M. *et al.* Adaptive interactions between HLA and HIV-1: highly divergent selection imposed by HLA class I molecules with common supertype motifs. *J. Immunol.* 184, 4368–4377 (2010).
46. Kouyos, R. D. *et al.* Tracing HIV-1 strains that imprint broadly neutralizing antibody responses. *Nature* **561**, 406–410 (2018).
47. Chohan, B. *et al.* Selection for Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79, 6528–6531 (2005).
48. Ping, L. H. *et al.* Comparison of viral Env proteins from acute and chronic infections with subtype C Human Immunodeficiency Virus type 1 identifies differences in glycosylation and CCR5 utilization and suggests a new strategy for immunogen design. *J. Virol.* **87**, 7218–7233 (2013).
49. Bouvin-Pley, M. *et al.* Evidence for a continuous drift of the HIV-1 species towards higher resistance to neutralizing antibodies over the course of the epidemic. *PLoS Pathog.* **9**, e1003477 (2013).
50. Li, M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* **79**, 10108–10125 (2005).
51. Diskin, R. *et al.* Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science* **334**, 1289–1293 (2011).
52. Scheid, J. F. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633–1637 (2011).
53. Walker, L. M. *et al.* Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285–289 (2009).
54. Walker, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466–470 (2011).
55. Shingai, M. *et al.* Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277–280 (2013).
56. Huang, J. *et al.* Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**, 406–412 (2012).
57. Scharf, L. *et al.* Antibody 8ANC195 reveals a site of broad vulnerability on the HIV-1 envelope spike. *Cell Rep.* **7**, 785–795 (2014).
58. Kong, R. *et al.* Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibodies. *Science* **352**, 828–833 (2016).

59. Ananthaswamy, N. *et al.* A sequestered fusion peptide in the structure of an HIV-1 transmitted founder envelope trimer. *Nat. Commun.* **10**, 873 (2019).
60. McLellan, J. S., *et al.* Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* **480**, 336–343 (2011).
61. Mouquet, H. *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E3268–E3277 (2012).
62. Garces, F. *et al.* Structural evolution of glycan recognition by a family of potent HIV antibodies. *Cell* **159**, 69–79 (2014).
63. Krumm, S. A. *et al.* Mechanisms of escape from the PGT128 family of anti-HIV broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology* **13**, 8 (2016).
64. Cormier, E.G. & Dragic, T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* **76**, 8953–8957 (2002).
65. Sander, O. *et al.* Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e58 (2007).
66. De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. & Goudsmit, J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* **66**, 6777–6780 (1992).
67. Cardozo, T. *et al.* Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**, 415–426 (2007).
68. Gruppung, K. *et al.* MiniCD4 protein resistance mutations affect binding to the HIV-1 gp120 CD4 binding site and decrease entry efficiency. *Retrovirology* **9**, 36 (2012).
69. Acharya, P. *et al.* Structural basis for highly effective HIV-1 neutralization by CD4-mimetic miniproteins revealed by 1.5 Å cocrystal structure of gp120 and M48U1. *Structure* **21**, 1018–1029 (2013).
70. Madani, N. *et al.* Small-molecule CD4 mimics interact with a highly conserved pocket on HIV-1 gp120. *Structure* **16**, 1689–1701 (2008).
71. Yoshimura, K. *et al.* Enhanced exposure of Human Immunodeficiency Virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J. Virol.* **84**, 7558–7568 (2010).
72. Bouvin-Pley, M. *et al.* Evolution of the envelope glycoprotein of HIV-1 clade B toward higher infectious properties over the course of the epidemic. *J. Virol.* **93**, e01171-18 (2019).
73. Joseph, S.B. & Swanstrom. The evolution of HIV-1 entry phenotypes as a guide to changing target cells. *J. Leukoc. Biol.* **103**, 421–431 (2017).

74. Julien, J. P. *et al.* Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 4351–4356 (2013).
75. Garces, F. *et al.* Affinity maturation of a potent family of HIV antibodies is primarily focused on accommodating or avoiding glycans. *Immunity* **43**, 1053–1063 (2015).
76. Gristick, H. B. *et al.* Natively glycosylated HIV-1 Env structure reveals new mode for antibody recognition of the CD4-binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 906–915 (2016).
77. Brumme, Z. L., Poon, A. F. Y., Carlson, J. M. & Walker, B. D. Identifying HLA-associated polymorphisms in HIV-1 in *HIV Molecular Immunology* (ed Yusim, K. *et al.*) 3-8 (Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2010).
78. Llano, A., Frahm, N. & Brander, C. How to optimally define optimal cytotoxic T lymphocyte epitopes in HIV infection? in *HIV Molecular Immunology* (ed Kuiken, C. *et al.*) I-3-5 (Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2009).
79. Oberle, C. S. *et al.* Tracing HIV-1 transmission: envelope traits of HIV-1 transmitter and recipient pairs. *Retrovirology* **13**, 63 (2016).
80. Goujard, C. *et al.* Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is "HIV controller" status established? *Clin. Infect. Dis.* **49**, 982-986 (2009).
81. Frange, P. *et al.* Recent HIV-1 infection contributes to the viral diffusion over the French territory with a recent increasing frequency. *PLoS One* **7**, e31695 (2012).
82. Connor, R. I., Chen, B. K., Choes, S. & Landau, N. R. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**, 935–944 (1995).
83. Beretta, M. *et al.* Phenotypic properties of envelope glycoproteins of transmitted HIV-1 variants from patients belonging to transmission chains. *AIDS* **32**, 1917-1926 (2018).
84. Beaumont, E. *et al.* Matrix and envelope coevolution revealed in a patient monitored since primary infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **83**, 9875–9889 (2009).
85. Montefiori, D. C. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. *Methods Mol. Biol.* **485**, 395-405 (2009).
86. Reed, L. J. & Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* **27**, 493–497 (1938).
87. Hongjaisee, S. *et al.* Effect of Amino Acid Substitutions Within the V3 Region of HIV-1 CRF01_AE on Interaction with CCR5-Coreceptor. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **33**, 946-951 (2017).
88. Guinoiseau, T. Deep sequencing is an appropriate tool for the selection of unique Hepatitis C virus (HCV) variants after single genomic amplification. *PLoS One* **12**, e0174852 (2017).

89. Afgan, E. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W3-W10 (2016).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Midpoint-rooted maximum likelihood phylogenetic tree of full-length *env* sequences. The consensus *env* representative to the viral population infecting each patient of the cluster was generated by NGS analysis. The eight *env* sequences included in our study were aligned with the most closely related sequences (subtype B) available in GenBank. Two more distant sequences of subtype CRF02-AG were used to outgroup root the tree. Bootstrap values are indicated on the nodes (%) and branch lengths correspond to nucleotide substitutions per site, as indicated in the scale. SE indicates the Shannon entropy measures of NGS-generated sequences.

Fig. 2. Neutralization sensitivity of early and chronic Env-pseudotyped viruses to autologous (panels a and b) and heterologous plasmas (panels c to h). Each virus stock was diluted to 400 TCID₅₀/mL and incubated for 1h at 37°C with serial dilutions of the late plasma sample before infecting TZM-bl cells. Infection levels were determined 48h later by measuring luciferase activity (RLU). **(a,c,e,g)** Results are expressed as percent inhibition of infection of early (dashed lines) and chronic (solid lines) viruses as a function of plasma concentrations. The late plasma sample of patient 3 was not tested due to its contamination by antiretroviral drugs. The data shown are mean results obtained from two independent experiments performed in triplicate. The statistical significance of differences between early and chronic neutralization curves was evaluated using a two-way ANOVA test. **(b,d,f,h)** Histograms represent the neutralizing titers (ID₅₀ values derived from neutralization curves) of late plasma samples against early (dashed bars) and chronic (solid bars) viruses.

Fig. 3. Neutralizing activity of late plasma samples against heterologous strains. **(a)** The heatmap shows the neutralizing titers (ID₅₀) of late plasma samples against heterologous strains. All heterologous strains are tier 2 viruses, except NL4-3 and Bal1 that are respectively tier 1A and tier 1B viruses. Increasing darker colors indicate increasing neutralizing titers. Plasmas were clustered

according to their neutralization profile, using the *Heatmap hierarchical clustering* tool of the HIV Los Alamos database (www.hiv.lanl.gov). **(b)** Comparison of pairwise correlations of neutralizing titers (ID₅₀) of late plasma samples.

Fig. 4. Antigenicity, functional properties and sequence diversity of the V3 region. **(a-b)** Neutralization sensitivity of early and late Env-pseudotyped viruses to bNabs targeting the V3 loop. Each virus stock was diluted to 400 TCID₅₀/mL and incubated for 1h at 37°C with serial dilutions of bNabs PGT121 or 10-1074 before infecting TZM-bl cells. Infection levels were determined 48h later by measuring luciferase activity (RLU). Results are expressed as percent inhibition of infection as a function of PGT121 (panel a) or 10-1074 (panel b) concentrations. The data shown are mean results obtained from two independent experiments performed in triplicate. The statistical significance of differences between early and chronic neutralization curves was evaluated using a two-way ANOVA test. **(c)** Sequence Logo of the V3 regions were generated from NGS sequences. The logo plots denote the conservation of individual amino acids within the viral population of patient samples, the height of each letter indicating the proportion of viral sequences that contain the residue. **(d)** Comparison of co-receptor use of early and chronic viruses. **(e)** Sensitivity of early and late Env-pseudotyped viruses to Maraviroc. TZM-bl cells were incubated for 1h at 37° with serial dilution of Maraviroc. Each virus stock was diluted to 400 TCID₅₀/mL and incubated with TZM-bl cells. Infection levels were determined 48h later by measuring luciferase activity (RLU). Results are expressed as percent inhibition of infection as a function of Maraviroc concentrations. Inhibition curves of viruses from a same patient were represented by a same color, the early virus by a dashed line and the late virus by a solid line. The data shown are mean results obtained from two independent experiments. The statistical significance of differences between early and chronic inhibition curves was evaluated using a two-way ANOVA test. **(f)** Histograms represent the Maraviroc IC₅₀ values (derived from inhibition curves) of late plasma samples against early (solid bars) and chronic (dashed bars) viruses.

Fig. 5. Sensitivity of early and late Env-pseudotyped viruses to CD4 inhibitors. **(a,c)** Each virus stock was diluted to 400 TCID₅₀/mL and incubated for 1h at 37°C with serial dilutions of M48U1 or sCD4 before infecting TZM-bl cells. Infection levels were determined 48h later by measuring luciferase activity (RLU). Results are expressed as percent inhibition of infection as a function of M48U1 (panel a) or sCD4 (panel c) concentrations. Inhibition curves of viruses from a same patient were represented by a same color, the early virus by a dashed line and the late virus by a solid line. The data shown are mean results obtained from two independent experiments performed in triplicate. The statistical significance of differences between early and chronic inhibition curves was evaluated using a two-way ANOVA test. **(b,d)** Histograms represent the M48U1 (panel b) and sCD4 (panel d) IC₅₀ values (derived from inhibition curves) of late plasma samples against early (dashed bars) and chronic (solid bars) viruses.

Fig. 6. Fusion properties and diversity of gp41. **(a)** Sensitivity of early and late Env-pseudotyped viruses to T20. Each virus stock was diluted to 400 TCID₅₀/mL and incubated for 1h at 37°C with serial dilutions of T20 before infecting TZM-bl cells. Infection levels were determined 48h later by measuring luciferase activity (RLU). Results are expressed as percent inhibition of infection as a function of T20 concentrations. Inhibition curves of viruses from a same patient were represented by a same color, the early virus by a dashed line and the late virus by a solid line. The data shown are mean results obtained from two independent experiments performed in triplicate. The statistical significance of differences between early and chronic inhibition curves was evaluated using a two-way ANOVA test. **(b)** Histograms represent the T20 IC₅₀ values (derived from inhibition curves) of late plasma samples against early (dashed bars) and chronic (solid bars) viruses. **(c)** Sequence Logo of fusion peptide and HR2 region of gp41 were generated from NGS sequences. The logo plots denote the conservation of individual amino acids within the viral population of patient samples, with the height of each letter indicating the proportion of viral sequences that contain the residue.

Fig. 7. Infectivity and Env content **(a)** Infectivity in TZM-bl cells and Env content of Env-pseudotyped viruses. The infectivity of early (spotted bars) and chronic (solid bars) viruses, with

inputs normalized for 25ng of p24, was evaluated 48h post-infection by assaying luciferase activity (reported as relative luminescence units or RLU, left axis). Env content of Env-pseudotyped viruses (diamonds) was determined by ELISA, with inputs normalized for 1000ng of p24, using a pool of three HuMoNabs for gp120 detection. Values of Env content were reported as ng of gp120 for 25ng of p24 (right axis). **(b)** Early and late matrix sequences of viruses infecting each patient. The matrix sequences of viruses were aligned with HXB2 reference sequence. Non-conserved residues are in red. **(c)** Infectivity in TZM-bl cells and Env content of Env-MA-pseudotyped viruses. The infectivity and the Env content of Env-MA-pseudotyped viruses were determined as in (a). **(d)** Infectivity in MDM and Env-content of Env-pseudotyped viruses. The infectivity and the Env content of Env-pseudotyped viruses were determined as in (a) except that MDM were used as target cells.

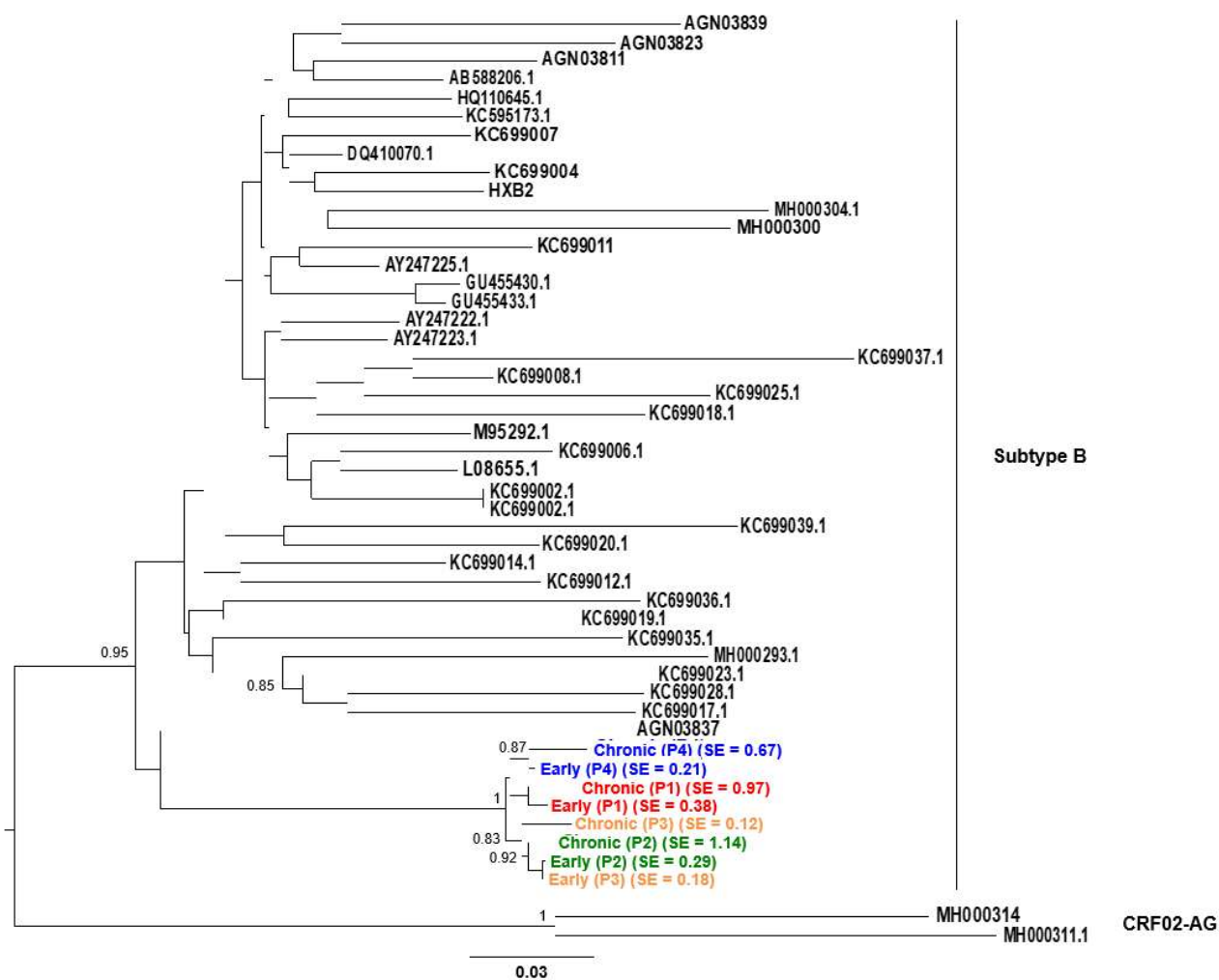


Figure 1

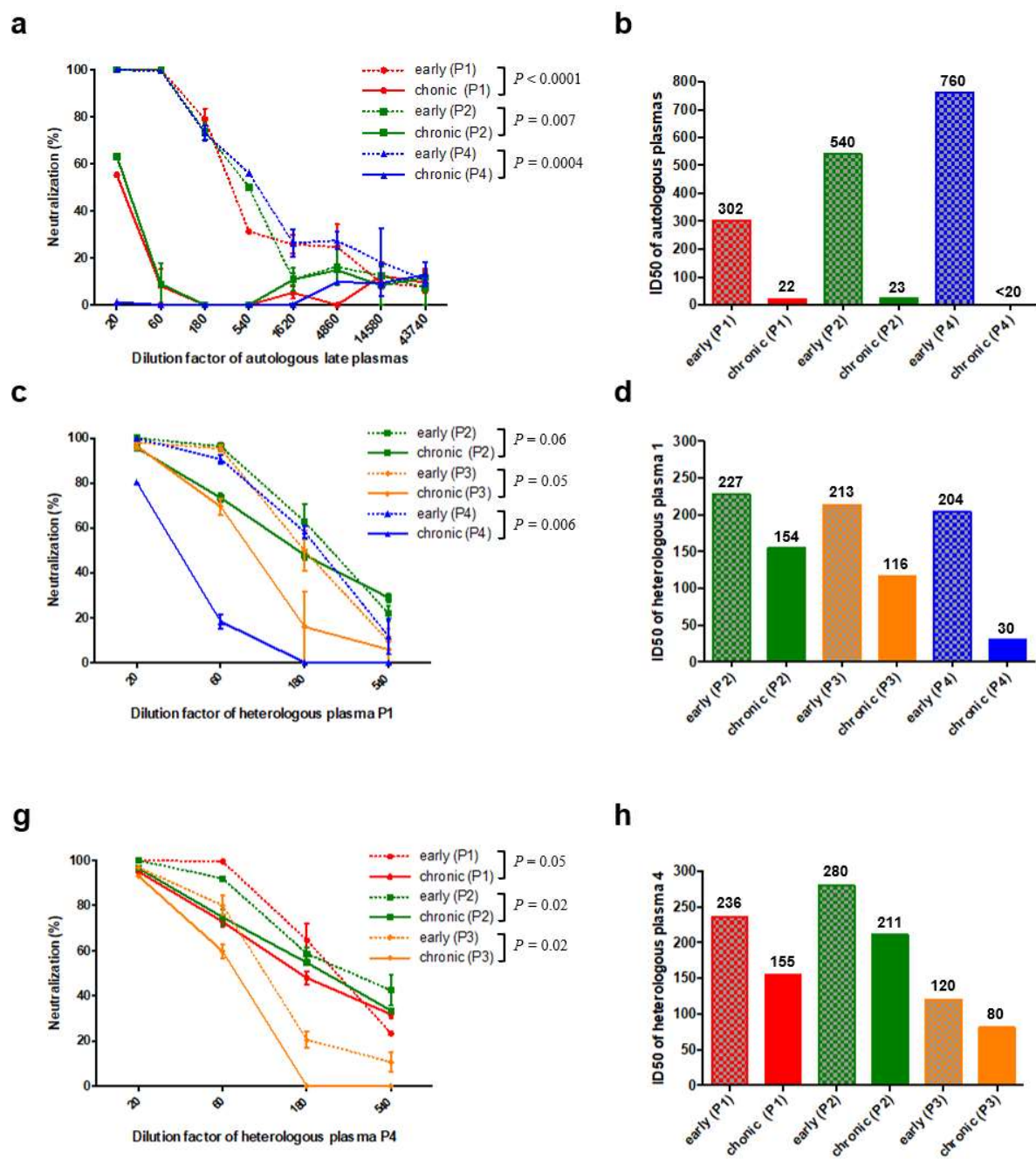
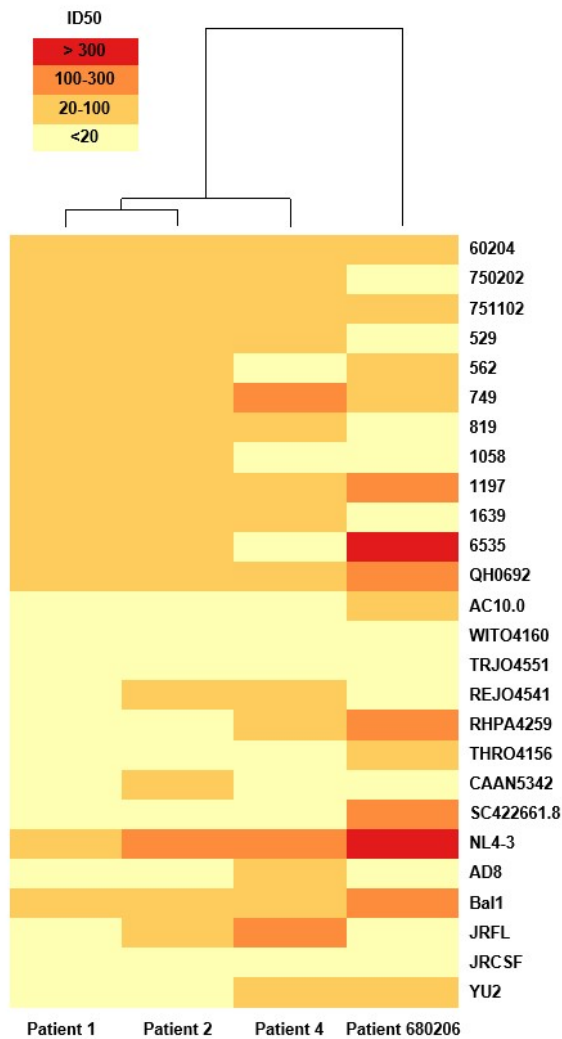


Figure 2

a



b

Pairwise correlations of ID50 of late plasma samples			
Spearman r (p-value)	Patient 1	Patient 2	Patient 4
Patient 2	$r=0.826$ ($P<0.0001$)		
Patient 4	$r=0.581$ ($P=0.002$)	$r=0.675$ ($P=0.00015$)	
Patient 680206	$r=0.194$ ($P=0.342$)	$r=0.260$ ($P=0.199$)	$r=0.0331$ ($P=0.872$)

Figure 3

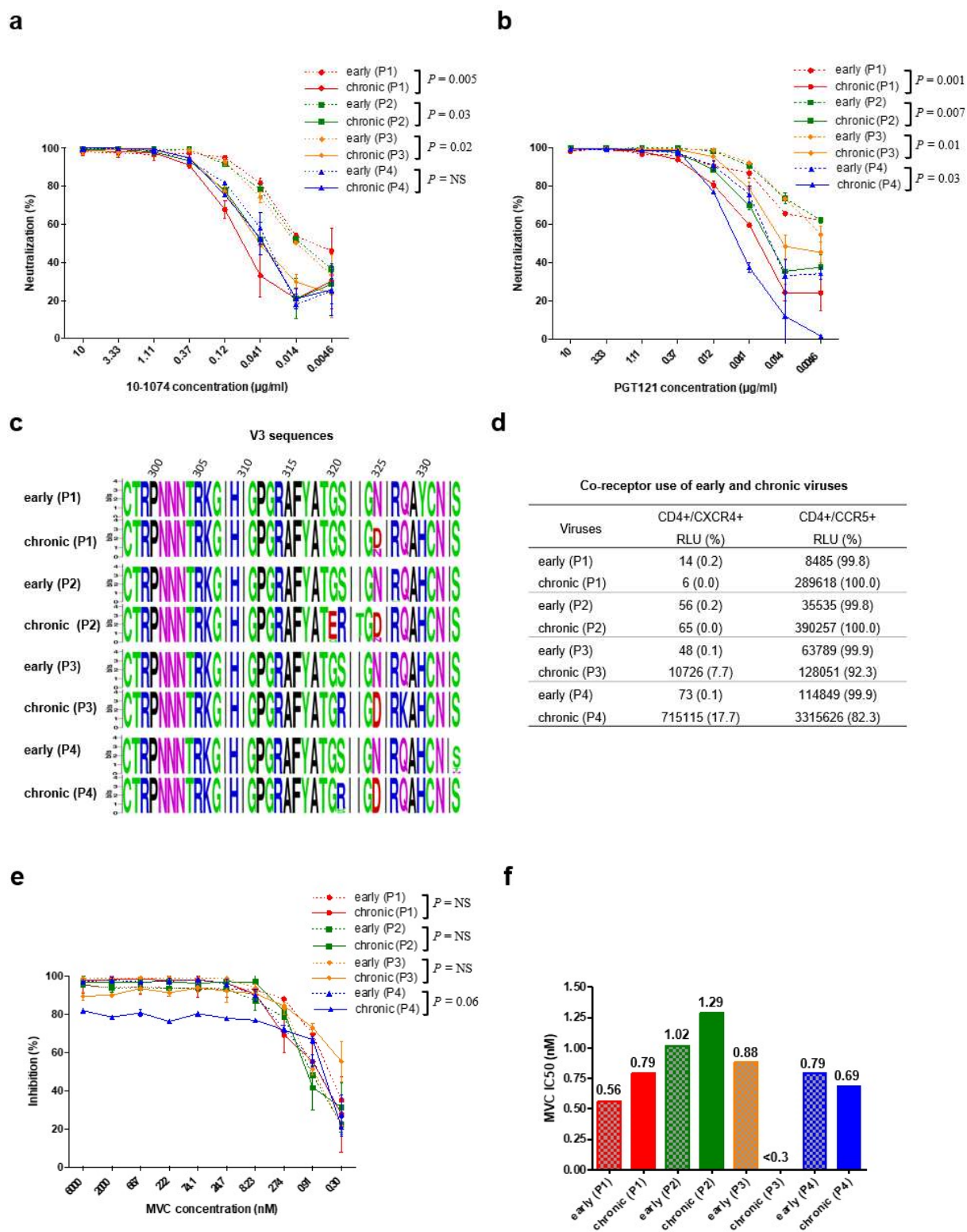
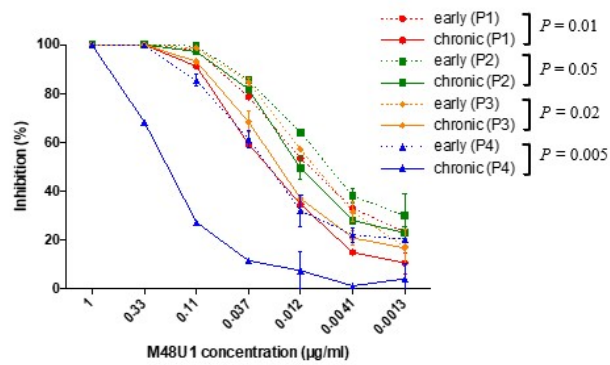
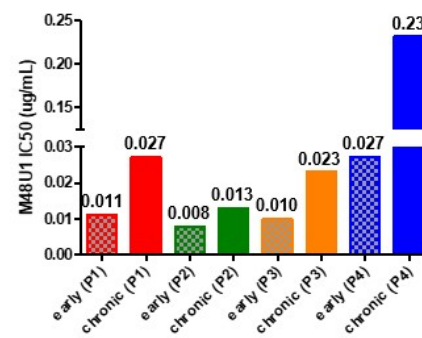
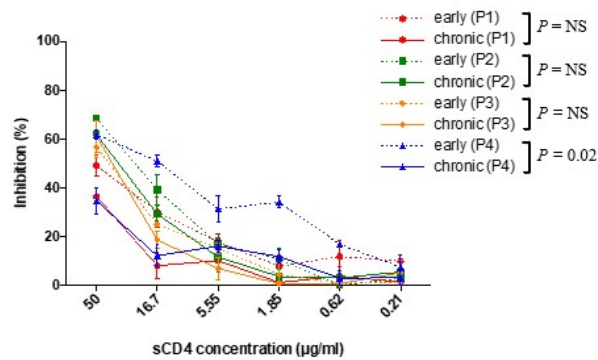
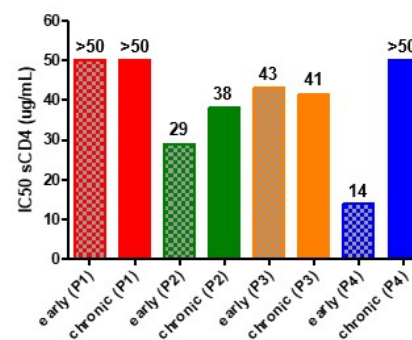


Figure 4

a**b****c****d****Figure 5**

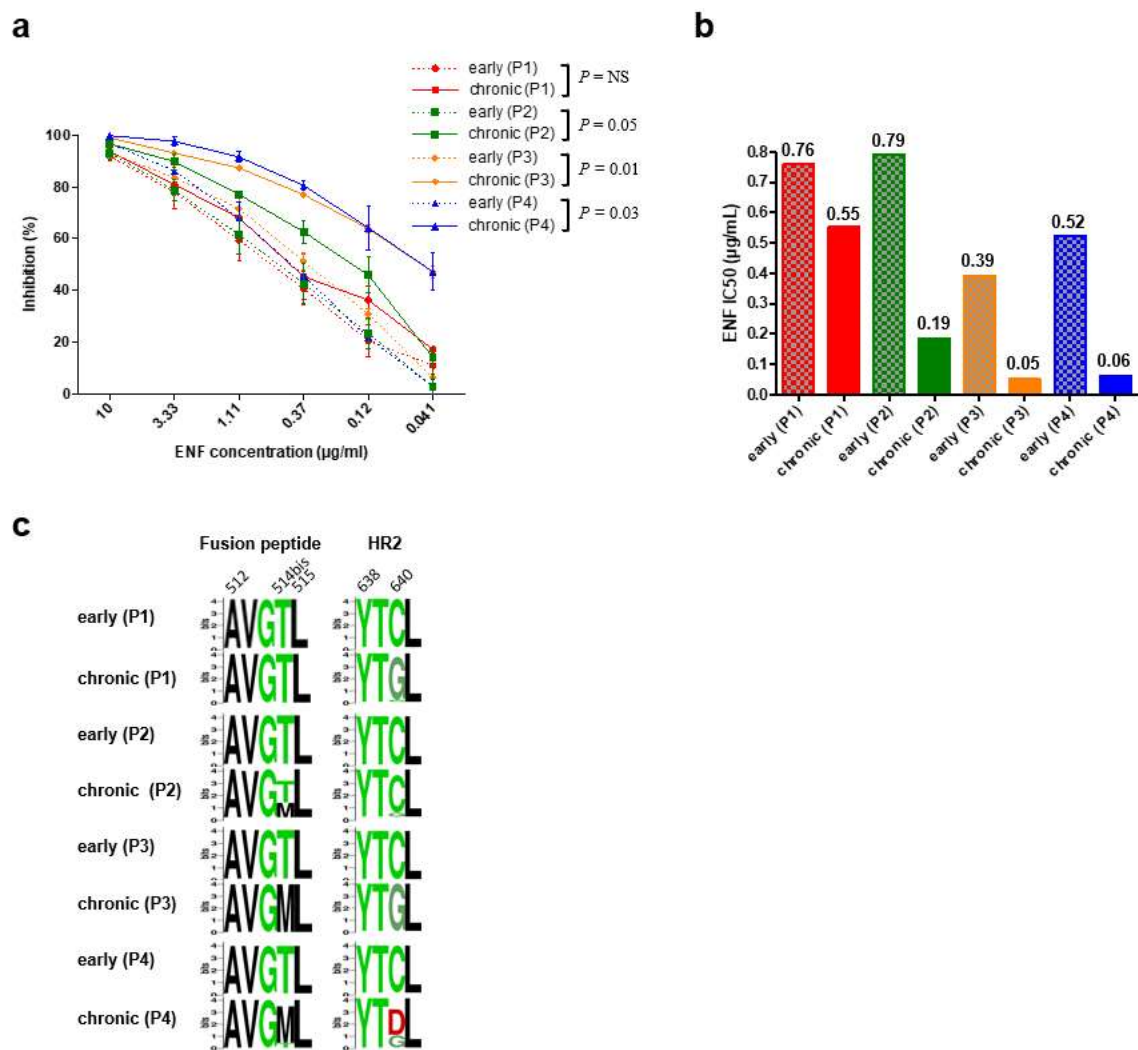


Figure 6

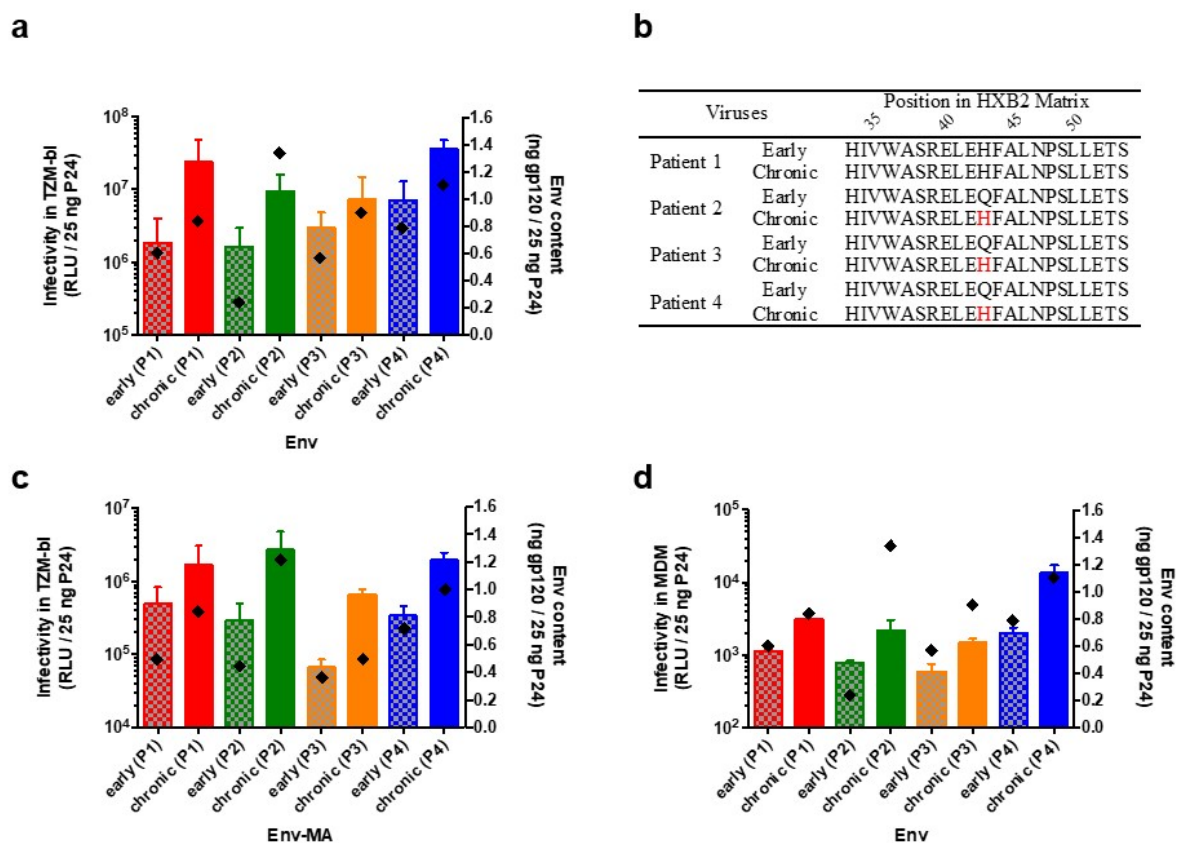


Figure 7

Table 1: Antigenic profile of early and chronic viruses.

Pseudotyped viruses		Neutralizing antibodies titers: IC ₅₀ (μg/mL)									
		CD4 binding site		V1V2		V3		MPER	gp120/gp41 interface	Fusion peptide	
		3BN C117	NIH 45-46 G54W	PG9	PGT 145	10-1074	PGT121	10E8	8ANC195	VRC 34.01	PGT 151
Patient 1	Early	0.06	0.03	>10.0	0.23	< 0.005	< 0.005	0.39	1.72	>10.0	0.05
	Chronic	0.05	0.07	9.84	0.07	0.09	0.03	0.72	2.83	>10.0	0.13
Patient 2	Early	0.10	0.12	8.13	0.08	0.01	< 0.005	0.49	0.83	>10.0	0.20
	Chronic	0.09	0.08	0.96	0.06	0.04	0.01	0.32	0.74	>10.0	0.18
Patient 3	Early	0.09	0.11	7.66	0.12	0.01	< 0.005	0.90	1.28	>10.0	0.07
	Chronic	0.04	0.09	7.39	0.18	0.04	0.02	0.48	1.01	>10.0	0.03
Patient 4	Early	0.05	0.08	>10.0	0.14	0.03	0.02	0.74	1.76	>10.0	0.06
	Chronic	2.77	0.72	2.57	0.09	0.03	0.07	0.81	3.11	>10.0	0.12

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Common evolutionary features of the envelope glycoprotein of HIV-1 in patients belonging to a transmission chain

Maxime BERETTA, Julie MIGRAINE, Alain MOREAU, Asma ESSAT, Cécile GOUJARD, Marie-Laure CHAIX, Aurélie DROUIN, Mélanie BOUVIN-PLEY, Laurence MEYER, Francis BARIN and Martine BRAIBANT.

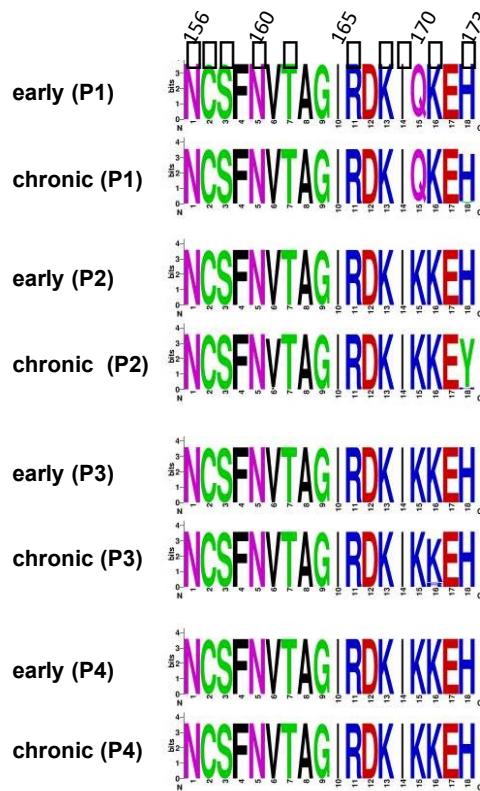
Supplementary Table S1: Characteristics of selected patients at time of blood sample collection

Patient (identification number)	HLA class I alleles			Estimated date of infection	Date of plasma samples	Number of CD4 ⁺ days after cells/m		Plasma viral load (log ₁₀)	Treatment
	A	B	C			infection	m ³		
1 (FHY01223832)	ND	B*14	CW*4	29/01/2006	13/04/2006	74	600	4.44	No
	ND	B*35	CW*8		06/12/2007	676	432	5.19	No
2 (MAA39190018)	A*02	B*44	CW*6	23/12/2006	22/03/2007	89	843	4.33	No
	A*23	B*50	CW*16		12/03/2009	810	658	4.56	No
3 (BDV23265724)	ND	B*44	CW*5	31/12/2006	19/04/2007	109	664	4.58	No
	ND	B*44	CW*16		26/03/2009	816	613	2.27	Yes
4 (EKT55884155)	A*02	B*44	CW*4	28/04/2007	06/07/2007	69	539	4.40	No
	A*29	B*45	CW*6		11/12/2008	593	246	4.52	No

ND: not determined

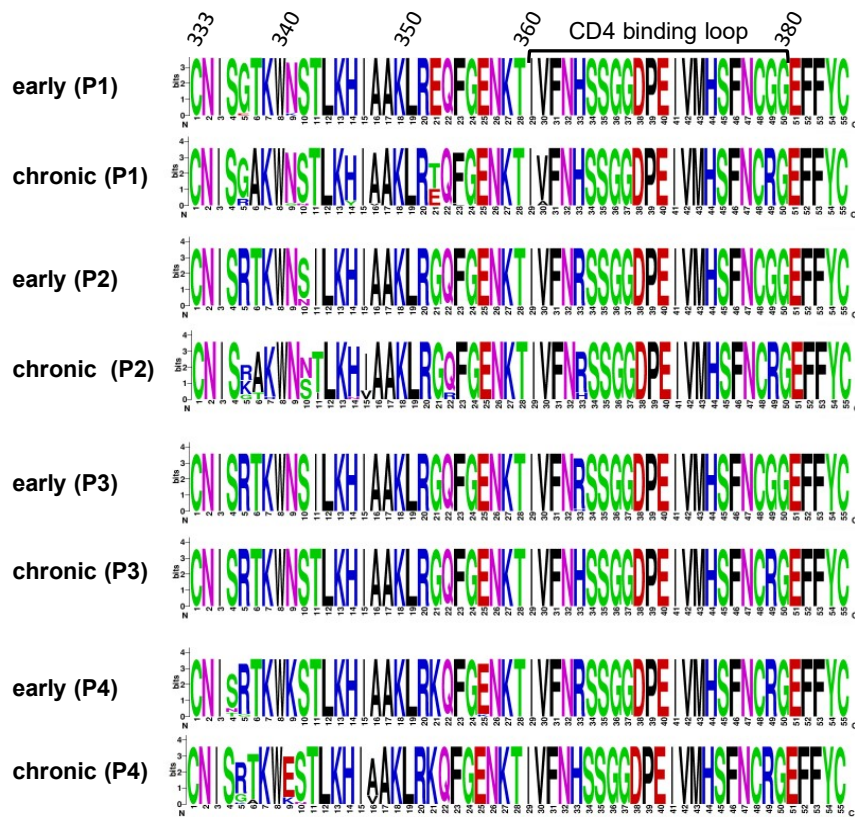
Supplementary Table S2: Length and number of PNGS of gp120 variable regions.

Env sequences		V1		V2		V3		V4		V5	
		PNGS	Length	PNGS	Length	PNGS	Length	PNGS	Length	PNGS	Length
Patient 1	Early	7	38	2	40	1	35	4	33	2	14
	Chronic	6	35	2	43	1	35	5	33	2	14
Patient 2	Early	4	31	2	40	1	35	5	33	2	14
	Chronic	4	28	2	43	1	35	4	32	2	14
Patient 3	Early	4	31	2	40	1	35	5	33	2	14
	Chronic	7	34	2	40	1	35	3	29	2	14
Patient 4	Early	6	38	2	40	1	35	5	33	2	14
	Chronic	4	32	2	40	1	35	4	30	2	16
HxB2		2	27	2	40	1	36	4	34	1	14



Supplementary Figure S1: Alignment of sequences encompassing the PG9 epitope

Sequence Logo of part of V1V2 regions encompassing the PG9 epitope were generated from NGS sequences. The logo plots denote the conservation of individual amino acids within the viral population of patient samples, the height of each letter indicating the proportion of viral sequences that contain the residue. Residues making contacts with PG9 are denoted by dots.



Supplementary Figure S2: Alignment of C3 regions encompassing the CD4 binding loop

Sequence Logo of C3 regions encompassing the CD4 binding loop epitope were generated from NGS sequences. The logo plots denote the conservation of individual amino acids within the viral population of patient samples, the height of each letter indicating the proportion of viral sequences that contain the residue.

Etude de la capacité d'échappement de la glycoprotéine d'enveloppe
du VIH-1 à la restriction de l'infection médiée par la protéine IFITM3**Résumé**

Les protéines IFITM (*InterFeron-Induced TransMembrane proteins*) bloquent l'entrée de nombreux virus dans la cellule hôte non infectée. Dans le cas du VIH-1, il a été montré qu'elles agissent également dans la cellule infectée en s'incorporant au sein des virions lors de leur formation, diminuant ainsi leur capacité à infecter de nouvelles cellules. Plusieurs travaux récents suggèrent que la glycoprotéine d'enveloppe (Env) pourrait jouer un rôle fondamental dans la restriction de l'infection du VIH-1 par les protéines IFITM, en particulier par la protéine IFITM3. Néanmoins la capacité de Env à y échapper n'a été que peu explorée et aucun consensus quant aux mécanismes mis en jeu n'a pu être établi.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons montré que des virus qui ne différaient que par l'Env exprimée à leur surface présentaient des sensibilités variables à la protéine IFITM3. Par l'étude des propriétés antigéniques et fonctionnelles de ces Env et la mise en œuvre de techniques d'immunoprécipitation et de microscopie confocale, nous avons pu mettre en évidence des différences conformationnelles et d'interaction avec la protéine IFITM3 entre les Env sensibles et résistantes. Nos résultats suggèrent que la protéine IFITM3 interagit avec les trimères d'Env matures des virus sensibles à IFITM3, les stabilisant dans un état conformationnel exposant les boucles variables V1V2, empêchant ainsi les changements conformationnels requis pour la fusion des membranes virales et cellulaires. En revanche, les modifications post-traductionnelles subies par les trimères d'Env des virus résistants à IFITM3, bloqueraient l'accès de la protéine IFITM3 à son site de liaison, rendant le trimère d'Env fonctionnel.

En conclusion, nos résultats soulignent l'importance de Env dans la modulation de la sensibilité du VIH-1 à l'inhibition de l'infection par la protéine IFITM3. Ils apportent un éclairage nouveau quant au mécanisme par lequel Env peut échapper à ce facteur de restriction.

Mot clés : VIH-1, glycoprotéines d'enveloppe, IFITM3, facteur de restriction

Abstract

IFITM proteins (*InterFeron-Induced TransMembrane proteins*) block the entry of many viruses into the uninfected host cell. In the case of HIV-1, it has been shown that they are also present in the infected cell and are able to be incorporated into the nascent virions, thus reducing their ability to infect new cells. Several recent works suggest that the envelope glycoprotein (Env) could play a fundamental role in the restriction of the infection of HIV-1 by the IFITM proteins, in particular by the IFITM3 protein. However, the ability of Env to escape this restriction remains poorly explored and no consensus about the mechanisms involved have been established.

In our study, we showed that viruses that differed only in the Env expressed on their surface presented variable sensitivities to the IFITM3 protein. By studying the antigenic and functional properties of these Env and by performing immunoprecipitation and confocal microscopy experiments, we showed differences between sensitive and resistant Envs both in their conformation and their capacity to interact with the IFITM3 protein. Our results suggest that the IFITM3 protein interacts with the mature Env trimer of IFITM3-sensitive viruses, stabilizing a conformational state in which the V1V2 loops are exposed, thereby preventing the conformational changes required for fusion of viral and cell membranes. By contrast, post-translational changes undergone by the Env trimer of IFITM3-resistant viruses would block the access of the IFITM3 protein to its binding site, rendering the Env trimer functional.

In conclusion, our data highlight the important role of Env in modulating the sensitivity of HIV-1 to the inhibition of infection by IFITM3. They provide new information about the mechanism by which Env may escape this restriction factor.

Keyword: HIV-1, envelope glycoprotein, IFITM3, restriction factor