

Université de Montréal

**Étude du rôle de CD47 comme nouvelle cible de la protéine
Vpu du VIH-1 dans la pathogenèse virale**

par Lijun Cong

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Février 2021

© Lijun Cong, 2021

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Étude du rôle de CD47 comme nouvelle cible de la protéine
Vpu du VIH-1 dans la pathogenèse virale**

Présentée par : Lijun Cong

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Woong-Kyung Suh, Ph.D.

Président-rapporteur

Dr Éric A. Cohen, Ph.D.

Directeur de recherche

Dr Daniel Kaufmann, M.D.

Membre de jury

Dr Jimmy Dikeakos, Ph.D.

Examineur externe

Dre Naglaa Shoukry, Ph.D.

Représentante du doyen

RÉSUMÉ

Le remodelage de la membrane plasmique de la cellule-hôte est une des stratégies d'évasion immunitaire utilisée par le VIH-1 pour persister chez un hôte. Une des protéines accessoires du VIH-1, la protéine virale U (Vpu), joue un rôle important dans ce processus en régulant négativement l'expression de plusieurs protéines de surface. Lors d'une étude de protéomique quantitative du protéome de la membrane plasmique des cellules T exprimant Vpu de manière inductible, nous avons identifié le cluster de différenciation 47 (CD47) comme une protéine potentiellement ciblée et régulée négativement par Vpu. CD47 est une protéine multifonctionnelle exprimée de manière ubiquitaire et impliquée dans plusieurs processus cellulaires, telle que l'inhibition de la phagocytose via son interaction avec la protéine régulatrice SIRP α (« signal-regulatory protein alpha »), un récepteur principalement exprimé par les cellules myéloïdes, telles que les macrophages. CD47 module aussi l'apoptose caspase-indépendante directement via son engagement induit par la thrombospondine 1 (TSP-1) ou des anticorps monoclonaux anti-CD47 spécifiques. Les macrophages sont des cellules cibles importantes du VIH-1 qui sont infectés depuis les phases initiales de l'infection malgré l'absence des virus macrophage (M)-tropiques. Plusieurs études ont suggéré que l'infection des macrophages pourrait être le résultat de la phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés.

Dans ce contexte, nous avons examiné si la régulation négative de CD47 par Vpu durant l'infection de cellules T pouvait favoriser la phagocytose par les macrophages et ainsi contribuer à leur infection. Nous avons initialement confirmé que CD47 est régulée négativement par le VIH-1, de manière Vpu-dépendante en utilisant des souches virales de laboratoire ainsi que des souches transmises/fondatrices (T/F). De plus, la coculture des cellules T infectées avec des macrophages dérivés de monocytes (MDMs) a démontré que la régulation négative de CD47 par Vpu provoque la capture et la phagocytose des cellules T infectées par les MDMs. Bien que les MDMs soient peu susceptibles à l'infection par les virus T/F, des expériences de coculture de MDMs avec des cellules T infectées par un virus T/F ont montré l'infection des MDMs et la relâche de particules infectieuses. Sur le plan du mécanistique, nous avons démontré que la déplétion de CD47 médiée par Vpu nécessite le

domaine transmembranaire (TMD) de la protéine, ainsi que les motifs double-sérine (DSGNES, qui permet le recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{βTrCP1/2}) et de trafic (ExxxLV) de Vpu. En effet, Vpu forme un complexe avec CD47 via son TMD et cible CD47 pour la dégradation lysosomale, ce qui est cohérent avec un mode d'action par lequel Vpu perturbe le trafic et/ou le renouvellement de CD47 à la membrane plasmique.

Pour mieux définir les implications fonctionnelles de la régulation négative de CD47 par Vpu, nous avons par la suite évalué si celle-ci a un effet sur l'apoptose. Ainsi, nous avons confirmé que l'anticorps monoclonal anti-CD47 (clone CC2C6) permet d'induire l'engagement de CD47 et provoquer l'apoptose de manière CD47-dépendante. De plus, nous avons démontré que Vpu inhibe la réponse de cellules T infectées à l'apoptose suite à l'engagement de CD47 par l'anticorps CC2C6.

L'ensemble de nos résultats souligne une nouvelle fonction de Vpu dans l'infection des macrophages en augmentant la phagocytose de cellules T infectées via un processus qui implique la régulation négative de CD47 à la surface des lymphocytes. Cette découverte permettra de mettre en lumière de nouveaux mécanismes régissant la transmission intercellulaire du VIH-1 et l'établissement de l'infection dans les macrophages durant les phases précoces de l'infection, une étape clé favorisant une transmission virale systémique et potentiellement l'établissement de réservoirs viraux persistants. Nos résultats mettent en évidence également un nouveau mécanisme par lequel le VIH-1 module l'apoptose de cellules infectées pour optimiser sa réplication et sa dissémination. Une meilleure connaissance de ces processus est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutique et vaccinale contre l'infection par le VIH-1.

Mots-clés : VIH-1, Vpu, CD47, phagocytose, apoptose

ABSTRACT

Remodelling of the host cell plasma membrane is one of the strategies used by HIV to evade host immune responses. One of the accessory proteins of HIV-1, the viral protein U (Vpu), plays a key role in this process by downregulating the expression of several cell-surface molecules. In the context of plasma membrane profiling studies of T cells inducibly-expressing HIV-1 Vpu, we identified the cluster of differentiation 47 (CD47) as a putative target downregulated by Vpu. CD47 is a ubiquitously expressed multifunctional protein involved in many cellular processes, such as inhibition of phagocytosis via its interaction with the signal-regulatory protein alpha (SIRP α), a surface receptor mainly expressed by myeloid cells, such as macrophages. In addition, CD47 modulates caspase-independent apoptosis directly through its ligation induced by thrombospondin 1 (TSP-1) or specific anti-CD47 monoclonal antibodies (mAbs). Macrophages are important targets of HIV-1, they are infected at early stages of infection despite the absence of macrophage (M)-tropic viruses, and several studies suggested that the infection of macrophages might result from phagocytosis of HIV-1-infected CD4⁺ T lymphocytes.

In this context, we investigated whether Vpu-mediated CD47 downregulation during infection of T cells promotes the phagocytosis by macrophages and contributes to their infection. We firstly confirmed that surface CD47 is downregulated by HIV-1, in a Vpu-dependent manner by using either laboratory adapted or transmitted/founder (T/F) strains. Furthermore, cocultures of HIV-1-infected T cells with monocyte-derived macrophages (MDMs) revealed that CD47 downregulation by Vpu promotes capture and phagocytosis of infected T cells by MDMs. Importantly, while MDMs were weakly susceptible to infection by cell-free T/F virus, coculture experiments of MDMs with T/F virus-infected T cells led to infection of MDMs and release of infectious particles. Mechanistically, Vpu-mediated depletion of CD47 was found to require the transmembrane domain (TMD), the SCF ^{β TrCP1/2} E3 ubiquitin ligase-interacting diserine motif (DSGNES), as well as the trafficking motif (ExxxLV) of Vpu. Indeed, Vpu can form a physical complex with CD47 through its TMD and target CD47 for lysosomal degradation, consistent with a mechanism whereby Vpu alters the trafficking and/or turnover of CD47 at the plasma membrane.

To better define the functional implications of the Vpu-mediated CD47 downregulation, we subsequently evaluated whether this would regulate apoptosis. We confirmed that anti-CD47 mAb CC2C6 was able to induce CD47 ligation and promote apoptosis in a CD47-dependent manner. Furthermore, we showed that Vpu inhibited the response of HIV-1-infected cells to apoptosis following CD47 ligation induced by CC2C6 mAb.

Altogether, our results highlight a novel function of Vpu in promoting infection of macrophages by increasing the phagocytosis of HIV-1-infected T cells through a process that involves downregulation of surface CD47. This finding provides new insights into the mechanisms governing the intercellular transmission of HIV-1 and the establishment of infection in macrophages during early stages of infection, a key step for a systematic viral transmission and potentially the establishment of persistent viral reservoirs. Our results also identify a new mechanism by which HIV-1 modulates apoptosis of infected T cells to optimize its replication and dissemination. A better understanding of these processes is important for developing novel therapeutic and vaccine strategies against HIV-1 infection.

Keywords : HIV-1, Vpu, CD47, phagocytosis, apoptosis

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------|
| RÉSUMÉ..... | i |
| ABSTRACT | iii |
| TABLE DES MATIÈRES..... | v |
| LISTE DES TABLEAUX..... | viii |
| LISTE DES FIGURES | ix |
| LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS | x |
| REMERCIEMENTS | xviii |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION | 1 |
| 1. Le Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)..... | 1 |
| 1.1. Problématique..... | 1 |
| 1.2. Classification et diversité du virus | 2 |
| 1.3. Structure et organisation génomique du VIH-1..... | 3 |
| 1.4. Cycle de réplication du VIH-1 | 6 |
| 1.4.1. Les étapes de la phase précoce | 7 |
| 1.4.2. Les étapes de la phase tardive | 9 |
| 1.5. Transfert du VIH-1 de cellule à cellule via des synapses..... | 11 |
| 1.6. Pathogénèse du VIH-1..... | 12 |
| 1.7. La thérapie antirétrovirale | 15 |
| 1.8. Rôles des protéines accessoires dans la pathogénèse virale..... | 16 |
| 1.8.1. Vif..... | 16 |
| 1.8.2. Nef..... | 17 |
| 1.8.3. Vpr..... | 18 |
| 1.8.4. Vpx | 19 |
| 2. La protéine virale U (Vpu) | 20 |
| 2.1. Structure | 20 |
| 2.2. Cibles principales | 21 |
| 2.2.1. CD4..... | 21 |
| 2.2.2. BST2..... | 22 |

| | |
|---|-----|
| 2.3. Autres cibles | 25 |
| 3. CD47..... | 27 |
| 3.1. Structure | 27 |
| 3.2. Principaux ligands extracellulaires..... | 28 |
| 3.2.1. SIRP α , γ | 28 |
| 3.2.2. TSP-1 | 29 |
| 3.3. Signalisations et fonctions..... | 31 |
| 3.3.1. Inhibition de la phagocytose par l'axe CD47/ SIRP α | 32 |
| 3.3.2. Apoptose-médiée par CD47 | 34 |
| 3.3.3. Rôle dans les infections virales | 38 |
| 4. Les macrophages | 39 |
| 4.1. Origines et diversité..... | 39 |
| 4.2. L'infection des macrophages par VIH-1 via la transmission intercellulaire | 40 |
| 4.2.1. Phagocytose des lymphocytes T CD4 ⁺ infectés | 40 |
| 4.2.2. Fusion avec des lymphocytes T CD4 ⁺ infectés | 42 |
| 4.2.3. « Tunneling nanotubes » entre les macrophages..... | 42 |
| 4.3. L'impact de l'infection des macrophages..... | 43 |
| 4.3.1. Dissémination virale..... | 43 |
| 4.3.2. Réservoir viral | 45 |
| 4.3.3. Pathogénèse virale | 46 |
| OBJECTIFS DE LA THÈSE..... | 48 |
| CHAPITRE 2: ARTICLE 1..... | 51 |
| La protéine Vpu du VIH-1 favorise la phagocytose des cellules T CD4 ⁺ infectées par les macrophages via la régulation négative de CD47 | 51 |
| CHAPITRE 3: ARTICLE 2..... | 125 |
| Vpu réduit la susceptibilité des cellules T CD4 ⁺ infectées par le VIH-1 à l'apoptose induite par l'engagement de CD47 | 125 |
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION..... | 146 |
| 1. Régulation de l'expression de CD47 | 146 |
| 2. Les signaux régulant la phagocytose..... | 147 |
| 3. Relâche des particules virales par les macrophages infectés..... | 149 |

| | |
|---|-----|
| 4. Mécanisme..... | 151 |
| 5. L'apoptose induite par l'engagement de CD47..... | 152 |
| 6. Moins de susceptibilité à l'apoptose pour une meilleure dissémination virale via la phagocytose? | 153 |
| 7. Modèle <i>in vivo</i> pour étudier la contribution potentielle de Vpu dans l'établissement du réservoir viral et le développement de stratégie thérapeutique | 155 |
| CONCLUSION | 157 |
| 1. Conclusion générale | 157 |
| 2. Perspectives | 158 |
| 3. Contributions majeures de la thèse..... | 160 |
| RÉFÉRENCES | 161 |
| ANNEXE : ARTICLE 3..... | i |
| Differential control of BST2 restriction and plasmacytoid dendritic cell antiviral response by antagonists encoded by HIV-1 group M and O strains | i |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les autres protéines cellulaires ciblées par Vpu.....26

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----------|
| Figure 1.1. Distribution globale des différents groupes, sous-types et recombina VIH-1. | 3 |
| Figure 1.2. Structures de la particule virale et du génome du VIH-1..... | 5 |
| Figure 1.3. Cycle de réplication du VIH-1. | 6 |
| Figure 1.4. Schéma d’une synapse virologique prototypique..... | 12 |
| Figure 1.5. Schéma de la progression de l’infection par VIH-1. | 14 |
| Figure 1.6. Schéma de la topologie structurale de Vpu..... | 21 |
| Figure 1.7. Dégradation protéasomale de CD4 par Vpu. | 22 |
| Figure 1.8. Antagonisme de BST2 par Vpu. | 24 |
| Figure 1.9. Schéma de la topologie structurale de CD47 avec la séquence cytoplasmique des quatre isoformes..... | 27 |
| Figure 1.10. Ligands extracellulaires de CD47..... | 31 |
| Figure 1.11. Inhibition de la phagocytose par l’interaction CD47/SIRPα. | 33 |
| Figure 1.12. Les voies d’apoptose médiée par CD47..... | 37 |
| Figure 1.13. Macrophages dans la transmission intercellulaire du VIH-1. | 45 |
| Figure 1.14. Résumé des objectifs principaux de la première article..... | 49 |

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

| Abbréviation | Anglais | Français |
|----------------------|--|---|
| ADCC | Antibody-dependent cellular cytotoxicity | Réponse cytotoxique dépendante des anticorps |
| ADN | Desoxyribonucleic acid | Acide désoxyribonucléique |
| ALIX | Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X | Protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose |
| AP-1 | Adaptator protein-1 | Protéine adaptatrice-1 |
| AP-2 | Adaptator protein-2 | Protéine adaptatrice-2 |
| APCs | Antigen presenting cells | Cellules présentatrices de l'antigène |
| APOBEC3G | Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like protein 3G | Polypeptide 3G d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm |
| ARN | Ribonucleic acid | Acide ribonucléique |
| ARNg | Genomic RNA | ARN génomique |
| ARNm | Messenger RNA | ARN messenger |
| ARNP II | RNA polymerase II | ARN polymérase II |
| ARNt ^{lys3} | Transfer RNA 3 for lysine | ARN de transfert 3 pour la lysine |
| ART | Antiretroviral therapy | Thérapie antirétrovirale |
| ATP | Adenosine triphosphate | Adénosine triphosphate |
| BAI-1 | Brain angiogenesis inhibitor-1 | Inhibiteur 1 de l'angiogenèse spécifique du cerveau |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 | Lymphome 2 à cellules B |
| BH | Bcl-2 homology domain | Domaine d'homologie à Bcl-2 |
| BIRC5 | Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 | Inhibiteur 5 de l'apoptose baculoviral contenant des répétitions |
| BLT | Bone marrow, liver, thymus | Moelle osseuse, foie, thymus |
| BNIP3 | Bcl-2/E1B-nineteen kilodalton interacting protein | Protéine de 19 kDa interagissant avec Bcl-2/E1B |
| BST2 | Bone marrow stromal cell antigen 2 | Antigène 2 des cellules stromales de la moelle osseuse |

| | | |
|----------|--|---|
| CA | Capsid | Capside |
| CBD | C-terminal binding domain | Domaine de fixation à C-terminal |
| CCR5 | CC chemokine receptor 5 | Récepteur de chimiokine CC de type 5 |
| CCR7 | CC chemokine receptor 7 | Récepteur de chimiokine CC de type 7 |
| CK-II | Casein kinase-II | Kinase caséine-II |
| CMH I | Major histocompatibility complex class I (MHC I) | Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I |
| CMH II | Major histocompatibility complex class II (MHC II) | Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II |
| Covid-19 | Coronavirus disease 2019 | Maladie à coronavirus 2019 |
| CPI | Pre-integration complex | Complexe de pré-intégration |
| CRFs | Circulating recombinant forms | Formes recombinantes circulantes |
| CTLs | cytotoxic T lymphocytes | Lymphocytes T cytotoxiques |
| CUL4A | Cullin 4A | Cullin 4A |
| CXCR4 | CXC chemokine receptor 4 | Récepteur de chimiokine CXC de type 4 |
| Cyt c | Cytochrome c | Cytochrome c |
| DAP12 | DNAX activation protein of 12 kDa | Protéine d'activation DNAX de 12 kDa |
| DCAF1 | DDB1 and Cullin 4-associated factor 1 | Facteur 1 associé à DDB1 et Cullin 4 |
| DCs | Dendritic cells | Cellules dendritiques |
| DD | Death domain | Domaine de mort |
| DDB1 | DNA damage-binding protein 1 | Protéine 1 liant les dommages à l'ADN |
| DISC | Death-inducing signaling complex | Complexe de signalisation conduisant à la mort cellulaire |
| dNTPs | Deoxynucleotides triphosphate | Désoxynucléotides triphosphate |
| Drp1 | Dynamamin-related protein 1 | Protéine 1 liée à la dynamine |
| DRs | Death receptors | Récepteurs de mort |
| EGF | Epidermal growth factor | Facteur de croissance épidermique |
| Env | Envelope | Enveloppe |

| | | |
|--------|--|--|
| ERAD | ER-associated degradation | Dégradation de protéine associée au RE |
| ESCRT | Endosomal sorting complex required for transport | Complexe de tirage endosomal requis pour le transport |
| FADD | Fas-associated protein with DD | Protéine associée à Fas avec DD |
| Gag | Group-specific antigen | Antigène spécifique du groupe |
| GALT | Gastrointestinal-associated lymphoid tissue | Tissu lymphoïde associé au tube digestif |
| GAPSA | Global arrayed protein stability analysis | Analyse globale de la stabilité des protéines |
| Gas6 | Growth arrest-specific 6 | Protéine spécifique à l'arrêt de croissance 6 |
| GBP-5 | Guanylate binding protein-5 | Protéine 5 associée à la guanylate |
| gp120 | Glycoprotein 120 kDa | Glycoprotéine de 120 kDa |
| gp160 | Glycoprotein 160 kDa | Glycoprotéine de 160 kDa |
| gp41 | Glycoprotein 41 kDa | Glycoprotéine de 41 kDa |
| GPI | Glycosyl-phosphatidylinositol | Glycosylphosphatidylinositol |
| HAART | Highly active antiretroviral therapy | Thérapie antirétrovirale hautement active |
| HAND | HIV associated neurological disorders | Troubles neurocognitifs associés au VIH |
| HBD | Heparin-binding domain | Domaine de fixation à l'héparine |
| HLA-C | Human leukocyte antigen -C | Antigène C des leukocytes humains |
| IAP | Integrin-associated protein | Protéine associée à l'intégrine |
| ICAM1 | Intercellular adhesion molecule 1 | Molécule d'adhésion intercellulaire 1 |
| IFN-I | Type I interferon | Interféron de type I |
| IFTIM3 | Interferon induced transmembrane protein 3 | Protéine transmembranaire 3 induite par l'IFN |
| Ig | Immunoglobulin | Immunoglobuline |
| ILT7 | Ig-like transcript 7 | Ig-like transcript 7 |
| IN | Integrase | Intégrase |
| ITAMs | Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs | Motifs d'activation d'immunorécepteur à base de tyrosine |
| ITIMs | Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs | Motifs d'inhibition d'immunorécepteur à base de tyrosine |

| | | |
|-----------|--|---|
| LCMV | Lymphocytic choriomeningitis virus | Virus de la chorioméningite lymphocytaire |
| LFA-1 | Lymphocyte fonction-associated antigen-1 | L'antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire |
| LILRB1 | Leukocyte Ig-like receptor 1 | Récepteur 1 Ig-like des leukocytes |
| LTR | Long terminal repeats | Longues répétitions terminales |
| MA | Matrix | Matrice |
| mAbs | Monoclonal antibodies | Anticorps monoclonaux |
| MARCH8 | Membrane-associated-RING-CH8 | Protéine RING-CH8 associée à la membrane |
| MCV | Cardiovascular diseases (CVDs) | Maladies cardiovasculaires |
| MDMs | Monocyte-derived macropahges | Macrophages dérivés de monocytes |
| MFG-E8 | Milk fat globule-EGF 8 | Globule gras de lait-EGF 8 |
| MGCs | Multinucleated giant cells | Cellules géantes multinucléées |
| MoM | Myeloid-only-mice | Souris contenant des cellules humaines uniquement de l'origine myéloïde |
| nAbs | Neutralizing antibodies | Anticorps neutralisants |
| NC | Nucleocapsid | Nucléocapside |
| Nef | Negative factor | Facteur négatif |
| NFκB | Nuclear factor kappa B | Facteur nucléaire kappa B |
| NK | Natural killer | Tueur naturel |
| NTB-A | NK, T-cell, B-cell Antigen | Antigène des cellules NK, T et B |
| OMS | World Health Organization (WHO) | Organisation mondiale de la santé |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerase | Polymérase poly (ADP-ribose) |
| PBS | Primer binding site | Site de liaison à l'amorce |
| PD-1 | Programmed cell death protein 1 | Protéine de mort cellulaire programmée 1 |
| pDCs | Plasmacytoid dendritic cells | Cellules dendritiques plasmacytoïdes |
| PD-L1 | Programmed cell death ligand 1 | Ligand de la protéine de mort cellulaire programmée 1 |
| PI(4,5)P2 | phosphoinositide phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate | phosphoinositide phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |

| | | |
|-------------------------|---|--|
| PLP2 | Proteolipid protein 2 | Protéine protéolipide 2 |
| Pol | Viral polymerase | Polymérase virale |
| PPT | Polypurine tract | Région polyurine |
| PR | Protease | Protéase |
| Pr160 ^{GagPol} | Precursor of GagPol 160 kDa | Précurseur de GagPol de 160 kDa |
| Pr55 ^{Gag} | Precursor of Gag 55 kDa | Précurseur de Gag de 55 kDa |
| PRRs | Pattern recognition receptors | Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires |
| PS | Phosphatidylserine | Phosphatidylsérine |
| PSGL-1 | P-selectin glycoprotein ligand 1 | Ligand 1 de glycoprotéine P-selectin |
| PTPases | Protein tyrosine phosphatases | Protéine tyrosine phosphatases |
| PVR | Poliovirus receptor | Récepteur du virus de la Polio |
| RAGE | Receptor for advanced glycation end products | Récepteur des produits de fin de glycation avancée |
| RE | Endoplasmic reticulum (ER) | Réticulum endoplasmique |
| Rev | Regulator of virions | Régulateur des gènes viraux |
| RNaseH | Ribonuclease H | Ribonucléase H |
| ROS | Reactive oxygen species | Espèces réactives de l'oxygène |
| RRE | Rev-responsive element | Élément répondant à Rev |
| SAMHD1 | Sterile alpha motif and histidine aspartate domain-containing protein 1 | Protéine 1 contenant le domaine SAM et le domaine HD |
| SARS-CoV-2 | Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 | Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère |
| SCF | Skp, Cullin and F-box | Skp, Cullin et boîte-F |
| SERINC3/5 | Serine incorporator 3/5 | Incorporateur de sérine 3/5 |
| SIDA | Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) | Syndrome de l'immunodéficience acquise |
| Siglec-10 | Sialic acid-binding Ig-like lectin 10 | Lectine 10 liant à l'acide sialique apparentée à l'Ig |
| SILAC | Stable isotope labeling by amino acids in cell culture | Marquage d'isotopes stables avec des acides aminés en culture cellulaire |

| | | |
|--------------|---|---|
| SIRP | Signal-regulatory protein | |
| SLAMF7 | Signaling lymphocytic activation molecule F7 | Protéine régulatrice de signal |
| SNAT1 | Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 | Transporteur d'acides aminés neutres couplé au sodium |
| SNC | Central nervous system | Système nerveux central |
| SV | Viral synapse | Synapse virale |
| T/F | Transmitted/Founder | Transmis/Fondateur |
| TAR | Transactivation response element | Élément répondant à transactivation |
| Tat | Transcriptional transactivator | Transactivateur transcriptionnel |
| TGF- β | Transforming growth factor- β | Facteur de croissance transformant- β |
| TGN | Trans-Golgi network | Réseau trans-Golgien |
| TI | Reverse transcriptase | Transcriptase inverse |
| Tim-3 | T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3 | Protéine 3 contenant Ig des cellules T et le domaine mucine |
| TMD | Transmembrane domain | Domaine transmembranaire |
| TNF | Tumor necrosis factor | Facteur de nécrose tumorale |
| TNFRSF | TNF receptor superfamily | Superfamille de récepteurs TNF |
| TNT | Tunneling nanotubes | Nanotubes tunneling |
| TRAF-1 | TNF receptor associated factor 1 | Facteur 1 associé au récepteur TNF |
| TSG101 | Tumor susceptibility gene 101 | Gène 101 de susceptibilité tumorale |
| TSP-1 | Thrombospondin-1 | Thrombospondine-1 |
| URFs | Unique recombinant forms | Formes recombinantes uniques |
| VCCs | Virus-containing compartments | Compartiments contenant des virus |
| Vif | Viral infectivity factor | Facteur viral d'infectivité |
| VIH | Human immunodeficiency virus | Virus de l'immunodéficience humaine |
| VIH-1 | Human immunodeficiency virus type 1 | Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 |
| VIS | Simian immunodeficiency virus | Virus de l'immunodéficience simienne |

| | | |
|------------------|--|--|
| VIScpz | Simian immunodeficiency virus of chimpanzee | Virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé |
| VISgor | Simian immunodeficiency virus of gorilla | Virus de l'immunodéficience simienne du gorille |
| Vpr | Viral protein R | Protéine virale R |
| VPRBP | Vpr binding protein | Protéine liant Vpr |
| Vpu | Viral protein U | Protéine virale U |
| vRNP | Viral ribonucleoprotein | Ribonucléoprotéine virale |
| VSV | Vesicular stomatitis virus | Virus de la stomatite vésiculaire |
| vWCD | von Willebrand C domain | Domaine von Willebrand C |
| β -COP | Coatomer subunit beta | Coatomère sous-unité beta |
| β -TrCP1/2 | Beta-transducin repeats-containing proteins 1 or 2 | Protéine 1 ou 2 contenant des répétitions de la beta transducine |
| $\Delta\Psi_m$ | Mitochondrial membrane potential | Potentiel membranaire mitochondrial |

献给敬爱的爸爸妈妈
和亲爱的哥哥嫂嫂
以及我挚爱的远

不积跬步，无以至千里
不积小流，无以成江海

*If you do not accumulate little steps,
You will not have the means to journey a thousand li;
If you do not pile up small streams,
You will have no way to fill a river or a sea.*

- Xun zi/ 荀子
« Encouraging learning » / « 劝学 »

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le docteur Éric A. Cohen, pour sa supervision, sa confiance et surtout pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir mon doctorat. Éric, ce fut un grand honneur de bénéficier de votre enseignement pendant ces dernières années, c'est dans le laboratoire de Rétrovirologie humaine où j'ai appris à faire de la recherche scientifique ! Je tiens à vous remercier du fond du cœur pour le temps et le soutien constant que vous m'avez accordés, et pour m'avoir encouragé à participer aux conférences de renom.

Merci à tous les membres de mon comité de suivi pour leurs conseils qui m'ont permis d'avancer sur mes projets : Dre. Petronela Ancuta, Dr. Woong-Kyung Suh et Dr. Jacques Thibodeau. Merci également à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de réviser mon travail de doctorat et ma thèse : Dr. Woong-Kyung Suh, Dr. Daniel Kaufmann, Dr. Jimmy Dikeakos et Dre. Naglaa Shoukry.

Je veux tout spécialement remercier Tram NQ. Pham pour son aide, ses encouragements et son amitié : « Thank you Tram for everything you did for me, for caring about me like my family ». J'aimerais sincèrement remercier Robert Lodge, j'ai apprécié sa bonne humeur, ses conseils pratiques, sa patience (surtout pour relire ma thèse et mes demandes de bourses), ainsi que nos discussions sur la culture, l'histoire, la politique et la science. Je veux également remercier Mariana Bego, la fille pleine d'énergie : « Thank you Mariana for inspiring me and providing your insights when I was lost ».

Mes remerciements à Frédéric Dallaire et Mélanie Laporte pour leur support dans l'organisation du laboratoire, nous permettant ainsi de travailler plus efficacement. Je veux également remercier tous les collègues que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces années : Scott, Sabelo, Cynthia, Marco, Olga, Oussama, Vandana, Nasser, Jérémy, Alexandre,

Samantha, Jaspreet, Nicolas et Isa. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec une équipe de personnes formidables et expérimentées, qui ont contribué à mon développement scientifique.

Je tiens à remercier infiniment mes parents, mon frère et ma belle-sœur, merci pour votre accompagnement et soutien en tout temps malgré la distance. Il me reste une personne importante à remercier, mon mari Chengyuan, merci pour ta présence, ton support, ta grande patience et ton tendre amour ; tu es mon âme. Aucun mot ne pourrait exprimer à sa juste valeur la gratitude et l'amour que je porte à ma famille.

Je voudrais également remercier l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), le Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie et la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal pour leur soutien financier tout au long de mon doctorat.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Le Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

1.1. Problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent pathogène responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Depuis l'identification du virus en 1983 [1], le nombre d'infections a rapidement augmenté et reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique à travers du monde. En 2019, près de 38 millions de personnes vivaient avec le VIH, et 1.7 millions de nouveaux cas d'infection ont été rapportés durant cette même année [2]. Seulement 25.4 millions de personnes vivant avec le VIH avaient accès à la thérapie antirétrovirale (ART, « antiretroviral therapy ») parmi les 38 millions personnes infectées [2], indiquant que des efforts demeurent à être déployés pour l'amélioration de l'accès au traitement. Depuis la fin de l'année 2019, l'émergence d'un nouveau virus, le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2, « Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 »), a rapidement atteint un niveau pandémique. Basé sur des études actuellement disponibles, les personnes vivant avec le VIH ne sont pas plus à risque d'acquisition de la maladie à coronavirus 2019 (Covid-19, « Coronavirus disease 2019 »), mais l'impact de la co-infection par le VIH-1 et SARS-CoV-2 est toujours sous investigation [3]. Néanmoins, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'accès aux traitements antirétroviraux est gravement perturbé en raison de la pandémie de Covid-19, soulignant l'importance d'une collaboration globale pour surmonter cette situation alarmante [4].

1.2. Classification et diversité du virus

Le VIH-1 fait partie de la famille des rétrovirus (*Retroviridae*), et de la sous-famille *Orthoretrovirinae*. Il s'agit d'un virus enveloppé avec deux brins d'acide ribonucléique (ARN) monocaténares, de polarité positive. Les virus de cette famille se distinguent des autres virus par la présence d'une enzyme virale nommée la transcriptase inverse (TI), qui leur permet de transformer leur génome d'ARN en acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire avant de s'intégrer dans le génome la cellule hôte. Le VIH-1 appartient au genre des Lentivirus, ceux qui sont des rétrovirus non-oncogènes dont les caractéristiques sont qu'ils causent des maladies avec une longue période d'incubation et une réplication virale persistante.

La grande diversité génétique du VIH-1 est l'un des obstacles majeurs pour effectuer un contrôle plus efficace de la pandémie du SIDA [5]. Selon les analyses phylogénétiques, le VIH-1 est classé en quatre groupes distincts : M (« *Major* »), O (« *Outlier* »), N (« *non-M, non-O* »), et P (« *Pending the identification of further human cases* ») [6]. Ces groupes correspondent chacun à une transmission indépendante inter-espèces de virus de l'immunodéficience simienne (VIS) à l'être humain [7]. En causant environ 95% des cas de SIDA, le groupe M est responsable de la pandémie actuelle. Le groupe O est principalement retrouvé dans les pays de l'Afrique de l'Ouest et centrale, notamment le Cameroun, où il représente 1-2% des cas d'infection dans cette région [8]. Les cas d'infection par les virus des groupes N et P sont très rares et principalement observés chez les résidents au Cameroun ou les voyageurs qui ont visité ce pays [9]. Le groupe M était sous-divisé en neuf sous-types ou clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) qui sont génétiquement distincts; le développement du séquençage de génome entier a permis l'identification récente d'un nouveau sous-type, L [10]. Il existe également des formes recombinantes uniques ou circulantes (URFs ou CRFs, pour « *Unique or Circulating Recombinant Forms* », respectivement), qui, par définition, sont issues de la recombinaison de différents sous-types chez un individu quand l'infection par plusieurs sous-types se produit. Les virus recombinants sont définis comme CRFs lorsqu'ils se trouvent chez plus de trois individus ; dans le cas contraire, ils sont considérés comme des URFs.

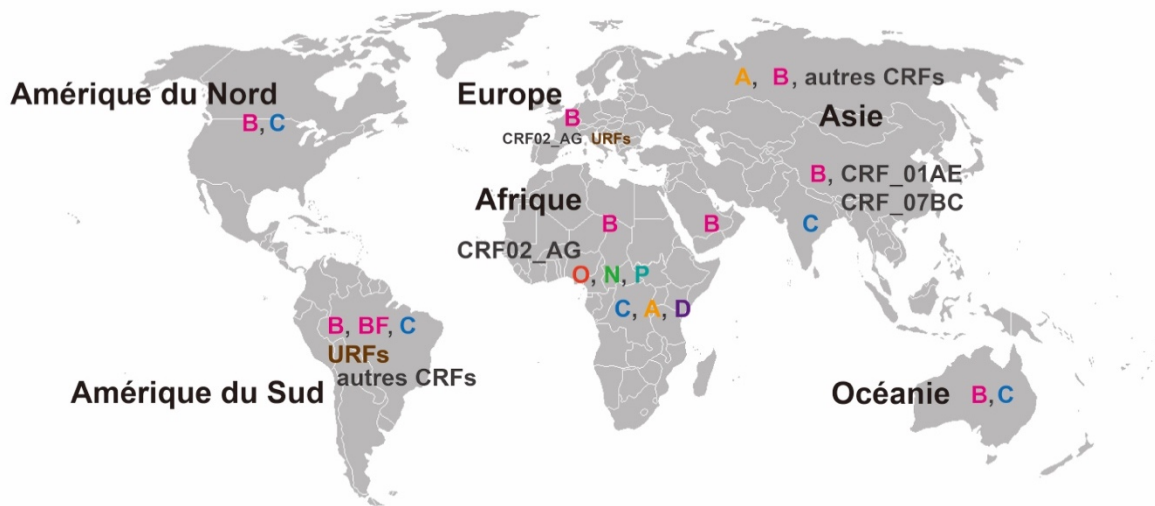


Figure 1.1. Distribution globale des différents groupes, sous-types et recombinants du VIH-1.

Carte du monde illustrant la distribution globale des trois groupes mineurs (O, N, P) du VIH-1, avec des sous-types majeurs du groupe M prédominant et les CRFs/URFs. La carte a été établie à partir des données publiées [8, 9, 11, 12].

1.3. Structure et organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé. Un virion mature mesure environ 145 nm de diamètre [13]. La particule virale est entourée d'une membrane lipidique dérivée de la cellule hôte infectée ; avec l'enchâssement des complexes glycoprotéiques, chaque complexe est formé de trimère de glycoprotéines de surface (gp120) et transmembranaires (gp41) liées de manière non covalente. À l'intérieur de la membrane virale se trouvent des protéines structurales telles que la matrice (MA, p17), la capside (CA, p24) et la nucléocapside (NC, p7) (Figure 1.2A). Dans la capside de forme conique se trouvent le génome viral constitué de deux molécules d'ARN simples brins sous forme du complexe de ribonucléoprotéine virale (vRNP, « viral ribonucleoprotein ») qui est recouvert et condensé par la protéine de la NC, et associée avec les enzymes TI et intégrase (IN, p13) [14]. La TI (p66/p51) a pour fonction, comme précédemment expliquée, de convertir l'ARN en ADN par l'étape de transcription inverse;

l'IN permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. De plus, des protéines accessoires (Vpr, Nef et Vif) sont aussi présentes au sein de la capsid. L'autre enzyme essentielle pour la réplication est la protéase (PR) qui se situe entre la MA et la CA, elle a pour fonction d'assister le clivage des poly-protéines nouvellement synthétisées afin de générer des protéines matures.

Appariés par des liaisons non-covalentes, les deux brins identiques d'ARN monocaténaire constituent le génome du VIH-1, qui est environ de 10 kb codant pour 15 protéines virales. L'ADN proviral est généré suite à la transcription inverse de l'ARN génomique (ARNg) viral en l'ADN proviral intégré dans le génome de la cellule hôte. Cet ADN proviral est flanqué à chaque extrémité par la séquence terminale longue répétée ou LTR (« Long terminal repeat ») [15]; le 5' LTR contient le promoteur ainsi que des séquences qui modulent positivement ou négativement la transcription. Le génome contient les gènes *gag*, *pol* et *env* codant pour les poly-protéines, qui sont clivées après la maturation et permettent la génération des protéines structurales et enzymatiques virales. Le gène *gag* code pour le précurseur Pr55^{Gag}, dont la maturation permet de générer les protéines MA, CA, NC et p6. Le gène *pol* code pour les protéines enzymatiques PR, TI et IN. Un précurseur Pr160^{GagPol} est également produit par changement de cadre de lecture ribosomique avec l'addition de PR, TI et IN au niveau de Pr55^{Gag}. Le gène *env* code pour le précurseur gp160, qui se forme en trimère et subit ensuite un clivage par la protéase furine au niveau du réseau trans-Golgien (TGN, « Trans-Golgi network »), en donnant deux fragments associés de manière non-covalente : la gp120 permet la fixation au récepteur CD4, et la gp41 qui induit la fusion des membranes virale et cellulaire [16]. Les séquences additionnelles codent pour les protéines régulatrices (Tat et Rev) et accessoires (Vif, Nef, Vpr et Vpu). La fonctionnalité de ces protéines sera présentée dans les sections ci-dessous.

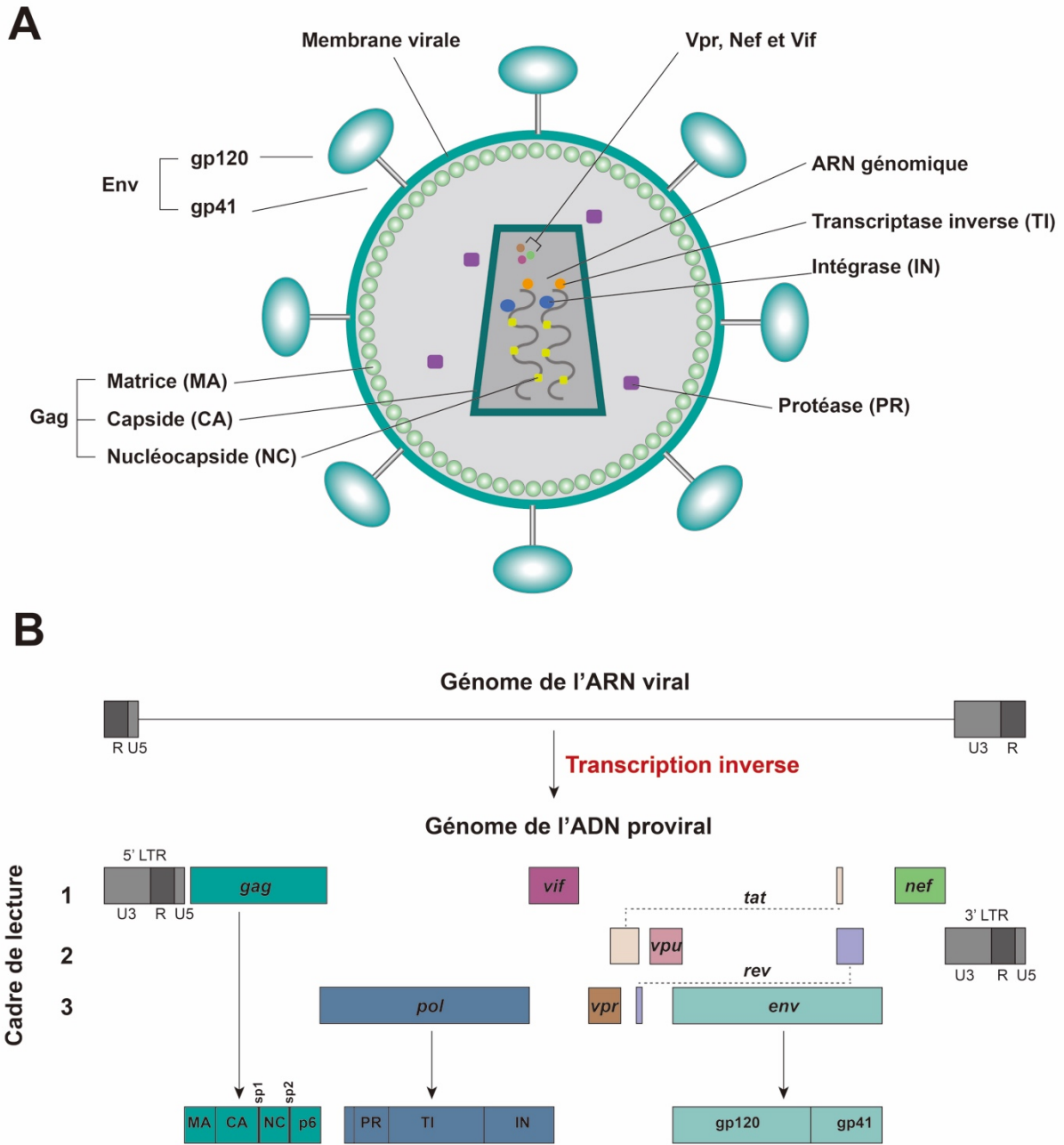


Figure 1.2. Structures de la particule virale et du génome du VIH-1.

(A) Schéma illustrant une particule virale mature du VIH-1. (B) Organisation du génome du VIH-1 sous formes de l'ARN viral et de l'ADN proviral. Les positions verticales des barres colorées indiquent les trois différents cadres de lecture codant pour les protéines virales. La figure a été établie à partir des données publiées [15, 17].

1.4. Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 inclut plusieurs étapes essentielles (Figure 1.3) : pour générer des particules virales matures et infectieuses. Il se divise en une phase précoce (de l'entrée jusqu'à l'intégration) et une phase tardive (de la transcription jusqu'à la production de particule virale infectieuse).

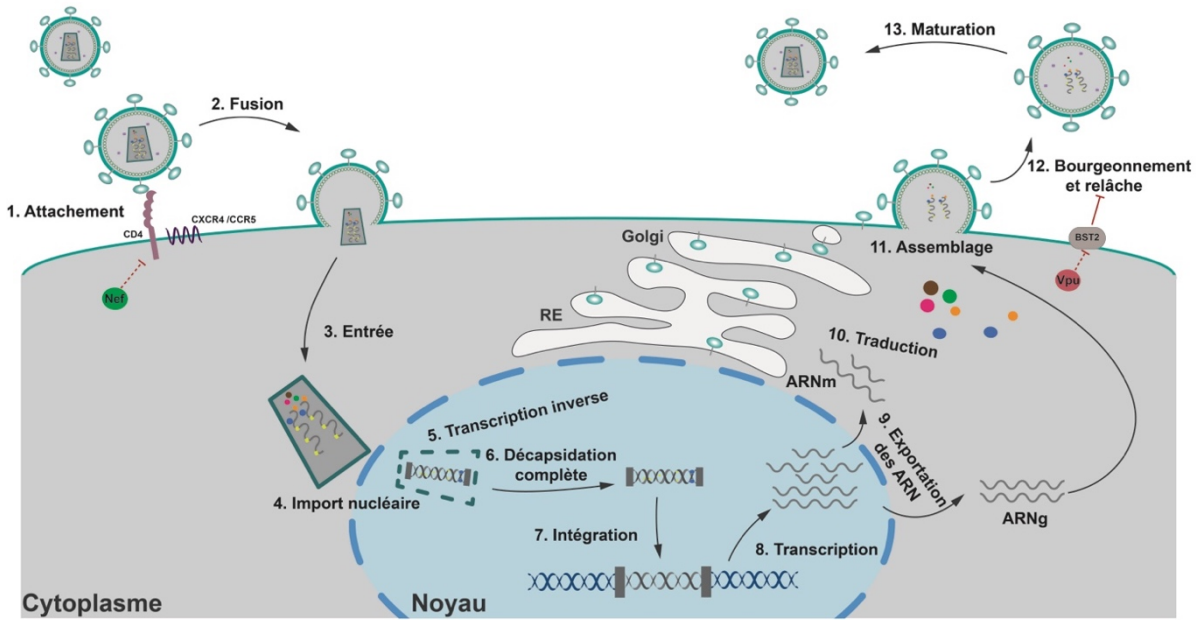


Figure 1.3. Cycle de réplication du VIH-1.

Schéma illustrant les étapes principales du cycle de réplication du VIH-1. L'entrée virale est médiée par l'attachement de l'enveloppe au récepteur CD4 et un corécepteur (CXCR4 ou CCR5). Après la fusion entre la membrane virale et la membrane plasmique, la capside contenant l'ARNg est transférée dans le noyau. La transcription inverse et la décapsidation se complètent à proximité d'un pore nucléaire. L'ADN viral est ensuite intégré dans le génome de cellule hôte. L'ARNP II permet par la suite la transcription des gènes : d'abord, les ARNm entièrement épissés sortent du noyau pour la synthèse des protéines précoces (Tat, Rev et Nef). Les ARNm partiellement épissés et non-épissés sortent à l'aide de Rev; les premiers codent pour Env, Vif, Vpr et Vpu ; les derniers codent pour les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} et servent d'ARNg pour la production des nouveaux virions. La traduction s'effectue dans le cytoplasme, sauf pour le précurseur d'Env gp160, qui est traduit dans le RE et la voie sécrétoire, où il est glycosylé et clivé par la furine en gp120 et gp41. L'assemblage se complète ensuite à la membrane plasmique, où les virions bourgeonnent puis sont relargués, et deviennent matures après le clivage par la PR pour obtenir des particules virales infectieuses. La figure a été établie à partir des données publiées [18-20].

1.4.1. Les étapes de la phase précoce

L'entrée dans une cellule hôte initie le cycle de réplication du VIH-1. Ceci commence par l'attachement du virus à la surface de la cellule hôte et finit par la fusion des membranes virale et cellulaire, avec ensuite la libération de la capsid virale dans le cytoplasme cellulaire. La fixation au récepteur primaire CD4 induit un changement conformationnel de la gp120 qui expose sa boucle variable 3 (V3), lui permettant d'interagir avec le corécepteur, CXCR4 (« CXC chemokine receptor 4 ») ou CCR5 (« CC chemokine receptor 5 »). Le choix du corécepteur est le déterminant majeur du tropisme viral des isolats du VIH-1 [21]; généralement, les isolats utilisant CCR5 (virus R5) sont responsable pour la transmission virale, tandis que les isolats utilisant CXCR4 (virus X4) ou les deux (bi-tropique, virus R5X4) émergent plus tard durant la progression de la maladie [22-25]. L'engagement du corécepteur provoque des changements de conformation additionnels dans la gp41, entraînant la translocation et l'insertion du peptide de fusion hydrophobique, qui se situe à l'extrémité N-terminale de gp41, dans la membrane cellulaire. Le segment C-terminal transmembranaire (TM) de gp41 se trouve dans la membrane virale. Des réarrangements subséquents aboutissent à la conformation repliée de la gp41 en une structure d' « épingle à cheveux », formant un faisceau de six hélices qui permet le rapprochement et l'alignement des segments du peptide de fusion et du TM. Ceci mène à la fusion des deux membranes [26, 27] et la formation du pore de fusion, via lequel la capsid virale est délivrée dans le cytoplasme de la cellule cible.

La capsid d'un virus mature comprend environ 1,500 unités de protéines de capsid, appelées capsomères, qui s'assemblent et forment une structure en treillis avec environ 200 hexamères et 12 pentamères [28]. Le désassemblage des capsomères est régulé par un processus appelé **la décapsidation**, qui s'est produite avant l'intégration de l'ADN proviral dans les chromosomes de la cellule hôte. Au cours des dernières décennies, cette étape étaient considérée comme un évènement cytoplasmique, car des études ont proposé qu'une capsid intacte mesure ~61 nm de diamètre [13], ce qui est supérieure qu'au diamètre d'un pore nucléaire de ~39 nm [29]. Cependant, plus en plus d'études supportent un autre modèle de décapsidation, qui aurait lieu aux pores nucléaires, et qui impliquerait l'amarrage de la capsid intacte, et une décapsidation progressive qui serait complète après l'entrée dans le noyau [30-

32]. Des études plus récentes également montrent que l'import nucléaire de la capsid se déroulerait avant la transcription inverse et la décapsidation, et affirment que ces dernières auraient lieu dans le noyau à proximité des sites d'intégration [32-34]. Néanmoins, le timing et le niveau de cette désorganisation structurelle est critique pour la transcription inverse, car des mutations au niveau de la protéine CA aboutissant à la déstabilisation de la structure de la capsid entraîne un défaut sévère de la transcription inverse, probablement en raison de la dégradation prématurée des composantes essentielles, y compris l'IN [30]. Il semble donc y avoir une relation séquentielle entre les processus de décapsidation et la transcription inverse de l'ARNg viral.

La **transcription inverse** de l'ARNg du VIH-1 en l'ADN bicaténaire est une étape clé au cours de l'infection virale [35]; c'est d'ailleurs une cible importante pour plusieurs drogues antirétrovirales [36]. L'enzyme TI joue un rôle central dans cette étape en catalysant la réaction [37, 38]; elle est encapsidée dans les virions avec les deux copies d'ARNg chacune associées à l'ARN de transfert lysine 3 de la cellule hôte ($\text{ARNt}^{\text{lys3}}$) qui fonctionne comme l'amorce pour l'initiation de la transcription inverse [39]. La réaction commence par l'association de l' $\text{ARNt}^{\text{lys3}}$ à la séquence complémentaire située dans la région PBS (« Primer binding site ») de l'extrémité 5' de l'ARNg. La synthèse de l'ADNc permet ensuite la formation d'un hybride ADN/ARN, qui est reconnu et clivé par le domaine RNaseH de la TI; l'ARNg est ainsi dégradé. Lorsque la réaction à cette extrémité se termine, le brin d'ADNc nouvellement synthétisé de polarité négative est transféré à l'extrémité 3' de l'ARNg et la synthèse de l'ADNc se poursuit. Parallèlement, l'ARNg est dégradé par la RNaseH, à l'exception du fragment PPT (« Polypurine tract ») qui lui est résistant. Le fragment PPT restant sert d'amorce pour la synthèse du brin positif qui s'étend jusqu'à la région PBS. La région PBS dans la séquence complémentaire favorise le transfert du brin, et la synthèse de ce brin de polarité positive continue. L'extension des deux brins permet la synthèse complète de l'ADN viral linéaire bicaténaire, qui reste associé à des protéines cellulaires et virales en formant le complexe de pré-intégration (CPI). Il faut souligner que la TI ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5' pour la relecture et le mécanisme d'édition, entraînant ainsi un taux d'erreurs très élevé [40].

Tel que mentionné ci-dessus, le CPI contient l'ADN viral, l'IN, la CA et des protéines cellulaires; il est libéré dans le noyau et régule l'**intégration** de l'ADN viral dans le génome cellulaire. L'IN est codée par le gène *pol*; l'enzyme IN mature, composée de trois domaines différents au niveaux structurel et fonctionnel [41-43], est dérivée de la poly-protéine Gag-Pol suite au clivage par la protéase virale [44]. Le domaine N-terminal de l'IN contient un motif pour la liaison du zinc; le domaine central est responsable de l'activité enzymatique, enfin le domaine C-terminal permet la liaison avec l'ADN de manière non spécifique. L'IN se multimérise au bout de LTR viral, et clive deux nucléotides à chaque extrémité 3' de l'ADN viral, générant ainsi des extrémités 3'-hydroxyle encastrées et chimiquement réactives. Ces extrémités 3' se lient ensuite aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cible de manière covalente, formant un intermédiaire d'ADN recombinant avec des cassures simple-brin au site d'intégration, qui sont finalement réparées par la machinerie cellulaire.

1.4.2. Les étapes de la phase tardive

L'ADN viral intégré sert de matrice pour la **transcription**. L'ARNm viral est ainsi transcrit par la machinerie de l'ARN polymérase II (ARNP II) [45], qui est recrutée au promoteur situé dans LTR 5' [46]. L'expression optimale des gènes du VIH-1 dépend des protéines régulatrices Tat et Rev, qui sont codées par les ARNm entièrement épissés produits immédiatement après l'infection. Le rôle principal de Tat est d'activer l'élongation à partir du LTR, permettant ainsi la synthèse des transcrits pleine-longueur. Pour ce faire, Tat interagit avec un élément tige-boucle d'ARN appelé TAR (« transactivation response element ») présent dans le LTR [47]; le facteur d'élongation P-TEFb est ensuite recruté au LTR via l'interaction avec Tat et TAR. Ceci induit la phosphorylation de l'ARNP II au domaine C-terminal, permettant ainsi une activation efficace de l'élongation via le désassemblage de facteurs inhibant l'élongation des ARNm [46].

Au fur et à mesure que s'effectue la transcription efficace, les ARNm partiellement épissés et non-épissés sont produits; ceux-ci s'accumulent dans le noyau en absence de Rev. Tel que mentionné au-dessus, Rev est codée par les ARNm entièrement épissés, qui ont la capacité de quitter le noyau et qui permettent la synthèse de Tat, Rev et Nef au début de l'infection. La protéine Rev se déplace ensuite au noyau et s'implique dans l'**export nucléaire** des ARNm partiellement épissés et non-épissés. Le transport régulé par Rev nécessite son interaction avec un élément d'ARN hautement structuré appelé RRE (« Rev-responsive element ») [48], les ARNm contenant RRE sont ainsi transférés au cytoplasme où la **traduction** s'effectue. Les ARNm partiellement épissés codent pour l'enveloppe virale Env du VIH-1 et les protéines accessoires Vif, Vpr et Vpu ; tandis que les ARNm non-épissés pleine-longueur codent pour la poly-protéine (Pr55^{Gag} ou Pr160^{GagPol}), et servent également d'ARNg pour les virions [49, 50].

L'**assemblage** des virions s'effectue au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Ce processus est régi par le précurseur des protéines structurales Pr55^{Gag}, qui consiste en les domaines mentionnés auparavant : MA, CA, NC et p6, ainsi que deux courts peptides de séparation (sp1 et sp2) [51]. La poly-protéine Pr160^{GagPol} contient tous les éléments de Pr55^{Gag} plus les enzymes virales PR, TI et IN. Le domaine MA est myristylé et contient une région hautement basique qui s'associe avec le PI(4,5)P2 («phosphoinositide phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate») membranaire, permettant ainsi l'ancrage de Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} à la membrane plasmique [52]. Il faut souligner que la production et l'incorporation du précurseur Pr160^{GagPol} est relativement plus bas par rapport au précurseur Pr55^{Gag} (~1 : 20) en raison d'un changement de cadre de lecture ribosomique [53, 54]. Le domaine CA, via l'interaction CA-CA, provoque l'oligomérisation de Gag qui est nécessaire pour l'assemblage des virions immatures et la formation subséquente de la capsidie conique des virions matures [55]. Le domaine NC lie l'ARNg viral via deux motifs en doigt de zinc, cette association permet l'encapsulation du génome viral et joue un rôle crucial dans l'oligomérisation de Gag [56]. Les précurseurs s'assemblent et forment une particule sphérique entourée de la membrane plasmique. Les glycoprotéines de l'enveloppe virales (Env), traduites sous forme d'un trimère gp160 au niveau du réticulum endoplasmique (RE), sont clivées dans l'appareil de Golgi et

donnent naissance aux sous-unités gp120 et gp41. Le domaine cytoplasmique de cette dernière s'interagit avec le domaine MA, permettant ainsi l'incorporation de l'Env [57].

Le domaine p6 est impliqué dans la **relâche** des virions via l'utilisation de la machinerie ESCRT (« endosomal sorting complex required for transport ») de la cellule hôte. Deux motifs de p6 sont responsables pour ce processus : le motif PTAP qui recrute la protéine TSG101 (« Tumor susceptibility gene 101 ») [58] et le motif LYPX qui recrute la protéine ALIX (« Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X ») [59]. TSG101 est une sous-unité du complexe ESCRT-I cellulaire, tandis que ALIX est une protéine accessoire du complexe ESCRT-III. L'association de p6 avec ces deux protéines permet le recrutement subséquent d'autres composantes des complexes ESCRT, menant à l'abscission finale des virions bourgeonnants à la membrane plasmique [60]. Finalement, l'enzyme PR conduit la **maturation** des virions via le clivage au plusieurs sites des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}. Ce processus est accompagné du changement de la morphologie virale, notamment l'apparence d'une capsid de forme conique [51].

1.5. Transfert du VIH-1 de cellule à cellule via des synapses

La diffusion en phase fluide des particules virales « libres » du VIH-1 n'est pas un mode efficace d'infection, car les virions devraient rencontrer les cellules cibles parmi de nombreuses cellules non-permissives [61]. Par contre, la propagation du VIH-1 via contact direct entre une cellule infectée et une cellule non infectée est généralement environ 10-fois plus efficace [62, 63]. Il existe plusieurs modes de transfert cellule-cellule, tels que via la formation des filopodes ou des nanotubes [64, 65], celui le plus efficace est probablement via la synapse virologique (SV) [66].

La structure de la SV établie entre une cellule T CD4⁺ infectée et une cellule T CD4⁺ cible non infectée est bien comprise. La formation de cette structure est initiée par l'attachement de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 exposée à la surface de la cellule infectée avec le récepteur CD4 de la cellule cible. Cette interaction permet ensuite le recrutement du précurseur viral Gag à l'interface intercellulaire [67], ainsi que le recrutement

de corécepteurs CXCR4 ou CCR5, molécules d'adhésion (e.g., LFA-1, ICAM-1/3) [67], et d'autres protéines membranaires telles que les tétraspanines [68]. La synapse est formée et stabilisée avec la polarisation de ces protéines virales et cellulaires, les virions se disséminent ainsi vers la cellule cible à partir de la cellule infectée [69].

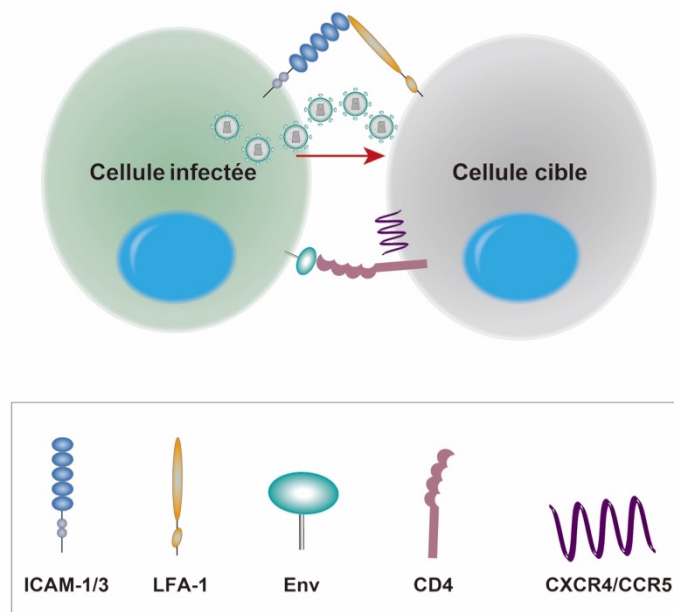


Figure 1.4. Schéma d'une synapse virologique prototypique.

La cellule T $CD4^+$ infectée forme un contact adhésif avec la cellule cible exprimant $CD4$ via l'interaction Env/ $CD4$ et l'interaction des molécules d'adhésion. Les virions bourgeonnés à partir de la cellule infectée se migrent vers la cellule cible (flèche), l'infection se poursuit via l'entrée médiée par le récepteur.

1.6. Pathogénèse du VIH-1

L'évolution de l'infection par le VIH-1 est divisée en trois étapes différentes : la phase de l'infection aiguë, la phase d'infection chronique et le stade SIDA. L'infection aiguë est la phase initiale qui ne dure que quelques semaines et se caractérise par une multiplication virale très importante et une perte de lymphocytes T $CD4^+$ partiellement réversible [70], notamment dans les muqueuses intestinales. Les réponses immunes contre le VIH-1 se développent durant les premières semaines d'infection et aboutissent à un certain contrôle de la réplication virale, surtout grâce aux lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (CTLs, « cytotoxic T lymphocytes »).

Cette étape est suivie par la phase chronique, qui est asymptomatique mais avec une réplication persistante du virus. Elle est aussi caractérisée par une activation immunitaire systématique, l'inflammation et la déplétion graduelle des lymphocytes T CD4⁺, menant ainsi au SIDA (phase finale) en absence de l'intervention ART.

L'établissement de l'infection par le VIH-1 est initiée par celle d'une cellule cible par une seule particule virale aux ports d'entrée. Des études dans le modèle d'infection des singes par VIS ont démontré que la transmission au niveau des muqueuses induit l'infection des cellules CD4⁺, notamment les lymphocytes au repos, et également les macrophages ainsi que cellules dendritiques [71, 72]. Bien que l'inoculation (e.g., le sang) contient des virus génétiquement différents, seulement une partie des virus sous le terme de « transmis/fondateurs » (T/F) sont capables d'établir l'infection [73]. Le virus se réplique initialement au niveau des organes lymphoïdes régionales et l'amplification est modeste. La migration des cellules T infectées et des virions dans le sang permet ensuite l'amplification massive au niveau des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT, « Gastrointestinal-associated lymphoid tissues »), de la rate et de la moelle osseuse. La virémie atteint ainsi le pic et, durant cette période, la déplétion prononcée de lymphocytes CD4⁺ dans les GALT est observable [74]. La perte de l'intégrité de la muqueuse aboutit à la translocation des produits microbiens dans la circulation sanguine, augmentant ainsi l'activation immunitaire et accélérant la propagation du VIH-1 [75, 76]. Ceci affecte également les fonctions métaboliques et digestives. Néanmoins, une portion des lymphocytes mémoires quiescentes qui ont survécu forme un réservoir viral latent. Le pic de la virémie ne persiste que pour quelques semaines, en raison de la déplétion des cellules susceptibles, et de l'augmentation de la réponse immunitaire médiée par les CTLs. Le nombre de CTLs augmentant, et éventuellement il y a production d'anticorps neutralisants (nAbs, « neutralizing antibodies »), qui sont capables de neutraliser le virus autologue malgré la puissance est faible [77]. Le nombre de lymphocytes CD4⁺ peut remonter grâce à la réponse inflammatoire; cependant, elles sont ciblées par les virus et la déplétion se persiste.

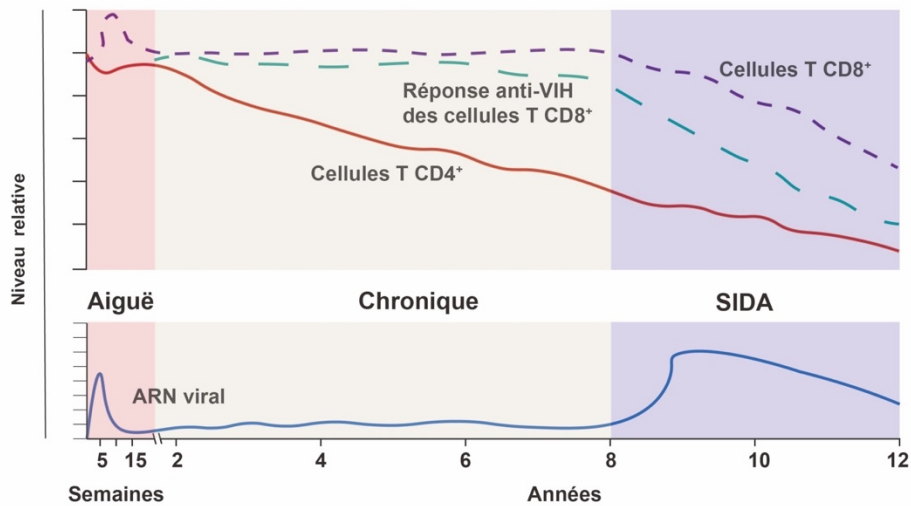


Figure 1.5. Schéma de la progression de l'infection par VIH-1.

Schéma illustrant l'évolution des paramètres au cours de la pathogenèse du VIH-1 : la charge virale (virémie) (bleu), les niveaux des cellules T CD4⁺ (rouge) et CTLs CD8⁺ (violet), ainsi que l'activation de la réponse immunitaire (vert). La figure a été établie à partir de la référence [78].

Les individus infectés entrent ensuite dans une période asymptomatique, associée avec le déclin de la virémie. Cette phase dure généralement environ 7 à 10 ans chez les individus sans traitement, bien que des cas avec une progression plus rapide (3 à 5 ans) ou plus lente (10 à 20 ans) ont été décrits [79]. Le niveau de CTLs reste relativement haut, la réplication virale persiste quoiqu'à un niveau très bas, la quantité de l'ARN viral dans le plasma (charge virale) se stabilise à une valeur de consigne (« set-point ») particulier, le niveau de laquelle est différent parmi les patients. Au cours de cette phase chronique, des effets pathogènes persistent, induisant la perte progressive des lymphocytes CD4⁺ et la déficience du système immunitaire [80]. Le niveau de la valeur de consigne et le nombre de cellules T CD4⁺ dans le sang s'agissent des prédicteurs pour la progression de la maladie [81, 82]. Au fur et à mesure que la maladie se développe, la destruction de l'architecture des tissus lymphoïdes devient plus profonde, qui résulte de la réplication virale et de l'activation chronique des cellules du système immunitaire. À la dernière phase de la maladie, il y a destruction du système lymphoïde ; le nombre de lymphocytes T CD4⁺ devient inférieur à 200 cellules/ μ L, ceci est aussi accompagné d'une baisse du nombre de CTLs. Dans les ganglions lymphatiques, la

réplication virale augmente, la population virale devient encore une fois relativement homogène. Dans ce stade de SIDA, le système immunitaire s'affaiblit, des infections opportunistes apparaissent, l'espérance de vie diminue.

Tels que mentionnés auparavant, les virus utilisant le corécepteur CCR5 (R5) persistent tout au long de l'infection, quoique des virus capables d'utiliser CXCR4 exclusivement (X4) ou les deux corécepteurs (R5X4) émergent au stade tardif chez environ 50% des individus infectés par le VIH-1 des sous-type B du groupe M [83, 84]. Ce changement de l'utilisation du corécepteur s'accompagne par la diminution de cellules cibles disponibles, car les cellules T CD4⁺ mémoires expriment plus de CCR5, et les cellules T naïves expriment plus de CXCR4 [85].

1.7. La thérapie antirétrovirale

Des avancées significatives dans le traitement des individus infectés par le VIH ont été réalisées depuis l'introduction du premier agent antirétroviral zidovudine (AZT) en 1987. Il existe actuellement plus de 25 médicaments antirétroviraux divisés en six grandes classes selon leur capacité à inhiber les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1 et leur mécanisme : (1) les inhibiteurs, nucléosidiques ou nucléotidiques, de la transcriptase inverse ; (2) les inhibiteurs non nucléosiques de la transcriptase inverse ; (3) les inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase ; (4) les inhibiteurs de la protéase ; (5) les inhibiteurs de fusion ; ainsi que (6) les antagonistes du corécepteur CCR5 [86].

Néanmoins, la monothérapie avec l'administration d'un seul antirétroviral n'est pas efficace en raison de l'apparition de résistances résultant de l'introduction des mutations fréquentes dans le génome viral par la transcriptase inverse [87]. Lorsque les médicaments antirétroviraux de différentes classes sont combinés, ils deviennent beaucoup plus efficace pour contrôler le virus. Cette combinaison s'agit d'un traitement antirétroviral hautement actif (HAART, « highly active antiretroviral therapy »), grâce auquel l'infection au VIH est

devenue une affection chronique maîtrisable chez les patients qui ont l'accès aux médicaments et qui ont une suppression virologique durable [88]. L'avènement de la HAART a bien amélioré la qualité et la durée de vie des personnes vivant avec le VIH, elle ne guérit cependant pas l'infection. Le traitement présente certains effets secondaires ou indésirables qui sont variés [89], l'arrêt de la prise des médicaments s'accompagne d'un rebond viral.

1.8. Rôles des protéines accessoires dans la pathogénèse virale

Les protéines accessoires du VIH-1 sont essentielles pour l'infection *in vivo*. Ces protéines partagent une propriété commune dans leurs fonctions : il s'agit des protéines adaptatrices qui, dans la plupart des cas, provoquent la destruction de ces protéines cellulaires, appelées facteurs de restriction. De cette manière, les protéines accessoires fonctionnent comme des antagonistes des mécanismes intrinsèques de défense qui détectent et contrecarrent la production virale.

1.8.1. Vif

La protéine Vif (« viral infectivity factor ») s'exprime tardivement dans le cycle viral. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique de 23 kDa [90], il est également incorporé dans les particules virales produites (60 à 100 copies par virion) [91]. Des études initiales ont démontré que Vif était essentielle pour la réplication virale dans les lymphocytes primaires et les cellules myéloïdes mais dispensable dans certaines lignées cellulaires immortalisées de lymphocytes T [92-94]. Les cellules ont été classifiées en « permissives » ou « non-permissives » selon leur susceptibilité à l'infection productive par les VIH-1 Vif-déficient. L'utilisation d'hétérokaryons formés par fusion des cellules permissives et non-permissives a démontré que ces dernières exprimaient un inhibiteur dominant qui perturberait la réplication virale [95, 96]. La protéine CEM15 était ensuite isolée à partir des cellules CEM non-permissives; cette protéine transmettait le phénotype non-permissif aux cellules permissives. Par la suite, elle a été identifiée comme APOBEC3G (A3G, « Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like protein 3G »), une cytidine désaminase [97].

Vif contrecarre l'activité antivirale intrinsèque des protéines APOBEC3, notamment l'A3G, qui est incorporée dans les virions, en absence de Vif, et désamine les cytidines de l'ADN formé durant la transcription inverse. Ceci entraîne l'hypermutation létale de G-à-A [98-100], ainsi que des mutations qui contribuent à la diversité génétique du virus [101]. Il faut noter que l'incorporation de l'A3G aux virions nouvellement formés inhibe la transcription inverse également via un mécanisme désamination-indépendante [102, 103]. Pour contrebalancer l'inhibition par les protéines APOBEC3, Vif recrute un complexe E3 ubiquitine ligase à ces protéines, induit leur poly-ubiquitination et leur dégradation subséquente par le protéasome [104, 105].

1.8.2. Nef

Nef (« negative factor») est une protéine myristoylée de 27-35 kDa exprimée précocement durant l'infection par un ARNm entièrement épissé [106], environ 5 à 10 copies de protéine Nef sont incorporées par chaque virion produit [107]. Comme les autres protéines accessoires du VIH-1, Nef n'est pas essentielle pour la réplication virale *in vitro*; cependant, chez les individus infectés par des virus Nef-déficients, la progression de la maladie est généralement très lente ou absente [108]. Des observations similaires ont été également trouvées chez les singes infectés par un VIS Nef-déficient [109].

Conjointement avec Vpu, Nef diminue le niveau de CD4, le composant majeur du complexe de récepteur utilisé par le VIH pour infecter les cellules. CD4 est une glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes CD4⁺ et des macrophages, les cibles cellulaires principales du VIH. L'infection des cellules CD4⁺ par le VIH induit une diminution rapide et constante de l'expression de CD4 à la surface cellulaire [110], limitant la surinfection des cellules par des virions additionnels [111] et contribuant ainsi à l'évasion immunitaire des cellules infectées. Ainsi, cette diminution permet aux cellules infectées d'échapper à la réponse ADCC (« Antibody-dependent cellular cytotoxicity») par la suppression de

changements conformationnels dans l'enveloppe virale induits par CD4 nécessaires pour la fixation d'Ac [112, 113]. Étant produite précocement, Nef cible les molécules de CD4 pré-existantes à la surface. Nef interagit avec CD4 au niveau de la membrane plasmique et recrute le complexe des protéines adaptatrices-2 (AP-2), induisant l'endocytose de CD4 de manière clathrine-dépendante et, finalement, la dégradation lysosomale du récepteur viral [114]. Le mécanisme du transport des vésicules contenant CD4 aux lysosomes est actuellement à l'étude, mais semble avoir besoin de l'interaction entre Nef et β -COP (« coatomer subunit beta ») [115].

Nef induit aussi la diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) à la surface des cellules infectées, les protégeant ainsi de la reconnaissance par les CTLs [116, 117]. Nef induit également l'augmentation de l'expression de la chaîne invariante (I α , CD74) de CMH-II et la diminution concomitante du CMH-II mature, empêchant ainsi la présentation antigénique des cellules infectées [118-120]. De plus, Nef provoque l'internalisation du facteur de restriction transmembranaire SERINC3/5 (« serine incorporator 3/5 »), inhibant ainsi leur inclusion dans les virions bourgeonnants et augmentant l'infectivité virale [121, 122].

1.8.3. Vpr

Vpr est une petite protéine de 96 acides aminés codée par le gène *vpr* qui se situe au centre du génome du VIH-1, chevauchant avec les gènes codant pour Vif et Tat [123]. Cette protéine de 14 kDa, exprimée tardivement durant l'infection, est bien conservée dans les lentivirus [124], et est particulièrement bien incorporée dans les particules virales (environ 100 copies par virions) [125]. L'incorporation est dépendante du domaine p6 de la poly-protéine Pr55^{Gag}[126], via l'interaction directe avec le motif LXSLFG de p6 Gag [127].

Il a été rapportée que Vpr est importante pour l'infection des cellules qui ne se divisent pas, notamment les macrophages [128] ; cependant, Vpr n'a pas d'effet sur le premier cycle

d'infection des MDMs [128, 129], suggérant que Vpr n'est pas requis pour l'import nucléaire dans ces cellules, et que ses fonctions principales tiennent place après l'intégration. Vpr contribue également à moduler la réponse antivirale induite par l'infection : en effet, elle réduit la transcription des gènes codant pour l'interféron de type I (notamment IFN α et IFN β), ainsi que des gènes induits par l'IFN, tel que MxA via l'activation du complexe SLX4, qui est impliqué dans la réparation de l'ADN; une activation de ces gènes entraînerait l'élimination de l'ADN viral et l'évasion immunitaire subséquente [130]. La fonction la plus étudiée de Vpr est son induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 dans les cellules qui se divisent activement [131]; ce blocage provoque d'une part l'augmentation de l'activité du LTR et la production virale [132] et d'autre part l'induction de l'apoptose [133].

Bien que plusieurs mécanismes impliqués dans les fonctions de Vpr restent insaisissables, il a été illustré que son interaction avec DCAF1 (« DDB1 and Cullin4-associated factor 1 », initialement appelé VPRBP « Vpr binding protein »), une protéine adaptatrice de l'E3 ubiquitine ligase DDB1-CUL4A^{VPRBP}, joue un rôle important dans ces processus [134]. Des protéines cibles de Vpr sont ubiquitinylées par ce complexe puis dégradées par la machinerie du protéasome [135].

1.8.4. Vpx

Le VIH-2 et certaines souches du VIS (e.g., celles du mangabey enfumé ou du macaque : VIS_{simm} ou VIS_{mac}) codent la protéine virale X (Vpx) [136-138]. Ayant une origine ancestrale commune avec Vpr [124, 139], Vpx est essentielle pour la réplication virale chez certaines cellules, telles que les macrophages, les cellules T CD4⁺ [140] et les DCs [141, 142]. En effet, Vpx interagit aussi avec DCAF1 et provoque la dégradation du facteur de restriction SAMHD1 (« Sterile alpha motif and histidine aspartate domain-containing protein 1 »), une enzyme avec l'activité phosphohydrolase et inhibe ainsi la transcription inverse en diminuant le taux intracellulaire des désoxynucléotides (dNTPs) [143, 144]. La poly-ubiquitination et dégradation subséquente de SAMHD1 induites par Vpx favorisent l'infection des cellules myéloïdes et des cellules T quiescentes.

2. La protéine virale U (Vpu)

Vpu (« Viral protein U ») est une petite protéine accessoire, exprimée seulement chez le VIH-1 et son précurseur VIScpz, mais absente chez le VIH-2 et d'autres isolats du VIS [145-148]. La caractérisation moléculaire subséquente a démontré la présence du gène *vpu* dans quelques isolats additionnels incluant VISgor [149, 150]. Vpu est synthétisée tardivement durant le cycle de réplication virale, à partir du même ARNm bicistronique qui code pour Env [151], différemment des autres protéines accessoires, Vpu n'est pas incorporée dans la particule virale [152].

2.1. Structure

La protéine Vpu se compose d'environ 81 acides aminés (aa); il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I de 16-17 kDa [145, 153]. Elle est constituée d'un domaine luminal court à l'extrémité N-terminale dont la fonction n'est pas encore déterminée, d'un domaine transmembranaire de 23 aa, et d'une queue cytosolique de 56 aa à l'extrémité C-terminale. Ce dernier contient deux hélices alpha (H1 et H2), contenant les motifs bi-sérine DSGNES et de trafic ExxxLV qui se trouvent, respectivement, dans la région liant les hélices et la deuxième hélice H2. Le motif DSGNES contient deux résidus sérines phosphorylés par la kinase cellulaire CK-II (« casein kinase-II »), ce qui entraîne le recrutement de β -TrCP1/2 (« beta-transducin repeats-containing proteins 1 or 2 »), la sous-unité du complexe E3 ubiquitine ligase Skp1, la Cullin et F-box ($SCF^{\beta-TrCP1/2}$); tandis que le motif de trafic ExxxLV est capable d'interagir avec les protéines AP-1 ou AP-2 [154].

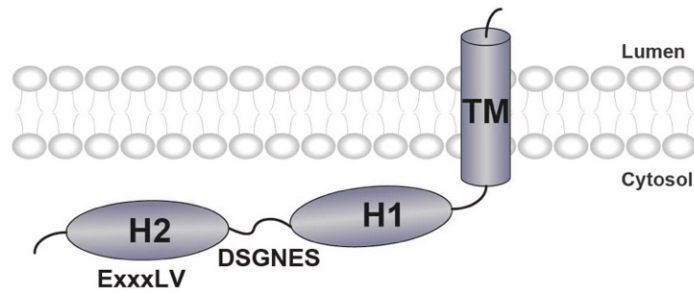


Figure 1.6. Schéma de la topologie structurale de Vpu.

Schéma illustrant les motifs fonctionnels principaux de Vpu : le domaine transmembranaire (TM), le motif bi-sérine DSGNES et le motif de trafic ExxxLV.

2.2. Cibles principales

2.2.1. CD4

Étant produite tardivement, au contraire de Nef, Vpu cible les protéines CD4 nouvellement synthétisées, entraînant leur rétention dans le RE et la dégradation subséquente par la voie associée au RE (ERAD, pour « ER-associated degradation ») [155-158]. Ce processus requiert l'interaction physique entre les domaines transmembranaires (TM) de Vpu et CD4 [159, 160], et le recrutement de la sous-unité β -TrCP1/2 du complexe SCF $^{\beta$ -TrCP1/2 E3 ubiquitine ligase via le motif DSGNES [161]. Ceci induit la poly-ubiquitination de la queue cytosolique de CD4 [156-158], qui provoque ensuite le recrutement du complexe VCP-UFD1L-NPL4, un composant tardif de la voie ERAD [157, 158]. La protéine CD4 est ainsi extraite à partir du RE au cytosol, puis délivrée au protéasome pour la dégradation efficace [156-158].

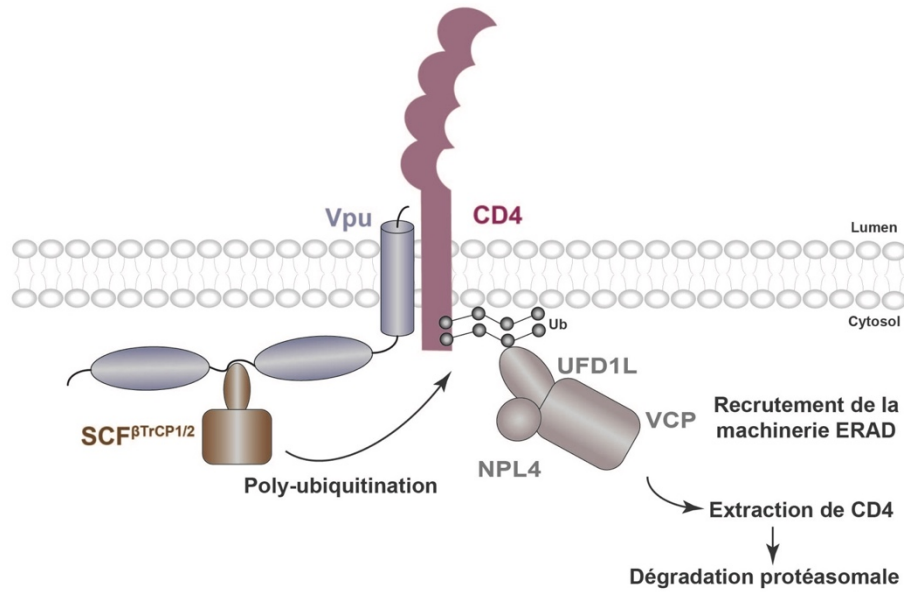


Figure 1.7. Dégradation protéasomale de CD4 par Vpu.

Vpu et CD4 interagissent via leurs domaines TM, le motif phosphorylé DSGNES de Vpu recrute le complexe SCF^{β-TrCP1/2} E3 ubiquitine ligase via l'association avec la sous-unité β-TrCP1/2. Ceci induit l'ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4, menant au recrutement de la machinerie ERAD, qui cible CD4 pour la dégradation protéasomale dans le cytosol.

2.2.2. BST2

Vpu augmente la relâche des particules virales via l'inhibition de l'activité de BST2 (« Bone marrow stromal cell antigen 2 »)/CD317/Tetherin/HM1.24. BST2 est une glycoprotéine transmembranaire de type II qui est sous forme d'homodimère. Elle est exprimée de manière constitutive à la surface de plusieurs types cellulaires, et régulée positivement par l'IFN-I [162]. La protéine est constituée d'une queue cytosolique courte à l'extrémité N-terminale, d'un domaine TM d'hélice α, puis d'un domaine extracellulaire associé à la membrane plasmique via une ancre GPI (« glycosyl-phosphatidylinositol ») à son extrémité C-terminale [163]. BST2 inhibe la relâche de presque tous les virus enveloppés [162], par l'incorporation de l'ancre GPI dans l'enveloppe des virions bourgeonnants, les retenant ainsi à la membrane plasmique [164].

L'antagonisme médié par Vpu induit la réduction de BST2 à la membrane plasmique. En effet, les deux protéines s'interagissent entre elles via leurs domaines TM, et cette association est essentielle pour contrecarrer l'activité antivirale de BST2 [165, 166]. Les analyses par mutagenèse ont démontré que les résidus A10, A14, A18 et W22 de Vpu jouent un rôle critique dans cette interaction [167, 168]. Le mécanisme exact par lequel Vpu réduit le niveau de BST2 à la surface cellulaire est toujours à l'étude, des connaissances actuelles indiquent que Vpu s'interagit avec BST2 et empêche son incorporation dans des virions bourgeonnants. De plus, une caractéristique des isolats Vpu du groupe M est leur capacité de cibler BST2 pour la dégradation lysosomale via la voie-médiée par ESCRT [169]. Ce processus dépend strictement du motif DSGNES pour le recrutement de la sous-unité β -TrCP1/2 du complexe SCF $^{\beta$ -TrCP1/2 E3 ubiquitine ligase [170, 171], qui entraîne l'ubiquitination de la queue cytosolique de BST2 et la dégradation subséquente dans les lysosomes [172, 173]. Néanmoins, l'antagonisme par Vpu semble dépendre également de la perturbation du trafic intracellulaire de BST2, qui circule entre la membrane plasmique, le TGN et les endosomes. Vpu est capable de séquestrer BST2 nouvellement-synthétisées et/ou circulantes et bloquer le trafic vers la surface cellulaire [174, 175]. Cette perturbation dépend du motif de trafic ExxxLV [176], par son interaction avec l'AP-1 [177] : Vpu détourne ainsi le trafic AP-1-dépendant et envoie le complexe Vpu/BST2 aux endosomes et au TGN où l'ubiquitination s'achève avant la dégradation lysosomale. De plus, la phosphorylation du motif DSGNES par CK-II a été démontré de réguler le recrutement des protéines AP-1 et AP-2 au motif ExxxLV. Une inactivation du motif DSGNES phénocopie ainsi celle du motif de trafic ExxxLV. Par contre, cette fonction peut être récupérée par l'interaction directe avec la clathrine, et ce même en absence du recrutement de SCF $^{\beta$ -TrCP1/2, soulignant l'importance de la phosphorylation de Vpu et du trafic clathrine-dépendant dans l'antagonisme de BST2 [154]. Vpu cible également BST2 vers les domaines enrichis en clathrine de la membrane plasmique, induisant ainsi le déplacement de BST2 hors des sites d'assemblage.

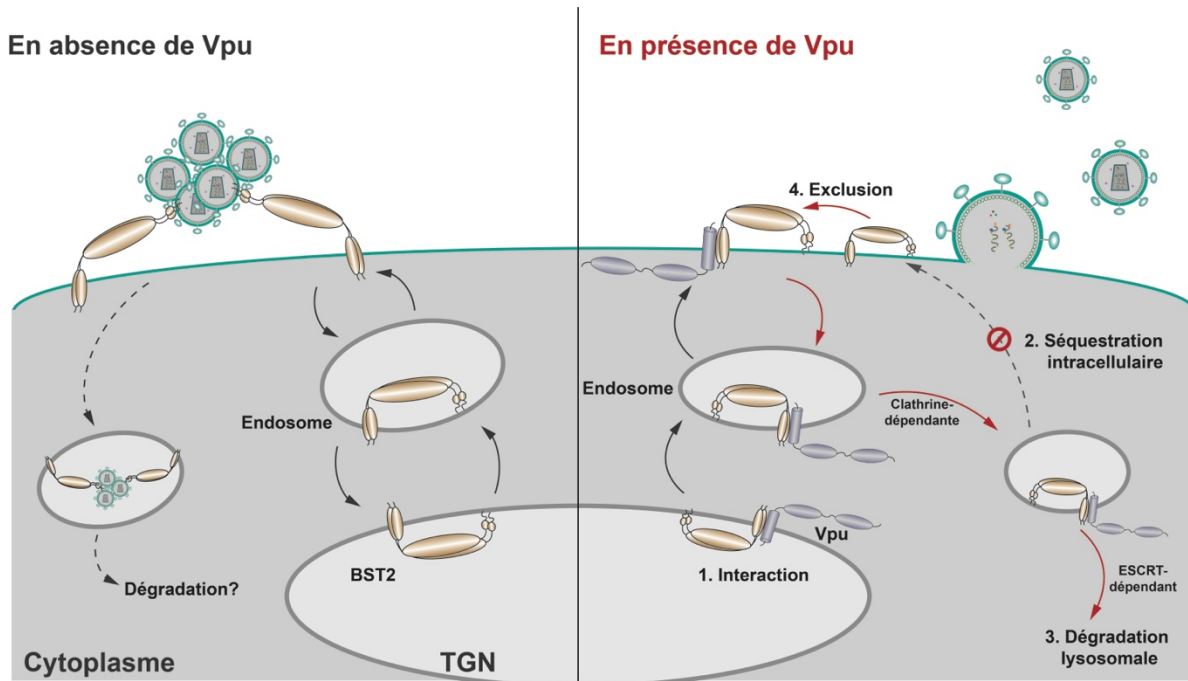


Figure 1.8. Antagonisme de BST2 par Vpu.

(Gauche) L'infection par le VIH-1 déficient pour Vpu, la protéine BST2 néo-synthétisée se déplace à la membrane plasmique via la voie sécrétoire. BST2 circule constitutivement entre la membrane plasmique, les endosomes et le TGN. Au cours d'une infection par un VIH-1 Vpu-déficient, l'accumulation de BST2 aux sites d'assemblage entraîne l'incorporation de BST2 dans les virions nouvellement formés, empêchant ainsi la relâche virale. Ces virions piégés par BST2 pourraient être internalisés puis dégradés. **(Droite)** Au cours de l'infection du VIH-1 exprimant Vpu, BST2 est intercepté par Vpu dans le système vésiculaire. Ceci entraîne la séquestration de BST2 dans les endosomes de manière AP-1 et clathrine-dépendante. BST2 est ensuite dégradée par la voie lysosomale qui dépend également de la machinerie ESCRT. Vpu peut interagir également avec BST2 à la membrane cellulaire, et l'exclure de sites s'assemblage via l'endocytose par l'AP-2 et la clathrine. Ces molécules BST2 sont ainsi déplacées dans les endosomes pour la séquestration et dégradation subséquentes.

En plus de sa capacité de retenir physiquement les virions et diminuer la production virale, l'antagonisme de BST2 par Vpu a des implications immunologiques. En effet, la rétention physique des virions par BST2 sensibilise les cellules infectées à l'ADCC [178-180], et active la signalisation pro-inflammatoire NFκB-dépendante [181]. De plus, les virions retenus à la surface des cellules infectées perturbent l'interaction de BST2 avec l'ILT7

(« Immunoglobulin-like transcript 7 »), un récepteur inhibiteur spécifique des pDCs (« Plasmacytoid dendritic cells »). L'ILT7 régule négativement la production de l'IFN-I, et ainsi l'inhibition de l'interaction BST2/ILT7 permet l'augmentation de la production de l'IFN-I [182]. Dans ces contextes, Vpu est capable de diminuer effectivement la détection et la destruction des cellules infectées par le système immunitaire via l'antagonisme de BST2.

2.3. Autres cibles

Les protéines cellulaires ciblées par Vpu ne se limitent pas à CD4 et BST2. Depuis quelques années, plusieurs autres cibles régulées négativement par Vpu ont été identifiées (**Tableau 1**). La régulation négative de ces protéines induit un large éventail d'effets immunomodulateurs, incluant, par exemple, l'évasion immunitaire et la dysfonction métabolique. Les interactions de Vpu avec ces nouvelles cibles cellulaires semblent se baser sur des interactions médiées par les domaines TM des protéines interagissant, telles que les interactions de Vpu avec BST2, NTB-A [183], PVR [184] et CCR7[185]. La modulation de ces protéine exige la séquence primaire du TMD de Vpu ; tandis que la modulation de CD1d par Vpu ne l'exige pas [186, 187]; et la modulation de HLA-C nécessite plutôt les résidus hydrophobiques que les alanines [188] (**Tableau 1**). Vpu se distribue tout au long des membranes cellulaires incluant le RE, le Golgi, le TGN, la membrane plasmique et les endosomes [106]. Bien que plus concentrée au niveau des endosomes péri-nucléaires et le TGN, Vpu se circule entre les systèmes membranaires, facilitant ainsi l'interaction avec ses cibles.

Des technologies visant une analyse globale des cibles de Vpu ont été établies, telles que la protéomique quantitative par la méthode SILAC (« Stable isotope labeling by amino acids in cell culture ») [189, 190], et la plateforme d'imagerie GAPSA (« Global arrayed protein stability analysis ») [191]. Dans ce contexte, CD47 a été identifiée comme une cible potentielle qui est régulée négativement par Vpu [189, 190].

| Protéine | Mécanisme de régulation négative | Domaines Vpu impliqués | Référence |
|---|--|--|------------|
| Tetraspanins | Dégradation : protéasome, lysosome | TM (partial), DSGNES | [192, 193] |
| NTB-A (CD352/SLAMF6) « NK, T-cell, B-cell Antigen » | Séquestration intracellulaire, glycosylation inhibée | TM (A18) | [183, 194] |
| PVR (CD55/Necl-5) « Poliovirus receptor » | Séquestration intracellulaire | TM (A10, 14, 18), DSGNES | [184, 195] |
| CD1d | Séquestration intracellulaire | n.d. | [186, 187] |
| CCR7 « CC chemokine receptor type 7 » | Recyclage inhibé et séquestration intracellulaire | TM | [185] |
| CD62L (L-selectin) | Séquestration intracellulaire | n.d. | [196] |
| SNAT1 (SLC38A1) « Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 » | Dégradation : ubiquitination médiée par SCF ^{β-TrCP} puis dégradée dans le lysosome | TM (W22), DSGNES | [189] |
| HLA-C « Human leukocyte antigen -C » | Séquestration intracellulaire | Isolats primaires de Vpu TM (LE5/L16/L18 de WITO) | [188, 197] |
| ICAM1 « Intercellular adhesion molecule 1 » | Dégradation : ubiquitination médiée par SCF ^{β-TrCP} puis dégradée dans le protéasome | TM (A10, 14, 18), DSGNES | [190] |
| CD99 | Dégradation : protéasome | n.d. | [191] |
| PLP2 « Proteolipid protein 2 » | n.d. | n.d. | [191] |
| PSGL-1 « P-selectin glycoprotein ligand 1 » | Dégradation : ubiquitination médiée par SCF ^{β-TrCP} puis dégradée dans le protéasome | TM (partial), DSGNES | [198] |
| Tim-3 « T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3 » | Séquestration intracellulaire | TM (A14, 18) | [199] |

Tableau 1. Les autres protéines cellulaires ciblées par Vpu.

3. CD47

CD47 ou « protéine associée à l'intégrine » (IAP, « integrin-associated protein ») est une protéine exprimée de manière ubiquitaire par le fait qu'elle se distribue pratiquement à la surface de tous les types de cellules. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la prolifération, l'adhésion cellulaire, l'angiogenèse, et la phagocytose.

3.1. Structure

CD47 est une protéine transmembranaire de type I de 50 kDa et appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) [200]. Elle a été identifiée par son association avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, d'où le nom IAP [201]. La protéine consiste en un domaine extracellulaire de type IgV à l'extrémité N-terminale contenant des sites de glycosylation, cinq domaines transmembranaires et une queue intracellulaire à l'extrémité C-terminale qui donne quatre isoformes de CD47 par l'épissage alternatif.

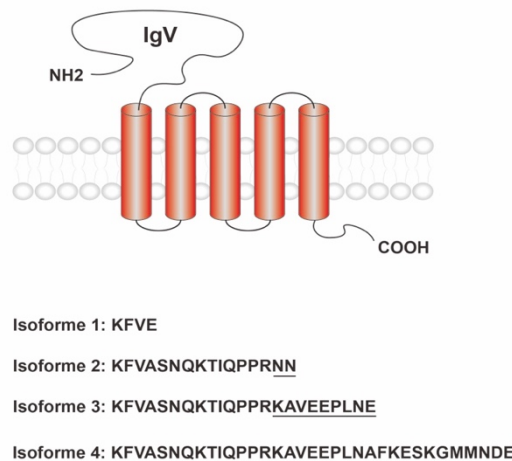


Figure 1.9. Schéma de la topologie structurale de CD47 avec la séquence cytoplasmique des quatre isoformes.

Les séquences d'acides aminés de la queue intracellulaire des 4 isoformes de CD47 en soulignant la partie différente des trois derniers isoformes longs.

La queue cytoplasmique C-terminale de l'isoforme 1 est constituée de quatre aa, et elle est exprimée de façon significative seulement dans les kératinocytes [202]. La partie cytoplasmique C-terminale de l'isoforme 2, comprend 16 aa et est la plus prédominante, elle est exprimée dans les cellules dérivées de la moelle osseuse et les cellules endothéliales [202]; il s'agit de la seule forme exprimée dans les globules rouges matures [203]. L'isoforme 4, qui est la plus longue s'exprime dans le cerveau et le système nerveux périphérique [202]; l'isoforme 3 se trouve aussi dans les neurones, il est impliqué dans la consolidation de la mémoire dans l'hippocampe de rat(e) [204]. Bien que ces quatre isoformes de CD47 sont distribués de manière spécifique de tissu, ils sont théoriquement capables d'interagir avec les ligands de CD47 décrits ci-dessous, grâce à leur domaine IgV extracellulaire identique. En effet, Leclair *et coll.* ont comparé le rôle de ces isoformes dans l'apoptose et trouvé que la différence au niveau de la queue cytoplasmique n'affecte pas la réponse [205]. Cela indique que le domaine extracellulaire de CD47 joue un rôle majeur dans la signalisation des processus cellulaires CD47-dépendants. Il faut noter que la plupart des études à l'heure actuelle, y compris celles incluses dans cette thèse, se sont focalisées sur l'isoforme 2 car c'est la forme la plus largement exprimée.

3.2. Principaux ligands extracellulaires

3.2.1. SIRP α , γ

Le deuxième ligand endogène de CD47 qui a été identifié est SIRP α (« signal-regulatory protein alpha ») [206], un membre des protéines SIRP (Figure 1.10. A) qui appartient à la superfamille des Ig. La protéine SIRP α s'exprime principalement à la surface des cellules myéloïdes mais est retrouvée aussi dans les neurones [207] et les lymphocytes cytotoxiques [208]. Cette protéine était alternativement appelée BIT [209], p84 [210], SHPS-1 [211] ou CD172a. C'est une protéine transmembranaire qui contient trois domaines d'Ig à l'extrémité N-terminale extracellulaire et une queue intracellulaire. Cette dernière partie contient quatre sites de phosphorylation de tyrosine, ainsi que deux motifs

inhibiteurs (ITIMs, « immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs ») [212]. SIRP α interagit avec CD47 via son domaine IgV à l'extrémité N-terminale [206].

Parmi les protéines SIRP, il y a également SIRP β (SIRP β 1 ou CD172b) et SIRP γ (SIRP β 2 ou CD172g) [213, 214]; cette dernière interagit aussi avec CD47. Bien que ces deux protéines possèdent toujours trois domaines d'Ig extracellulaire, leurs structures intracellulaires diffèrent de celle de SIRP α . En effet, la queue intracellulaire de SIRP β est très courte, et ne contient pas de motifs de signalisation; cependant, SIRP β s'associe avec DAP12 (« DNAX activation protein of 12 kDa »), une protéine adaptatrice dimérique contenant un motif activateur (ITAM, « immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») via un résidu d'aa basique de son domaine transmembranaire. Le ligand de SIRP β n'est toujours pas connu; il n'interagit pas avec CD47, dû partiellement au fait d'un remplacement de la Val27 par une Met dans le domaine IgV [215]. La protéine SIRP γ est exprimée dans les lymphocytes T et les cellules NK [207]; sa queue intracellulaire est courte et elle n'est pas capable de se lier à DAP12 en raison de l'absence du résidu d'aa chargé dans son domaine transmembranaire. L'interaction entre SIRP γ et CD47 a été rapportée comme facilitant l'adhésion cellulaire [216, 217] et l'engagement de SIRP γ sur les lymphocytes T par le CD47 des cellules présentatrices d'antigènes (APCs, « Antigen-presenting cells ») renforcerait la prolifération antigène-spécifique des lymphocytes T [216]. Néanmoins, le mécanisme de signalisation impliqué dans ces processus reste inconnu, car SIRP γ n'a pas de motifs de signalisation et n'est pas capable de se lier à DAP12.

3.2.2. TSP-1

Le premier ligand endogène de CD47 identifié est la thrombospondine-1 (TSP-1, « Thrombospondin-1 ») [218], une glycoprotéine matricielle de 450 kDa initialement découverte dans les plaquettes activées par la thrombine [219, 220]. La famille des thrombospondines (TSP) rassemble cinq protéines multifonctionnelles, TSP-1 à -5. La TSP-1 et la TSP-2, constituant le groupe A, sont des homotrimères qui sont similaires sur le plan structural; le groupe B réunit les TSP-3 à -5, qui sont homopentamériques. Chaque monomère

de TSP-1 comporte plusieurs domaines différents (Figure 1.10. B) : le domaine globulaire N-terminal, le domaine liant à l'héparine (HBD, « Heparin-binding domain ») ; un domaine vWC (vWCD, « von Willebrand C domain ») ; trois répétitions de type 1 properdine ; trois répétitions de type 2 EGF (« Epidermal growth factor »)-like ; sept répétitions de type 3 de fixation au calcium et le domaine globulaire C-terminal. Ces domaines interagissent avec des récepteurs différents, et illustrent bien la multiplicité des fonctions de cette protéine.

TSP-1 interagit avec CD47 via son domaine C-terminal (CBD, « C-terminal binding domain »), via une séquence consensus contenant le motif VVM proposé d'être essentielle. Cette découverte a mené à l'élaboration de plusieurs peptides agonistes de CD47 [221], tels que 7N3 (¹¹⁰²FIRVVMYEGKK¹¹¹²), 4N1 (¹⁰¹⁶RFYVVMWK¹⁰²⁴), 4N1K (K-¹⁰¹⁶RFYVVMWK¹⁰²⁴-K, c.-à-d. 4N1 flanqué par deux résidus Lys) et, plus récemment, PKHB1 [222], qui miment l'activité de TSP-1 *in vitro*. Néanmoins, il a été rapporté par plusieurs études que ces peptides affectent de nombreux événements biologiques qui sont indépendants de CD47 [223-226]. Il devient ainsi important d'introduire des contrôles adéquats lors d'études sur la signalisation-médiée par CD47 en utilisant ces peptides : par exemple, des contrôles utilisant la forme naturelle de TSP-1, un blocage avec des anticorps anti-CD47 monoclonaux (mAbs, « monoclonal antibodies ») ou une utilisation de cellules CD47 déficientes.

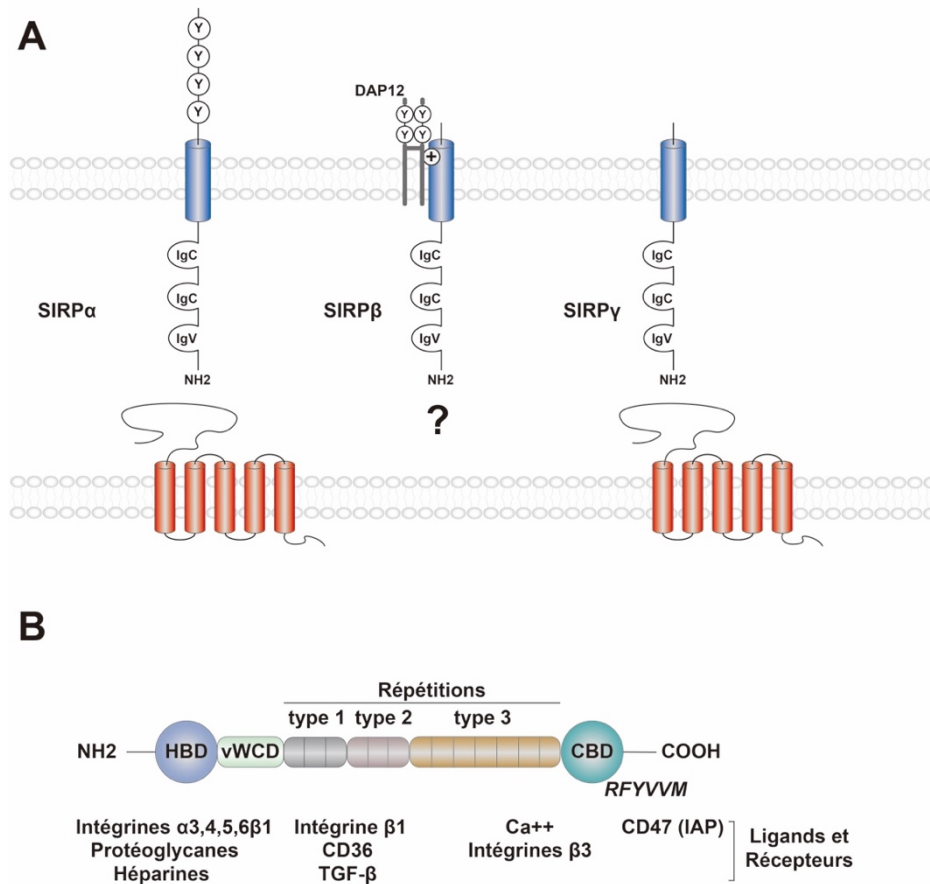


Figure 1.10. Ligands extracellulaires de CD47.

(A) La famille des protéines SIRP, dont SIRP α et SIRP γ sont capables d'interagir avec CD47 via leurs domaines IgV avec celui de CD47. (B) Schéma d'un monomère de TSP-1 avec ses domaines différents, la séquence d'aa (RFYVVM) responsable pour l'interaction avec CD47 est indiquée en *italique*.

3.3. Signalisations et fonctions

Comme mentionné auparavant, CD47 est impliqué dans plusieurs processus cellulaires normaux ou pathophysiologiques; il s'agit donc d'un récepteur multifonctionnel qui pourrait être une cible clé pour le développement des stratégies thérapeutiques contre les maladies, notamment le cancer.

3.3.1. Inhibition de la phagocytose par l'axe CD47/ SIRP α

L'une des fonctions les mieux étudiées de l'interaction CD47/ SIRP α est son rôle dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. L'observation initiale découlait d'une étude dans laquelle les érythrocytes CD47-déficientes étaient rapidement éliminées lors d'infusion dans les souris de type sauvage [227]. En revanche, les cellules exprimant CD47 ont survécu de 60 à 80 jours dans les souris. CD47 était ainsi identifiée comme un « marqueur du soi », ou un signal « don't-eat-me », qui protège les cellules globules rouges de l'élimination homéostatique. D'autres études subséquentes confirmaient que cette fonction était liée à l'interaction de CD47 avec SIRP α exprimée à la surface des macrophages, et que cette interaction inhibait la phagocytose médiée par les récepteurs Fc γ et le complément [228, 229].

SIRP α était initialement identifiée comme substrat des protéine tyrosine phosphatases (PTPases) contenant des domaines d'homologie SH2 (SHP-1 et SHP-2) et il était ainsi nommé SHPS-1 [213, 230]. Suite de l'attachement de CD47, les résidus de tyrosine à l'ITIM du domaine cytoplasmique de SIRP α deviennent phosphorylés, permettant le recrutement et l'activation de SHP-1 et SHP-2. Bien que les deux sont capables de s'associer avec les résidus phosphorylés de SIRP α , seulement SHP-1 inhibe les voies de signalisation en aval dans les macrophages; tandis que l'association de SHP-2 avec SIRP α entraîne l'augmentation phosphatase-dépendante de signalisation dans plusieurs cas [231]. Malgré qu'il a été montré que la fonction de la myosine IIA nonmusculaire, qui joue un rôle central dans la phagocytose, est inhibée dans ce processus [232, 233], les cibles des phosphatases de cette cascade de signalisation et leur lien avec la phagocytose restent à découvrir.

La contribution de l'interaction CD47/SIRP α dans l'élimination des cellules cancéreuses a été étudiée en profondeur depuis une décennie. Les cellules cancéreuses, d'origine hématologiques ou non-hématologiques, expriment CD47 à des niveaux relativement hauts, qui permet ainsi l'évasion de la phagocytose de ces cellules par les macrophages. En effet, la surexpression de CD47 dans les cellules de leucémie myéloïde protège leur élimination par les macrophages et prolonge la survie des cellules tumorales *in*

vivo [234]. De nombreuses études ont également confirmé le profil d'expression élevée de CD47 dans les différents types de tumeurs. Dans ce contexte, la thérapie de blocage de l'axe CD47/SIRP α devient une stratégie anti-tumorale, par l'utilisation des agents ciblant l'une des deux protéines. Beaucoup d'études précliniques ont utilisé l'anti-CD47 mAb B6H12 [235], qui bloque l'interaction avec SIRP α [236, 237], et permet la destruction des tumeurs hématopoïétiques et solides *in vitro* par une phagocytose active des macrophages; ceci est également le cas *in vivo* dans les souris [238-241]. Plus récemment, un anti-CD47 mAb humanisé, Hu5F9-G4, a été testé en phase I d'essai clinique [242]. D'autres agents bloquants de l'axe ont été aussi développés (e.g., anticorps anti-SIRP α , dimères de SIRP α solubles fusionnant avec la portion Fc d'IgG humaine), et ils ont montré leur efficacité *in vitro* et dans des études précliniques.

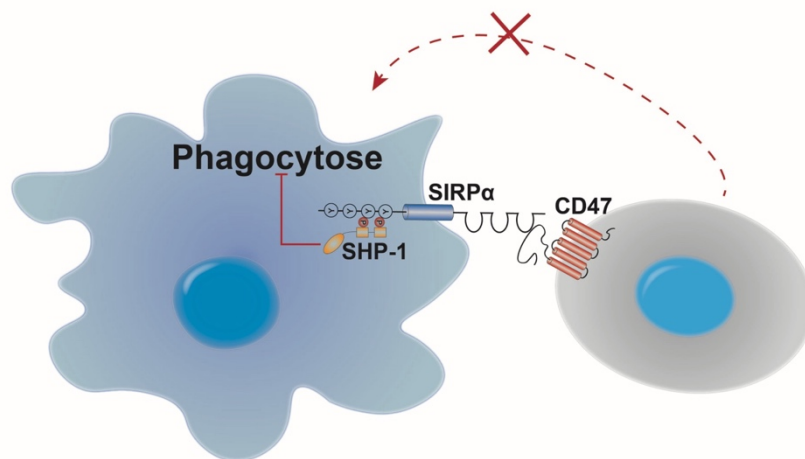


Figure 1.11. Inhibition de la phagocytose par l'interaction CD47/SIRP α .

L'engagement de CD47 à son récepteur SIRP α induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique de ce dernier, ce qui permet le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-1, et induit ainsi la déphosphorylation et l'inactivation des molécules essentielles pour la phagocytose.

3.3.2. Apoptose-médiée par CD47

L'engagement de CD47 par TSP-1 ou des mAbs anti-CD47 induit la mort cellulaire. Ce phénomène a été premièrement observé dans les cellules Jurkat et les lymphocytes T primaires activées [243, 244]. Les mAbs permettant l'induction de l'apoptose se distinguent par la nécessité de leur immobilisation : en effet, certains d'entre eux (e.g., Ad22, 1F7, MABL, CC2C6) induisent l'apoptose sous forme soluble [205, 243, 245-247] ; tandis que d'autres (e.g., B6H12 et 2D3) induisent l'apoptose seulement lorsqu'ils sont immobilisés à la surface [244, 248]. Cette forme d'apoptose est caspase-indépendante et se caractérise par le rétrécissement de la cellule, l'externalisation de résidus phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire, la perte du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS, « reactive oxygen species »), la diminution du niveau de l'adénosine triphosphate (ATP) et la perméabilisation éventuelle de la membrane cellulaire [243-245, 248-251]. Elle est également indépendante des signalisations médiées par les récepteurs Fas (CD95) et TNF (« Tumor necrosis factor »), et la fragmentation de l'ADN et d'autres caractéristiques nucléaires de l'apoptose « canonique » n'ont pas été observées [243, 244].

Dans les lymphocytes T, la protéine BNIP3 (« Bcl-2/E1B-nineteen kilodalton interacting protein ») forme un complexe avec CD47. BNIP3 est une protéine de la famille Bcl-2 (« B-cell lymphoma 2 »), qui possèdent des régions de séquences conservées appelées BH (« Bcl-2 homology domain ») dans leurs gènes. Cette famille contient des protéines proapoptotiques (Bax, Bak, Bid, Bim/Bad, Noxa) qui induisent directement l'apoptose via la dérégulation des mitochondries et des protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1) dont la surexpression bloque effectivement l'apoptose [252]. De plus, la protéine BNIP3 non seulement induit l'apoptose, mais elle assure également la survie cellulaire via l'induction de la dégradation sélective des mitochondries (mitophagie) [253, 254]. Dans le contexte d'association de BNIP3 avec CD47, ceci permet à BNIP3 d'échapper à la dégradation protéasomale et de s'accumuler ensuite dans le cytoplasme. En effet, l'efficacité de l'apoptose-induite par CD47 corrèle avec l'expression de BNIP3 et l'accumulation de BNIP3 sensibilise les cellules à l'apoptose [249, 255]. Suite à l'engagement de CD47, BNIP3 est

transporté dans les mitochondries où il induit le dysfonctionnement de ces dernières et la mort cellulaire subséquente. D'autre part, l'atténuation de l'activité de BNIP3 inhibe l'apoptose [249] et le knockdown de BNIP3 mène à une diminution effective de l'apoptose-induite par l'engagement de CD47 [256].

Le rôle des autres membres des protéines de la famille Bcl2 dans cette voie d'apoptose reste peu claire et même parfois contradictoire. Par exemple, il a été rapporté que l'engagement de CD47 n'affecte pas l'expression de Bcl-2 [245, 246] et que la surexpression de Bcl-2 ne rend pas les cellules Jurkat plus sensibles à l'engagement de CD47 [251]. D'autre part, une autre étude a démontré que la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose dans ces mêmes cellules [249]. Par contre, il a été démontré que la surexpression d'autres protéines de cette famille, telles que Mcl-1, Bax, Bak et Bim, n'affecte pas l'apoptose induite par l'engagement de CD47 [251]. Plus récemment, il a été rapporté que l'anti-CD47 mAb CC2C6 induit l'augmentation simultanée de la protéine proapoptotique Noxa et de la protéine antiapoptotique Mcl-1. Fait intéressant, le ratio entre ces deux protéines n'a pas été affecté. Cette balance entre les deux protéines montrerait que l'état cellulaire obtenu est insuffisant pour provoquer la perméabilisation des mitochondries, la libération du cytochrome c (Cyt c) dans le cytoplasme et l'activation des caspases [205].

Un autre médiateur important impliqué dans cette voie d'apoptose est la protéine Drp1 (« dynamin-related protein 1 ») [251]. Drp1 est une GTPase cytosolique qui se déplace vers les mitochondries par un processus qui dépend des protéases à sérine [257]. L'engagement de CD47 favorise la translocation de Drp1 aux mitochondries, où il affecte la chaîne de transport d'électrons. Ceci mène à la dissipation du $\Delta\Psi_m$, à la génération de ROS, et également à la diminution du niveau d'ATP [251].

CD47 est également impliqué dans l'apoptose "canonique" qui est caspase-dépendante et médiée par le récepteur Fas. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs TNF, connus également sous le nom « récepteurs de mort » (DRs, « death receptors »).

L'engagement du récepteur Fas par des anticorps anti-Fas (e.g., CH11) ou par son ligand (FasL) induit son oligomérisation sous forme de trimère et son activation. Ceci permet ensuite le recrutement de la protéine adaptatrice contenant le domaine DD (« death domain »), FADD (« Fas-associated protein with DD »). FADD contrôle la mort cellulaire via le recrutement de la procaspase 8, formant ainsi le complexe DISC (« death-inducing signaling complex ») [258]. Ce complexe permet le clivage et l'activation de la procaspase 8, et la caspase 8 activée est ainsi libérée dans le milieu cytosolique, où elle va à son tour propager le signal via protéolyse d'un certain nombre de caspases effectrices telles que la caspase 3, la caspase 6 et la caspase 7 [259]. Il a été démontré que le niveau d'expression de CD47 affecte l'apoptose médiée par Fas [260] : les cellules Jurkat CD47-déficientes sont résistantes à l'induction de FasL, tandis que la réexpression de CD47 rétablit la sensibilité à l'engagement de Fas [261]. En effet, l'association de Fas avec l'IgV de CD47 permet l'activation de la voie d'apoptose. L'absence de CD47 entrave les événements proapoptotiques en aval, tels que la perte de $\Delta\Psi_m$, la relâche de Cyt c, l'activation des caspases, le clivage de PARP (« poly (ADP-ribose) polymerase ») et la fragmentation de l'ADN [261].

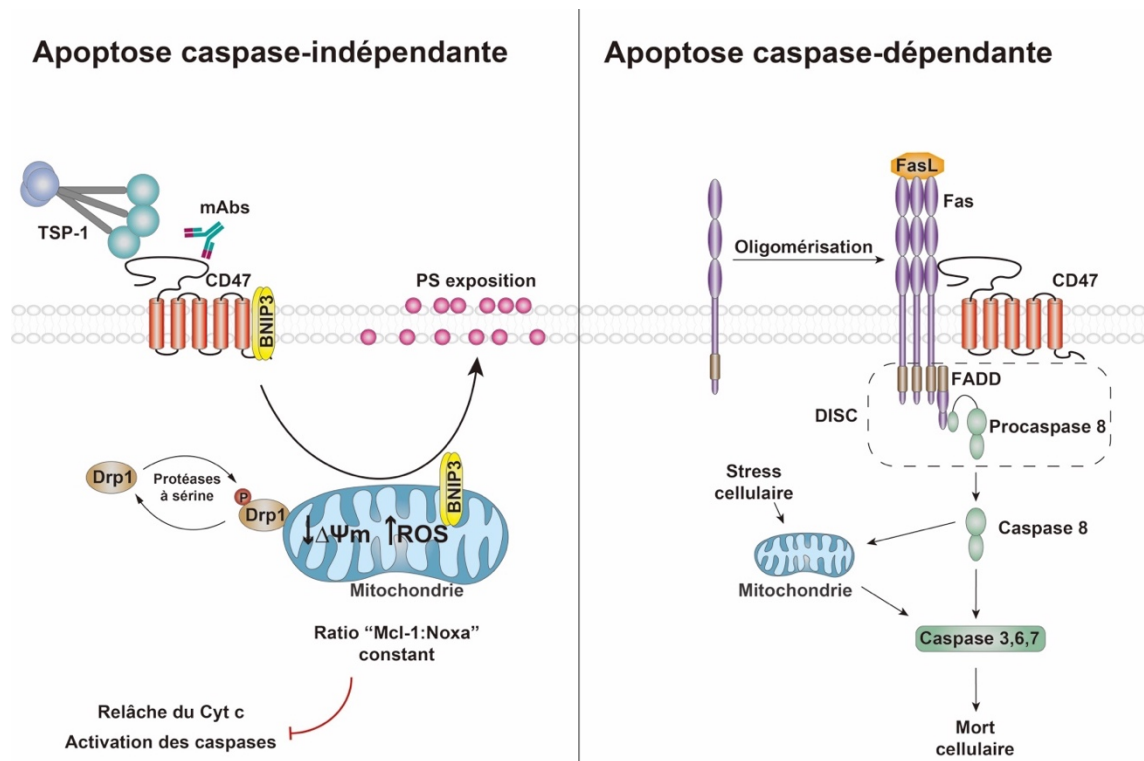


Figure 1.12. Les voies d'apoptose médiée par CD47.

(Gauche) Apoptose caspase-indépendante. L'engagement de CD47 induit par TSP-1 et les mAbs anti-CD47 permet la translocation de BNIP3 et Drp1 aux mitochondries. Ceci entraîne la diminution du $\Delta\Psi_m$, l'augmentation de ROS et éventuellement la mort cellulaire. La production de Mcl-1 et de Noxa augmente, mais le ratio entre ces deux protéines reste constant, incapable d'induire la relâche du Cyt c et l'activation des caspases. **(Droite) Apoptose caspase-dépendante.** La fixation de FasL induit l'oligomérisation du récepteur de Fas, l'association du domaine IgV de CD47 avec le récepteur de Fas favorise l'activation de ce dernier. Ceci permet le recrutement de FADD et de la procaspase 8, formant ainsi le complexe DISC. La procaspase 8 dans le DISC est ensuite clivée, la caspase 8 est ainsi activée et libérée dans le cytosol, qui va à son tour cliver un certain nombre de caspases effictrices.

3.3.3. Rôle dans les infections virales

Les fonctions immuno-régulatrices de l'interaction CD47/ SIRP α ne se limitent pas à la phagocytose. Cette interaction est impliquée également dans la suppression de l'activation des cellules dendritiques (DCs, « dendritic cells ») et l'inhibition de la production de cytokines par les DCs matures [237]. Elle contribue aussi à l'activation des CTLs par les DCs [262]. La protéine CD47 est donc impliquée dans de nombreux processus cellulaires et ses fonctions, notamment l'évasion immunitaire des cellules cancéreuses, ont été largement étudiées telles que mentionnées auparavant. Ceci étant dit, le rôle de CD47 dans le contexte d'infections virales restent relativement peu connu.

La première étude dans ce contexte rapportait l'identification d'une protéine mimétique de CD47 exprimée par le virus myxoma. En effet, ce virus possède une protéine appelée M128L qui est un facteur de virulence [263]. Cette protéine est similaire à CD47 non seulement au niveau de sa séquence, mais aussi au niveau structural. L'expression de M128L est essentielle pour la pathogénicité du myxoma *in vivo*, car la protéine contribue à l'inhibition de l'activation des macrophages, un processus essentiel pour l'élimination de ces éléments pathogènes. Ceci pourrait suggérer le rôle de CD47 dans la régulation immunitaire contre l'infection virale. Par la suite, il a été rapporté que l'expression de CD47 par les cellules NK régule l'homéostasie chez la souris. La réponse antivirale de ces cellules à l'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV, «Lymphocytic choriomeningitis virus ») dépend également à l'expression de CD47 [264]. Plus récemment, une étude a démontré que l'expression de CD47 augmente suite de l'infection de plusieurs virus incluant le SARS-CoV-2 [265].

4. Les macrophages

4.1. Origines et diversité

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée avec une vaste distribution. Ces cellules ont été décrites pour la première fois par Elie Metchnikoff, en 1883. Les macrophages jouent un rôle central dans la défense de la hôte contre les pathogènes et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ils ont été considérés comme strictement issus des monocytes circulants pendant un demi-siècle, mais plusieurs études ont confirmé que les macrophages tissulaires chez l'adulte sont aussi d'origine embryonnaire [266-270]. En effet, les macrophages peuvent se différencier à partir de trois sources : le sac vitellin, le foie fœtal [271], et les monocytes dans le sang périphérique, qui sont eux-mêmes dérivés des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les deux premières donnent naissance à presque tous les macrophages tissulaires.

Les macrophages qui résident dans le système nerveux central (SNC), dénommés microglies, sont les seuls qui dérivent exclusivement du sac vitellin [272, 273]. Les macrophages résidant dans le foie et les poumons, dénommées respectivement les cellules de Kupffer et macrophages alvéolaires, sont dérivés à la fois des macrophages du sac vitellin et des monocytes du foie fœtal [271, 274-276]. Après la naissance, les cellules de Kupffer et les macrophages alvéolaires ont besoin de leurs capacités d'auto-renouvellement et de prolifération pour le maintien du pool [266, 271]. Les macrophages résidant dans et/ou à proximité des tissus muqueux (e.g. l'intestin, le derme et le cœur) n'ont pas la capacité d'auto-renouvellement ; néanmoins, les monocytes circulants se migrent constamment dans ces tissus, et se différencient pour assurer le pool des macrophages tissulaires [267, 277].

4.2. L'infection des macrophages par VIH-1 via la transmission intercellulaire

Les macrophages font partie des cellules cibles du VIH-1, ils expriment le récepteur viral CD4 et les deux corécepteurs CXCR4 et CCR5 [278]. Cependant, le niveau d'expression de ces protéines est plus faible, les macrophages sont ainsi moins susceptibles à l'infection par le VIH-1 que les lymphocytes CD4⁺ [279, 280]. Les cellules de la lignée myéloïde, comprenant également les monocytes et les DCs, expriment constitutivement des facteurs de restriction qui ont pour l'effet d'inhiber la réplication virale après l'entrée [281]. Par conséquent, les macrophages sont modestement infectés par la plupart des isolats viraux *in vitro*, les virus capables d'établir une infection efficace dans les macrophages sont ceux de "macrophage (M)-tropiques", qui possèdent d'une affinité plus forte pour CD4 et émergent relativement tard durant l'infection *in vivo* [279, 280, 282]. Les virus T/F, qui initient la transmission inter-hôte, sont faiblement M-tropiques [283], et infectent les lymphocytes T CD4⁺ beaucoup plus efficacement [283, 284]. Fait intéressant, l'infection des macrophages se retrouve dans toutes les phases de l'infection et de la physiopathologie du VIH et ils y jouent un rôle important [285] ; compte tenu de l'absence des virus M-tropiques à la phase précoce, il est possible que l'infection des macrophages résidants dans les tissus se fasse via l'interaction intercellulaire. En effet, plusieurs modes de transmission du VIH-1 vers les macrophages ont été établies.

4.2.1. Phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés

Une étude par Baxter *et coll.* a démontré que l'infection des macrophages pourrait passer par la capture des lymphocytes T infectés [286]. Ces auteurs ont infecté les lymphocytes T avec le VIH-1 et les ont mis en coculture avec des macrophages dérivés de monocytes (MDMs). Les MDMs étaient ensuite observés en microscopie confocale. Les auteurs ont observé la présence des lymphocytes T infectés à l'intérieur des MDMs. Ces macrophages étaient également infectés productivement, ce qui suggérait une mode de transmission virale très efficace. Ils ont également démontré que la capture était indépendante

de l'interaction entre les glycoprotéines du VIH-1 avec le récepteur CD4, mais dépendait de l'activité du cytosquelette. En utilisant le jasplakinolide (Jasp) et l'EIPA qui bloquent respectivement la phagocytose et la macropinocytose, ils ont observé l'inhibition de la capture uniquement par le Jasp, ce qui suggérait qu'il s'agissait d'un processus de phagocytose. Une autre étude par Ladinsky *et coll.* a été mise en place dans les souris humanisées BLT (« bone marrow, liver, thymus ») infectées par le VIH-1, en utilisant une approche d'imagerie multi-échelle combinée avec la microscopie confocale, et la tomographie en microscopie électronique [287]. Ces auteurs ont observé la phagocytose des lymphocytes T producteurs de virions par les macrophages dérivés de moelle osseuse. Ces cellules T phagocytées étaient dégradées éventuellement dans les phagosomes, mais les virions, matures ou immatures, survivaient et se trouvaient dans les compartiments endosomaux adjacents. Les auteurs ont aussi observé l'assemblage, le bourgeonnement, et la maturation des virions dans des compartiments entièrement clos, qui pourraient par ailleurs se fusionner par la suite avec les autres compartiments possédant un accès à l'espace extracellulaire, permettant ainsi la dissémination virale.

Des observations similaires ont été également obtenues *in vivo* dans le macaque rhésus [288, 289] ; dans ce cas, il s'agit de la phagocytose de lymphocytes T infectées au VIS par les cellules myéloïdes des tissus immunitaires. En effet, ce mode de transmission des pathogènes à partir d'un type de cellule infectée vers un autre par la phagocytose a été nommée la « stratégie du “Cheval de Troie” », qui a été décrite initialement en observant la dissémination de *Leishmania major* au sein d'un hôte infecté [290] : les neutrophiles infectés par *L. major* meurent éventuellement et transfèrent ces parasites à leurs hôtes principaux, les macrophages par phagocytose [291]. Cette stratégie de dissémination vers les macrophages a été également observée chez les bacilles de *Mycobacterium tuberculosis* [292] et *Listeria monocytogenes* [293].

4.2.2. Fusion avec des lymphocytes T CD4⁺ infectés

La fusion des lymphocytes T infectés avec les macrophages a été considérée comme un autre mode de transmission virale entre ces deux types de cellules, qui se produisent parallèlement à la transmission médiée par la SV [294]. L'étude par Bracq et *coll.* a rapporté la formation des cellules géantes multinucléées (MGCs, « Multinucleated giant cells ») exprimant Gag [295]. Ils ont proposé un modèle de fusion en deux étapes : d'abord, la fusion entre les lymphocytes T CD4⁺ infectés au VIH-1 et les MDMs est suivie, par la suite, de la fusion des MDMs infectés avec les MDMs adjacents pour aboutir à la formation des MGCs contenant des virions infectieux. Ils ont observé la présence des marqueurs de lymphocytes T (CD2, CD3, Lck) dans les MGCs, et ont démontré que la fusion est dépendante des glycoprotéines du VIH-1. Ce même groupe a ensuite étendu l'observation aux DCs immatures et aux ostéoclastes [296], en proposant que ce mode de fusion constitue une façon commune de transmission virale entre les lymphocytes T et les cellules myéloïdes. De plus, ils ont trouvé que les MGCs pouvaient surmonter, au moins partiellement, la restriction imposée par SAMHD1, probablement grâce à l'import des composantes cyclin/CDK et des dNTPs issus des lymphocytes T suite à la fusion, qui a pour effet d'inactiver et de saturer l'activité antivirale de SAMHD1.

La présence des macrophages et de DCs multinucléés a été rapportée *in vivo* chez les patients du VIH-1 [297, 298]. Par exemple, les syncytia VIH-1⁺ multinucléés exprimant des marqueurs de DCs ont été observés à la surface des amygdales nasopharyngiennes des patients [298]. Les macrophages multinucléés se trouvent dans les tissus différents (e.g., les ganglions lymphatiques, le cerveau, les poumons, etc.) [299-302] soulignant que ces observations pourraient suggérer un rôle des MGCs dans la pathogénèse du VIH-1.

4.2.3. « Tunneling nanotubes » entre les macrophages

Les nanotubes « tunneling nanotubes » ou TNT sont des minuscules tunnels qui permettent la communication entre les cellules par l'échange d'ions, de protéines, d'organites,

et même de virus. Ceux sont des structures riches en F-actine connectant au moins deux cellules distantes [303-305]. Les TNT sont dynamiques et pourraient s'étendre jusqu'à 200 μm en longueur [306] avec un diamètre entre 50 et 200 nm [307]. Dans les macrophages, il existe des TNT courts contenant seulement de la F-actine et des TNT longs contenant également les microtubules [305] : les premiers permettent le transport des particules virales, tandis que les derniers sont impliqués dans le transport des vésicules contenant des virions (e.g., exosomes) [306]. Il a été rapporté que la protéine accessoire Nef joue un rôle important dans l'induction de la formation des TNT, via son interaction avec la protéine M-sec, qui est un régulateur clé des TNT [308]. L'ensemble de ces observations indiquent que dans le cas d'infection des macrophages, le VIH-1, via la protéine Nef, détourne les structures de TNT pour assurer sa transmission entre ces cellules.

4.3. L'impact de l'infection des macrophages

4.3.1. Dissémination virale

L'infection par le VIH-1 induit la déplétion des lymphocytes T mais, au contraire, les macrophages infectés sont relativement moins susceptibles aux effets cytopathiques du virus, et possèdent une longue durée de vie [309, 310]. Les macrophages sont capables de migrer et traverser également la barrière hémato-encéphalique : ils seraient ainsi une source de production virale qui permettant la dissémination du virus à presque à tous les tissus du corps incluant le système nerveux central [311-314]. Il a été rapporté que l'infection des macrophages *in vitro* entraîne l'accumulation de particules virales infectieuses dans les compartiments intracellulaires (VCC, «virus-containing compartments»), dont la plupart sont connectés à la surface cellulaire [315-317]. Les VCCs proviennent de la séquestration intracellulaire des domaines de la membrane plasmique avec une composition spécifique protéique et lipidique [318, 319]. En effet, des protéines de la surface cellulaire, telles que les tétraspanines CD9, CD53 et CD81 [315], sont trouvées à la membrane de VCCs pour maintenir la rigidité de ces compartiments. Ils contiennent également les récepteur CD36, CD44 et les complexes de CMH II [317, 320, 321].

Les particules virales pourraient être retenues dans les VCCs pour une longue période grâce à son pH neutre [322]. Les virions se déplacent ensuite au niveau de la SV formée entre les MDMs et les cellules T non-infectées, menant à l'infection efficace de ces dernières [323]. La réduction du volume de VCCs entraînerait une diminution de la transmission des particules virales aux lymphocytes T autologues, soulignant l'importance des VCCs dans ce mode de dissémination virale [324]. De plus, le recrutement de ces compartiment à proximité de la SV a été observé [325], les marqueurs de VCCs CD9 et CD81 ont été également trouvés enrichis à cette structure [326]. En effet, l'accumulation de protéine Gag a été observée au niveau de la SV formée entre les MDMs infectés et les lymphocytes T non-infectés ; son recrutement est indépendant des glycoprotéines du VIH-1, contrairement à la SV observée entre les cellules T [325]. En effet, le recrutement de Gag est régulé par le réseau des microtubules, qui affecte également la relâche des virions [327]. L'accumulation des particules infectieuses au niveau de la SV favorise finalement la transmission aux lymphocytes T CD4⁺ adjacents [325, 326, 328]. En résumé, il est donc probable que par la fusion et l'utilisation des nanotubes présentées ci-dessus, les macrophages infectés transmettent le virus aux lymphocytes, mais aussi également aux autres macrophages.

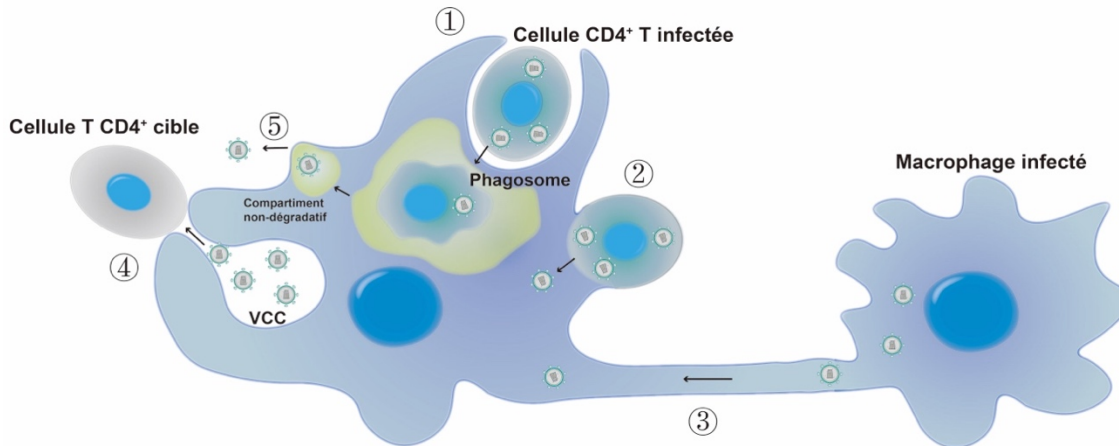


Figure 1.13. Macrophages dans la transmission intercellulaire du VIH-1.

Les macrophages peuvent être infectés par différents mécanismes et ils transmettent également les virions vers d'autres cellules adjacentes. (1) La phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés permet l'infection des macrophages : les lymphocytes T phagocytés sont dégradés éventuellement, tandis que les virions survivent. (2) La fusion avec les lymphocytes T CD4⁺ infectés permet la formation des hétérocaryons puis des MGCs. (3) Les cellules infectées (e.g., les macrophages) transmettent les virions via les nanotubes TNT, ce qui permet la dissémination du VIH-1 vers d'autres macrophages. (4) Dans les macrophages infectés, les virions peuvent être retenus dans les VCCs, des compartiments connectés à la surface cellulaire. La relâche des virions permet ensuite l'infection des cellules cibles adjacentes. (5) Les virions survivants après la phagocytose sont retenues dans les compartiments relativement fermés mais sans dégradation. Après les fusions subséquentes de ces compartiments, les virions sont finalement relargués dans le milieu extracellulaire pour infecter les cellules adjacentes.

4.3.2. Réservoir viral

Les macrophages, en plus des lymphocytes T CD4⁺ mémoires au repos, des DCs folliculaires des ganglions lymphatiques, ainsi que des cellules progénitrices hématopoïétiques, sont des constituants du réservoir viral du VIH-1 [329]. On entend par réservoir viral un type cellulaire ou un site anatomique où se cachent les virions « dormants » mais compétents pour la réplication [330]. En effet, le VIH-1 recommence à se répliquer dès l'absence de traitement. Les réservoirs viraux permettent également de rétablir la population des cellules infectées. De plus, les macrophages sécrètent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, attirant les

lymphocytes T, et ainsi permettant d'augmenter le nombre de cellules infectées par les mécanismes discutés dans les sections ci-dessus. Les protéines virales sont capables de moduler la voie de signalisation du récepteur TNF, qui peut moduler la formation du réservoir viral dans les macrophages [331].

Tel que déjà mentionné, la longue durée de vie et la plus grande résistance de ces cellules aux effets cytopathiques du virus confèrent potentiellement aux macrophages le potentiel de fonctionner comme un réservoir du VIH-1. Les macrophages infectés ont été trouvés dans de nombreux tissus tels que le cerveau, les poumons et les GALT chez les individus infectés [332-334]. Chez les individus sous traitement, une étude a démontré que la quantité totale de l'ADN viral dans une biopsie lymphoïde dépasse celle détectée dans les lymphocytes T CD4⁺, suggérant l'existence d'un réservoir viral autre part que dans les lymphocytes T [335]. L'ADN proviral a aussi été détecté dans les macrophages isolés à partir des tissus rectal et iléal [336]. Une étude plus récente a démontré, pour la première fois, que les macrophages du tissu urétral de patients infectés ont la capacité à produire des virus dès l'arrêt du traitement ; Mais surtout, la réplication virale était seulement observée dans les macrophages lorsque les auteurs stimulaient également les lymphocytes T isolés à partir du même tissu, suggérant le rôle principal des macrophages à la constitution du réservoir viral dans les muqueuses urétrales [337].

4.3.3. Pathogénèse virale

Les macrophages des tissus muqueux sont parmi les premières cellules ciblées par le VIH-1 grâce à leur localisation à proximité du site de l'infection [337, 338]. Malgré l'absence de virus M-tropique durant la phase précoce, l'infection des macrophages pourrait se réaliser via la phagocytose des lymphocytes T infectés tel que discuté ci-dessus. En effet, les GALT sont la cible majeure du VIH-1 pendant l'infection aiguë, et ces tissus contiennent une grande quantité de macrophages. Cependant, les macrophages intestinaux sont relativement réfractaires à l'infection, en raison de l'exposition *in situ* au TGF- β (« Transforming growth factor- β ») qui réduit l'expression de CD4 et CCR5 [339]. De plus, les cellules myéloïdes

intestinales expriment un niveau plus haut de microARN miR-221, qui a pour effet de réguler négativement CD4, diminuant ainsi la susceptibilité de ces cellules à l'infection [340]. Ces macrophages pourraient par contre assister à la transmission virale via la phagocytose des lymphocytes T infectés et leur rôle comme APCs. Il est à noter qu'à ce stade, les virions peuvent se déplacer dans la circulation sanguine, et sont ainsi capables d'infecter les macrophages périvasculaires, qui migrent par la suite vers d'autres organes, y compris les poumons et le cerveau [341]. Au cours de la phase aiguë, les macrophages jouent un rôle important dans l'induction des réponses immunitaires adaptative et humorale, en diminuant le fardeau viral sur les cellules immunitaires et en baissant la virémie [342].

Avec l'évolution de l'infection vers le stade avancé, les virus M-tropiques émergent. Grâce à leur distribution dans plusieurs tissus et leur potentiel comme un réservoir viral, les macrophages tissulaires peuvent contribuer à la progression du VIH-1 chez l'individu infecté. Cette progression pourrait dépendre de l'état d'activation des processus inflammatoires. En effet, l'inflammation associée avec la phase chronique représente un risque pour les maladies cardiovasculaires (MCV), et les macrophages sembleraient avoir un rôle central dans ce processus. Les corrélations entre la durée de l'infection par VIH-1, les marqueurs de l'inflammation, la présence des macrophages inflammatoires et la pathogenèse de MCV ont été confirmées [343]. De plus, l'infection au niveau du SNC est associée à l'inflammation, qui aboutit aux pathologies allant d'encéphalites à des maladies neurodégénératives plus sévères (HAND, « HIV associated neurological disorders »). En effet, le HAND semble résulter de l'infiltration des cellules mononucléaires dans le parenchyme cérébral et possiblement de la formation des MGCs. Ces MGCs, tels que mentionnés, sont formés par la fusion entre les macrophages infectés et non-infectés ; quoiqu'il en soit, les macrophages sont des cellules productrices du VIH-1 dans le cerveau [295, 344]. Le VIH-1 entre dans le SNC très précocement et continue à s'y rendre tout de long de l'infection [285]. Les monocytes envahissants et les macrophages périvasculaires sont capables de transmettre le VIH-1 aux microglies et possiblement aux astrocytes ; de cette manière, l'inflammation chronique persiste [345, 346].

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La revue de la littérature nous a permis de constater les divers rôles de CD47 dans différentes voies de signalisation et l'importance des macrophages dans la pathogenèse du VIH-1. Compte tenu du rôle de CD47 dans la régulation de la phagocytose et de l'apoptose, ainsi que sa potentielle régulation négative par Vpu, les deux prochains chapitres de cette thèse présentent mes travaux, sous forme d'articles scientifiques, qui visent à mieux comprendre le rôle de l'interaction Vpu-CD47, dans la pathogenèse du VIH-1.

Dans le premier article, j'ai déterminé que CD47 est régulé négativement par Vpu durant l'infection par le VIH-1. Par la suite, j'ai examiné l'effet de cette régulation négative sur la phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés par les macrophages, et son implication dans l'infection productive des macrophages. Cette section inclut donc 3 objectifs spécifiques :

1. Valider la régulation négative de CD47 par Vpu durant l'infection et analyser la conservation de cette fonction en utilisant des souches différentes de virus exprimant Vpu.
2. Déterminer si cette régulation négative module la capture et la phagocytose des lymphocytes T infectés par les macrophages et mène à leur infection productive.
3. Élucider le mécanisme de la régulation de CD47 médiée par Vpu.

Dans le second article, j'ai déterminé que Vpu affecte l'apoptose induite par l'engagement de CD47 dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés.

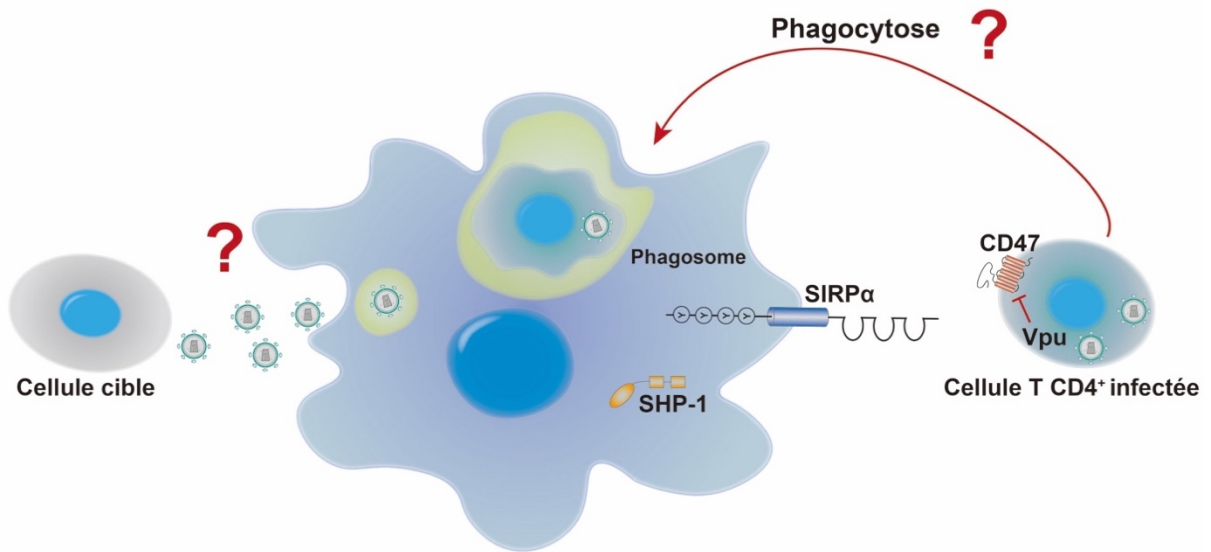


Figure 1.14. Résumé des objectifs principaux de la première article.

CHAPITRE 2: ARTICLE 1

La protéine Vpu du VIH-1 favorise la phagocytose des cellules T CD4⁺ infectées par les macrophages via la régulation négative de CD47

L'objectif de ce chapitre était donc de valider la régulation négative de CD47 par Vpu dans un contexte physiologique et d'étudier son rôle dans la régulation de la phagocytose des cellules T CD4⁺ infectées par les macrophages.

J'ai élaboré, développé et exécuté toutes les expériences, les analyses, les figures et l'écriture de la première version du manuscrit. L'article a été évalué par le journal mBio, la version plus à jour est présente ci-après.

Résumé:

La protéine accessoire Vpu du VIH-1 régule négativement de nombreuses protéines membranaires, ce qui est l'une des stratégies pour l'évasion des réponses immunitaires. Dans ce chapitre, nous présentons des résultats indiquant que Vpu est capable d'induire une régulation négative de CD47, une protéine de surface multifonctionnelle impliquée dans plusieurs voies de signalisation contrôlant notamment la phagocytose. En effet, l'interaction de CD47 avec SIRP α , un récepteur inhibiteur principalement exprimé dans les cellules myéloïdes, permet l'inhibition de la phagocytose. Nous démontrons que la régulation négative de CD47 par Vpu entraîne l'augmentation de la capture et de la phagocytose des cellules T CD4⁺ infectées, permettant ainsi l'infection productive des macrophages. De plus, Vpu interagit avec CD47 via son domaine transmembranaire et cible CD47 à la dégradation lysosomale. Nos résultats mettent en évidence le rôle de Vpu dans la modulation de l'infection des macrophages, ce qui pourrait avoir des implications pour la transmission du VIH-1 aux phases précoces de l'infection.

HIV-1 Vpu promotes phagocytosis of infected CD4⁺ T cells by macrophages through downregulation of CD47

Lijun Cong^a, Scott M. Sugden^a, Pascal Leclair^b, Chinten James Lim^b,
Tram NQ. Pham^a, Éric A. Cohen^{a,c,#}

^aLaboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada; ^bDepartment of Pediatrics, University of British Columbia, Vancouver, Canada; ^cDepartment of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author.

Correspondence: Éric A. Cohen
Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM)
110 Pine avenue west, Montreal, Quebec
Canada, H2W 1T5
Tel: 514-987-5804
Email: eric.cohen@ircm.qc.ca

Running title: HIV-1 Vpu downregulates the CD47 protein

Abstract: 233/250 words (importance section: 148/150 words)

Main text: 4678/5000 words

Figures: 7

Supplementary materials: 7 Supplementary Figures and 1 Supplementary table

ABSTRACT: Human immunodeficiency virus (HIV) remodels the cell surface of infected cells to facilitate viral dissemination and promote immune evasion. The membrane-associated Vpu accessory protein encoded by HIV-1 plays a key role in this process by altering cell surface levels of multiple host proteins. Using an unbiased quantitative plasma membrane profiling approach, we previously identified CD47 as a putative host target downregulated by Vpu. CD47 is a ubiquitously-expressed cell surface protein that interacts with the myeloid cell inhibitory receptor SIRP α to deliver a “don’t-eat-me” signal, thus protecting cells from phagocytosis. In this study, we investigate whether CD47 modulation by HIV-1 Vpu might promote the susceptibility of macrophages to viral infection via phagocytosis of infected CD4⁺ T cells. Indeed, we find that Vpu downregulates CD47 expression on infected CD4⁺ T cells leading to an enhanced capture and phagocytosis by macrophages. We further provide evidence that, this Vpu-dependent process allows a CCR5-tropic transmitted/founder (T/F) virus, which otherwise poorly infects macrophages in its cell-free form, to efficiently infect macrophages. Importantly, we show that HIV-1-infected cells expressing a Vpu-resistant CD47 mutant are less prone to infect macrophages through phagocytosis. Mechanistically, Vpu forms a physical complex with CD47 through its transmembrane domain and targets the latter for lysosomal degradation. These results reveal a novel role of Vpu in modulating macrophage infection, which has important implications for HIV-1 transmission in early stages of infection and the establishment of viral reservoir.

IMPORTANCE: Macrophages play critical roles in HIV transmission, viral spread early in infection, and as a reservoir of virus. Selective capture and engulfment of HIV-1 infected T cells was shown to drive efficient macrophage infection suggesting that this mechanism represents an important mode of infection notably for weakly macrophage-tropic T/F viruses.

In this study, we provide insight into the signals that regulate this process. We show that the HIV-1 accessory protein Vpu downregulates cell surface levels of CD47, a host protein that interacts with the inhibitory receptor SIRP α to deliver a “don’t-eat-me” signal to macrophages. This allows for enhanced capture and phagocytosis of infected T cells by macrophages, ultimately leading to their productive infection even with T/F virus. These findings provide new insights into the mechanisms governing the intercellular transmission of HIV-1 to macrophages with implications for the establishment of the macrophage reservoir and early HIV-1 dissemination *in vivo*.

INTRODUCTION

The viral protein U (Vpu) is a membrane-associated accessory protein encoded by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and related simian immunodeficiency viruses (SIVs) but not by HIV-2. Consistent with the roles of HIV-1 accessory proteins in targeting cellular restriction factors to favor immune evasion and viral dissemination, Vpu counteracts many host proteins including BST2/Tetherin to promote efficient viral particle release (1, 2) and CD4 to avoid superinfection and subsequent premature cell death (3). The downregulation of both CD4 and BST2 also protects HIV-1 infected CD4⁺ T cells from antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) (4). Given the contribution of Vpu towards HIV pathogenesis, partly through targeting BST2 and CD4, there is a continuing interest in identifying additional Vpu targets. To date, a diverse list of host factors has been identified including CD1d, NTB-A/SLAMF6, PVR/CD155, CCR7, CD62L; SNAT1 (5), ICAM1/3 (6), CD99 and PLP2 (7), PSGL-1 (8), Tim-3 (9), and there likely are more to be discovered. Indeed, using a stable isotope labelling of amino acids in cell culture (SILAC)-based proteomic approach, we and others previously identified CD47 as a potential target that is downmodulated by Vpu (6, 10).

CD47, also known as integrin-associated protein (IAP), is a ubiquitously-expressed type I transmembrane protein (11) that serves as a ligand of the signal regulatory protein- α (SIRP α , or CD172a), an inhibitory receptor mainly expressed on myeloid cells, like macrophages and dendritic cells (DCs) (12, 13), but also on cytolytic T lymphocytes (14). The interaction between these two proteins results in a “don’t-eat-me” signal that inhibits phagocytosis of target cells expressing CD47 by macrophages and DCs, thus providing an important regulatory switch for the phagocytic function of these cells.

Macrophages make up a heterogeneous population of immune cells that play important roles in tissue homeostasis and host defense against pathogens partly through their phagocytic function (15). They are increasingly recognized as important cellular targets of HIV-1 infection (16, 17). Indeed, given their relatively lengthy life span and unique ability to resist HIV-1 cytopathic effects and CD8⁺ T cell-mediated killing (18, 19), macrophages are thought to be an important viral sanctuary and vector for HIV-1 dissemination as well as a potential viral reservoir during antiretroviral therapy (ART) (20-23). Macrophages are among the early targets of HIV-1 infection given their proximity to the portal of viral entry, commonly the mucosal tissue (21, 24). They express the CD4 receptor and both chemokine coreceptors CXCR4 and CCR5. While macrophage-tropic (M-tropic) viruses mainly use CCR5 as coreceptor, they are paradoxically mostly isolated from brain tissues of AIDS patients at late stages of infection (17, 25). Yet, infected tissue macrophages can be detected at all stages of disease (26) and T/F viruses that initiate infection as well as inter-individual transmission are weakly M-tropic (27). It is therefore crucial to understand the mechanisms by which macrophages become infected during the early phase of infection. In this regard, it has been reported that macrophages capture SIV- or HIV-1-infected T cells, retain infectious particles in a non-degradative compartment and ultimately become infected (28-30). As well, proinflammatory cytokines secreted shortly after infection (31) may activate macrophages and enhance the phagocytosis of infected CD4⁺ T cells in proximity *in vivo*.

Putting our observation in this context, we investigated whether Vpu-mediated CD47 downregulation would facilitate macrophage infection by promoting phagocytosis of HIV-1-

infected CD4⁺ T cells. In the current study, we report that Vpu downregulates CD47 from the surface of infected CD4⁺ T cells. We also show that CD47 modulation by Vpu promotes enhanced capture and phagocytosis of T cells by monocyte-derived macrophages (MDMs), which ultimately leads to productive infection of MDMs. In addition, our findings uncover that through this process a T/F virus could efficiently infect MDMs, revealing a possible model for macrophage infection at early stages of infection. Importantly, mechanistic studies reveal that Vpu depletes CD47 via a process that requires its transmembrane domain (TMD) for binding CD47 as well as the DSGNES diserine motif and the ExxxLV trafficking motif for targeting CD47 to lysosome-dependent degradation.

RESULTS

Vpu downregulates CD47 from the surface of HIV-1-infected CD4⁺ T cells.

To verify the expression profile of CD47 in the context of HIV-1 infection, we first examined the effect of Vpu on CD47 surface expression levels in HIV-1-infected SupT1 cells that do not express BST2 (32). Given that both BST2 and CD47 localize to lipid rafts at the cell surface (12, 33), and as such might be part of supramolecular protein complexes, the use of SupT1 cells would indicate whether the effect of Vpu on CD47 was independent from BST2 downmodulation by Vpu. To this end, SupT1 cells were infected with the CXCR4 (X4)-tropic GFP-marked NL4-3 HIV-1 (NL4-3) expressing (WT) or lacking Vpu (dU) and surface expression of CD47 was measured by flow cytometry at 48 hours post-infection (hpi). Infection with WT HIV-1 resulted in an ~30% decrease in surface CD47 levels on infected cells as compared to bystander GFP⁻ cells or cells infected with dU HIV-1, suggesting that modulation of CD47 by Vpu did not involve BST2 (Fig. 1). This downregulation of CD47 was also observed to varying extents in primary CD4⁺ T cells infected with either NL4-3, CCR5 (R5)-tropic NL 4-3.ADA.IRES.GFP (NL 4-3 ADA) or R5-tropic T/F WITO virus expressing Vpu (16% to 24% downregulation, average of n=4). Importantly, no such modulation in CD47 expression was noted in cells infected with the respective dU derivatives of these viruses (Fig. 1), further confirming a Vpu-dependent downregulation of CD47 during HIV infection of primary CD4⁺ T cells.

CD47 is reported to undergo post-translational pyroglutamate modification at the SIRP α binding site by the glutaminyl-peptide cyclotransferase-like protein (QPCTL), a modification that is thought to positively regulate the CD47/SIRP α axis by enhancing SIRP α binding (34).

Since CD47 surface expression was detected using anti-human CD47 mAb clone CC2C6, which specifically recognizes the pyroglutamate of CD47, we next assessed whether Vpu targeting of CD47 is dependent or independent of the pyroglutamate epitope. Using the anti-human CD47 mAb clone B6H12 that recognizes all forms of CD47 at the cell surface, we found that the extent of Vpu-mediated downregulation of CD47 (~40%) was comparable to that detected with the CC2C6 mAb in infected Jurkat E6.1 cells (Fig. S1). Together, these data show that Vpu downregulates all forms of CD47 from the surface of HIV-1-infected CD4⁺ T cells.

Vpu-mediated CD47 downregulation enhances capture and phagocytosis of infected T cells by MDMs.

CD47 is known to function as a marker of “self” that protects healthy cells from being engulfed by macrophages. Accordingly, hematopoietic cells lacking CD47 are efficiently cleared by macrophages (35). Therefore, we hypothesized that Vpu-mediated downregulation of CD47 modulates the capture and phagocytosis of HIV-1-infected T cells by MDMs. To test this, we generated a CD47 knockout (CD47KO) Jurkat E6.1 cell line (Fig. S2A and B). First, target Jurkat cells (CD47 expressing control and CD47KO) were infected with NL 4-3 ADA (WT or dU) for 48 h, then labelled with CFSE and cocultured with MDMs for 2 h to assess the capture of labelled T cells by CD11b-expressing macrophages using flow cytometry (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, we observed a significantly higher frequency of CD11b⁺/CFSE⁺ MDMs upon coculture with WT-infected CD47-expressing Jurkat cells (~12 %, average of n=4) compared to those cocultured with mock- or dU-infected Jurkat cells (~7.5 or 8.8 %, respectively, average of n=4). When MDMs were cocultured with CD47KO Jurkat cells, there

was an overall increase in capture of target cells (Fig. S2C), and this increase was unchanged regardless of whether these cells were infected with WT or dU virus (21.5% vs 23.3% or 22%, average of n=4 for mock vs WT and dU, respectively. Fig. 2B). In keeping with an inverse correlation between cell capture efficiency and CD47 expression on target cells, these results indicate that Vpu-mediated CD47 downregulation enhanced the susceptibility of T cells to be taken up by MDMs.

To directly demonstrate that this process was a consequence of phagocytosis, we performed similar experiments using target cells labelled with pHrodo, a pH-sensitive dye that becomes fluorescent within the acidic environment of phagolysosomes, thus enabling an accurate measurement of *bona fide* phagocytosis. Indeed, using this approach we also observed a significantly higher frequency of CD11b⁺/pHrodo⁺ cells when MDMs were cocultured with WT (6.3 %, average of n=5) instead of dU (3.2 %, average of n=5) virus-infected targets (Fig. 2C). Also consistent with the data from the capture assay (Fig. 2B; Fig. S2C), CD47KO target cells were more efficiently phagocytosed by MDMs (Fig. S2D) and the extent of which was comparable among uninfected, WT- or dU-virus (10.8, 12.8 and 14.6 %, respectively, average of n=5) infected targets (Fig. 2C). Importantly the differential impact of Vpu on the capture and phagocytosis of CD47-expressing T cells was not linked to an increase in the frequency of Annexin⁺ apoptotic target cells, a condition known to trigger phagocytosis by MDMs (Fig. S2E). Taken together, these results indicate that Vpu promotes both capture and phagocytosis of target cells.

Phagocytosis of infected CD4⁺ T cells promotes productive infection of MDMs by T/F virus.

T/F viruses were reported to display a much weaker tropism for MDMs compared to truly M-tropic virus strains (27). Indeed, there was no detectable infection (based on intracellular Gag p24) of MDMs using WITO T/F virus (MOI = 5), whereas infection with a cell-free WT NL 4-3 ADA virus (M-tropic, MOI = 2) resulted in up to 1.5 - 5 % of p24⁺ cells (Fig. S3A). To investigate whether WITO could infect MDMs via phagocytosis of infected primary CD4⁺ T cells, MDMs were either cocultured with CD4⁺ T cells infected (to a comparable level, Fig. S3B) with either ADA or WITO viruses or cultured in the presence of the corresponding virion-containing supernatants from T cell cultures prior to extensive washes to eliminate input target T cells or virions. The former was referred to as “co-culture” while the latter, was designated “cell-free” in Fig. 3. Conditioned supernatant from both “co-culture” and “cell-free” infections was collected at various time points and quantified for infectious particles using a TZM-bl cell-based luciferase reporter assay (Fig. 3A). While the media from cell-free-infected MDMs revealed a modest luciferase activity for both ADA and WITO infections, that from MDMs cocultured with infected CD4⁺ T cells showed meaningfully higher levels (Fig. 3B). Interestingly, we observed an approximately 6- to 9-fold higher viral production (day 2) for MDMs cocultured with WITO-infected CD4⁺ T cells compared to those with ADA-infected cells (Fig. 3B), despite the initially comparable infection of CD4⁺ T cells at the time of the cocultures (Fig. S3B). These results show that HIV and notably T/F viruses can productively infect MDMs through cell-to-cell contact with infected CD4⁺ T cells. To directly support the notion that capture and engulfment of infected T cells was occurring in these conditions, MDMs cocultured with T cells infected with GFP-marked viruses were processed

for immunostaining and analysis by confocal microscopy. As shown in Figure 3C, the presence of GFP⁺ MDMs in close contact with T cells or containing intact GFP⁺ T cells could be observed. Furthermore, MDMs displaying a GFP signal following cell-contact showed the presence of multiple nuclei and harbored Gag p17 immunostaining in internal compartments as well as at the cell periphery, suggesting the intercellular transfer of fully mature virus particles to MDM (Fig. 3D). Taken together with the capture/ phagocytosis data (Fig. 2), we assert that the improved infection of MDMs is likely a consequence of their engulfment of infected CD4⁺ T cells.

To provide evidence that the infection of MDMs was indeed due to phagocytosis, we introduced Jasplakinolide (Jasp) to the cocultures (Fig. 4A). Jasp was reported to promote actin polymerization and stabilize actin filaments, thereby inhibiting cellular processes dependent on actin dynamics including phagocytosis (28, 36). In brief, MDMs were pretreated with Jasp, cocultured with WITO-infected CD4⁺ T cells, and analyzed by flow cytometry for phagocytosis activity (Fig. 4B) and the frequency of infected (Fig. 4C) MDMs. Treatment of MDMs with Jasp effectively inhibited phagocytosis (Fig. 4B) and blocked the infection (Fig. 4C). Consistent with these findings, the level of infectious viral particles, measured via luciferase activity in TZM-bl cells was negligible in the supernatant of MDMs cultures following Jasp treatment (Fig. 4D). As well, the fact that reverse transcriptase inhibitor zidovudine (AZT) or integrase inhibitor raltegravir (Ral) (Fig. S4A and B) could block MDMs infection following coculture of WITO-infected CD4⁺ T cells further validates the authenticity of the MDMs infection.

Given that the effect of actin filament disruption on HIV-1 viral release remained unclear (37), we assessed whether Jasp treatment would affect virion release, which would ultimately interfere with MDMs infection. To this end, WITO-infected T cells were washed to remove cell-free virions and then cultured in the presence or absence of Jasp. As shown in Fig. 4E, Jasp treatment did not affect the release of viral particles from T cells. Altogether, using different cell-based assays, we provide evidence that the ability of MDMs to phagocytose infected T cells rendered them susceptible to infection by viruses which would otherwise be poorly infectious.

Vpu facilitates productive infection of macrophages by enhancing phagocytosis of infected T cells through CD47 downregulation

To directly address whether the enhanced uptake of infected T cells that display a CD47 downregulation by Vpu results in enhanced infection of macrophages, similar experiments were conducted using WT or dU WITO-infected Jurkat cells as target (Fig. 5A). Consistent with our previous results, we observed a significantly higher frequency of CD11b⁺/pHrodo⁺ cells upon coculture of MDMs with WT WITO-infected Jurkat cells (7%, average of n=4) as compared to the cocultures with mock- or dU WITO-infected Jurkat cells (3.2% or 4.6%, respectively, average of n=4. Fig. 5B), a condition that was directly linked to a Vpu-dependent downregulation of CD47 expression at the surface of infected T cells (Fig. S5A), yet was independent from apoptosis (Fig. S5B). Importantly, we found that macrophage infection was generally more efficient upon coculture with T cells infected with WT WITO as compared to coculture with T cells infected with Vpu-deficient WITO (Fig. 5C), thus supporting the notion

that enhanced phagocytosis of infected T cells by MDMs following Vpu-mediated CD47 downregulation promotes a heightened productive infection of MDMs.

Vpu binds CD47 via its transmembrane domain (TMD) and targets CD47 for lysosomal degradation.

We next sought to understand the mechanism involved in Vpu-mediated CD47 antagonism. HEK 293T cells were co-transfected with plasmids expressing CD47 and Vpu and analyzed by Western blotting for CD47 expression. CD47 was downregulated by Vpu in a dose-dependent manner by as much as 60% (Fig. 6A), bringing the question as to how, mechanistically, Vpu mediates the depletion. Thus, we generated Vpu variants that contain mutations within the main functional domains including the: (1) A15L-W23A in the TMD that is involved in various target interactions (38, 39), (2) S53/57A mutation within the DSGNES diserine motif that is involved in the recruitment of the SCF^{βTrCP} E3 ubiquitin ligase, responsible for ubiquitination and degradation of several Vpu targets (40, 41), and (3) A₆₃XXXA₆₇V (A_{XXX}AV for short) within the E_{XXX}LV trafficking motif, which targets Vpu-containing complexes to intracellular compartments away from the plasma membrane (42). To this end, we found that all three Vpu mutants prevented CD47 depletion (Fig. 6B and C(input)), suggesting the importance of the main functional domains of Vpu in this process. Indeed, the A15L-W23A mutant was unable to bind CD47 (Fig. 6C), implying that the Vpu TMD mediates the complex formation with CD47. To determine whether Vpu induces CD47 protein degradation by either the proteasomal or lysosomal pathway, we treated Vpu- and CD47-expressing HEK 293T transfectants with proteasomal inhibitor MG132 or lysosomal inhibitor Concanamycin A (ConA) and found that ConA, but not MG132 prevented CD47

depletion (Fig. 6D). Collectively, these results indicate that Vpu binds CD47 via its TMD and targets the host protein for lysosomal degradation. Conceivably, this process requires both the SCF^{βTrCP}-recruiting DSGNES diserine motif as well as the ExxxLV trafficking signal, consistent with the lack of CD47 degradation by the S53/57A and AxxxAV mutants.

Furthermore, given that Vpu is typically involved in TMD-TMD interactions with its target proteins, we generated a chimeric CD47 mutant, composed of the extracellular domain (ECD1, aa 1-141) of human CD47 as well as the five membrane-spanning domains (MSDs) and the cytoplasmic tail (CT) of mouse CD47 (Fig. S6), which displays ~26% of aa sequence divergence mainly found in the first and second MSDs. In this configuration, CD47 became largely resistant to Vpu-mediated degradation, consistent with the fact that the mouse CD47 counterpart was insensitive to Vpu (Fig. S6). These results suggest that the MSDs are important determinants of human CD47 susceptibility to Vpu-mediated degradation.

HIV-1-infected cells expressing Vpu-resistant chimeric CD47 are less prone to infect macrophages through phagocytosis.

Given that chimeric CD47 was resistant to Vpu-mediated degradation, we next asked if expression of this mutant would alter target cell susceptibility to phagocytosis by MDMs. To this end, we used a CD47KO Jurkat cell line (JC47) (43) to generate cell lines stably expressing either the human-mouse chimeric CD47 (JC47-cCD47) or human CD47 (JC47-hCD47). Cells were selected and enriched by fluorescence-activated cell sorting (FACS) to obtain CD47 expression levels comparable to those detected on the parental Jurkat cells (Fig. 7A). Upon infection of these cell lines with NL 4-3 ADA WT HIV-1, we observed

downregulation of CD47 by 40 % on JC47-hCD47 cells but only by 10 % on those expressing the chimeric JC47-cCD47 (Fig. 7B). Next, we investigated the susceptibility of uninfected (mock) and infected JC47-derived cell lines to phagocytosis by MDMs. First, we found that JC47-hCD47 cells were phagocytosed by MDMs to a similar degree as JC47-cCD47 cells, since both showed ~ 5% CD11b⁺/pHrodo⁺ cells, suggesting that cCD47 was as effective as hCD47 at inducing a “don’t-eat-me” signal (Fig. S7A and Fig. 7C). Interestingly, upon infection with WT HIV-1, JC47-hCD47 cells were phagocytosed more efficiently than infected JC47-cCD47 cells (Fig. 7C). Importantly, this difference in phagocytosis was not linked to apoptosis of target cells (Fig. S7B). Furthermore, and in agreement with the phagocytosis results, we observed a heightened virus production as measured by luciferase activity from MDMs co-cultured with WT HIV-infected JC47-hCD47 cells (Fig. 7D) compared to their chimeric JC47-cCD47 counterparts. Collectively, these results further underscore our observation that Vpu-mediated CD47 downregulation potentiates phagocytosis of infected T cells by MDMs and, consequently, promotes increased productive infection of MDMs.

DISCUSSION

In this study, we extend our previous SILAC-based observation that CD47 is a putative target of HIV-1 Vpu (6, 10) and reveal that Vpu indeed downregulates CD47 on CD4⁺ T cells infected with lab-adapted X4-tropic NL 4-3, R5-tropic NL 4-3 ADA as well as T/F WITO virus (Fig. 1). These findings obtained in the context of HIV-1 infection are in contrast to those reported by the Hasenkrug group, which showed that CD47 was upregulated in different types of immune cells upon recognition of several pathogens including SARS-CoV-2, hepatitis C virus (HCV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (44, 45), suggesting that downregulation of CD47 is an evolved viral counter-measure which provides HIV with a selective advantage. Indeed, we show that Vpu-mediated CD47 downregulation leads to an enhanced capture and phagocytosis of infected CD4⁺ T cells by MDMs (Fig. 2), a process which ultimately facilitates productive infection of macrophages (Fig. 5). As well, our data in the context of primary CD4⁺ T cells show that the R5-tropic WITO T/F virus relies on phagocytosis to efficiently infect MDMs, raising the possibility that phagocytosis of infected cells is an important mechanism through which myeloid cells get productively infected by HIV-1 and is likely consequential for inter-host HIV-1 transmission.

Macrophages were reported to engulf HIV-1-infected CD4⁺ T cells, a process that leads to their own infection (28, 29), but the capture recognition signals remained unclear. Binding of CD47 to SIRP α suppresses multiple pro-phagocytosis signaling pathways including those mediated by IgG/Fc γ R, complement/complement receptors, and calreticulin (46, 47), suggesting that decreased CD47 expression might trigger phagocytosis. Indeed, we show that Vpu-mediated CD47 downregulation enhanced capture and engulfment of infected T cells by

MDMs (Fig. 2; Fig. 5B). Although modest, the effect was invariably reproducible and consistent with other studies which used Jurkat cell lines expressing differential surface levels of CD47 as target cells in phagocytosis assays (43, 48). Apart from calreticulin, phosphatidylserine (PS) is another critical pro-phagocytosis signal predominant on apoptotic cells (49). Nevertheless, CD47/ SIRP α signaling was recently reported to block the “eat-me” signal driven by PS (50). In the context of HIV-1 infection, we found more externalization of PS on the cell surface as measured by Annexin V staining (Fig. S2E; Fig. S5B), in line with previously reported results (51). However, although Vpu expression was reported to induce apoptosis (52), we did not observe a significant difference of PS exposure between cells infected with WT and dU HIV-1 (Fig. S2E; Fig. S5B) suggesting that the augmented phagocytosis of cells infected by WT virus was likely resulting from Vpu-induced decrease of CD47. Indeed, this notion was further supported by our finding that target T cells expressing human-mouse chimeric form of CD47 that are less responsive to Vpu-mediated downregulation were less prone to phagocytosis by MDMs as compared to human CD47 expressing target cells (Fig. 7C). Furthermore, since we show that knock-out of CD47 in Jurkat T cells results in a strong enhancement of phagocytosis by MDMs (Fig. S2D), our data are collectively consistent with findings showing that lack of CD47 results in augmented phagocytosis of red blood cells (35) and more efficient clearance of lymphohematopoietic cells by macrophages (53). Conversely, target cells with elevated cell surface CD47 are shown to be protected from phagocytosis by macrophages (48, 54).

Infection of macrophages can be detected throughout all stages of HIV-1 infection (26). However, M-tropic viruses are found at late stages of infection and virus isolated at early

stages of infection display very limited tropism for macrophages as cell-free virus (17, 25). We hypothesized that through phagocytosis of T/F virus-infected CD4⁺ T cells, macrophages could become infected with these viruses, a process that would potentially initiate inter-host viral dissemination at early stages of HIV-1 infection. Indeed, we found that T/F virus WITO, which poorly infects MDMs by a cell-free route (Fig. S3A), as reported previously (27, 28, 55), was able to elicit a productive infection in MDMs. Interestingly, we observed that phagocytosis of WITO-infected CD4⁺ T cells ultimately led to an approximately 6- to 9-fold higher viral production by infected MDMs compared to the engulfment of T cells infected with a M-tropic NL 4-3 ADA (Fig. 3B) despite comparable degree of CD47 downregulation by these viruses (Fig. 1). This implies a potentially more efficient infection of MDMs following uptake of T cells infected with T/F WITO since the frequency of infected T cells was comparable at the time of phagocytosis (Fig. S3B). This difference in infection efficiency between T/F WITO and HIV ADA may be linked to the differential impact of host antiviral restriction factors, and notably interferon-induced transmembrane proteins (IFITMs), which accumulate intracellularly during HIV-1 infection of macrophages (56, 57) and are incorporated into virions, thus reducing their infectivity (57). In this context, it was reported previously that as IFITMs incorporation increased (57), there was a decrease in the infectivity of virions produced by HIV-1 ADA-infected MDMs. In contrast, T/F viruses were reported to be relatively resistant to IFITMs-mediated restriction (58, 59) with WITO displaying the most resistance to IFITM3 and releasing the highest levels of infectious virions among all viral strains tested (59). That being said, given the gradual decrease in the level of infectious particles released by MDMs (Fig. 3B; Fig. 5C), it is possible that other restriction factors

present in macrophages including GBP5 (60) and MARCH8 (61), which inhibit the infectivity of macrophage-derived virions, could play a role in controlling viral dissemination.

Phagocytosis is a process known to be important for the elimination of engulfed pathogens and apoptotic cells (62). However, we show that inhibition of phagocytosis by Jasp is linked to a suppression of productive infection of MDMs (Fig. 4), suggesting that HIV-1 takes advantage of this process to infect macrophages. Indeed, a recent study by the Kieffer group (29) in HIV-1-infected humanized mice provided evidence that bone marrow macrophages phagocytosed infected T cells and produced virus within enclosed intracellular compartments. Using electron tomography (ET), they observed macrophages phagocytosing infected T cells, with mature and immature HIV-1 virions within macrophage phagosomes alongside engulfed cells at varying degrees of degradation. Moreover, virions were also observed to assemble and undergo budding and maturation within fully-enclosed compartments which would subsequently fuse with surface-accessible invaginations to release virions into the extracellular space. Since HIV-1 virions are inactivated in acidic environments (63), further investigation is needed to better understand how virions escape phagosomal degradation before a complete destruction of the ingested T cells. In fact, many microorganisms have evolved multiple strategies to prevent phagocytic destruction. For instance, *Mycobacterium tuberculosis* inhibits the acidification process of phagosomes via the exclusion of vesicular proton-ATPase thus hindering the maturation of these compartments (64); it also prevents the fusion of lysosomes with phagosome (65). Interestingly, we show herein that inhibition of reverse transcription and integration suppresses productive infection

of MDMs by WITO (Fig. S4), suggesting that virions transferred to macrophages via phagocytosis of HIV-1-infected T cells were able to actively replicate in MDMs.

While phagocytosis of infected T cells by macrophages represents one route of infection of macrophages, other mode of cell-to-cell virus transfer have also been described in vitro. It was recently reported that contacts between infected T lymphocytes and macrophages could lead to virus spreading to macrophages via a two-step fusion process that involves fusion of infected T cell to macrophages and virus transfer to these newly formed lymphocytes/macrophages fused cells. These newly formed cells were in turn able to fuse to neighboring uninfected macrophages leading to the formation of long-lived virus-producing multinucleated giant cells (MGCs) (66, 67). Although the formation of MGCs has been reported in the lymphoid organs and central nervous system of HIV-1-infected patients (68-70) and SIV-infected macaques (71), the presence of macrophage-T-cell fusion was not observed by the Kieffer group in humanized mice (29).

Experiments directly comparing WT and dU WITO-infected target T cells support the notion that enhanced phagocytosis of infected T cell by MDMs following Vpu-mediated CD47 downregulation facilitates productive infection of macrophages (Fig. 5 and Fig. S5). Considering the conflicting reports about a potential positive or negative effect of BST2 on cell-to-cell transmission (72-75) and its potential impact on phagocytosis and infection of macrophages, we also used a complementary approach that avoided the comparison between WT and dU HIV-infected target T cells. Taking advantage of a Jurkat cell line expressing human-mouse chimeric CD47, which is relatively unresponsive to Vpu modulation (Fig. S6;

Fig. 7A and B), we validate that Vpu-mediated CD47 downregulation contributes to phagocytosis of HIV-1-infected CD4⁺ T cells by MDMs and facilitates productive infection of MDMs (Fig. 7C and D).

Mechanistically, we provide evidence that the main functional domains of Vpu are involved in the downregulation of CD47 and that Vpu interacts with CD47 via its TMD to target the latter for degradation via a lysosomal pathway (Fig. 6). Although the model of CD47 degradation seems rather similar to how Vpu depletes BST2; it remains unclear whether: (1) the DSGNES motif through the recruitment of SCF^{βTRCP1/2} complex promotes CD47 ubiquitination and (2) interaction of adaptor proteins to the ExxxLV trafficking motif of Vpu in complex with CD47 target CD47 to cellular compartment away from the plasma membrane. More detailed mechanistic studies are required to fully dissect processes underlying Vpu-mediated downregulation of CD47.

In summary, we report herein that CD47 is a new cellular target downregulated by HIV-1 Vpu. Such a decrease in CD47 expression allows for enhanced phagocytosis of infected T cells by macrophages, which ultimately leads to productive infection of this myeloid cell subset even with HIV strains that would otherwise be weakly M-tropic (i.e., T/F viruses). We posit that this process enables macrophages to be infected, including during early stages of HIV infection when M-tropic strains have not yet emerged. Taken together, our data identifies a mechanism whereby T/F virus-infected macrophages could be a source of viral reservoirs and promote viral dissemination to different tissues.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

For flow cytometry, the following antibodies (Abs) were used: PE/Cy7-conjugated mouse anti-human CD47 (clone CC2C6) monoclonal Ab (mAb) and APC-conjugated anti-CD11b mAb (clone ICRF44) as well as corresponding isotype controls from BioLegend, APC-conjugated mouse anti-human CD47 mAb (clone B6H12; eBioscience), RD1-conjugated anti-Gag (clone KC57; Beckman Coulter). For immunoprecipitation and Western blot analysis, the following Abs were used: polyclonal sheep anti-human CD47 (AF4670) and sheep IgG HRP-conjugated Ab (HAF016) from R&D system; mouse anti-HA mAb (16B12), anti-GAPDH (FF26A/F9) and anti-CRISPR Cas9 (7A9) from BioLegend; rabbit anti-HA mAb (C29F4) from Cell Signaling Technology; rabbit anti-GFP (SAB4301138) from Sigma-Aldrich; anti- β -actin (C4, sc-47778) from Santa Cruz Biotechnology; goat anti-rabbit IgG H+L (HRP, ab205718) and goat anti-mouse IgG H+L (HRP, ab 205719) from Abcam and anti-Vpu rabbit polyclonal serum as described previously (76). For confocal microscopy analysis, the following Abs were used: purified anti-CD11b (clone ICRF44; BioLegend), anti-p17 as previously described (77), Alexa Fluor 594-coupled donkey anti-mouse IgG H+L (Invitrogen, #A-21203).

Plasmids

The X4-tropic proviral construct pBR NL 4-3. IRES. GFP wild-type (WT) and its Vpu-deficient derivative (dU) were kindly provided by Frank Kirchhoff (78, 79). The R5-tropic pNL 4-3 ADA. IRES.GFP WT and dU were generated as described (80). The molecular clone

of T/F virus WITO was obtained from the NIH AIDS Reagent Program (#11919)(55) and the dU version of WITO was generated by overlapping PCR.

The pSVCMV-VSV-G plasmid encoding for the vesicular stomatitis virus glycoprotein G (VSV-G) was previously described (32). The lentiviral psPAX2 packaging vector was provided by Didier Trono (Addgene plasmid #12260). The lentivectors lentiCRISPR v2 (plasmid #52961) (81) and pWPI-IRES-Puro-Ak (plasmid #154984) were also obtained through Addgene from Feng Zhang and Sonja Best, respectively.

Vpu mutants were generated using PCR-based Quick-change site-directed mutagenesis as per standard protocols (Agilent). The plasmids encoding WT Vpu and Vpu mutants were generated by insertion of the corresponding Vpu fragments from pNL 4-3 ADA proviral constructs into the pCGCG-IRES-GFP plasmid, a kind gift from Frank Kirchhoff (79). The cDNA of human CD47 and mouse CD47 with an HA-tag at the C-terminal were purchased from Sino Biological and Thermo Fisher Scientific, respectively. The HA-tag was then added to human CD47 by PCR. Chimeric CD47 consisting of a human extracellular domain and mouse MSDs+ HA-tagged cytosolic tail was generated by overlapping PCR (see Supplementary table 1 for oligonucleotides). These fragments were then inserted into pECFP-N1 (Clontech). Fragments without the HA-tag were also generated by PCR and inserted into pWPI-IRES-Puro-Ak to create pWPI- hCD47 or pWPI-cCD47 for expression of human or chimeric CD47, respectively. All constructs were confirmed by sequencing.

Cell lines

HEK 293T cells and the HeLa TZM-bl indicator cell line were cultured in DMEM (Wisent) containing 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (P/S) and 10% FBS (DMEM-10).

Lymphocytic cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (Wisent) containing P/S and 10% FBS (RPMI-10). SupT1 (Dr. Dharam Ablashi (82)) and TZM-bl (Dr. John C. Kappes, and Dr. Xiaoyun Wu (83)) cells were obtained from the NIH AIDS Reagent Program, whereas Jurkat E6.1 and HEK 293T cells were acquired from ATCC. The Jurkat E6.1-based CD47 knockout (KO) cell line, JC47, was as described previously (43).

CD47 knockout and rescue

To generate a CD47KO Jurkat E6.1 cell line, guide sequence 5' CACCGGATAGCCTATATCCTCGCTG-3' targeting CD47 was inserted into the lentiCRISPR v2 vector. Lentiviruses were produced by triple transfection of the generated lentivector with psPAX2 and pSVCMV-VSV-G in HEK 293T cells as described previously (6). Control lentiviruses were also produced using the lentiCRISPR v2 without sgRNA. Jurkat E6.1 cells were transduced with either the control or sgRNA-expressing lentiviruses, selected with puromycin and the CD47KO population was enriched by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

In order to rescue CD47 expression in CD47 KO cells, the JC47 cell line was used. Lentiviruses were produced by transfecting HEK 293T cells with pWPI-hCD47 or pWPI-cCD47 and psPAX2 and pSVCMV-VSV-G. JC47 cells were transduced with lentiviruses expressing either hCD47 or cCD47, selected by CD47 surface expression and enriched by FACS to ensure that CD47 expression levels are comparable with parental Jurkat E6.1.

Primary cell cultures

Human blood samples were obtained from healthy adult donors following informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocol approved by the Research Ethics Review Board of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from buffy coats following Ficoll density gradient (GE Healthcare). CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Purified CD4⁺ T cells were activated with 5 µg/mL phytohemagglutinin-L (PHA-L; Sigma-Aldrich, #11249738001) and 100 U/mL IL-2 (PeproTech, #200-02) for 3 days and cultured in RPMI-10 containing 100 U/mL IL-2 for another 2 days before infection.

PBMCs were seeded for 2 h at 37°C in non-tissue culture treated dishes (Fisherbrand) containing serum-free RPMI medium. After gentle washes, adherent cells (which mostly contain monocytes) were cultured for 7 days in RPMI supplemented with 5% decompartmented autologous human blood plasma and 10 ng/mL M-CSF (R&D system, #216-MC) to obtain MDMs. Purity of MDMs was determined by CD11b surface staining and was found to routinely reach > 95 %.

Virus production and infection

Virus stocks were obtained by transfecting of HEK 293T cells with proviral DNA in the presence or absence of pSVCMV-VSV-G using polyethylenimine (PEI; Polyscience, #23966). Briefly, HEK 293T cells were plated at 5 x 10⁶ cells per 15 cm dish for overnight incubation and then transfected with 20 µg of total DNA combined with 60 µg of PEI. Media was changed at 18 h post-transfection. Virus-containing supernatants were collected at 48 h post-

transfection, clarified and pelleted by ultracentrifugation onto a 20% sucrose-phosphate-buffered saline (PBS) cushion for 2 h at 35,000 rpm at 4°C. Viruses were titrated using the TZM-bl indicator cells as previously described (84).

For infection of T cell lines, cells were infected at multiplicity of infection (MOI) of 0.5 or 1. Primary CD4⁺ T cells were infected at MOI of 1 by spin-inoculation as previously described (85). MDMs (seeded at 1×10^5 cells/well in 12 well-plate) were infected at MOI of 2 (for NL 4-3 ADA) or MOI of 5 (for WITO) in 300 μ L of RPMI-10. Viruses were adsorbed for 6 h at 37°C before medium was replaced with 1 mL of RPMI-10.

***In vitro* capture and phagocytosis assays**

For flow cytometry-based capture assay, target cells were labelled with 5 μ M of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) from a CFSE cell proliferation kit (Invitrogen, C34554) for 5 min at room temperature, then washed three times with PBS containing 5 % FBS, and resuspended in RPMI with 5 % FBS before cells (4×10^5) were added to MDMs and cocultured at 37°C. After 2 h of co-culture, MDMs were extensively washed and analyzed by flow cytometry. Capture efficiency was determined as the percentage of CD11b⁺ cells containing CFSE-derived green fluorescence. For phagocytosis assay, target cells were labelled with 100 ng/ml of pHrodo Green STP ester (Invitrogen, P35369) pH 7.8 for 30 min at room temperature, resuspended in serum-free RPMI and then added to MDMs. After 2 h of co-culture at 37°C, MDMs were washed, collected and analyzed. Phagocytosis efficiency was determined as the percentage of CD11b⁺ cells containing pHrodo-derived green fluorescence.

Coculture experiments of CD4⁺ T cells with MDMs

CD4⁺ T cells were infected and after 2 days, washed, and maintained in culture for virus release during a 6 h incubation. Supernatants were separated from T cells by centrifugation (300 x g, 5 min), and fraction was added to MDMs for “cell-free” and “co-culture” infections, respectively. After the 6 h of incubation, MDMs were extensively washed to remove supernatants or T cells, and then cultured for 10 days. Media of MDMs were collected at specific interval of time for further analysis.

For the experiments involving Jaspikininolide (Jasp; Cayman Chemical, #102396-24-7), MDMs were pretreated with 5 μM of the inhibitor (or vehicle DMSO) for 1h. CD4⁺ T cells were subsequently cocultured with treated or untreated MDMs for 6 h in the presence or absence of Jasp. MDMs were washed extensively after the coculture and analyzed by flow cytometry for phagocytosis of pHrodo-labelled CD4⁺ target T cells by MDMs, as described above, or maintained in culture for 10 days for a replication kinetic study. Media of MDMs were collected at day 2 post coculture for measurement of infectious virus production by TZM-bl luciferase reporter assay (see below). To determine the effect of Jasp on virus production, infected CD4⁺ T cells were washed and incubated with Jasp or DMSO for 6 h, prior to cell supernatants being collected for quantification of virus production by HIV-1 p24 ELISA (XpressBio).

To assess the effect of reverse transcriptase inhibitor Zidovudine (AZT) or integrase inhibitor Raltegravir (Ral) on MDM infection, cells were pretreated with 5 μM AZT, 10 μM Ral or vehicle control DMSO for 2 h, and cocultured with infected CD4⁺ T cells in the presence of the drugs. After 6 h, MDMs were extensively washed to remove the T cells and drugs, and then cultured for another 2 days. Efficiency of MDMs infection was determined by flow

cytometry analysis of intracellular Gag and production of infectious virus in MDMs-free culture supernatant using the TZM-bl assay.

For experiments using Jurkat cells infected with VSV-G pseudotyped WITO (WT or dU) viruses as target, cells were extensively washed to remove cell-associated virions 48 h after infection and subsequently cocultured with MDMs for 6 h. MDMs were washed extensively after the coculture and analyzed for phagocytosis or productive infection as described above.

TZM-bl luciferase reporter assay

TZM-bl cells (2×10^4 cells/well seeded in a 24-well plate the previous day) were inoculated with MDM-free culture supernatant for 6 h at 37°C, washed with PBS and maintained in DMEM-10. At 48 hpi, cells were lysed in cell culture lysis reagent (E153A, Promega) and analyzed for luciferase activity using a commercial kit (E1501, Promega).

Confocal microscopy

SupT1 cells were infected with VSV-G pseudotyped GFP-expressing WT NL 4-3 ADA virus for 48 h and cocultured at a ratio of 4:1 with MDMs plated at 1,000 cells/well in an 8-well chamber slide (ibidi, #80806). After 2 h, MDMs were gently washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min. Fixed MDMs were incubated for 2 h at 37°C in 5% milk-PBS containing anti-CD11b, a marker of macrophages. To detect p17, fixed MDMs were permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 5 min, blocked in PBS containing 5% milk for 15 min, then incubated for 2 h at 37°C in 5% milk-PBS containing anti-p17 Abs which recognizes the mature matrix protein following Gag precursor processing by the viral protease but not the immature Gag precursor (77). Cells were washed and incubated with Alexa Fluor 594-coupled

donkey anti-mouse IgG for 30 min at room temperature. Chamber slides were then washed with PBS and applied with DAPI solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) for 5 min, washed again and mounted using fluorescent mounting medium. Data were acquired using laser-scanning confocal microscope LSM-710.

HEK 293T cell transfection

HEK 293T cells were transfected with appropriate plasmids using PEI. When applicable, the corresponding empty vectors were included in each transfection to ensure the same amount of transfected DNA in all conditions. For biochemical analyses involving the use of proteasomal and lysosomal inhibitors, MG132 (10 μM ; Sigma-Aldrich, #474787) or Concanamycin A (ConA, 50 nM; Tocris Bioscience, #2656), respectively, were added to HEK 293T cells 36 h post-transfection. Cells were harvested for analysis 8 h thereafter.

Western blotting

For SDS-PAGE and Western blotting analysis, cells were lysed in RIPA-DOC buffer (10 mM Tris pH7.2, 140 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1% Nonidet-P40, 0.5 % sodium dodecyl sulfate, 1.2 mM deoxycholate) supplemented with protease inhibitors (cOmplete, Roche). Lysates were then mixed with equal volume of 2 x sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 25 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 5 % β -mercaptoethanol), and incubated at 37°C for 30 min as boiling was reported to cause aggregation of CD47 (86). Proteins from lysates were resolved on 15 % SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and reacted with primary antibodies. Endogenous CD47 was detected using a sheep polyclonal Ab, HA-tagged exogenous CD47 were detected using a rabbit mAb (clone

C29F4). Membranes were then incubated with HRP-conjugated secondary Abs and proteins visualized by enhanced chemiluminescence (ECL).

Co-immunoprecipitation assay

For co-immunoprecipitation studies of Vpu and CD47, transfected HEK 293T cells were lysed in CHAPS buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% CHAPS, pH7.2) supplemented with protease inhibitors. Lysates were first precleared by incubation with 40 μ L of protein A-sepharose beads CL-4B (Sigma, #GE17-0963-03) for 1 h at 4°C and then incubated with mouse mAb anti-HA (clone 16B12) overnight. The following day, 40 μ L of beads were added and samples were incubated for 2 h, washed five times with CHAPS buffer and analyzed by Western blotting.

Flow cytometry

For analysis of CD47 surface expression on T cells, cells were washed with ice-cold PBS/EDTA (5 mM), stained at 4°C with anti-human CD47 or mouse IgG isotype control diluted in PBS/FBS (1%) for 30 min. Cells were then washed twice with PBS/FBS (1%) and fixed with 1% PFA. Apoptosis of target cells was evaluated using the Annexin V-PI detection kit (eBioscience, #88-8007-72) as per manufacturer's protocol. For surface staining of MDMs, cells were washed with ice-cold PBS/EDTA (5 mM), detached with Accutase (Sigma-Aldrich, A6964), blocked in PBS/BSA (1%) /human IgG (blocking buffer) at 4°C for 20 min, and stained for 30 min with anti-human CD11b before additional washing and fixation with 1% PFA. For intracellular Gag staining, CD4⁺ T cells or MDMs were fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions and

stained with anti-Gag (KC57) at room temperature for 15 min, washed and resuspended in PBS/FBS (1%).

Flow cytometry data were collected on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience) unless specially specified. Cell sorting was conducted on a FACS Aria (BD Bioscience). Analyses were performed using the FlowJo software, version 10.1 for Mac, BD Biosciences.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank members of our laboratory, especially Drs. Robert Lodge, Mariana G Bego and Sabelo Lukhele for helpful discussions and critical review of the manuscript; Frédéric Dallaire and Mélanie Laporte for technical support. We also thank Eric Massicotte and Julie Lord (IRCM Flow Cytometry Core) for assistance with flow cytometry; Dominic Filion (IRCM Microscopy and Imaging Core) for microscopy assistance; Odile Neyret and Myriam Rondeau (IRCM Molecular Biology Core) for their support with DNA sequencing; Martine Gauthier (IRCM clinic) for coordinating access to blood donors and all volunteers for providing blood samples. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program: SupT1 from D. Ablashi, TZM-bl from J.C. Kappes and X. Wu, WITO (#11919), Zidovudine (#3485), Raltegravir (#11680) from Merck & Company, Inc. This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (FDN 154324), the CIHR supported Canadian HIV Cure Enterprise 2 (CanCURE 2.0) (HB2 164064), and the Fonds de Recherche du Québec-Santé AIDS and Infectious Disease Network to É.A.C. L.C. was supported by studentships from the IRCM and Université de Montréal. É.A.C. is the recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV Research.

REFERENCES

1. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-430.
2. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245-252.
3. Wildum S, Schindler M, Munch J, Kirchhoff F. 2006. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol* 80:8047-8059.
4. Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen EA. 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4⁺ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11:15.
5. Sugden SM, Bego MG, Pham TN, Cohen EA. 2016. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses* 8:67.
6. Sugden SM, Pham TN, Cohen EA. 2017. HIV-1 Vpu Downmodulates ICAM-1 Expression, Resulting in Decreased Killing of Infected CD4⁺ T Cells by NK Cells. *J Virol* 91.
7. Jain P, Boso G, Langer S, Soonthornvacharin S, De Jesus PD, Nguyen Q, Olivieri KC, Portillo AJ, Yoh SM, Pache L, Chanda SK. 2018. Large-Scale Arrayed Analysis of Protein Degradation Reveals Cellular Targets for HIV-1 Vpu. *Cell Rep* 22:2493-2503.
8. Liu Y, Fu Y, Wang Q, Li M, Zhou Z, Dabbagh D, Fu C, Zhang H, Li S, Zhang T, Gong J, Kong X, Zhai W, Su J, Sun J, Zhang Y, Yu XF, Shao Z, Zhou F, Wu Y, Tan X. 2019. Proteomic profiling of HIV-1 infection of human CD4(+) T cells identifies PSGL-1 as an HIV restriction factor. *Nat Microbiol* 4:813-825.

9. Prevost J, Edgar CR, Richard J, Trothen SM, Jacob RA, Mumby MJ, Pickering S, Dube M, Kaufmann DE, Kirchhoff F, Neil SJD, Finzi A, Dikeakos JD. 2020. HIV-1 Vpu Downregulates Tim-3 from the Surface of Infected CD4(+) T Cells. *J Virol* 94.
10. Matheson NJ, Sumner J, Wals K, Rapiteanu R, Weekes MP, Vigan R, Weinelt J, Schindler M, Antrobus R, Costa AS, Frezza C, Clish CB, Neil SJ, Lehner PJ. 2015. Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host Microbe* 18:409-423.
11. Brown EJ, Frazier WA. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
12. Oldenborg PA. 2013. CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol* 2013:614619.
13. Barclay AN, Van den Berg TK. 2014. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol* 32:25-50.
14. Myers LM, Tal MC, Torrez Dulgeroff LB, Carmody AB, Messer RJ, Gulati G, Yiu YY, Staron MM, Angel CL, Sinha R, Markovic M, Pham EA, Fram B, Ahmed A, Newman AM, Glenn JS, Davis MM, Kaech SM, Weissman IL, Hasenkrug KJ. 2019. A functional subset of CD8(+) T cells during chronic exhaustion is defined by SIRPalpha expression. *Nat Commun* 10:794.
15. Hirayama D, Iida T, Nakase H. 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci* 19.
16. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Clapham PR, Smythies LE, Smith PD. 2009. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 83:3258-3267.

17. Sattentau QJ, Stevenson M. 2016. Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host Microbe* 19:304-310.
18. Swingler S, Mann AM, Zhou J, Swingler C, Stevenson M. 2007. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS Pathog* 3:1281-1290.
19. Clayton KL, Collins DR, Lengieza J, Ghebremichael M, Dotiwala F, Lieberman J, Walker BD. 2018. Resistance of HIV-infected macrophages to CD8(+) T lymphocyte-mediated killing drives activation of the immune system. *Nat Immunol* 19:475-486.
20. Yukl SA, Sinclair E, Somsouk M, Hunt PW, Epling L, Killian M, Girling V, Li P, Havlir DV, Deeks SG, Wong JK, Hatano H. 2014. A comparison of methods for measuring rectal HIV levels suggests that HIV DNA resides in cells other than CD4+ T cells, including myeloid cells. *AIDS* 28:439-442.
21. Ganor Y, Real F, Sennepin A, Dutertre CA, Prevedel L, Xu L, Tudor D, Charmeteau B, Couedel-Courteille A, Marion S, Zenak AR, Jourdain JP, Zhou Z, Schmitt A, Capron C, Eugenin EA, Cheynier R, Revol M, Cristofari S, Hosmalin A, Bomsel M. 2019. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol* 4:633-644.
22. Zalar A, Figueroa MI, Ruibal-Ares B, Bare P, Cahn P, de Bracco MM, Belmonte L. 2010. Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Res* 87:269-271.
23. Andrade VM, Mavian C, Babic D, Cordeiro T, Sharkey M, Barrios L, Brander C, Martinez-Picado J, Dalmau J, Llano A, Li JZ, Jacobson J, Lavine CL, Seaman MS, Salemi M, Stevenson M. 2020. A minor population of macrophage-tropic HIV-1 variants is identified in recrudescing viremia following analytic treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:9981-9990.
24. Shen R, Richter HE, Smith PD. 2011. Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. *Am J Reprod Immunol* 65:261-267.

25. Arrildt KT, LaBranche CC, Joseph SB, Dukhovlinova EN, Graham WD, Ping LH, Schnell G, Sturdevant CB, Kincer LP, Mallewa M, Heyderman RS, Rie AV, Cohen MS, Spudich S, Price RW, Montefiori DC, Swanstrom R. 2015. Phenotypic Correlates of HIV-1 Macrophage Tropism. *J Virol* 89:11294-11311.
26. Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M. 2012. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* 9:82.
27. Ochsenbauer C, Edmonds TG, Ding H, Keele BF, Decker J, Salazar MG, Salazar-Gonzalez JF, Shattock R, Haynes BF, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. 2012. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J Virol* 86:2715-2728.
28. Baxter AE, Russell RA, Duncan CJ, Moore MD, Willberg CB, Pablos JL, Finzi A, Kaufmann DE, Ochsenbauer C, Kappes JC, Groot F, Sattentau QJ. 2014. Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. *Cell Host Microbe* 16:711-721.
29. Ladinsky MS, Khamaikawin W, Jung Y, Lin S, Lam J, An DS, Bjorkman PJ, Kieffer C. 2019. Mechanisms of virus dissemination in bone marrow of HIV-1-infected humanized BLT mice. *Elife* 8.
30. Calantone N, Wu F, Klase Z, Deleage C, Perkins M, Matsuda K, Thompson EA, Ortiz AM, Vinton CL, Ourmanov I, Lore K, Douek DC, Estes JD, Hirsch VM, Brechley JM. 2014. Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells. *Immunity* 41:493-502.
31. Norris PJ, Pappalardo BL, Custer B, Spotts G, Hecht FM, Busch MP. 2006. Elevations in IL-10, TNF-alpha, and IFN-gamma from the earliest point of HIV Type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:757-762.

32. Bego MG, Cote E, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen EA. 2015. Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 11:e1005024.
33. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 4:694-709.
34. Logtenberg MEW, Jansen JHM, Raaben M, Toebes M, Franke K, Brandsma AM, Matlung HL, Fauster A, Gomez-Eerland R, Bakker NAM, van der Schot S, Marijt KA, Verdoes M, Haanen J, van den Berg JH, Neefjes J, van den Berg TK, Brummelkamp TR, Leusen JHW, Scheeren FA, Schumacher TN. 2019. Glutaminyl cyclase is an enzymatic modifier of the CD47- SIRPalpha axis and a target for cancer immunotherapy. *Nat Med* 25:612-619.
35. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051-2054.
36. Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA, Duncan KL, Korn ED. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 269:14869-14871.
37. Ospina Stella A, Turville S. 2018. All-Round Manipulation of the Actin Cytoskeleton by HIV. *Viruses* 10.
38. Vigan R, Neil SJ. 2010. Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Virol* 84:12958-12970.
39. Magadan JG, Bonifacino JS. 2012. Transmembrane domain determinants of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu. *J Virol* 86:757-772.

40. Kueck T, Foster TL, Weinelt J, Sumner JC, Pickering S, Neil SJ. 2015. Serine Phosphorylation of HIV-1 Vpu and Its Binding to Tetherin Regulates Interaction with Clathrin Adaptors. *PLoS Pathog* 11:e1005141.
41. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1:565-574.
42. Kueck T, Neil SJ. 2012. A cytoplasmic tail determinant in HIV-1 Vpu mediates targeting of tetherin for endosomal degradation and counteracts interferon-induced restriction. *PLoS Pathog* 8:e1002609.
43. Leclair P, Liu CC, Monajemi M, Reid GS, Sly LM, Lim CJ. 2018. CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis* 9:544.
44. Cham LB, Torrez Dulgeroff LB, Tal MC, Adomati T, Li F, Bhat H, Huang A, Lang PA, Moreno ME, Rivera JM, Galkina SA, Kosikova G, Stoddart CA, McCune JM, Myers LM, Weissman IL, Lang KS, Hasenkrug KJ. 2020. Immunotherapeutic Blockade of CD47 Inhibitory Signaling Enhances Innate and Adaptive Immune Responses to Viral Infection. *Cell Rep* 31:107494.
45. Tal MC, Torrez Dulgeroff LB, Myers L, Cham LB, Mayer-Barber KD, Bohrer AC, Castro E, Yiu YY, Lopez Angel C, Pham E, Carmody AB, Messer RJ, Gars E, Kortmann J, Markovic M, Hasenkrug M, Peterson KE, Winkler CW, Woods TA, Hansen P, Galloway S, Wagh D, Fram BJ, Nguyen T, Corey D, Kalluru RS, Banaei N, Rajadas J, Monack DM, Ahmed A, Sahoo D, Davis MM, Glenn JS, Adomati T, Lang KS, Weissman IL, Hasenkrug KJ. 2020. Upregulation of CD47 Is a Host Checkpoint Response to Pathogen Recognition. *mBio* 11.
46. Oldenborg PA, Gresham HD, Lindberg FP. 2001. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 193:855-862.

47. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
48. Berkovits BD, Mayr C. 2015. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature* 522:363-367.
49. Barth ND, Marwick JA, Vendrell M, Rossi AG, Dransfield I. 2017. The "Phagocytic Synapse" and Clearance of Apoptotic Cells. *Front Immunol* 8:1708.
50. Morrissey MA, Kern N, Vale RD. 2020. CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis. *Immunity* 53:290-302 e296.
51. Zaitseva E, Zaitsev E, Melikov K, Arakelyan A, Marin M, Villasmil R, Margolis LB, Melikyan GB, Chernomordik LV. 2017. Fusion Stage of HIV-1 Entry Depends on Virus-Induced Cell Surface Exposure of Phosphatidylserine. *Cell Host Microbe* 22:99-110 e117.
52. Akari H, Bour S, Kao S, Adachi A, Strebel K. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* 194:1299-1311.
53. Blazar BR, Lindberg FP, Ingulli E, Panoskaltsis-Mortari A, Oldenborg PA, Iizuka K, Yokoyama WM, Taylor PA. 2001. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 194:541-549.
54. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138:271-285.

55. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, Decker JM, Wang S, Baalwa J, Kraus MH, Parrish NF, Shaw KS, Guffey MB, Bar KJ, Davis KL, Ochsenbauer-Jambor C, Kappes JC, Saag MS, Cohen MS, Mulenga J, Derdeyn CA, Allen S, Hunter E, Markowitz M, Hraber P, Perelson AS, Bhattacharya T, Haynes BF, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM. 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.
56. Woelk CH, Ottonnes F, Plotkin CR, Du P, Royer CD, Rought SE, Lozach J, Sasik R, Kornbluth RS, Richman DD, Corbeil J. 2004. Interferon gene expression following HIV type 1 infection of monocyte-derived macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:1210-1222.
57. Tartour K, Appourchaux R, Gaillard J, Nguyen XN, Durand S, Turpin J, Beaumont E, Roch E, Berger G, Mahieux R, Brand D, Roingeard P, Cimorelli A. 2014. IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* 11:103.
58. Foster TL, Wilson H, Iyer SS, Coss K, Doores K, Smith S, Kellam P, Finzi A, Borrow P, Hahn BH, Neil SJD. 2016. Resistance of Transmitted Founder HIV-1 to IFITM-Mediated Restriction. *Cell Host Microbe* 20:429-442.
59. Wang Y, Pan Q, Ding S, Wang Z, Yu J, Finzi A, Liu SL, Liang C. 2017. The V3 Loop of HIV-1 Env Determines Viral Susceptibility to IFITM3 Impairment of Viral Infectivity. *J Virol* 91.
60. Krapp C, Hotter D, Gawanbacht A, McLaren PJ, Kluge SF, Sturzel CM, 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.

61. 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.
62. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. 2020. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front Immunol* 11:553.
63. Ongradi J, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Bendinelli M, Szilagyi J. 1990. [Different sensitivity to acid reaction of the AIDS virus and virus-producing cells: clinical conclusions]. *Orv Hetil* 131:1959-1964.
64. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681.
65. Shukla S, Richardson ET, Athman JJ, Shi L, Wearsch PA, McDonald D, Banaei N, Boom WH, Jackson M, Harding CV. 2014. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG binds lipoarabinomannan and determines its cell envelope localization to control phagolysosomal fusion. *PLoS Pathog* 10:e1004471.
66. Bracq L, Xie M, Lambele M, Vu LT, Matz J, Schmitt A, Delon J, Zhou P, Randriamampita C, Bouchet J, Benichou S. 2017. T Cell-Macrophage Fusion Triggers Multinucleated Giant Cell Formation for HIV-1 Spreading. *J Virol* 91.
67. Xie M, Leroy H, Mascarau R, Woottum M, Dupont M, Ciccone C, Schmitt A, Raynaud-Messina B, Verollet C, Bouchet J, Bracq L, Benichou S. 2019. Cell-to-Cell Spreading of HIV-1 in Myeloid Target Cells Escapes SAMHD1 Restriction. *mBio* 10.
68. Dargent JL, Lespagnard L, Kornreich A, Hermans P, Clumeck N, Verhest A. 2000. HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Mod Pathol* 13:1293-1299.

69. Geny C, Gherardi R, Boudes P, Lionnet F, Cesaro P, Gray F. 1991. Multifocal multinucleated giant cell myelitis in an AIDS patient. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:157-162.
70. Vicandi B, Jimenez-Heffernan JA, Lopez-Ferrer P, Patron M, Gamallo C, Colmenero C, Viguier JM. 1999. HIV-1 (p24)-positive multinucleated giant cells in HIV-associated lymphoepithelial lesion of the parotid gland. A report of two cases. *Acta Cytol* 43:247-251.
71. Lackner AA, Vogel P, Ramos RA, Kluge JD, Marthas M. 1994. Early events in tissues during infection with pathogenic (SIVmac239) and nonpathogenic (SIVmac1A11) molecular clones of simian immunodeficiency virus. *Am J Pathol* 145:428-439.
72. Jolly C, Booth NJ, Neil SJ. 2010. Cell-cell spread of human immunodeficiency virus type 1 overcomes tetherin/BST-2-mediated restriction in T cells. *J Virol* 84:12185-12199.
73. Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A, Marcelin AG, Guatelli J, Schwartz O. 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog* 6:e1000955.
74. Giese S, Marsh M. 2014. Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells. *PLoS Pathog* 10:e1004189.
75. Kuhl BD, Sloan RD, Donahue DA, Bar-Magen T, Liang C, Wainberg MA. 2010. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1. *Retrovirology* 7:115.
76. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Mercier J, Binette J, Leung G, Cohen EA. 2009. Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J Virol* 83:4574-4590.

77. Bego MG, Cong L, Mack K, Kirchhoff F, Cohen EA. 2016. Differential Control of BST2 Restriction and Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Response by Antagonists Encoded by HIV-1 Group M and O Strains. *J Virol* 90:10236-10246.
78. Munch J, Rajan D, Rucker E, Wildum S, Adam N, Kirchhoff F. 2005. The role of upstream U3 sequences in HIV-1 replication and CD4⁺ T cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. *Virology* 341:313-320.
79. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayoub A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatzioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409-421.
80. Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad E, Cohen EA. 2013. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10:128.
81. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11:783-784.
82. Ablashi DV, Berneman ZN, Kramarsky B, Whitman J, Jr., Asano Y, Pearson GR. 1995. Human herpesvirus-7 (HHV-7): current status. *Clin Diagn Virol* 4:1-13.
83. Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:2855-2864.
84. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, Wiche Salinas TR, Bego MG, Power C, Routy JP, Ancuta P, Tremblay MJ, Cohen EA. 2017. Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell Rep* 21:141-153.

85. Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile JP, Cohen EA. 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115:1354-1363.
86. Yuan FF, Mirshahi S, Fletcher A. 1996. Chemiluminescent enhanced CD47 detection on Western blotting. *Electrophoresis* 17:219-220.

FIGURES

Figure 1. CD47 is downregulated from the surface of HIV-1-infected CD4⁺ T cells by Vpu. SupT1 T cells or primary CD4⁺ T cells were infected with GFP-expressing NL4-3 (WT or dU) viruses or with either VSV-G pseudotyped GFP-expressing NL 4-3 ADA (WT or dU) or transmitted/founder WITO (WT or dU) viruses as indicated. After 48 h, cells were stained with anti-CD47 (clone CC2C6) and analyzed by flow cytometry. **(Top)** Representative flow cytometry dot-plot graphs with indication of the median fluorescence intensity (MFI) values for infected (GFP- or Gag-positive) and bystander cells (GFP- or Gag-negative). **(Bottom)** Summary graphs of relative surface CD47 expression levels at 48 h postinfection (hpi) with the indicated viruses (n=4). The percent MFI values were calculated relative to that obtained in the respective bystander cells. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test (**, P < 0.01; *, P < 0.05), error bars represent standard deviations (SD). Flow cytometry data for this figure was generated on a CyAn ADP cytometer (Beckman coulter).

Figure 1

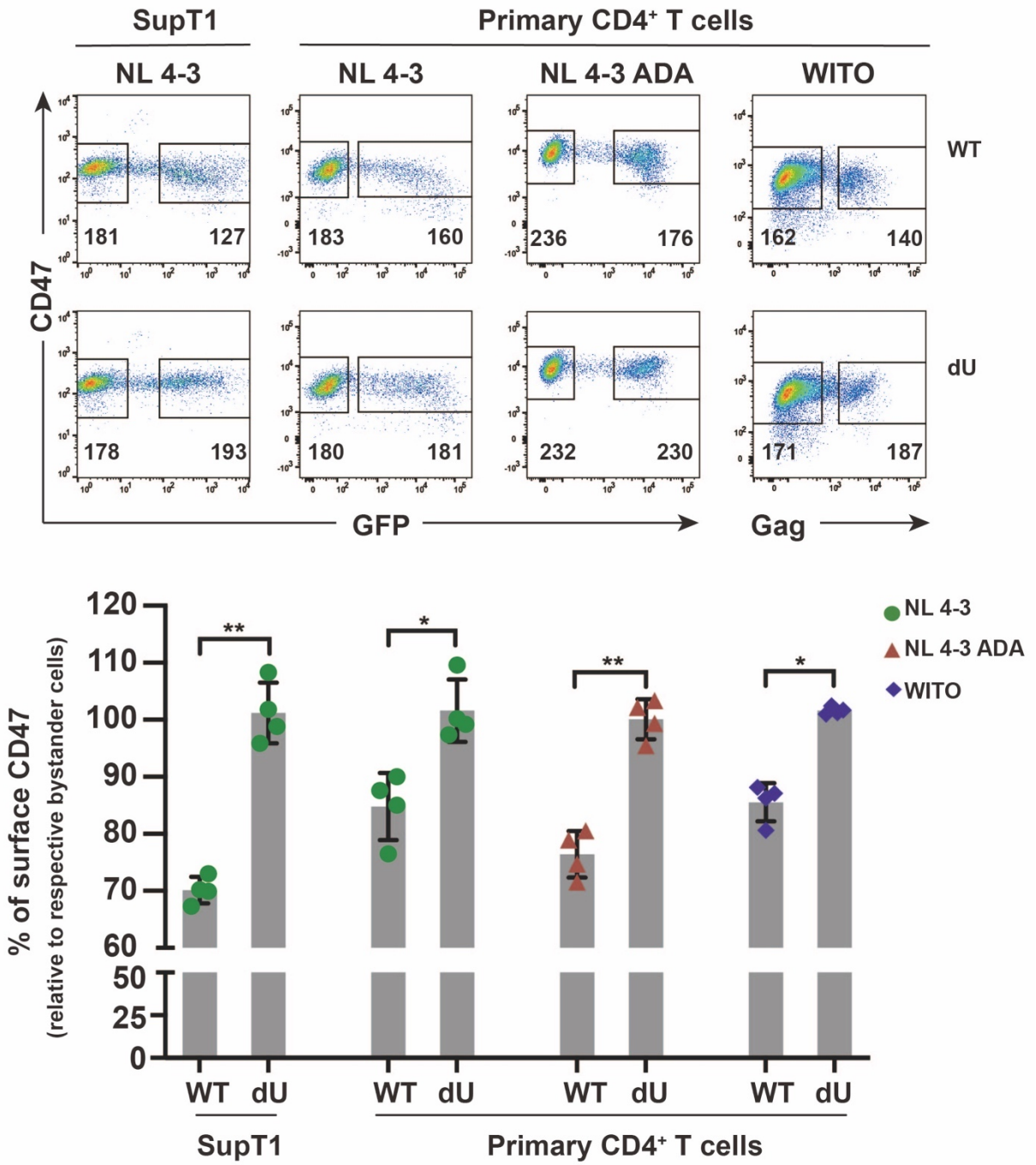
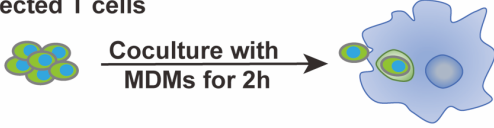


Figure 2. Vpu-mediated CD47 downregulation enhances capture and phagocytosis of infected T cells by MDMs. (A) Experimental strategy for HIV-1-infected target cells labelling, coculture with MDMs for analysis of *in vitro* capture or phagocytosis by flow cytometry. Target cells were either mock-infected or infected with VSV-G pseudotyped NL 4-3 ADA (WT or dU) viruses for 48 h and labelled with either CFSE (left) or pHrodo (right). (B) Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage numbers of CFSE⁺ population corresponding to capture (top); summary graphs for capture of CFSE-labelled CD47 expressing Jurkat E6.1 control (ctrl) or CD47 knockout (KO) Jurkat E6.1 cells by MDMs in the indicated conditions (bottom). (C) Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage numbers of pHrodo⁺ populations corresponding to phagocytosis (top); summary graphs for phagocytosis of pHrodo-labelled target cells by MDMs in the indicated conditions (bottom). (B and C) analyzed by Mann-Whitney U-test (*, P < 0.05; ns, nonsignificant, P > 0.05), error bars represent SD.

Figure 2

A

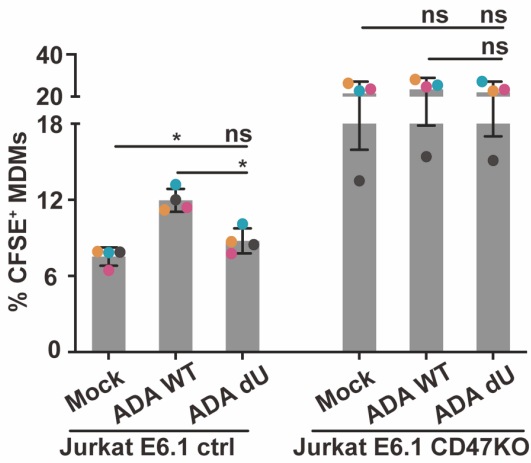
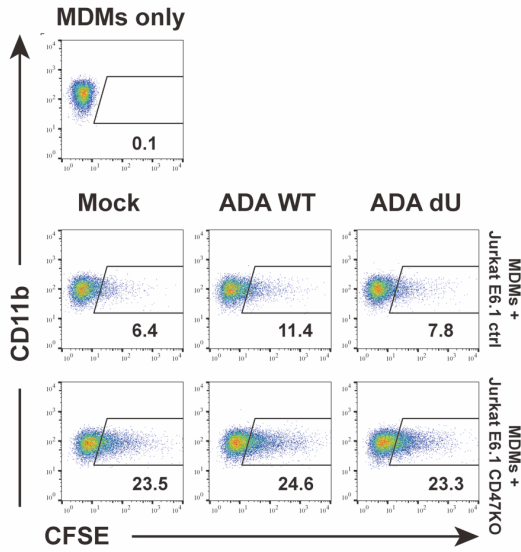
CFSE-labelled
infected T cells



pHrodo-labelled
infected T cells



B



C

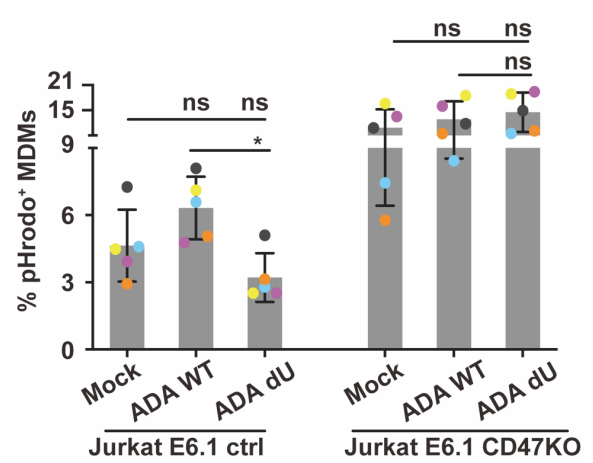
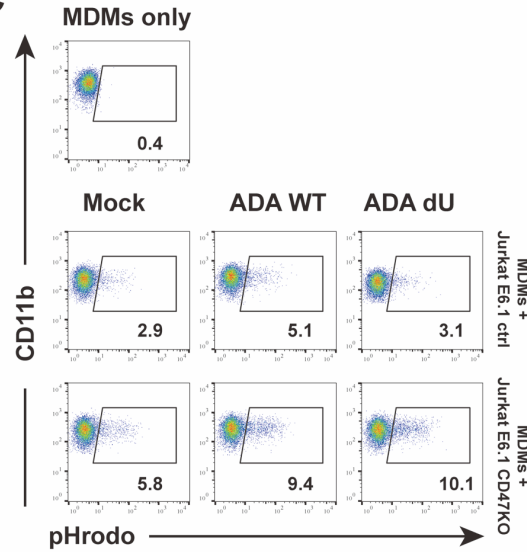


Figure 3. Phagocytosis of infected CD4⁺ T cells promotes productive infection of MDMs by T/F virus. (A) Experimental strategy for coculture of infected CD4⁺ T cells with autologous MDMs, and analysis of MDMs productive infection. MDMs were cocultured for 6 h with WT NL 4-3 ADA- or WITO-infected autologous CD4⁺ T cells (**Co-culture**) or were exposed for 6 h with supernatants from the same HIV-1-infected T cells (**Cell-free**). MDMs were maintained in culture after washing-off T cells or supernatants, media of MDMs were collected at the indicated time points to assess the production of infectious particles via infection of TZM-bl cells and luciferase (Luc) activity assay. (B) TZM-bl cells were infected for 48 h with media of MDMs collected at different time points and assayed for Luc activity. Results are expressed as relative light units (RLU). Shown are RLU of TZM-bl infected with media collected from MDMs from 3 donors. (C-D) GFP-expressing NL 4-3 ADA-infected SupT1 cells were cocultured for 2 h with MDMs, cells were then stained with anti-CD11b (C) or anti-p17 Abs (D) as well as DAPI and analyzed by confocal microscopy (scale bar, 10 μ m), T cells are indicated by white arrows.

Figure 4. Inhibition of phagocytosis hinders productive infection of MDMs by T/F virus.

(A) Experimental strategy for coculture of infected CD4⁺ T cells, with autologous MDMs pretreated with Jasplakinolide (Jasp), analysis of phagocytosis and MDMs productive infection. Pretreated MDMs (1 h with Jasp or vehicle (DMSO)) were cocultured for 6 h with WITO-infected CD4⁺ T cells in the presence of Jasp or DMSO. MDMs were also cocultured for 2 h with the same number of pHrodo-treated CD4⁺ T cells and analyzed for phagocytosis by flow cytometry. MDMs were maintained in culture after washing-off T cells and collected at the indicated time points for intracellular Gag staining and flow cytometry analysis. Evaluation of infectious virus production was determined as described above using the TZM-bl assay. **(B)** Inhibition of phagocytosis by Jasp. Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage of pHrodo⁺ populations corresponding to phagocytosis of CD4⁺ T cells by MDMs (top) and summary graph (bottom), analyzed by Mann-Whitney U-test, (*, P < 0.05). **(C)** Inhibition of MDMs infection by Jasp. Representative flow cytometry dot-plots of MDMs showing the percentage of Gag⁺ cells at the indicated time points (top) following exposure to infected target cells; summary graph represents the data obtained with MDMs of 3 distinct donors (bottom). **(D)** TZM-bl cells infected with media from MDMs cocultured with infected CD4⁺ T cells were assayed for Luc activity; shown are RLU detected with media collected from MDMs from 3 distinct donors. **(E)** Jasp does not affect viral release from infected CD4⁺ T cells. WT WITO virus-infected cells were washed to remove cell-associated virions, and then treated with Jasp or vehicle DMSO for 6 h. Virus-containing supernatants were collected and quantified for p24 by ELISA; shown are the results obtained with CD4⁺ T cells from 3 distinct donors. **(C and E)** Analyzed by two-tailed Student's *t*-test, (*, P < 0.05; ns, nonsignificant, P>0.05), error bars represent SD.

Figure 4

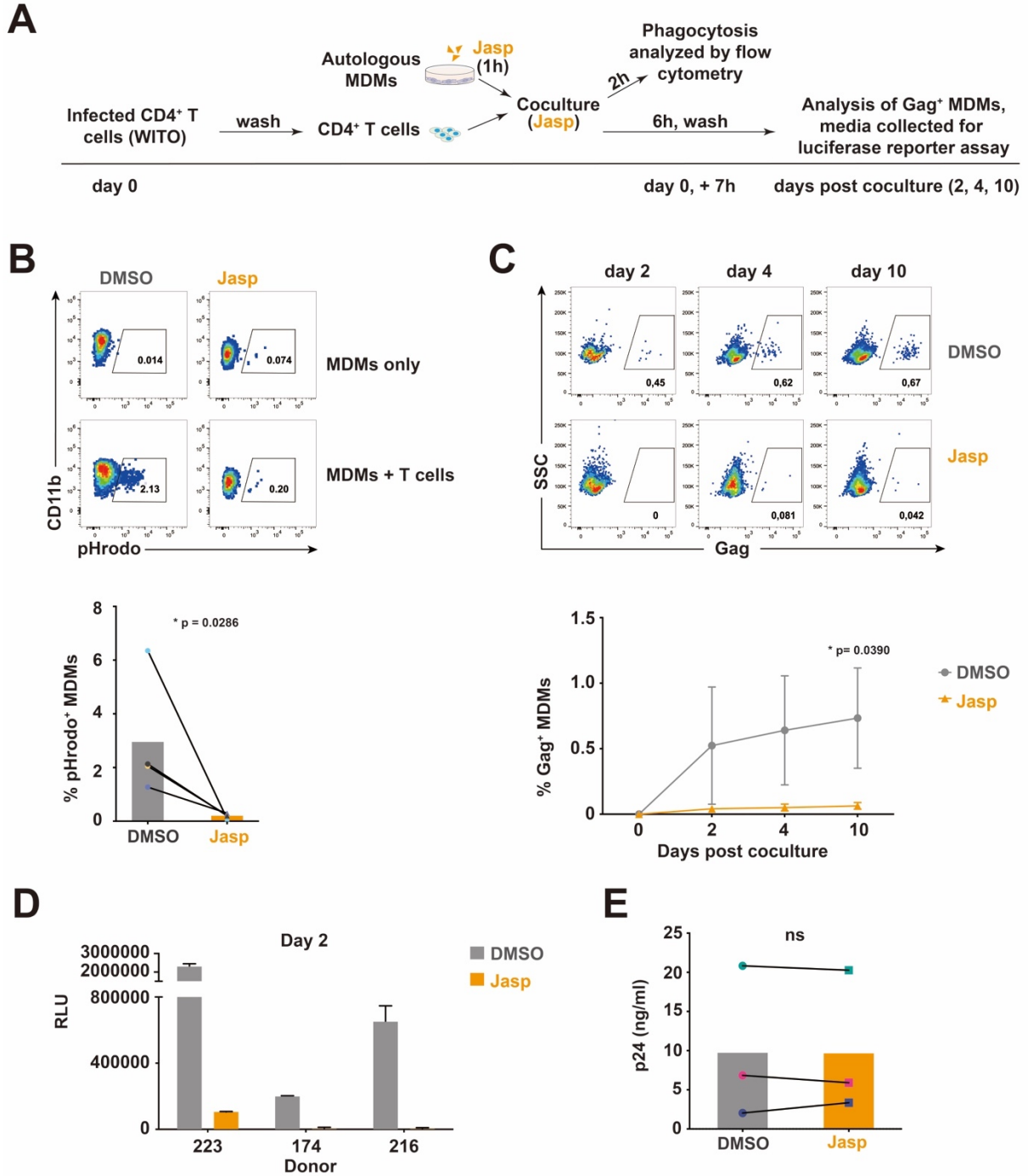


Figure 5. Effect of Vpu on infection of MDMs through phagocytosis of infected Jurkat cells. (A) Experimental strategy for coculture of infected Jurkat E6.1 cells with MDMs, analysis of phagocytosis and MDMs productive infection. MDMs were cocultured for 6 h with VSV-G pseudotyped WITO (WT or dU)-infected Jurkat cells. MDMs were also cocultured for 2 h with the same number of pHrodo-treated Jurkat cells and analyzed for phagocytosis by flow cytometry. MDMs were maintained in culture after washing-off T cells, media of MDMs were then collected at the indicated time points for evaluation of infectious virus production using the TZM-bl assay as described above. (B) WITO-infected Jurkat cells are prone to phagocytosis by MDMs in a Vpu-dependent manner. Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage numbers of pHrodo⁺ populations corresponding to phagocytosis (left); summary graphs for phagocytosis of pHrodo-labelled Jurkat cells by MDMs in the indicated conditions (right), analyzed by Mann-Whitney U-test (*, $P < 0.05$; ns, nonsignificant, $P > 0.05$), error bars represent SD. (C) TZM-bl cells were infected for 48 h with media of MDMs collected at different time points and assayed for Luc activity. Shown are RLU of TZM-bl infected with media collected from MDMs of 3 donors (left); Luc activity of TZM-bl infected with media collected at day 2 post coculture from distinct donors (n=6, right).

Figure 6. Vpu binds CD47 via its transmembrane domain (TMD) and targets CD47 for lysosomal degradation. (A) Vpu induces depletion of CD47. HEK 293T cells were cotransfected with plasmids encoding HA-tagged CD47 (pCD47-HA), along with increasing concentrations of GFP-marked plasmids expressing wild-type ADA Vpu (pVpu). An empty vector expressing GFP alone was added to adjust the total amounts of plasmid DNAs in all conditions. Whole cell lysates were analyzed for the indicated proteins by Western blotting. A Representative blot is shown (top), and a summary graph of densitometric analysis of CD47 is presented (bottom), error bars represent SD. (B) Vpu-mediated CD47 depletion requires the main Vpu functional motifs. HEK 293T were cotransfected with pCD47-HA, along with either empty vector, or plasmids encoding WT Vpu, or the indicated Vpu mutants. A representative Western blot is shown (top) as well as a summary graph of densitometric analysis of CD47 (bottom); statistical significance was determined by Mann-Whitney U-test (**, $P < 0.01$; ns, nonsignificant, $P > 0.05$); error bars represent SD. (C) HEK 293T cells were co-transfected with the indicated plasmids for 48 h prior to cell lysis and immunoprecipitation (IP) using anti-HA antibody. The immunoprecipitates were analyzed for the indicated proteins by Western blotting. (D) HEK 293T cells were cotransfected with the indicated plasmids for 36 h and vehicle (DMSO), MG132 or Concanamycin A (ConA) were added 8 h before cells were harvested and analyzed by Western blotting.

Figure 6

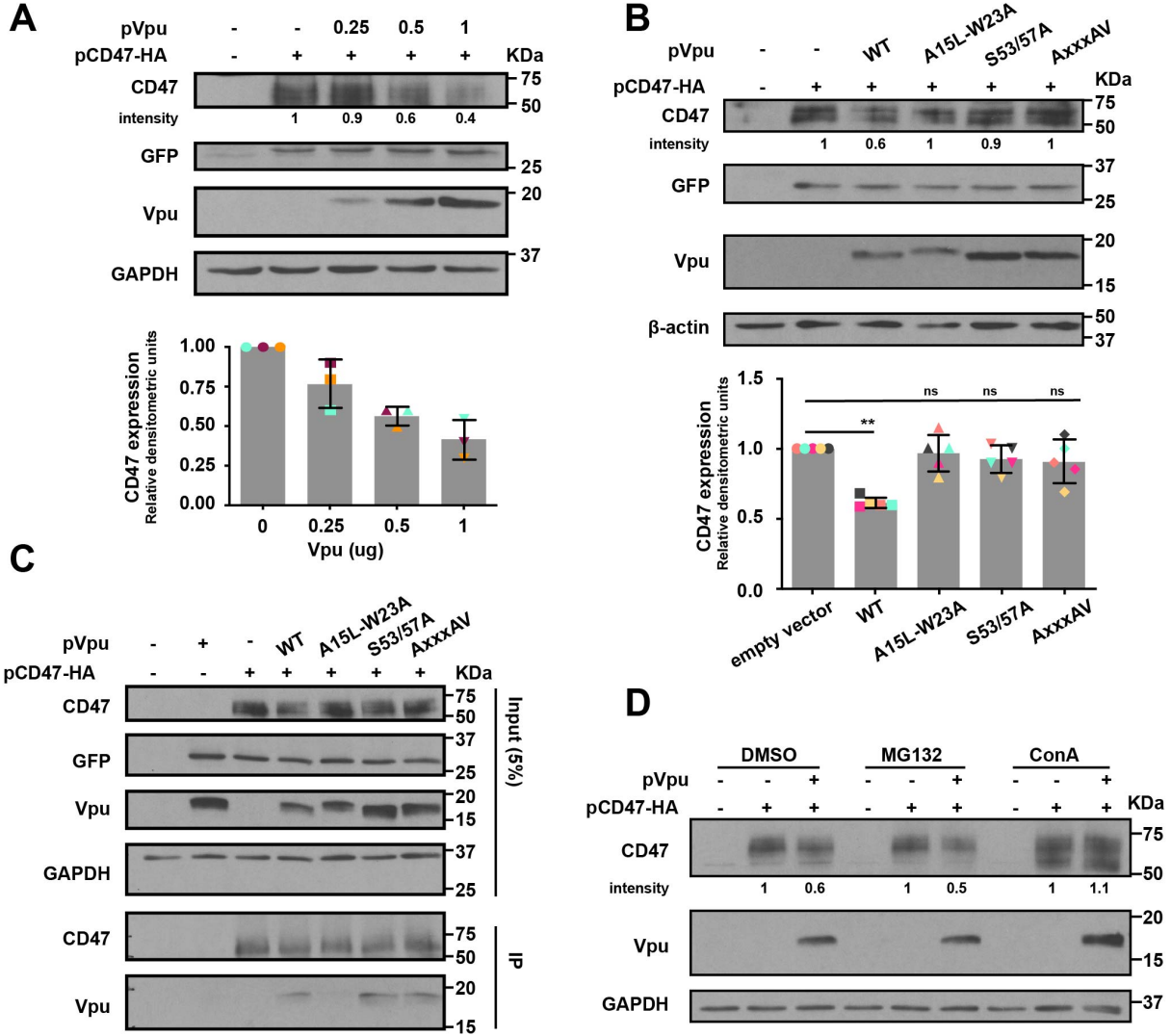
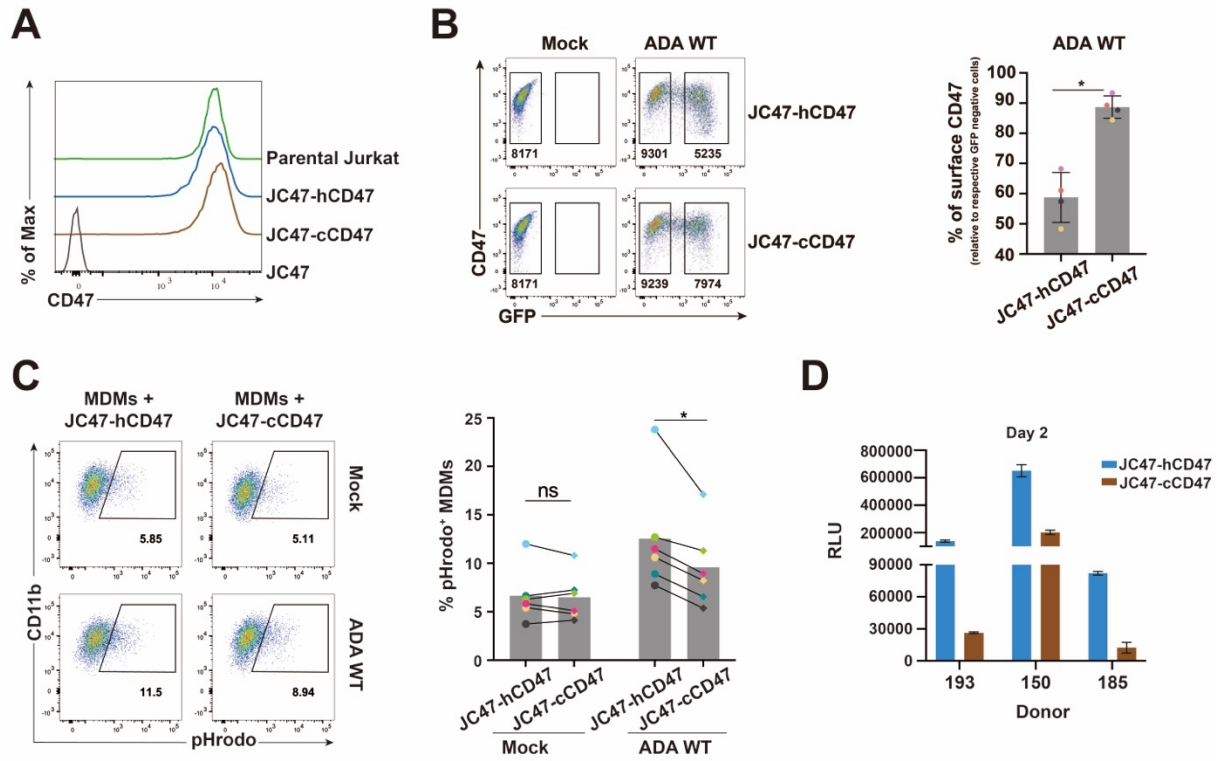


Figure 7. HIV-1-infected CD4⁺ T cells expressing Vpu-resistant chimeric CD47 are less prone to infect macrophages through phagocytosis. (A) Flow cytometry histogram to validate CD47 surface expression levels in different target Jurkat cell lines including JC47 (CD47 knockout), JC47-hCD47 (human CD47 reintroduced in JC47), JC47-cCD47 (chimeric CD47 reintroduced in JC47). (B) JC47-hCD47 and JC47-cCD47 cells were mock-infected or infected with VSV-G pseudotyped GFP-expressing WT NL 4-3 ADA virus for 48 h, then stained with anti-CD47mAb (clone CC2C6) and analysed by flow cytometry. Representative flow cytometry dot-plot graphs with the MFI values in infected (GFP-positive) and bystander cells (GFP-negative), (left); summary graphs of relative surface CD47 expression levels at 48 h after infection (n=4), (right), the percent MFI values were calculated relative to respective the GFP-negative cells. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test (*, P < 0.05); error bars represent SD. (C) The indicated mock or HIV-1-infected target cells were labelled with pHrodo and cocultured with MDMs for 2 h, prior to analysis of MDMs by flow cytometry. Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage of pHrodo⁺ populations corresponding to phagocytosis of target cells by MDMs (left); summary graphs for MDMs (right) from 6 distinct donors, analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test (*, P < 0.05; ns, nonsignificant, P > 0.05). (D) JC47-hCD47 or JC47-cCD47 cells were infected as described and cocultured with MDMs for 6 h. Following washing-off of infected T cells, MDMs were cultured for 2 days, media of MDMs was collected to infect TZM-bl, for luciferase assay. Shown are RLU detected with media collected from MDMs of 3 distinct donors, error bars represent SD.

Figure 7



SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1. Vpu downregulates overall levels of surface CD47. Jurkat E6.1 cells were infected with VSV-G pseudotyped GFP-expressing NL 4-3 ADA (WT or dU) viruses and stained after 48 h with the indicated anti-CD47 mAbs (CC2C6 or B6H12) prior to flow cytometry analysis. **(Left)** Representative flow cytometry dot-plot graphs with indication of MFI values for infected (GFP-positive) and bystander cells (GFP-negative). **(Right)** Summary graphs of relative surface CD47 expression levels at 48 hpi with the indicated viruses (n=4). The percent MFI values were calculated relative to the respective GFP-negative cells. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test (*, $P < 0.05$), error bars represent SD.

Figure S1

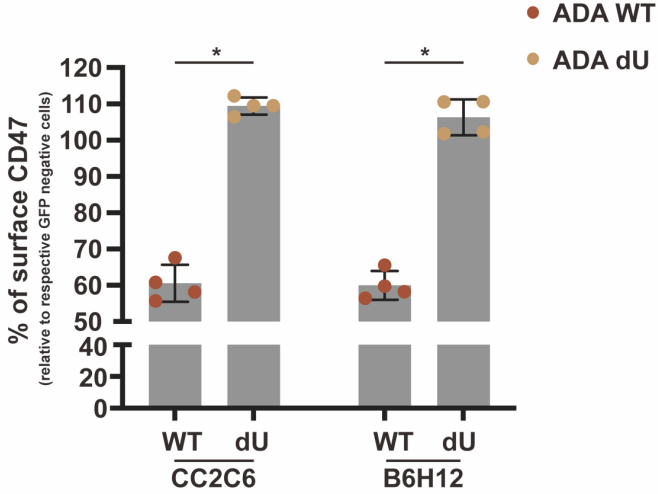
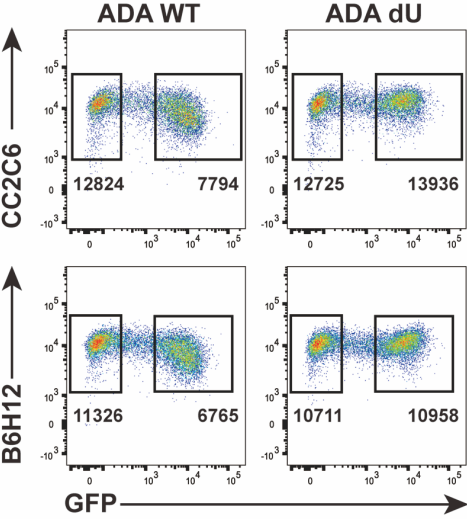


Figure S2. *In vitro* capture and phagocytosis assay controls. (A-D) Characterization of target Jurkat E6.1 cell lines. **(A)** Flow cytometry histogram to validate CD47 surface expression levels in the indicated Jurkat cell lines; the y axis shows relative cell count for each population (normalized to mode) while the x axis shows fluorescence intensity of CD47. **(B)** Western blotting to assess total CD47 protein levels in the tested target Jurkat cell lines. **(C, D)** Summary graphs depicting the capture or phagocytosis of target Jurkat cell lines by MDMs as determined by CFSE- or pHrodo- labelling, respectively. Knockout of CD47 resulted in a better capture (n=4) and phagocytosis (n=5) of target cells by MDMs. **(E)** Representative flow cytometry dot-plots of Annexin V-propidium iodide (PI) staining of the indicated tested mock-infected or HIV-infected target cells for capture and phagocytosis assays (left); summary graphs for percentage of Annexin V⁺ population of tested target cells (right), n=5. **(C-E)** Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, (**, P < 0.01; *, P < 0.05; ns, nonsignificant, P > 0.05), error bars represent SD.

Figure S2

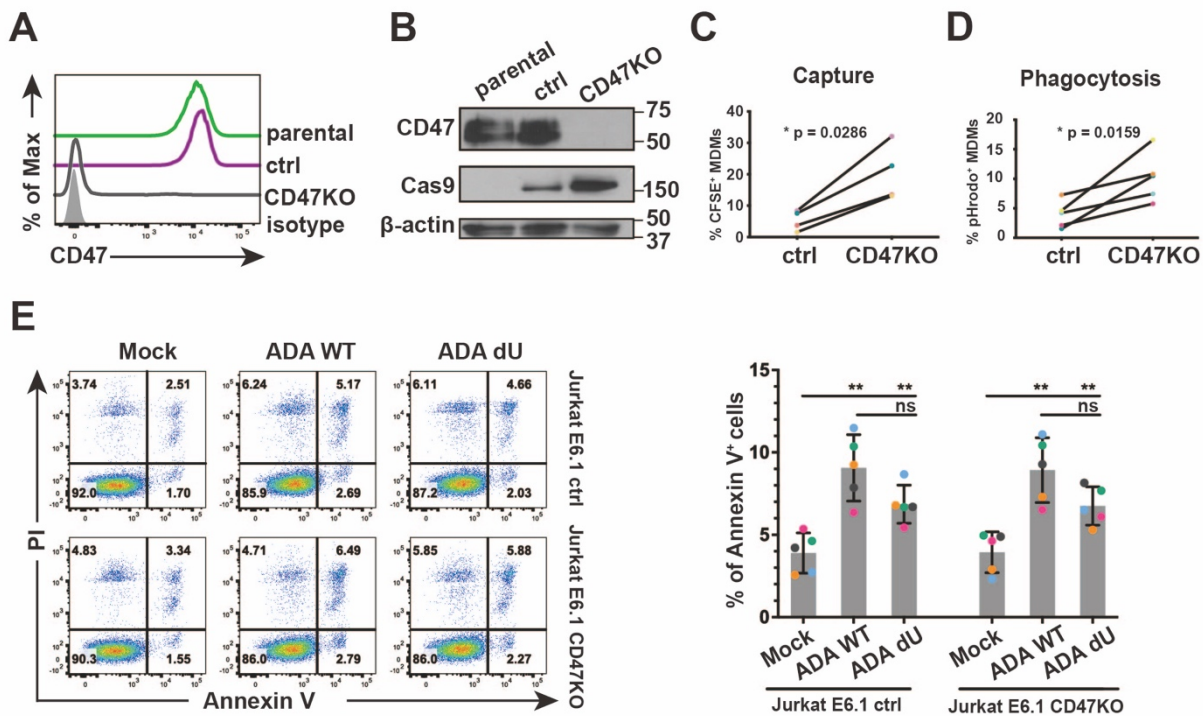


Figure S3. Experimental controls. (A) Infection of MDMs by WT NL 4-3 ADA (M-tropic) at MOI of 2, or WITO (T/F) at a MOI of 5; shown are the frequency of Gag⁺ MDMs from 3 donors at the indicated time points. (B) Infection levels of primary CD4⁺ T cells used for coculture with autologous MDMs; intracellular Gag staining was performed at 48 hpi and measured by flow cytometry. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test (ns, nonsignificant, P>0.05).

Figure S3

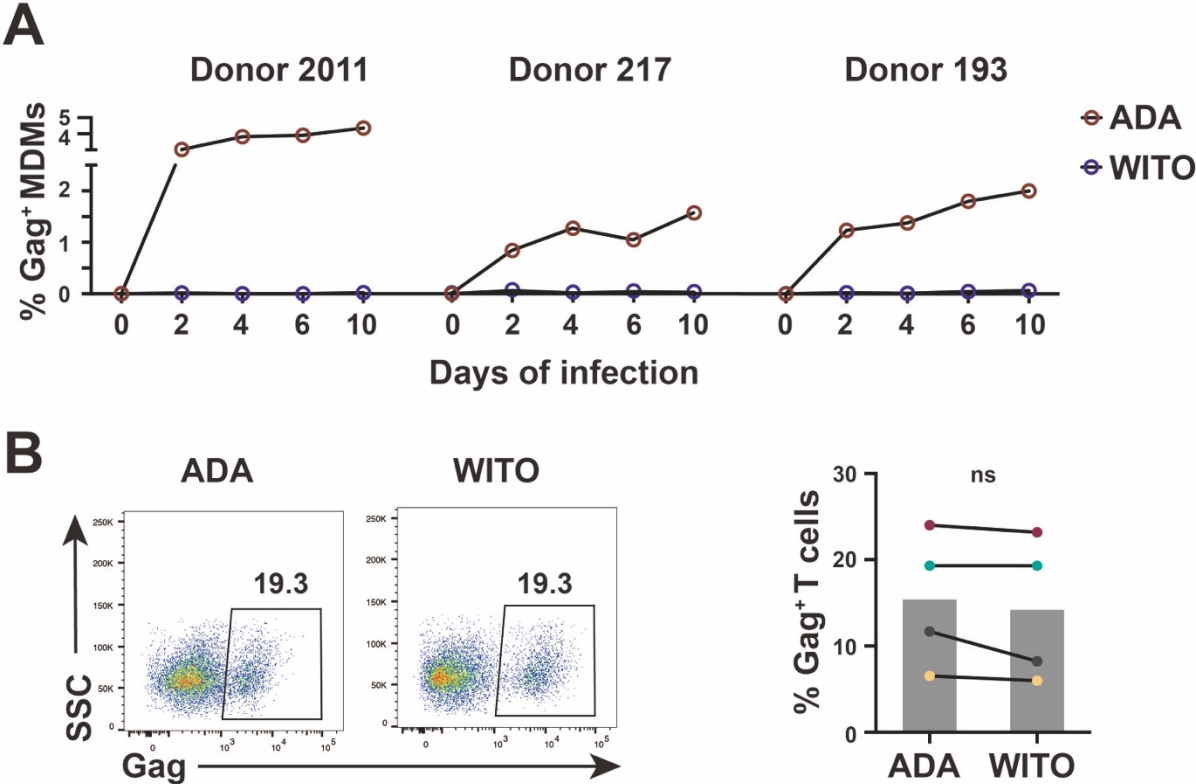


Figure S4. Inhibition of reverse transcription and integration hinders the productive infection of MDMs. MDMs were pretreated with raltegravir (Ral) or AZT, and cocultured with WITO-infected autologous primary CD4⁺ T cells in the presence of indicated drugs or vehicle (DMSO) for 6 h. After washing-off T cells and drugs, MDMs were cultured for 2 days and assayed for intracellular Gag by flow cytometry. Media of MDMs were collected at day 2 to infect TZM-bl cells as well. **(A)** Representative flow cytometry dot-plots showing the percentage of Gag⁺ cells at day 2 post coculture (top) and summary graph for MDMs from 3 distinct donors (bottom). **(B)** TZM-bl cells infected with media of MDMs collected at day 2 were assayed for Luc activity; shown are RLU detected with media collected from MDMs from 2 distinct donors; error bars represent SD.

Figure S4

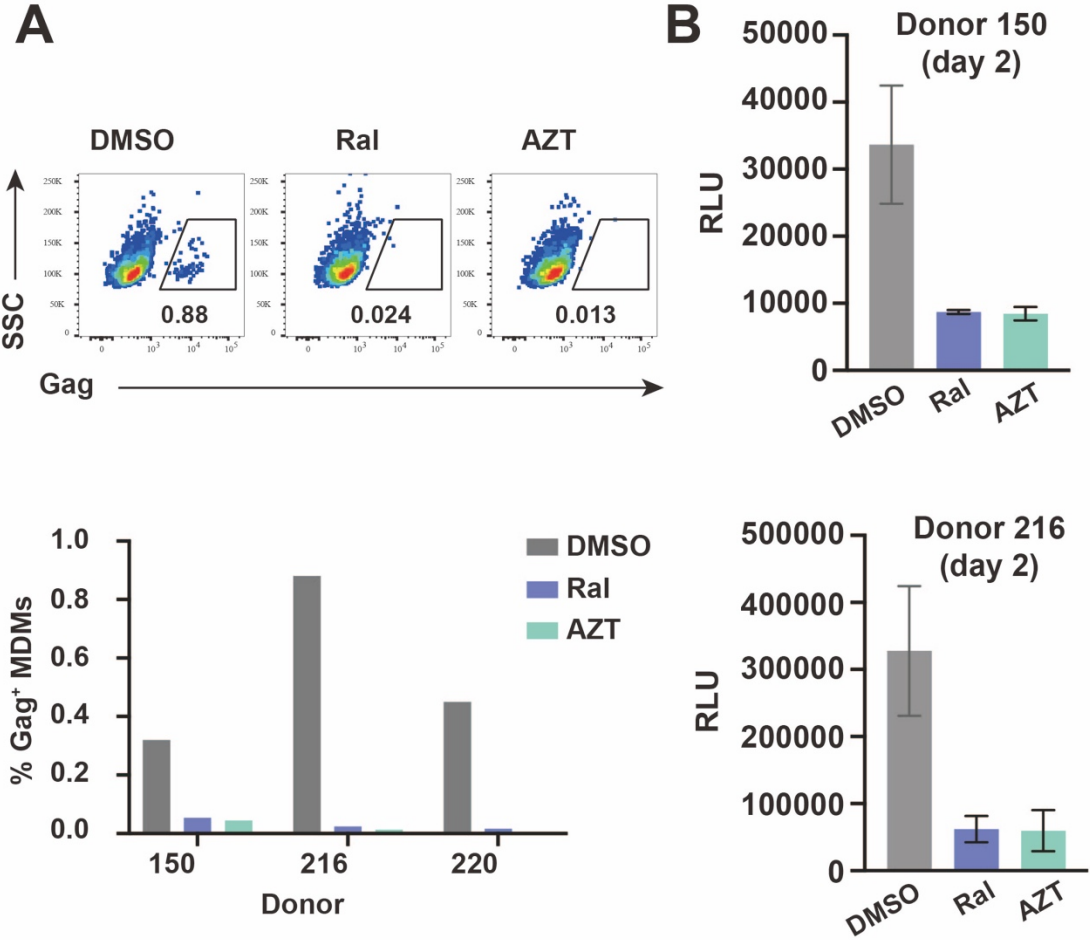


Figure S5. Infected Jurkat cells and MDMs coculture assay controls. (A) Jurkat E6.1 cells were infected with VSV-G pseudotyped WITO (WT or dU) viruses. After 48 h, cells were firstly stained with anti-CD47 (clone CC2C6) and anti-Gag (KC57), and then analyzed by flow cytometry. Representative flow cytometry dot-plot graphs with indication of CD47 MFI values for infected population (Gag-positive) and bystander cells (Gag-negative), (left); summary graphs of relative surface CD47 expression levels at 48 h after infection (n=4), (right). The percent MFI values were calculated relative to respective Gag-negative cells. (B) Representative flow cytometry dot-plots of Annexin V-Pi staining of the indicated tested mock-infected or infected Jurkat target cells used for phagocytosis assays (left); summary graphs for percentage of Annexin V⁺ population of tested target cells (right), n=4. (A-B) Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test, (*, P < 0.05; ns, nonsignificant, P > 0.05), error bars represent SD.

Figure S5

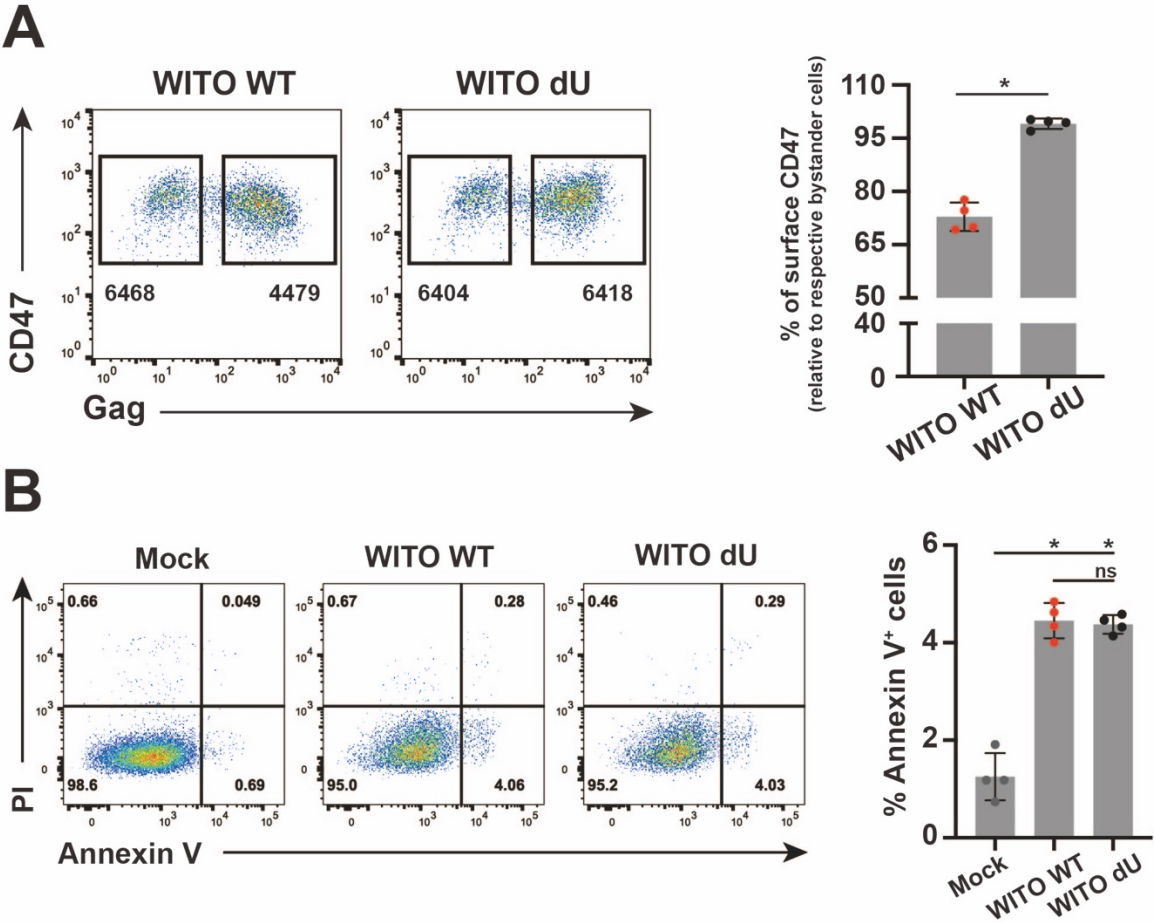


Figure S6. Generation and characterization of chimeric CD47. Chimeric CD47 was generated by replacing the five membrane-spanning domains (MSDs) and cytoplasmic tail (CT) of human CD47 with the corresponding regions of mouse CD47. HEK 293T cells were co-transfected with plasmids encoding HA-tagged human, chimeric or mouse CD47 (HA-tagged at C-terminal), along with Vpu-expressing plasmid (pVpu). Whole cell lysates were analyzed by Western blotting. ECD: extracellular domain.

Figure S6

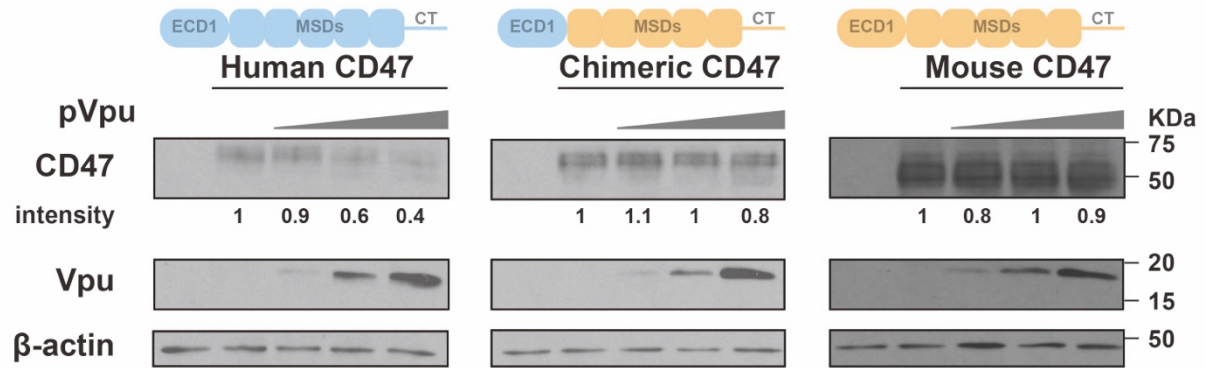


Figure S7. Controls for phagocytosis assay. (A) Phagocytosis of parental and modified Jurkat (Jk) cell lines by MDMs. The indicated Jk cell line were labelled with pHrodo and cocultured with MDMs for 2 h, prior to analysis of MDMs by flow cytometry. Representative flow cytometry dot-plots of MDMs (CD11b⁺) with percentage of pHrodo⁺ populations corresponding to phagocytosis of target cells by MDMs (left); summary graphs for MDMs (right) from 6 distinct donors, analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test (*, $P < 0.05$; ns, nonsignificant, $P > 0.05$). **(B)** Apoptosis of target cells. Representative flow cytometry dot-plots of Annexin V-PI staining of the indicated tested target cells used for phagocytosis assay (left); summary graphs for percentage of Annexin V⁺ population of target cells (right), n=4, analyzed by Mann-Whitney U-test, (ns, nonsignificant, $P > 0.05$), error bars represent SD.

Figure S7

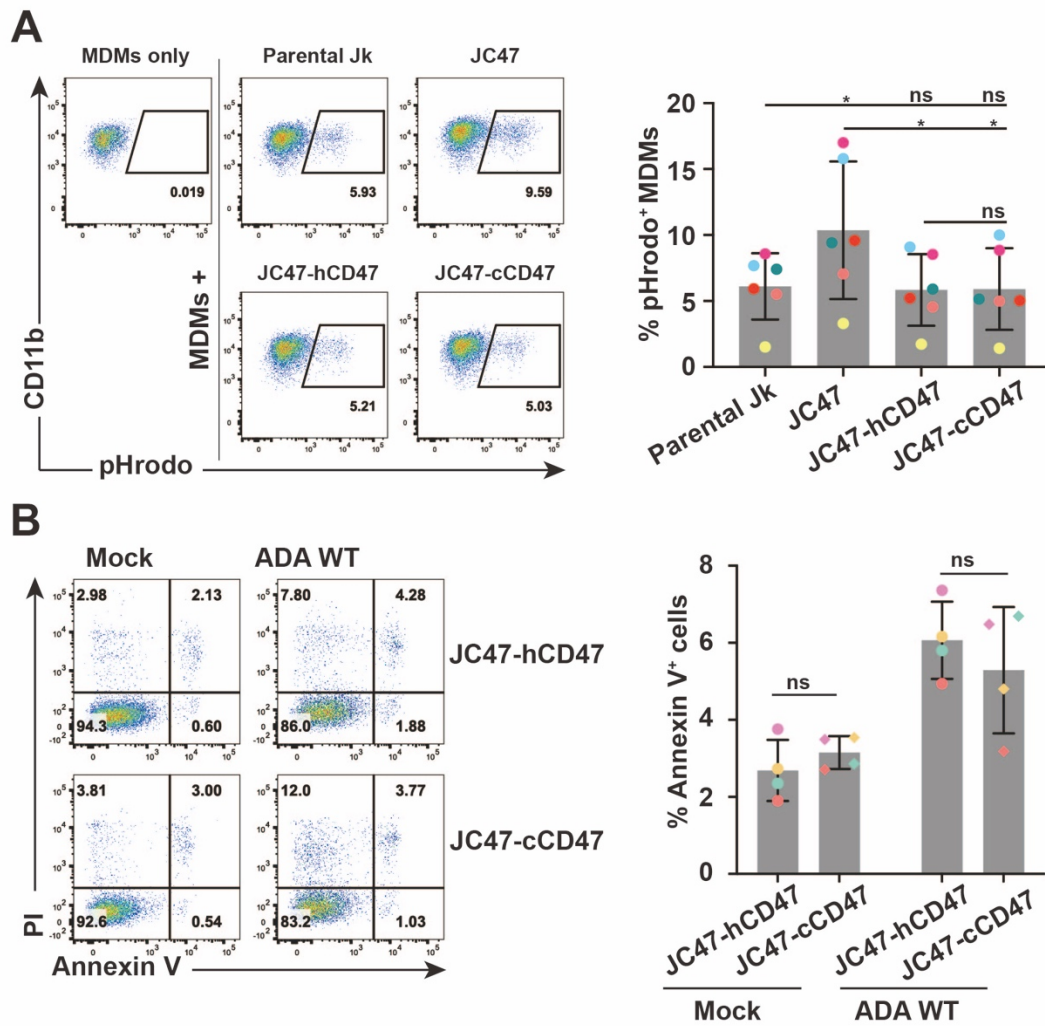


Table S1. Oligonucleotides used in this study

| Designation | Oligonucleotide sequence (5'-to-3') | Purpose |
|---|---|--|
| ADA Vpu A15L forward | GTAGCATTAGTAGTATTAGCAATAATAGCAATAGTTG | Vpu TMD (A ₁₅) mutation |
| ADA Vpu A15L reverse | CAACTATTGCTATTATTGCTAATACTACTAATGCTAC | Vpu TMD (A ₁₅) mutation |
| ADA Vpu W23A forward | GCAATAATAGCAATAGTTGTGGCGACCATAGTATTCATAG | Vpu TMD (W ₂₃) mutation |
| ADA Vpu W23A reverse | CTATGAATACTATGGTCGCCACAACATTGCTATTATTGC | Vpu TMD (W ₂₃) mutation |
| ADA Vpu S53/57A forward | TAACAGAAAGAGCAGAAAGACGCTGGCAATGAAGCTGAAGGGGATCAGGAAGAAT | Vpu DS ₅₃ GNES ₅₇ mutations |
| ADA Vpu S53/57A reverse | ATTCTTCTGATCCCCTTCAGCTTCATTGCCAGCGTCTTCTGCTCTTTCTGTTA | Vpu DS ₅₃ GNES ₅₇ mutations |
| ADA Vpu AxxxAV forward | TGAAGGGGATCAGGAAGCATTATCAGCAGCTGTGGAATGGGGCATC | Vpu E ₆₃ xxxL ₆₇ V mutations |
| ADA Vpu AxxxAV reverse | GATGCCCCATTTCCACAGCTGCTGCTGATAATGCTTCCTGATCCCCTTCA | Vpu E ₆₃ xxxL ₆₇ V mutations |
| EcoRI forward for WITO dU | TAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGTTTATT | Vpu-defective mutation |
| delU reverse for WITO dU | TGGTCCACACAACATAAAAGAAAGCATTACATATATT | Vpu-defective mutation |
| delU forward for WITO dU | AATATATGTAATGCTTTCTTTTAGTTGTGTGGACCA | Vpu-defective mutation |
| BamHI reverse for WITO dU | ACTTCTGGATCCCCTCTGAGGATTGGTTAAA | Vpu-defective mutation |
| HindIII forward for human CD47-HA | CCAAGCTTATGTGGCCCCTGGTAGCGCGG | HA-tag for human CD47 |
| BamHI reverse for human CD47-HA | CGGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTTATTCC TAGGAGGT | HA-tag for human CD47 |
| Human CD47 forward | AGCTCGTCGACAAGCTTATGT | Chimeric CD47 |
| Mouse CD47 reverse | GTTCTAGAGGATCCTTCAAGCGTAA | Chimeric CD47 |
| Forward for human - mouse chimeric CD47 | TGGTTTTCTCCAATGAAAA | Chimeric CD47 |
| Reverse for human-mouse chimeric CD47 | TTTTTCATTTGGAGAAAACCA | Chimeric CD47 |
| Xmal forward for hCD47 into pWPI | ACATCCCGGGATGTGGCCCCTGGTA | pWPI-hCD47 lentivector |
| BamHI reverse for hCD47 into pWPI | AAGGGATCCTTAGTTATTCTTAGGAGG | pWPI-hCD47 lentivector |
| BamHI reverse for cCD47 into pWPI | AAGGGATCCTTACCTATTCTTAGGAGG | pWPI-cCD47 lentivector |

CHAPITRE 3: ARTICLE 2

Vpu réduit la susceptibilité des cellules T CD4⁺ infectées par le VIH-1 à l'apoptose induite par l'engagement de CD47

L'objectif général de ce chapitre était de déterminer l'implication de la régulation négative de CD47 par Vpu dans l'apoptose induite par l'engagement de CD47. Plus spécifiquement, nous voulions déterminer si la réduction de CD47 par Vpu était capable de diminuer la susceptibilité des cellules T infectées à cette voie d'apoptose. Ces données ouvrent la voie à des études subséquentes pour caractériser ces processus d'apoptose.

J'ai élaboré, développé et exécuté tous les expériences, les analyses, les figures et l'écriture de la version initiale du manuscrit.

Résumé:

CD47 est une protéine exprimée de manière ubiquitaire et impliquée dans de nombreux processus cellulaires incluant l'apoptose. Un anticorps monoclonal contre CD47 (clone CC2C6) a été récemment démontré capable d'induire la voie d'apoptose caspase-indépendante via l'engagement de CD47. Nous présentons dans cette section que, en régulant négativement CD47, Vpu est capable de réduire la susceptibilité des cellules T infectées par le VIH-1 à cette apoptose médiée par l'engagement de CD47. Ceci pourrait réguler la survie des cellules T au cours de l'inflammation aiguë induite suite à l'infection par le VIH-1.

Vpu decreases susceptibility of HIV-1-infected CD4⁺ T cells to apoptosis induced by CD47 ligation

Lijun Cong^a, Éric A. Cohen^{a,b}

Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, H2W 1R7 Canada^a;
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal,
Quebec, Canada^b.

* Address correspondence to: Éric A. Cohen, eric.cohen@ircm.qc.ca

SUMMARY

CD47 is an ubiquitously-expressed protein involved in many cellular processes including apoptosis. A monoclonal antibody (mAb) against CD47 (clone CC2C6) was recently reported to induce a caspase-independent apoptosis through CD47 ligation. In the current study, we report that by downregulating CD47 during infection, the HIV-1 accessory protein Vpu reduces the susceptibility of HIV-1-infected cells to apoptosis following CD47 ligation. This finding highlights a potential mechanism that promotes infected T cell survival for optimal viral production and spread.

Key words: HIV-1, Vpu, CD47, apoptosis

INTRODUCTION

Remodeling of the host plasma membrane is one of the strategies used by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) to evade immune responses. One of the accessory proteins of HIV-1, viral protein U (Vpu), plays a key role in this process by downregulating several cell surface proteins [1]. The list of Vpu targets keeps increasing with the development of large scale analysis of HIV-1-infected T cell surface proteome [2-5]. Recently, CD47 was identified as a new cellular target that is downregulated during HIV-1 infection through a Vpu-dependent process [Article 1].

CD47 is an ubiquitously expressed type-I transmembrane protein involved in various functions, including cell adhesion, T-cell activation, inhibition of phagocytosis and apoptosis [6, 7]. In fact, CD47 was reported to augment the Fas-mediated caspase-dependent apoptosis through association with the Fas receptor [8]. It is also known to induce caspase-independent cell death in many cell types through ligation induced by several monoclonal antibodies (mAbs) as well as its secreted ligand thrombospondin-1 (TSP-1) [9-14].

Firstly isolated from activated platelets [15], TSP-1 is a matricellular protein which, given its extracellular matrix non-structural function, has multiple roles in the regulation of different cellular processes including angiogenesis [16]. TSP-1 is transiently released during the acute phase of inflammation and is highest in the blood [16, 17], moreover, it was reported to display an anti-HIV activity [18]. As the first identified ligand of CD47, the C-terminal domain of TSP-1 contains a CD47 interacting “RFYVVM” motif [19], from which several peptides such as 4N1K and 7N3 were subsequently derived and used to mimic TSP-1 activity [7, 19]. Several mAbs have been used to induce CD47 ligation, with some (e.g., B6H12 and 2D3) only promoting cell death in an immobilized form and others, in suspension (e.g., Ad22, 1F7 and CC2C6) [7]. Importantly, Leclair *et al.* recently reported that anti-CD47 mAb CC2C6 was able to induce CD47 ligation and promote caspase-independent apoptosis [20].

Vpu was previously reported to increase susceptibility of HIV-1-infected cells to Fas-mediated killing [21]. It also induces TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)-mediated

apoptosis by inhibiting the expression of antiapoptotic factors [22]. Nevertheless, the role of Vpu in caspase-independent apoptosis remains unclear. We therefore investigated whether Vpu could modulate cell death through this process by downregulating CD47.

In the current study, we used the anti-CD47 mAb CC2C6, and confirmed that it was able to induce apoptosis in a CD47-dependent manner. Furthermore, we show that Vpu modulates the susceptibility of HIV-1-infected CD4⁺ T cells infected to CC2C6-induced apoptosis via a process that involves CD47 downregulation.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Jurkat E6.1 cell line was acquired from ATCC, while CD47 knockout (KO) and control (ctrl) Jurkat E6.1 cells were generated as described [Article 1]. Jurkat cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (Wisent) containing 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 10% FBS (RPMI-10). Primary CD4⁺ T cells were isolated from purified peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and were activated as described [Article 1].

Infection

Viruses were produced and titrated as detailed previously [Article 1]. VSV-G pseudotyped CCR5-tropic (R5) NL 4-3. ADA.IRES.GFP (NL 4-3 ADA) expressing (WT) or lacking Vpu (dU) viruses were used in this study. Jurkat T cell lines were infected at multiplicity of infection (MOI) of 0.5, whereas primary CD4⁺ T cells were infected at MOI of 1 by spinoculation [23].

CC2C6-induced apoptosis assay

PBS-washed cells were resuspended at 1×10^5 cells/mL in RPMI-10 with or without the purified anti-CD47 monoclonal antibody (mAb) clone CC2C6 (BioLegend, #323102) in suspension at the indicated concentration(s). After 2h of incubation at 37°C, cells were washed and stained using Annexin V-PI detection kit (eBioscience, #88-8007-72) as per manufacturer's protocol.

4N1K-induced cell death assay

PBS-washed cells were resuspended at 1×10^5 cells/mL in RPMI-10 with or without the 4N1K peptide (AnaSpec, #AS-64591) at the indicated concentration(s). After 2h of incubation at 37°C, cells were washed and analyzed by flow cytometry. Viable cells were determined by side scatter and forward scatter.

Flow cytometry

Flow cytometry data were collected on a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience) and a CyAn ADP cytometer (Beckman coulter). Post-acquisition analysis was conducted using the FlowJo software, version 10.1 for Mac, BD Biosciences.

Statistical analysis

Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare differences between 2 groups. Data were presented as mean \pm standard deviation (SD), p values of <0.05 were considered as statistically significant. Statistical comparisons were performed using GraphPad Prism, version 8.0 for Mac, GraphPad Software.

RESULTS AND DISCUSSION

CC2C6-induced apoptosis is CD47-dependent

CC2C6 was reported to induce CD47 ligation and promote apoptosis [20]. To confirm the reported observation and define the working antibody concentrations in our system, we performed a dose titration experiment. Jurkat E6.1 cells expressing CD47 (ctrl: control) or CD47KO were treated with 125-500 ng/mL of CC2C6 for 2h, then analyzed for apoptosis induction using Annexin V/PI assay and flow cytometry. Annexin V⁺/PI⁻ population represents early apoptotic cells, while Annexin V⁺/PI⁺ population represents late apoptotic cells; the sum of values of the two populations (Annexin V⁺) was therefore considered as total apoptotic cells. Jurkat E6.1 control cells treated with increasing concentrations of CC2C6 led to a gradual enhancement of phosphatidylserine (PS) exposure, a hallmark of apoptosis, and membrane rupture as indicated by the PI uptake (Figure 1). Since reached maximum percentage of Annexin V⁺ cells at a 125 ng/mL concentration of CC2C6, subsequent experiments were performed at that concentration. Interestingly, no augmentation of Annexin V⁺ cells was observed in Jurkat E6.1 CD47KO. Taken together, we confirmed that CC2C6 is able to induce apoptosis in a CD47-dependent manner.

Vpu-mediated CD47 downregulation decreases the susceptibility of HIV-1-infected CD4⁺ cells to CC2C6-induced apoptosis

As we previously observed that CD47 is downregulated by Vpu during HIV-1 infection [Article 1], we therefore hypothesized that Vpu would regulate CC2C6-induced apoptosis through CD47 downregulation. To test our hypothesis, we treated GFP-marked HIV-1 viruses-infected Jurkat E6.1 control and CD47KO cells with 125 ng/mL of CC2C6, then assayed the cells for Annexin V binding. We analyzed specifically the populations of infected cells which are GFP⁺ (Supplementary Figure 1). Indeed, we observed less augmentation of Annexin V⁺ cells in control cells infected with WT HIV-1 compared to cells infected by dU virus, whereas CD47KO cells were resistant to CC2C6-mediated apoptosis independently of whether they were infected with WT or dU viruses (Figure 2A). Together, our data support the notion that

decreased CD47 surface level by Vpu leads to reduced susceptibility of target cells to CD47-mediated apoptosis.

We subsequently investigated whether this finding is conserved in primary CD4⁺ T cells and found that under the same experimental conditions Annexin V⁺ cells were significantly higher in dU HIV-1-infected cells compared to WT HIV-1-infected cells where they appeared less sensitive to CC2C6-induced apoptosis (Figure 2B). Interestingly, when apoptosis was specifically analyzed in bystander cells in excluding the GFP⁺ population, we observed that all non-infected cells were susceptible to CC2C6 induction as the percentage of Annexin V⁺ cells increased significantly following treatment (Figure 2C). These results suggest that Vpu protects HIV-1-infected CD4⁺ T cells from CC2C6-induced apoptosis through downregulation of CD47.

4N1K-induced cell death is CD47-independent

We then sought to put our observation in a physiological context. As TSP-1 is the known CD47 ligand *in vivo* to induce caspase-independent cell death [14, 24], we used the TSP-1-derived 4N1K peptide as a proxy for its activity. Although 4N1K has been reported to exert biological phenomena independent of CD47 [25-27], we took advantage of the CD47KO cells as an adequate control to study CD47-mediated cell death. Jurkat E6.1 control and CD47KO cells were incubated with 4N1K for 2h then analyzed by flow cytometry. By increasing the concentration of 4N1K, we observed increased cell death in both control and CD47KO cells compared to the untreated target cells as shown by the forward and side scatter flow dot plot. Importantly, the flow graphs showed a similar profile in both cell lines (Figure 3), suggesting that 4N1K-induced cell death is CD47-independent.

CONCLUSION

We previously reported that CD47 was downregulated from surface of CD4⁺ T cells by Vpu during HIV-1 infection [Article 1]. Here we show that anti-CD47 mAb CC2C6 is able to induce apoptosis in a CD47-dependent manner, we also provide evidence that Vpu-mediated CD47 downregulation increases the resistance of infected cells to CC2C6-induced apoptosis. However, the TSP-1-derived 4N1K peptide induces cell death regardless of CD47 expression. We therefore corroborate previous observations that 4N1K induces CD47-independent effects [25-28] and as such requires careful consideration when used as a replacement of TSP-1 to study CD47-mediated signaling. Nevertheless, soluble TSP was previously used to induce cell death [14]; in a physiological context, TSP-1 is released in response to inflammation [16]. Our results suggest that Vpu might protect HIV-1-infected CD4⁺ T cells from cell death induced by TSP-1 through the downregulation of CD47.

REFERENCES

1. Sugden, S.M., M.G. Bego, T.N. Pham, and E.A. Cohen, *Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence*. *Viruses*, 2016. **8**(3): p. 67.
2. Matheson, N.J., J. Sumner, K. Wals, R. Rapiteanu, M.P. Weekes, R. Vigan, J. Weinelt, M. Schindler, R. Antrobus, A.S. Costa, C. Frezza, C.B. Clish, S.J. Neil, and P.J. Lehner, *Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef*. *Cell Host Microbe*, 2015. **18**(4): p. 409-23.
3. Sugden, S.M., T.N. Pham, and E.A. Cohen, *HIV-1 Vpu Downmodulates ICAM-1 Expression, Resulting in Decreased Killing of Infected CD4+ T Cells by NK Cells*. *J Virol*, 2017. **91**(8).
4. Jain, P., G. Boso, S. Langer, S. Soonthornvacharin, P.D. De Jesus, Q. Nguyen, K.C. Olivieri, A.J. Portillo, S.M. Yoh, L. Pache, and S.K. Chanda, *Large-Scale Arrayed Analysis of Protein Degradation Reveals Cellular Targets for HIV-1 Vpu*. *Cell Rep*, 2018. **22**(9): p. 2493-2503.
5. Liu, Y., Y. Fu, Q. Wang, M. Li, Z. Zhou, D. Dabbagh, C. Fu, H. Zhang, S. Li, T. Zhang, J. Gong, X. Kong, W. Zhai, J. Su, J. Sun, Y. Zhang, X.F. Yu, Z. Shao, F. Zhou, Y. Wu, and X. Tan, *Proteomic profiling of HIV-1 infection of human CD4(+) T cells identifies PSGL-1 as an HIV restriction factor*. *Nat Microbiol*, 2019. **4**(5): p. 813-825.
6. Sick, E., A. Jeanne, C. Schneider, S. Dedieu, K. Takeda, and L. Martiny, *CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(7): p. 1415-30.
7. Oldenborg, P.A., *CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease*. *ISRN Hematol*, 2013. **2013**: p. 614619.

8. Manna, P.P., J. Dimitry, P.A. Oldenborg, and W.A. Frazier, *CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29637-44.
9. Pettersen, R.D., K. Hestdal, M.K. Olafsen, S.O. Lie, and F.P. Lindberg, *CD47 signals T cell death*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7031-40.
10. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati, *CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1277-84.
11. Mateo, V., E.J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F.L. Deist, and M. Sarfati, *Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2882-90.
12. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3544-53.
13. Johansson, U., K. Higginbottom, and M. Londei, *CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells*. Scand J Immunol, 2004. **59**(1): p. 40-9.
14. Bras, M., V.J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J.E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S.A. Susin, *Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 7073-88.
15. Baenziger, N.L., G.N. Brodie, and P.W. Majerus, *A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(1): p. 240-3.
16. Lopez-Dee, Z., K. Pidcock, and L.S. Gutierrez, *Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation*. Mediators Inflamm, 2011. **2011**: p. 296069.

17. Wahl, S.M., M. Redford, S. Christensen, W. Mack, J. Cohn, E.N. Janoff, J. Mestecky, H.B. Jenson, M. Navazesh, M. Cohen, P. Reichelderfer, A. Kovacs, and D.S. Group, *Systemic and mucosal differences in HIV burden, immune, and therapeutic responses*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **56**(5): p. 401-11.
18. Crombie, R., *Mechanism of thrombospondin-1 anti-HIV-1 activity*. AIDS Patient Care STDS, 2000. **14**(4): p. 211-4.
19. Gao, A.G., F.P. Lindberg, M.B. Finn, S.D. Blystone, E.J. Brown, and W.A. Frazier, *Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 21-4.
20. Leclair, P., C.C. Liu, M. Monajemi, G.S. Reid, L.M. Sly, and C.J. Lim, *CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 544.
21. Casella, C.R., E.L. Rapaport, and T.H. Finkel, *Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 92-100.
22. Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1299-311.
23. Richard, J., S. Sindhu, T.N. Pham, J.P. Belzile, and E.A. Cohen, *HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing*. Blood, 2010. **115**(7): p. 1354-63.
24. Isenberg, J.S., J.B. Maxhimer, F. Hyodo, M.L. Pendrak, L.A. Ridnour, W.G. DeGraff, M. Tsokos, D.A. Wink, and D.D. Roberts, *Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury*. Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 1100-12.

25. Tulasne, D., B.A. Judd, M. Johansen, N. Asazuma, D. Best, E.J. Brown, M. Kahn, G.A. Koretzky, and S.P. Watson, *C-terminal peptide of thrombospondin-1 induces platelet aggregation through the Fc receptor gamma-chain-associated signaling pathway and by agglutination*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3346-52.
26. Barazi, H.O., Z. Li, J.A. Cashel, H.C. Krutzsch, D.S. Annis, D.F. Mosher, and D.D. Roberts, *Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42859-66.
27. Leclair, P. and C.J. Lim, *CD47-independent effects mediated by the TSP-derived 4NIK peptide*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98358.
28. Leclair, P., M.J. Kim, and C.J. Lim, *Peptide analogues PKHB1 and 4NIK induce cell death through CD47-independent mechanisms*. Cancer Sci, 2020. **111**(3): p. 1028-1030.

Figures

Figure 1. CC2C6 induces apoptosis in a CD47-dependent manner. Jurkat E6.1 cells expressing (ctrl: control) CD47 or not (CD47KO) were incubated with CC2C6 at the indicated concentrations for 2h, then stained for Annexin V-PI and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry dot-plot graph of Annexin V-PI staining of untreated and treated cells (top). Histogram graph of percentage of Annexin V⁺ cells (bottom, n=1).

Figure 1

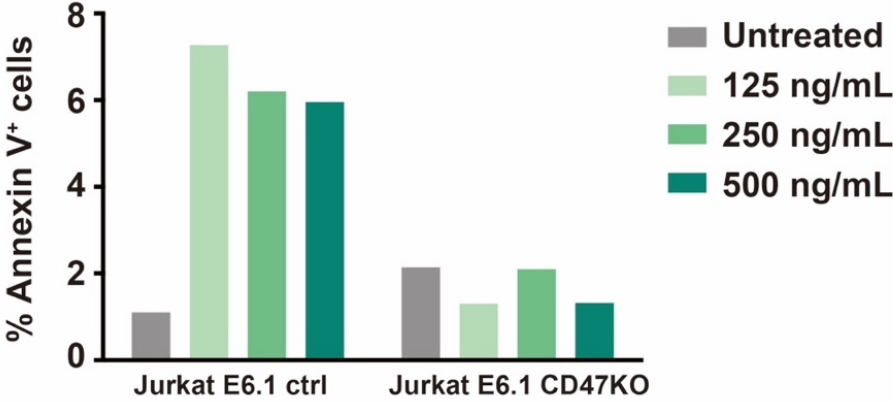
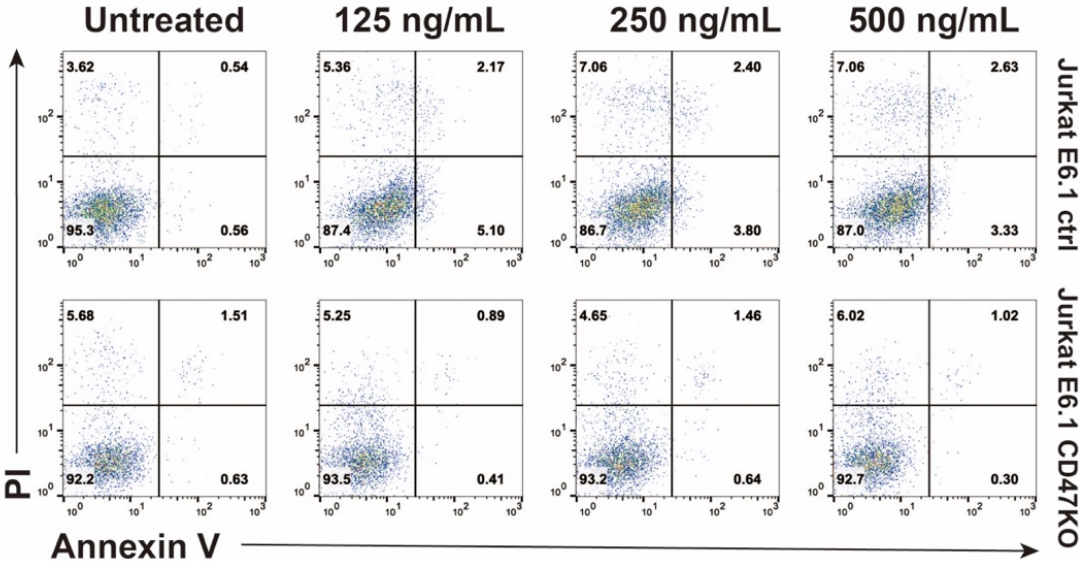


Figure 2. Vpu decreases susceptibility of HIV-1-infected CD4⁺ T cells to CC2C6-induced apoptosis. Jurkat E6.1 ctrl or CD47KO, or primary CD4⁺ T cells were infected with VSV-G-pseudotyped GFP-expressing NL 4-3 ADA (WT or dU) viruses. After 48h, cells were incubated with CC2C6 at 125 ng/mL for 2h, then stained for Annexin V-PI and analyzed by flow cytometry. **(A)** Jurkat E6.1 ctrl and CD47KO cell lines. Flow cytometry dot-plot graph of Annexin V-PI staining of untreated and treated cells (top). Histogram graph of percentage of Annexin V⁺ cells (bottom, n=1). **(B)** Infected cells population of primary CD4⁺ T cells. Representative flow cytometry dot-plot graph of Annexin V-PI staining of untreated and treated cells (top). Summary histogram graph of percentage of Annexin V⁺ cells (bottom). **(C)** Bystander cells population of primary CD4⁺ T cells. Representative flow cytometry dot-plot graph of Annexin V-PI staining of untreated and treated cells (left). Summary histogram graph of percentage of Annexin V⁺ cells (right). **(B and C)** n= 6 donors, analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test (*, P < 0.05; ns, nonsignificant, P > 0.05).

Figure 2

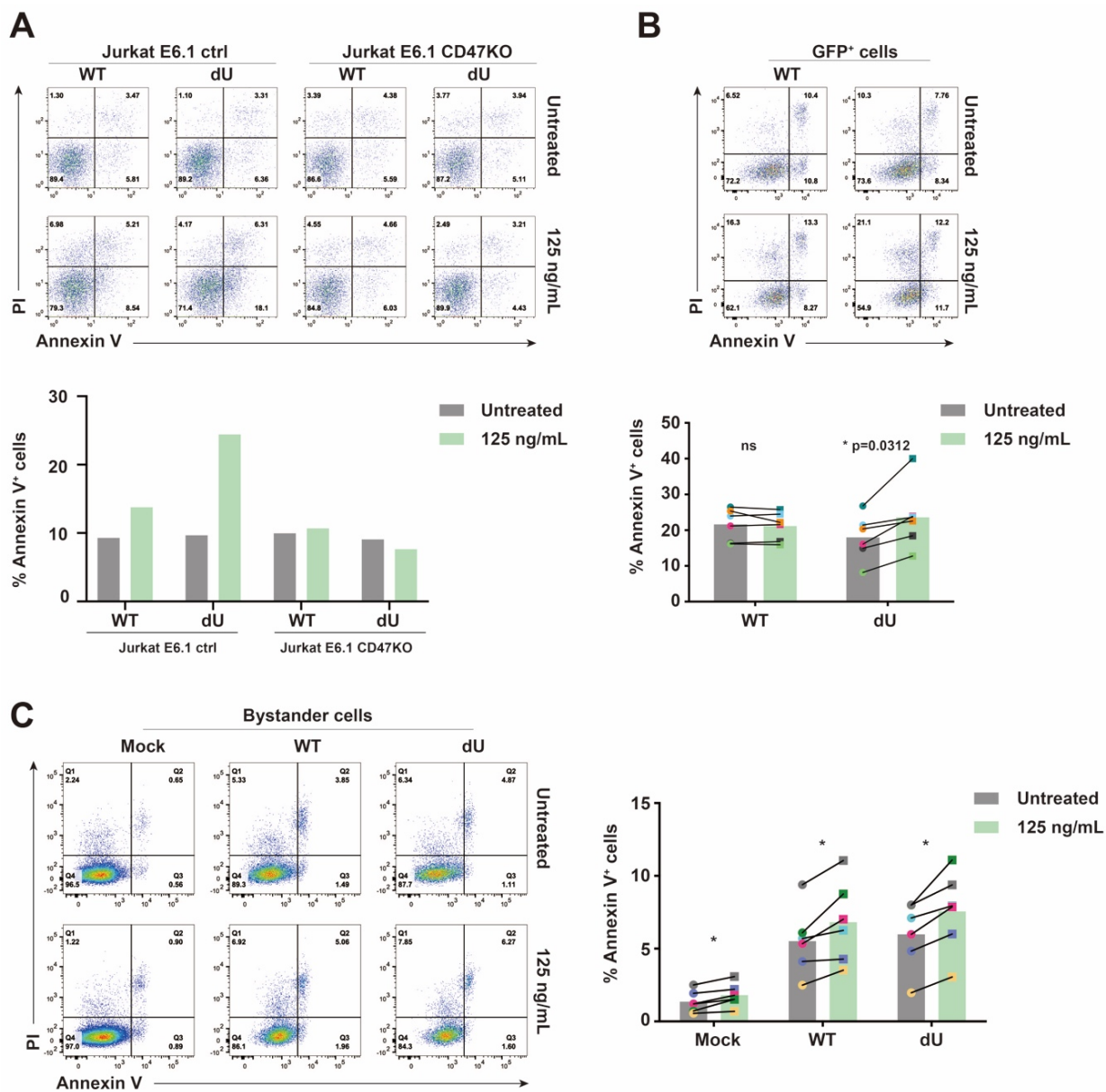
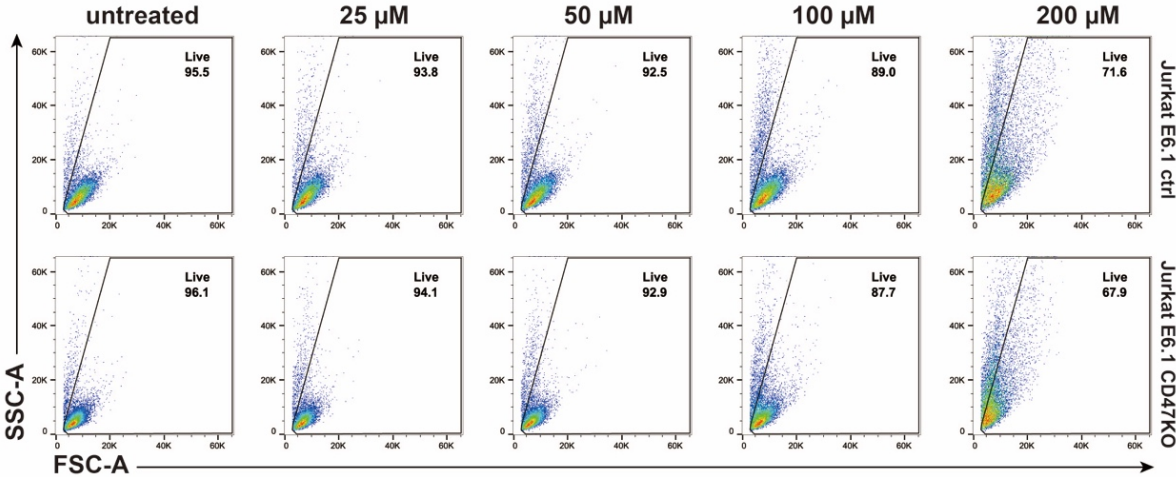
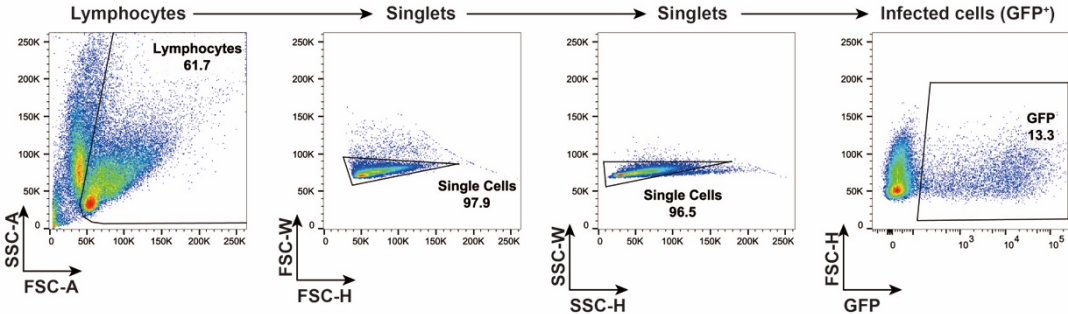


Figure 3. 4N1K induces cell death independently of CD47. Jurkat E6.1 ctrl or CD47KO cells were incubated with 4N1K at the indicated concentrations for 2h, then analyzed by flow cytometry. Shown are flow cytometry dot-plot as side scatter (SSC-A) vs forward scatter (FSC-A) with indications of the percentage of viable cells.

Figure 3



Supplementary Figure 1. Gating strategy (related to Figure 2).



CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les travaux présentés dans le premier article (Chapitre 2) nous ont permis de comprendre le rôle de Vpu dans la régulation de l'infection des macrophages via le processus de phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés, ainsi que l'impact de la diminution de CD47 par Vpu dans ce processus. Les résultats présentés dans le deuxième article (Chapitre 3) nous ont permis d'élaborer un modèle fonctionnel de cette activité de Vpu. Le chapitre actuel vise à mettre en évidence les éléments importants et mettre en perspectives les résultats présentés, en tenant compte de la littérature actuelle. Certains points déjà discutés dans les articles ne seront pas élaborés dans ce chapitre.

1. Régulation de l'expression de CD47

Le niveau d'expression de CD47 affecte la susceptibilité de cellules cibles à la phagocytose. Par exemple, les jeunes globules rouges exprimant un haut niveau de CD47 sont protégés de la phagocytose des macrophages [227]. Les cellules cancéreuses ont aussi une forte expression de CD47; plus ces cellules expriment CD47, plus elles sont résistantes à la phagocytose et à l'immunothérapie anti-CD47 [347]. La surexpression de CD47 est donc une stratégie importante pour la survie des cellules cancéreuses.

De manière similaire, le virus myxoma a évolué pour encoder une protéine mimétique de CD47 pour échapper à la défense immunitaire de l'hôte [263]. De plus, le virus de l'herpès et les adénovirus modulent l'expression de CD47 et d'autres membres de la superfamille d'Ig pour contrecarrer la défense immunitaire [348]. Plus récemment, Tal *et coll.* a démontré que le niveau d'expression de CD47 augmente durant l'infection par le LCMV, le virus Friend, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), ainsi que celle du SARS-CoV-2 [265]. Leur étude propose que l'augmentation de CD47 résulte de la stimulation cytosolique ou endosomale des PRRs (« Pattern recognition receptors »). Ils ont également observé que les cytokines inflammatoires telles que l'IFN α et le TNF α du sérum des patients infectés par le virus de

l'hépatite C permettent d'induire l'augmentation de CD47 dans les cellules immunes naïves *in vitro*. Cependant, la capacité d'autres agents infectieux à induire l'expression de CD47 reste encore à confirmer.

Néanmoins, les résultats présentés dans cette thèse nous ont permis de conclure que le niveau d'expression de CD47 est régulé négativement durant l'infection par le VIH-1, de manière Vpu-dépendante. Nos résultats suggèrent que la régulation de l'expression de CD47 suite à l'infection par des pathogènes est un processus plus spécifique, variant selon l'agent infectieux. De plus, pour déterminer les niveaux de CD47, il est important d'examiner spécifiquement la population infectée pour éviter les impacts confondants liés aux effets « bystander ». Ainsi, il est aussi possible que les cellules infectées puissent sécréter des cytokines inflammatoires, qui affecteront à leur tour l'expression de CD47 dans les cellules non-infectées. Dans le cas d'une infection modeste, ceci pourrait dissimuler les changements du niveau de CD47 dans les cellules infectées.

2. Les signaux régulant la phagocytose

Bien qu'il ait déjà été rapporté que les macrophages peuvent être infectés par le VIH-1 via la phagocytose des lymphocytes T infectés [286, 287], les mécanismes impliqués restaient peu connus. Les résultats présentés dans cette thèse ont mis en évidence le rôle de Vpu dans ce processus, ainsi que sa régulation négative de l'expression de CD47 pour réduire son interaction avec SIRP α .

En effet, la phagocytose est un processus dynamique modulé par les signaux pro- et anti-phagocytose. Depuis l'identification de l'axe CD47/ SIRP α comme le premier point de contrôle de la phagocytose, plusieurs autres complexes récepteur/ligand ont été identifiés inhibiteurs sur la phagocytose, tels que PD-1/PD-L1 (« Programmed cell death protein 1/Programmed cell death ligand 1 »), CMH I/LILRB1 (« Leukocyte Ig-like receptor 1 ») et CD24/Siglec-10 (« Sialic acid-binding Ig-like lectin 10 ») [349-351]. Ainsi, les cellules

cancéreuses expriment plus de signaux anti-phagocytose que les cellules normales pour contrebalancer les signaux pro-phagocytose. Le blocage des points de contrôle inhibiteurs pour la phagocytose favorise l'élimination des cellules cancéreuses par les macrophages. Il a été rapporté que l'expression de la protéine pro-phagocytose SLAMF7 (« signaling lymphocytic activation molecule F7 ») joue un rôle important en provoquant l'augmentation de phagocytose induite par le blocage de l'interaction CD47/ SIRP α [352]. D'autre part, CD47 supprime plusieurs signaux pro-phagocytose médiés par l'IgG, le complément et la calréticuline [229, 352-354].

Parmi les signaux pro-phagocytose, la phosphatidylsérine (PS) est particulière grâce à l'existence de plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans sa reconnaissance. La PS est un phospholipide situé normalement au niveau du feuillet interne de la bicouche lipidique et est exposé vers la surface cellulaire suite aux stimuli apoptotiques [355]. En effet, les phagocytes détectent la présence de PS à la surface de cellules apoptotiques soit par des molécules solubles incluant la protéines S, Gas6 (« Growth arrest-specific 6 ») et MFG-E8 (« Milk fat globule-EGF 8 ») [356, 357] ; soit par des récepteurs qui directement lient à la PS tels que TIM-1, -3 et -4 [358-360], CD300-b et -f [361-363] , BAI-1 (« Brain angiogenesis inhibitor-1 ») [364], RAGE (« Receptor for advanced glycation end products ») [365] et les Stabilin 1 et 2 [366-368].

Tenant compte de l'importance de la PS dans la phagocytose et le fait que l'infection par le VIH-1 induit l'externalisation de PS [369], nous avons vérifié le niveau de PS exposées à la surface des lymphocytes T cocultivés avec les MDMs. Bien que nous ayons observé une augmentation de l'externalisation de PS à la surface des lymphocytes T infectés par le VIH-1, nous n'avons pas détecté de différence significative entre les niveaux de PS des lymphocytes infectés par les virus WT et Vpu-déficient. Ceci nous a permis de valider que l'augmentation de la phagocytose dans notre système résulte de la diminution de CD47 induite par Vpu. De plus, une étude récente a rapporté que l'interaction CD47/ SIRP α est capable de bloquer la

phagocytose induite par la PS, suggérant que l'effet de CD47 est plus important que celui de la PS.

3. Relâche des particules virales par les macrophages infectés

Nos résultats ont démontré que les MDMs sont infectés de manière productive suite à la coculture avec les lymphocytes T CD4⁺ infectées. Néanmoins, la capacité des particules virales relarguées par les MDMs à infecter cellules TZM-bl diminue avec le temps. Pour expliquer cette observation, nous proposons : (1) soit que la quantité totale de virions relargués a diminué en raison de leur accumulation au sein des macrophages dans les compartiments tels que les VCCs ; (2) soit que le pouvoir infectieux du virus lui-même a diminué en raison de la restriction cellulaire. Cette section vise à discuter l'effet de ces paramètres sur le bourgeonnement des particules virales dans les macrophages infectés.

Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ infectées où le bourgeonnement se produit au niveau de la membrane plasmique, les virions bourgeonnent principalement dans les VCCs dans les macrophages infectés. Tel que mentionné auparavant, les VCCs sont des compartiments à pH neutre connectés au milieu extracellulaire [315-317]. En effet, des analyses ont montré que seulement 5 à 12% de bourgeonnements de virus chez les macrophages ont lieu à la surface cellulaire. De plus, ces événements sont bien concentrés dans les régions où les VCCs se connectent avec la membrane plasmique [319]. Si de plus en plus de particules virales s'accumulent dans les VCCs, ces compartiment éventuellement deviennent plus saturés, les lieux de bourgeonnement des virions deviennent limités et les VCCs débordent [370]. Fait intéressant à noter, le facteur de restriction BST2 est concentré dans les VCCs et favorise ainsi la rétention des virions au sein de ces compartiments [326, 371]. Cependant, les connections entre les VCCs et la membrane plasmique sont très étroites pour permettre la diffusion passives des particules virales [372]. Ceci mène à la diminution de la relâche virale vers le milieu extracellulaire, confirmant en revanche la rétention des virions dans les VCCs [370]. Plus récemment, une étude effectuée dans le modèle de souris

humanisées a mis en évidence des compartiments cellulaires entièrement clos où les virions s'accumulent [287]. Ces compartiments pourraient donc fusionner avec d'autres compartiments possédant l'accès à la surface cellulaire, comme les VCCs, pour faciliter la dissémination virale. Grâce à ces processus, les virions deviendraient moins accessibles aux médiateurs solubles tels que les anticorps neutralisants [373], aux capteurs cytoplasmiques ou endosomaux et aux mécanismes effecteurs anti-pathogène tels que les ROS et le pH acide. Les virions conservés dans les VCCs persistent ainsi pour une longue durée, au lieu d'être relargués directement ; ils peuvent aussi s'accumuler au niveau de la SV où ils sont capables d'infecter les lymphocytes T cibles de manière plus efficace.

Les macrophages sont paradoxalement exploités par de nombreux pathogènes incluant le VIH-1 comme niche cellulaire pour favoriser leur propre réplication [374]. Étant des cellules du système immunitaire inné, ils sont capables de détecter et de répondre aux composants viraux par l'expression des facteurs cellulaires qui restreignent la capacité du virus à se répliquer et se propager. En effet, plusieurs facteurs cellulaires participent à cette restriction observée chez les macrophages tels que APOBEC3G, qui induit l'hypermutation du génome viral (tel que mentionné dans le chapitre 1), et SAMHD1 qui réduit le taux cellulaire de dNTPs et limite l'activité de la transcription inverse [143, 144]. Il existe également des facteurs de restriction qui affectent le pouvoir infectieux des virions relargués. Certaines protéines perturbent le clivage du précurseur gp160 et l'incorporation des glycoprotéines virales dans les virions nouvellement formés, diminuant ainsi leur capacité de fusionner avec les cellules cibles. Parmi ces protéines cellulaires, citons les protéines GBP5 (« Guanylate binding protein-5 ») [375] et MARCH8 (« Membrane-associated-RING-CH8 ») [376]. Certaines protéines sont incorporées dans les nouveaux virions et réduisent leur potentiel infectieux : par exemple, l'incorporation de IFTIM3 (« Interferon induced transmembrane protein 3 ») dans l'enveloppe virale inhibe la fluidité membranaire et ainsi inhibe la fusion virale [377]. Il est intéressant de noter qu'une étude récente a rapporté que l'incorporation de PSGL-1 et de CD43 dans les particules virales diminue leur potentiel infectieux ; ceci est possiblement dû à l'important volume des domaines extracellulaires de ces protéines, qui deviennent des barrières physiques et bloquent ainsi l'attachement virus-cellule [378].

Tous ces paramètres pourraient donc affecter la libération des particules virales dans les macrophages infectés, de manières quantitative et qualitative. Pour faire suite, il devient nécessaire de mesurer la quantité de capsid virale (p24) présente dans les surnageants des MDMs infectés, afin de déterminer le potentiel infectieux des virions relargués par l'essai de Luciférase en utilisant les cellules indicatrices TZM-bl.

4. Mécanisme

Nos résultats ont mis en évidence l'importance des motifs fonctionnels principaux de Vpu dans la régulation négative de CD47. En effet, nous avons généré des mutants de Vpu de l'isolat ADA (sous-type B), et trouvé qu'ils ne sont plus capables d'induire la déplétion de CD47, suggérant que le domaine TM, le motif bisérine DSGNES et le motif de trafic ExxxLV de Vpu étaient requis pour ce processus. Plus précisément, nos résultats suggèrent que Vpu interagit avec CD47 via les résidus alanine (A15) et tryptophane (W23) dans son domaine TM et cible CD47 pour la dégradation lysosomale. Les deux sérines (S53, 57) phosphorylées du motif DSGNES sont également nécessaires. Tel que mentionné dans la section sur la modulation de BST2, ce motif permet à la fois le recrutement du complexe SCF^{β-TrCP1/2} E3 ubiquitine ligase, nécessaire pour l'ubiquitination et dégradation lysosomale de BST2, ainsi que la régulation du recrutement de AP-1/AP-2 au motif de trafic ExxxLV pour la séquestration et le déplacement de BST2. Par contre, il reste à déterminer si ce motif DSGNES a un rôle similaire dans la régulation négative de CD47; de plus, nous pourrions examiner si la dégradation de CD47 dépend du recrutement du complexe SCF^{β-TrCP1/2} (par exemple, en utilisant la technologie des shRNA) et vérifier si CD47 subit l'ubiquitination, processus essentiel pour cibler les protéines à la dégradation lysosomale via l'engagement de la machinerie ESCRT [379]. Ayant démontré l'interaction physique entre CD47 et Vpu, ainsi que le rôle du motif de trafic ExxxLV de Vpu sur sa modulation de CD47, il serait intéressant de déterminer si Vpu affecte la localisation subcellulaire et le trafic de CD47, en utilisant des approches d'immuno-marquage et de microscopie confocale. En perspective, nos résultats actuels nous permettent de conclure que la régulation négative de CD47 par Vpu se fait par un

mécanisme plus similaire à celui de BST2 qu'à celui de CD4 qui correspond à une dégradation protéasomale.

5. L'apoptose induite par l'engagement de CD47

Dans le chapitre 3, nous avons rapporté que la régulation négative de CD47 par Vpu réduit la susceptibilité des lymphocytes infectées par le VIH-1 à l'apoptose induite par l'engagement de CD47. L'anticorps monoclonal anti-CD47 CC2C6 a été utilisé dans notre système pour induire l'apoptose, qui est caspase-indépendante selon une étude récente [205].

En effet, Vpu a plusieurs rôles dans la régulation de l'apoptose durant l'infection par le VIH-1. Il a été démontré que Vpu était impliqué dans les voies d'apoptose caspase-dépendante [380, 381]. La séquestration de β -TrCP par Vpu induit la stabilisation de certains substrats de β -TrCP tel que I- κ B α [381, 382] ; dans ce contexte, Vpu joue un rôle de compétiteur de β -TrCP et inhibe la dégradation de I- κ B α , menant à la réduction de l'activité NF- κ B [381]. En inhibant l'expression NF- κ B-dépendante des facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et le facteur TRAF-1 (« TNF receptor associated factor 1 »), Vpu induit l'apoptose via l'activation de la voie de caspases [380]. De manière similaire, en compétition avec β -TrCP, Vpu inhibe également l'ubiquitination et la dégradation protéasomique de p53, entraînant l'augmentation de l'apoptose-médiée par p53 [383]. En plus, Vpu est capable d'augmenter la susceptibilité des cellules infectées par le VIH-1 à l'apoptose médiée par le récepteur Fas [384].

Nous présentons pour la première fois dans cette thèse le rôle potentiel de Vpu dans la régulation de l'apoptose caspase-indépendante. Une caractérisation plus précise de l'apoptose induite par CC2C6 pourrait être envisagée. Nous pourrions examiner si le traitement des cellules infectées avec CC2C6 induit l'augmentation de ROS et la diminution de $\Delta\Psi_m$, caractères de l'apoptose caspase-indépendante (Chapitre 1), de manière CD47-dépendante. Nous avons également démontré que l'utilisation du peptide 4N1K n'était pas optimale pour

l'étude de CD47 car la morte cellulaire induite par ce peptide dérivé de TSP-1 est CD47-indépendante. Il faut donc utiliser la protéine TSP-1 recombinante pour mimer l'activité de TSP-1 *in vivo* en induction de l'engagement de CD47, puis vérifier si la régulation négative de CD47 par Vpu pourrait affecter la susceptibilité des cellules infectées à l'apoptose induite par TSP-1.

6. Moins de susceptibilité à l'apoptose pour une meilleure dissémination virale via la phagocytose?

Nous avons observé deux activités fonctionnelles liées à la régulation négative de CD47 par Vpu, la phagocytose et l'apoptose. Sachant que les cellules apoptotiques sont plus enclines à la phagocytose, ceci nous amène à poser la question : pourquoi Vpu augmente à la fois la phagocytose des lymphocytes T infectés par les macrophages, et diminue la susceptibilité des lymphocytes T infectés à l'apoptose médiée par CD47?

L'infection des lymphocytes T CD4⁺ par le VIH-1 induit des effets cytopathiques qui résultent des interactions directes hôte-pathogène et mènent à la mort cellulaire. Dans les lymphocytes T CD4⁺ au repos, le capteur d'ADN microbien IFI16 détecte les produits de la transcription virale et induit l'apoptose via l'activation de caspase [385]; cependant, dans les lymphocytes T CD4⁺ activés, le virus induit l'apoptose en causant des dommages à l'ADN suite à la réponse de l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte [386]. Des protéines virales sont aussi impliquées dans l'induction de l'apoptose : la PR du VIH-1 induit l'apoptose via un clivage de la procaspase 8 en Casp8p41 [387, 388]; la protéine Tat supporte la transcription des gènes proapoptotiques de la cellule hôte via l'activation du facteur de transcription FOXO3a [389] ; Vpr induit aussi l'apoptose via l'activation des caspases [133, 390]; quant à Vpu, elle a pour effet de provoquer l'apoptose par les mécanismes déjà décrits ci-dessus.

Cependant, cette notion de mort cellulaire induite par le VIH-1 est contraire à l'observation clinique qui a démontré que certaines cellules infectées ont la capacité de survivre et de persister pour de longues périodes malgré le traitement antirétroviral [391-393]. Certaines études ont suggéré que le virus a développé plusieurs mécanismes pour interrompre la signalisation apoptotique et affecter la susceptibilité à l'apoptose. Par exemple, l'expression précoce de Vif entraîne la dégradation de Vpr, permettant de retarder l'arrêt du cycle cellulaire induit par Vpr. Ceci favoriserait ainsi la survie des cellules infectées précocement [394]. Nef et Vpu régulent négativement CD4 pour éviter la surinfection des lymphocytes T CD4⁺ et les protègent contre la mort prématurée [111]; Nef induit également la phosphorylation et l'inactivation de la protéine proapoptotique Bad pour réduire l'apoptose [395]. De plus, grâce à une analyse protéomique quantitative basée sur la spectrométrie de masse, une étude a rapporté que l'infection par le VIH-1 activait le programme de survie cellulaire médié par BIRC5 (« Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 », ou « survivin »), une molécule inhibitrice de l'apoptose qui est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses [396]. L'expression de BIRC5 et de son régulateur en amont OX40, un membre de la famille TNFRSF (« TNF receptor superfamily »), augmente dans les lymphocytes T CD4⁺ infectées de manière productive ou latente. Ceci permet de maintenir la viabilité de ces cellules à long terme et favoriser la réplication virale, ainsi que la persistance via l'établissement du réservoir viral.

Tel que déjà introduit (Chapitre 1), les lymphocytes T CD4⁺ infectés phagocytés sont éventuellement dégradés dans les phagosomes, tandis que les virions amenés par ces cellules survivent et échappent à ces compartiments dégradatifs avant la destruction des lymphocytes T [282, 286, 287]. Dans ce contexte, il semble important d'éviter la mort prématurée des cellules infectées pour assurer la rigidité membranaire. Il devient ainsi possible que Vpu ait un rôle dans l'inhibition de la susceptibilité à l'apoptose afin de compenser les signalisation proapoptotiques et favoriser la persistance virale dans les cellules infectées. Ceci permettrait de créer un environnement plus optimal pour la dissémination virale vers les macrophages, et la survie des virions dans ces derniers.

7. Modèle *in vivo* pour étudier la contribution potentielle de Vpu dans l'établissement du réservoir viral et le développement de stratégie thérapeutique

Tel que mentionné ci-dessus, l'identification de CD47 comme une cible de Vpu, et l'étude fonctionnelle de cette nouvelle activité de Vpu, nous permettent de suggérer l'hypothèse que Vpu agit pour favoriser la dissémination virale et l'établissement du réservoir dans les macrophages. Il a été démontré que l'ADN viral n'était pas détectable dans les monocytes du sang périphérique [397], donc ces cellules ne servent pas du réservoir viral. D'autre part, l'analyse des macrophages tissulaires humains n'est pas facile en raison des difficultés d'accès à des échantillons et à l'expansion de ces cellules *ex vivo*. Bien que les monocytes du sang puissent être différenciés *in vitro* pour générer des macrophages, l'hétérogénéité liée à la localisation anatomique de ces cellules n'existe plus en culture; ceci constitue un obstacle de taille pour mimer les macrophages tissulaires primaires [398, 399]. Dans ce contexte, l'utilisation de modèles animaux pourrait nous permettre d'établir la contribution réelle de cette activité de Vpu *in vivo*. En effet, dans une étude sur la susceptibilité de cellules myéloïdes humaines au VIH-1 et sur leur capacité de soutenir la réplication virale et l'infection productive, Honeycutt *et coll.* ont généré des souris humanisées MoM (« Myeloid-only mice ») [397, 400]. Les auteurs ont trouvé que la réplication virale persistait pendant plusieurs mois dans ces souris. Il est à noter que les seules cellules humaines pouvant permettre la réplication du virus dans ces souris sont d'origine myéloïde.

Ce modèle a pour l'avantage d'éviter la présence confondante des lymphocytes T dans l'évaluation de la persistance virale dans les macrophages. Il devient ainsi possible d'effectuer le transfert adoptif des lymphocytes infectés dans les souris MoM pour déterminer si la présence de ces cellules infectées permet l'établissement de l'infection *de novo* dans un hôte non-infecté. Il est intéressant de noter que la plupart des études sur le rôle de CD47 durant l'infection a utilisé les souris CD47 knockout [401-403], dont un modèle de souris BLT humanisée [404], elles pourraient servir de contrôle adéquat. Il serait donc envisageable d'utiliser les lymphocytes CD4⁺ provenant des souris infectées exprimant CD47 ou non, pour

injection dans les souris MoM non-infectées. Une cinétique de l'infection des cellules myéloïdes pourrait ensuite être évaluée pour déterminer l'impact de l'expression de CD47 dans l'infection de ces souris. Un VIH-1 Vpu-défectif pourrait également être introduit dans ce système afin d'examiner la contribution de la régulation négative de CD47 médiée par Vpu dans l'infection et la persistance virale au sein de ces souris MoM.

L'utilisation de modèles animaux permettrait ainsi d'établir le rôle de cette activité de Vpu et sa contribution de l'établissement du réservoir viral. Si la régulation négative de CD47 par Vpu induisait plus d'infection productive ou latente des macrophages, l'interaction entre Vpu et CD47 représenterait une cible idéale pour le développement de molécule thérapeutique. En effet, Vpu est déjà une cible pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques grâce à sa capacité de cibler une série de protéines cellulaire : en effet, un inhibiteur de Vpu, BIT225, est déjà en phase II d'essai clinique [405-407]. Il serait intéressant de tester l'effet de cet inhibiteur sur l'infection des macrophages. Par contre, le développement d'autres drogues ciblant cette activité de Vpu pourrait être nécessaire afin de perturber l'établissement du réservoir.

CONCLUSION

1. Conclusion générale

Nos travaux ont permis de valider CD47 comme une nouvelle cible de Vpu et mettre en évidence le rôle potentiel de cette activité dans la pathogenèse du VIH-1. Nous démontrons que la régulation négative de CD47 par Vpu favorise la phagocytose des cellules T infectées par les macrophages, un processus qui entraîne l'infection productive de ces derniers. Plus important encore, nous démontrons que les virus transmis/fondateurs, tel que WITO, qui n'infectent pas les macrophages sous sa forme libre, est capable d'induire l'infection productive des macrophages à l'aide de la phagocytose. Ceci pourrait permettre d'expliquer la présence des macrophages infectés durant les phases précoces de la maladie avant l'émergence des virus M-tropiques. Mécaniquement, nous décrivons que Vpu induit la déplétion de CD47 de manière similaire à l'antagonisme de BST2 par la machinerie lysosomale. De plus, nous démontrons que cette activité de Vpu réduit la susceptibilité des lymphocytes T CD4⁺ infectés à l'apoptose induite par l'engagement de CD47, protégeant ainsi les cellules infectées de la mort prématurée. La balance entre l'apoptose et la phagocytose pourrait enfin favoriser l'établissement du réservoir viral dans les macrophages.

Néanmoins, beaucoup de travail reste à faire afin d'établir la contribution de cette activité de Vpu dans la pathogenèse virale. Notamment, il serait important d'examiner les paramètres impliqués dans la réduction de la production des particules virales infectieuses avec le temps. De plus, le mécanisme de déplétion de CD47 pourrait être défini avec plus de détails. Quant à l'apoptose, il serait intéressant de caractériser la mort cellulaire induite par l'engagement de CD47 et de vérifier si les caspases sont impliquées. Un modèle *in vivo* serait également intéressant pour évaluer la contribution de la régulation négative de CD47 médiée par Vpu dans l'établissement du réservoir viral myéloïde. Finalement, une meilleure compréhension de ces mécanismes impliqués dans les fonctions de Vpu a le potentiel de permettre l'identification de nouvelles cibles antivirales.

2. Perspectives

Dans les quatre chapitres, cette thèse est progressivement passée d'une présentation générale de VIH-1, Vpu, CD47 et les macrophages, où les hypothèses et les objectifs ont été mis en évidence. Étant une nouvelle cible de Vpu, CD47 a été ensuite étudié en deux aspects, la phagocytose et l'apoptose, pour mieux comprendre son rôle dans la pathogenèse virale. Certains éléments importants et les perspectives qui leur correspondent ont été discutés. Cependant, les perspectives envisageables sont diverses, celles en prolongement direct de cette thèse concernent 4 objectifs majeurs :

1. Consolidation de l'infection productive des MDMs en testant plus de souches virales, notamment les virus T/F.

Nous avons démontré que les macrophages étaient productivement infectés via la phagocytose des cellules T infectées. Il est intéressant à noter que la production virale des macrophages était plus importante lorsqu'ils étaient co-cultivés avec les cellules T infectées par un virus T/F WITO qu'avec celles infectées par un virus M-tropique ADA. L'étude par Baxter *et coll.* a fait une comparaison similaire [286], ils n'ont pas observé de différence significative dans la coculture avec des cellules T infectées par des virus M-tropique (BaL, YU2) et celle avec des cellules infectées par des virus T/F (CHO40, REJO, RHPA, SUMA, THRO et WITO). Il faut souligner que les constructions provirales utilisées dans leur étude sont NL 4-3 isogéniques exprimant la Rénilla luciférase et codant pour les Env des virus M-tropiques ou T/F indiqué ci-dessus [283]. Les macrophages co-cultivés avec les cellules T infectées par ces virus étaient lysés directement pour mesurer l'activité de la luciférase. Nous disposons des constructions provirales des virus M-tropiques et T/F en séquence complète dans laboratoire, des expériences similaires à celle présentée dans la Figure 3 du premier article seront mises en place pour évaluer si la différence de l'infection productive des MDMs est conservée entre les autres souches M-tropiques et T/F. Si c'est le cas, il serait essentiel d'examiner les facteurs potentiellement impliqués dans ce processus (e.g., protéines IFTIMs).

2. Caractérisation de l'apoptose induite par l'engagement de CD47.

Nous avons ensuite démontré que la régulation négative de CD47 par Vpu rend les cellules infectées moins susceptibles à l'apoptose via l'engagement de CD47 induit par l'anticorps anti-CD47 clone CC2C6. Cette voie d'apoptose a été décrite comme caspase-indépendante [205], les paramètres tels que ROS et $\Delta\Psi_m$ pourront être mesurés pour mieux caractériser la signalisation dans notre système comme mentionnés auparavant dans la discussion.

3. Étude plus profonde du mécanisme moléculaire Vpu/CD47.

Nous avons mis en évidence que Vpu forme un complexe avec CD47, également les motifs fonctionnels de Vpu impliqués dans la déplétion de CD47. Notre résultat de CD47 chimère possède une résistance à la déplétion par Vpu, ce qui souligne l'importance des domaines transmembranaires et intracellulaire de CD47 dans l'interaction avec Vpu. Il serait intéressant de cartographier les déterminants spécifiques dans CD47 qui le rendent susceptible à Vpu. Sachant que la plupart des études à l'heure actuelle se sont focalisées sur l'isoforme 2 de CD47, y compris la construction utilisée dans notre système de surexpression, nous pourrions également générer d'autres isoformes de CD47 avec des outils de clonage moléculaire et comparer leur susceptibilité à Vpu. À cet effet, pour valider l'importance de la régulation négative de CD47 par Vpu dans les processus de phagocytose et d'apoptose, en tenant compte de la distribution tissulaire des différentes formes de CD47.

4. Mise en évidence d'un modèle *in vivo*.

Nos résultats ont suggéré que Vpu pourrait favoriser la transmission intercellulaire et l'établissement du réservoir viral. Un modèle *in vivo* serait envisageable, on pourrait infecter les souris BLT normales ou CD47 knockout [401-404] avec des virus exprimant Vpu ou non, puis transfert les cellules CD4⁺ qui soient infectées de ces souris aux souris humanisées MoM qui ne disposent pas de cellules T CD4⁺ en soi. S'il y ait infection de macrophages détectée dans les souris MoM au final, cela pourrait suggérer une infection via la phagocytose de cellules T infectées transférées.

3. Contributions majeures de la thèse

- 1. Validation de CD47, comme une nouvelle cible cellulaire de Vpu.**
- 2. La régulation négative de CD47 par Vpu est le premier signal identifié dans la régulation de la phagocytose des lymphocytes T CD4⁺ infectés par les macrophages.**
- 3. Mécanismes de transfert intercellulaire permettant au virus T/F d'infecter les macrophages.**
- 4. Premières données sur le mécanisme sous-jacent à la régulation négative de CD47 par Vpu.**
- 5. Première observation que Vpu pourrait réguler l'apoptose caspase-indépendante induite par l'engagement de CD47.**

RÉFÉRENCES

1. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
2. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics - 2020 fact sheet*.
<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
3. Xu, Z., C. Zhang, and F.S. Wang, *COVID-19 in people with HIV*. Lancet HIV, 2020. **7**(8): p. e524-e526.
4. *WHO access to HIV medicines severely impacted by COVID-19 as AIDS response stalls*.
5. Taylor, B.S., M.E. Sobieszczyk, F.E. McCutchan, and S.M. Hammer, *The challenge of HIV-1 subtype diversity*. N Engl J Med, 2008. **358**(15): p. 1590-602.
6. Plantier, J.C., M. Leoz, J.E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemeé, F. Damond, D.L. Robertson, and F. Simon, *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
7. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
8. D'Arc, M., A. Ayouba, A. Esteban, G.H. Learn, V. Boue, F. Liegeois, L. Etienne, N. Tagg, F.H. Leendertz, C. Boesch, N.F. Madinda, M.M. Robbins, M. Gray, A. Cournil, M. Ooms, M. Letko, V.A. Simon, P.M. Sharp, B.H. Hahn, E. Delaporte, E. Mpoudi Ngole, and M. Peeters, *Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. E1343-52.
9. Rodgers, M.A., A.S. Vallari, B. Harris, J. Yamaguchi, V. Holzmayer, K. Forberg, M.G. Berg, J. Kenmenge, C. Ngansop, B. Awazi, D. Mbanya, L. Kaptue, C. Brennan, G. Cloherty, and N. Ndembi, *Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon*. Virology, 2017. **504**: p. 141-151.
10. Yamaguchi, J., A. Vallari, C. McArthur, L. Sthreshley, G.A. Cloherty, M.G. Berg, and M.A. Rodgers, *Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes*

- HIV-1 Subtype L*. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2020. **83**(3): p. 319-322.
11. Hemelaar, J., R. Elangovan, J. Yun, L. Dickson-Tetteh, I. Fleminger, S. Kirtley, B. Williams, E. Gouws-Williams, P.D. Ghys, and W.-U.N.f.H.I. Characterisation, *Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis*. *Lancet Infect Dis*, 2019. **19**(2): p. 143-155.
 12. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(3): p. 182-92.
 13. Briggs, J.A., T. Wilk, R. Welker, H.G. Krausslich, and S.D. Fuller, *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. *EMBO J*, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
 14. Mattei, S., F.K. Schur, and J.A. Briggs, *Retrovirus maturation-an extraordinary structural transformation*. *Curr Opin Virol*, 2016. **18**: p. 27-35.
 15. Watts, J.M., K.K. Dang, R.J. Gorelick, C.W. Leonard, J.W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C.L. Burch, and K.M. Weeks, *Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome*. *Nature*, 2009. **460**(7256): p. 711-6.
 16. Harrison, S.C., *Viral membrane fusion*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(7): p. 690-8.
 17. Gurtler, L., M. Aepfelbacher, U. Bauerfeind, J. Blumel, R. Burger, B. Gartner, A. Groner, M. Heiden, M. Hildebrandt, B. Jansen, R. Offergeld, G. Pauli, U. Schlenkrich, V. Schottstedt, R. Seitz, J. Strobel, H. Willkommen, and G.A.C. Blood, *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2016. **43**(3): p. 203-222.
 18. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. *Curr Opin Struct Biol*, 2008. **18**(2): p. 203-17.
 19. Laskey, S.B. and R.F. Siliciano, *A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy*. *Nat Rev Microbiol*, 2014. **12**(11): p. 772-80.
 20. Lubow, J. and K.L. Collins, *Vpr Is a VIP: HIV Vpr and Infected Macrophages Promote Viral Pathogenesis*. *Viruses*, 2020. **12**(8).
 21. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 657-700.

22. Connor, R.I., K.E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N.R. Landau, *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 621-8.
23. de Roda Husman, A.M. and H. Schuitemaker, *Chemokine receptors and the clinical course of HIV-1 infection*. Trends Microbiol, 1998. **6**(6): p. 244-9.
24. Verhofstede, C., M. Nijhuis, and L. Vandekerckhove, *Correlation of coreceptor usage and disease progression*. Curr Opin HIV AIDS, 2012. **7**(5): p. 432-9.
25. Mild, M., A. Kvist, J. Esbjornsson, I. Karlsson, E.M. Fenyo, and P. Medstrand, *Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(3): p. 356-64.
26. Wyatt, R. and J. Sodroski, *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1884-8.
27. Melikyan, G.B., R.M. Markosyan, H. Hemmati, M.K. Delmedico, D.M. Lambert, and F.S. Cohen, *Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 413-23.
28. Ni, T., S. Gerard, G. Zhao, K. Dent, J. Ning, J. Zhou, J. Shi, J. Anderson-Daniels, W. Li, S. Jang, A.N. Engelman, C. Aiken, and P. Zhang, *Intrinsic curvature of the HIV-1 CA hexamer underlies capsid topology and interaction with cyclophilin A*. Nat Struct Mol Biol, 2020. **27**(9): p. 855-862.
29. Campbell, E.M. and T.J. Hope, *HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 471-83.
30. Francis, A.C. and G.B. Melikyan, *Single HIV-1 Imaging Reveals Progression of Infection through CA-Dependent Steps of Docking at the Nuclear Pore, Uncoating, and Nuclear Transport*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(4): p. 536-548 e6.
31. Rawle, D.J. and D. Harrich, *Toward the "unravelling" of HIV: Host cell factors involved in HIV-1 core uncoating*. PLoS Pathog, 2018. **14**(10): p. e1007270.
32. Burdick, R.C., C. Li, M. Munshi, J.M.O. Rawson, K. Nagashima, W.S. Hu, and V.K. Pathak, *HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(10): p. 5486-5493.

33. Selyutina, A., M. Persaud, K. Lee, V. KewalRamani, and F. Diaz-Griffero, *Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating*. Cell Rep, 2020. **32**(13): p. 108201.
34. Dharan, A., N. Bachmann, S. Talley, V. Zwickelmaier, and E.M. Campbell, *Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus*. Nat Microbiol, 2020. **5**(9): p. 1088-1095.
35. Gilboa, E., S.W. Mitra, S. Goff, and D. Baltimore, *A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects*. Cell, 1979. **18**(1): p. 93-100.
36. Sarafianos, S.G., B. Marchand, K. Das, D.M. Himmel, M.A. Parniak, S.H. Hughes, and E. Arnold, *Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition*. J Mol Biol, 2009. **385**(3): p. 693-713.
37. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
38. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.
39. Huang, Y., J. Mak, Q. Cao, Z. Li, M.A. Wainberg, and L. Kleiman, *Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 7676-83.
40. Roberts, J.D., K. Bebenek, and T.A. Kunkel, *The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1*. Science, 1988. **242**(4882): p. 1171-3.
41. Engelman, A., F.D. Bushman, and R. Craigie, *Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex*. EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3269-75.
42. van Gent, D.C., C. Vink, A.A. Groeneger, and R.H. Plasterk, *Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains*. EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3261-7.
43. Dyda, F., A.B. Hickman, T.M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, and D.R. Davies, *Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases*. Science, 1994. **266**(5193): p. 1981-6.
44. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006890.

45. Karn, J. and C.M. Stoltzfus, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a006916.
46. Rice, A.P., *The HIV-1 Tat Protein: Mechanism of Action and Target for HIV-1 Cure Strategies*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(28): p. 4098-4102.
47. Feng, S. and E.C. Holland, *HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 165-7.
48. Malim, M.H., J. Hauber, S.Y. Le, J.V. Maizel, and B.R. Cullen, *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-7.
49. Kim, S.Y., R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore, *Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3708-13.
50. Pomerantz, R.J., D. Trono, M.B. Feinberg, and D. Baltimore, *Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1271-6.
51. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 484-96.
52. Mucksch, F., V. Laketa, B. Muller, C. Schultz, and H.G. Krausslich, *Synchronized HIV assembly by tunable PIP2 changes reveals PIP2 requirement for stable Gag anchoring*. Elife, 2017. **6**.
53. Jacks, T., M.D. Power, F.R. Masiarz, P.A. Luciw, P.J. Barr, and H.E. Varmus, *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression*. Nature, 1988. **331**(6153): p. 280-3.
54. Houck-Loomis, B., M.A. Durney, C. Salguero, N. Shankar, J.M. Nagle, S.P. Goff, and V.M. D'Souza, *An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 561-4.
55. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
56. Koma, T., O. Kotani, K. Miyakawa, A. Ryo, M. Yokoyama, N. Doi, A. Adachi, H. Sato, and M. Nomaguchi, *Allosteric Regulation of HIV-1 Capsid Structure for Gag*

- Assembly, Virion Production, and Viral Infectivity by a Disordered Interdomain Linker.* J Virol, 2019. **93**(17).
57. Wyma, D.J., A. Kotov, and C. Aiken, *Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles.* J Virol, 2000. **74**(20): p. 9381-7.
58. Pornillos, O., S.L. Alam, D.R. Davis, and W.I. Sundquist, *Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein.* Nat Struct Biol, 2002. **9**(11): p. 812-7.
59. Fisher, R.D., H.Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill, *Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding.* Cell, 2007. **128**(5): p. 841-52.
60. Usami, Y., S. Popov, and H.G. Gottlinger, *Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site.* J Virol, 2007. **81**(12): p. 6614-22.
61. Sattentau, Q., *Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses.* Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(11): p. 815-26.
62. Sourisseau, M., N. Sol-Foulon, F. Porrot, F. Blanchet, and O. Schwartz, *Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes.* J Virol, 2007. **81**(2): p. 1000-12.
63. Martin, N., S. Welsch, C. Jolly, J.A. Briggs, D. Vaux, and Q.J. Sattentau, *Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition.* J Virol, 2010. **84**(7): p. 3516-27.
64. Sherer, N.M., M.J. Lehmann, L.F. Jimenez-Soto, C. Horensavitz, M. Pypaert, and W. Mothes, *Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 310-5.
65. Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M.A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F.M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D.M. Davis, *Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 211-9.
66. Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q.J. Sattentau, *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse.* J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 283-93.

67. Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau, *Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13916-21.
68. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7873-84.
69. Alvarez, R.A., M.I. Barria, and B.K. Chen, *Unique features of HIV-1 spread through T cell virological synapses*. PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004513.
70. Okoye, A.A. and L.J. Picker, *CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 54-64.
71. Haase, A.T., *Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 783-92.
72. Kariuki, S.M., P. Selhorst, K.K. Arien, and J.R. Dorfman, *The HIV-1 transmission bottleneck*. Retrovirology, 2017. **14**(1): p. 22.
73. Joseph, S.B., R. Swanstrom, A.D. Kashuba, and M.S. Cohen, *Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(7): p. 414-25.
74. Mehandru, S., M.A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz, *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
75. Brenchley, J.M., D.A. Price, T.W. Schacker, T.E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B.R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J.N. Martin, F.M. Hecht, L.J. Picker, M.M. Lederman, S.G. Deeks, and D.C. Douek, *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
76. Epple, H.J. and M. Zeitz, *HIV infection and the intestinal mucosal barrier*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1258**: p. 19-24.
77. Davis, K.L., E.S. Gray, P.L. Moore, J.M. Decker, A. Salomon, D.C. Montefiori, B.S. Graham, M.C. Keefer, A. Pinter, L. Morris, B.H. Hahn, and G.M. Shaw, *High titer*

- HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination.* *Virology*, 2009. **387**(2): p. 414-26.
78. Levy, J.A., *Mysteries of HIV: challenges for therapy and prevention.* *Nature*, 1988. **333**(6173): p. 519-22.
79. Poropatch, K. and D.J. Sullivan, Jr., *Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression.* *J Gen Virol*, 2011. **92**(Pt 2): p. 247-68.
80. Ford, E.S., C.E. Puro, and I. Sereti, *Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm.* *Curr Opin HIV AIDS*, 2009. **4**(3): p. 206-14.
81. Phillips, A.N., S. Staszewski, R. Weber, O. Kirk, P. Francioli, V. Miller, P. Vernazza, J.D. Lundgren, B. Ledergerber, H.I.V.C.S. Swiss, H.I.V.C.C. Frankfurt, and S.S.G. Euro, *HIV viral load response to antiretroviral therapy according to the baseline CD4 cell count and viral load.* *JAMA*, 2001. **286**(20): p. 2560-7.
82. Ford, N., G. Meintjes, M. Vitoria, G. Greene, and T. Chiller, *The evolving role of CD4 cell counts in HIV care.* *Curr Opin HIV AIDS*, 2017. **12**(2): p. 123-128.
83. Schuitemaker, H., M. Koot, N.A. Kootstra, M.W. Dercksen, R.E. de Goede, R.P. van Steenwijk, J.M. Lange, J.K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette, *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytophilic to T-cell-tropic virus population.* *J Virol*, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
84. Regoes, R.R. and S. Bonhoeffer, *The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective.* *Trends Microbiol*, 2005. **13**(6): p. 269-77.
85. Kamp, C., *Understanding the HIV coreceptor switch from a dynamical perspective.* *BMC Evol Biol*, 2009. **9**: p. 274.
86. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy.* *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(4): p. a007161.
87. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications.* *Drugs*, 2012. **72**(9): p. e1-25.
88. Palella, F.J., Jr., K.M. Delaney, A.C. Moorman, M.O. Loveless, J. Fuhrer, G.A. Satten, D.J. Aschman, and S.D. Holmberg, *Declining morbidity and mortality among patients*

- with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.* N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 853-60.
89. Margolis, A.M., H. Heverling, P.A. Pham, and A. Stolbach, *A review of the toxicity of HIV medications.* J Med Toxicol, 2014. **10**(1): p. 26-39.
90. Barraud, P., J.C. Paillart, R. Marquet, and C. Tisne, *Advances in the structural understanding of Vif proteins.* Curr HIV Res, 2008. **6**(2): p. 91-9.
91. Kao, S., H. Akari, M.A. Khan, M. Dettenhofer, X.F. Yu, and K. Strebel, *Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection.* J Virol, 2003. **77**(2): p. 1131-40.
92. Gabuzda, D.H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W.A. Haseltine, and J. Sodroski, *Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes.* J Virol, 1992. **66**(11): p. 6489-95.
93. Sakai, H., R. Shibata, J. Sakuragi, S. Sakuragi, M. Kawamura, and A. Adachi, *Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles.* J Virol, 1993. **67**(3): p. 1663-6.
94. von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono, *Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells.* J Virol, 1993. **67**(8): p. 4945-55.
95. Simon, J.H., N.C. Gaddis, R.A. Fouchier, and M.H. Malim, *Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype.* Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1397-400.
96. Madani, N. and D. Kabat, *An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein.* J Virol, 1998. **72**(12): p. 10251-5.
97. Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, J.D. Choi, and M.H. Malim, *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.* Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-50.
98. Harris, R.S., K.N. Bishop, A.M. Sheehy, H.M. Craig, S.K. Petersen-Mahrt, I.N. Watt, M.S. Neuberger, and M.H. Malim, *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection.* Cell, 2003. **113**(6): p. 803-9.

99. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono, *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. *Nature*, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
100. Zhang, H., B. Yang, R.J. Pomerantz, C. Zhang, S.C. Arunachalam, and L. Gao, *The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA*. *Nature*, 2003. **424**(6944): p. 94-8.
101. Simon, V., V. Zennou, D. Murray, Y. Huang, D.D. Ho, and P.D. Bieniasz, *Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification*. *PLoS Pathog*, 2005. **1**(1): p. e6.
102. Iwatani, Y., D.S. Chan, F. Wang, K. Stewart-Maynard, W. Sugiura, A.M. Gronenborn, I. Rouzina, M.C. Williams, K. Musier-Forsyth, and J.G. Levin, *Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(21): p. 7096-108.
103. Bishop, K.N., M. Verma, E.Y. Kim, S.M. Wolinsky, and M.H. Malim, *APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(12): p. e1000231.
104. Stanley, B.J., E.S. Ehrlich, L. Short, Y. Yu, Z. Xiao, X.F. Yu, and Y. Xiong, *Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly*. *J Virol*, 2008. **82**(17): p. 8656-63.
105. Bergeron, J.R., H. Huthoff, D.A. Veselkov, R.L. Beavil, P.J. Simpson, S.J. Matthews, M.H. Malim, and M.R. Sanderson, *The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(6): p. e1000925.
106. Sugden, S.M., M.G. Bego, T.N. Pham, and E.A. Cohen, *Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence*. *Viruses*, 2016. **8**(3): p. 67.
107. Welker, R., H. Kottler, H.R. Kalbitzer, and H.G. Krausslich, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase*. *Virology*, 1996. **219**(1): p. 228-36.

108. Kirchhoff, F., T.C. Greenough, D.B. Brettler, J.L. Sullivan, and R.C. Desrosiers, *Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 228-32.
109. Kestler, H.W., 3rd, D.J. Ringler, K. Mori, D.L. Panicali, P.K. Sehgal, M.D. Daniel, and R.C. Desrosiers, *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS*. Cell, 1991. **65**(4): p. 651-62.
110. Ray, N. and R.W. Doms, *HIV-1 coreceptors and their inhibitors*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **303**: p. 97-120.
111. Wildum, S., M. Schindler, J. Munch, and F. Kirchhoff, *Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 8047-59.
112. Veillette, M., M. Coutu, J. Richard, L.A. Batrville, O. Dagher, N. Bernard, C. Tremblay, D.E. Kaufmann, M. Roger, and A. Finzi, *The HIV-1 gp120 CD4-bound conformation is preferentially targeted by antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies in sera from HIV-1-infected individuals*. J Virol, 2015. **89**(1): p. 545-51.
113. Alshafi, N., S. Ding, J. Richard, T. Markle, N. Brassard, B. Walker, G.K. Lewis, D.E. Kaufmann, M.A. Brockman, and A. Finzi, *Nef Proteins from HIV-1 Elite Controllers Are Inefficient at Preventing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*. J Virol, 2015. **90**(6): p. 2993-3002.
114. Chaudhuri, R., O.W. Lindwasser, W.J. Smith, J.H. Hurley, and J.S. Bonifacino, *Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3877-90.
115. Schaefer, M.R., E.R. Wonderlich, J.F. Roeth, J.A. Leonard, and K.L. Collins, *HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells*. PLoS Pathog, 2008. **4**(8): p. e1000131.
116. Collins, K.L., B.K. Chen, S.A. Kalams, B.D. Walker, and D. Baltimore, *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.

117. Le Gall, S., L. Erdtmann, S. Benichou, C. Berlioz-Torrent, L. Liu, R. Benarous, J.M. Heard, and O. Schwartz, *Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules*. *Immunity*, 1998. **8**(4): p. 483-95.
118. Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, and P. Benaroch, *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(21): p. 12144-9.
119. Schindler, M., S. Wurfl, P. Benaroch, T.C. Greenough, R. Daniels, P. Easterbrook, M. Brenner, J. Munch, and F. Kirchhoff, *Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles*. *J Virol*, 2003. **77**(19): p. 10548-56.
120. Ghiglione, Y., A.M. Rodriguez, C. De Candia, M. Carobene, P. Benaroch, M. Schindler, H. Salomon, and G. Turk, *HIV-mediated up-regulation of invariant chain (CD74) correlates with generalized immune activation in HIV+ subjects*. *Virus Res*, 2012. **163**(1): p. 380-4.
121. Rosa, A., A. Chande, S. Ziglio, V. De Sanctis, R. Bertorelli, S.L. Goh, S.M. McCauley, A. Nowosielska, S.E. Antonarakis, J. Luban, F.A. Santoni, and M. Pizzato, *HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation*. *Nature*, 2015. **526**(7572): p. 212-7.
122. Usami, Y., Y. Wu, and H.G. Gottlinger, *SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef*. *Nature*, 2015. **526**(7572): p. 218-23.
123. Pandey, R.C., D. Datta, R. Mukerjee, A. Srinivasan, S. Mahalingam, and B.E. Sawaya, *HIV-1 Vpr: a closer look at the multifunctional protein from the structural perspective*. *Curr HIV Res*, 2009. **7**(2): p. 114-28.
124. Tristem, M., A. Purvis, and D.L. Quicke, *Complex evolutionary history of primate lentiviral vpr genes*. *Virology*, 1998. **240**(2): p. 232-7.
125. Cohen, E.A., G. Dehni, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine, *Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein*. *J Virol*, 1990. **64**(6): p. 3097-9.

126. Paxton, W., R.I. Connor, and N.R. Landau, *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis*. J Virol, 1993. **67**(12): p. 7229-37.
127. Bachand, F., X.J. Yao, M. Hrimech, N. Rougeau, and E.A. Cohen, *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 9083-91.
128. Mashiba, M., D.R. Collins, V.H. Terry, and K.L. Collins, *Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(6): p. 722-35.
129. Wang, Q. and L. Su, *Vpr Enhances HIV-1 Env Processing and Virion Infectivity in Macrophages by Modulating TET2-Dependent IFITM3 Expression*. mBio, 2019. **10**(4).
130. Laguette, N., C. Bregnard, P. Hue, J. Basbous, A. Yatim, M. Larroque, F. Kirchhoff, A. Constantinou, B. Sobhian, and M. Benkirane, *Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 134-45.
131. Jowett, J.B., V. Planelles, B. Poon, N.P. Shah, M.L. Chen, and I.S. Chen, *The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6304-13.
132. Goh, W.C., M.E. Rogel, C.M. Kinsey, S.F. Michael, P.N. Fultz, M.A. Nowak, B.H. Hahn, and M. Emerman, *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 65-71.
133. Stewart, S.A., B. Poon, J.B. Jowett, and I.S. Chen, *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5579-92.
134. Belzile, J.P., G. Duisit, N. Rougeau, J. Mercier, A. Finzi, and E.A. Cohen, *HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e85.
135. Greenwood, E.J.D., J.C. Williamson, A. Sienkiewicz, A. Naamati, N.J. Matheson, and P.J. Lehner, *Promiscuous Targeting of Cellular Proteins by Vpr Drives Systems-Level Proteomic Remodeling in HIV-1 Infection*. Cell Rep, 2019. **27**(5): p. 1579-1596 e7.

136. Henderson, L.E., R.C. Sowder, T.D. Copeland, R.E. Benveniste, and S. Oroszlan, *Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2*. Science, 1988. **241**(4862): p. 199-201.
137. Yu, X.F., S. Ito, M. Essex, and T.H. Lee, *A naturally immunogenic virion-associated protein specific for HIV-2 and SIV*. Nature, 1988. **335**(6187): p. 262-5.
138. Beer, B.E., B.T. Foley, C.L. Kuiken, Z. Tooze, R.M. Goeken, C.R. Brown, J. Hu, M. St Claire, B.T. Korber, and V.M. Hirsch, *Characterization of novel simian immunodeficiency viruses from red-capped mangabeys from Nigeria (SIVrcmNG409 and -NG411)*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12014-27.
139. Sharp, P.M., E. Bailes, M. Stevenson, M. Emerman, and B.H. Hahn, *Gene acquisition in HIV and SIV*. Nature, 1996. **383**(6601): p. 586-7.
140. Yu, X.F., Q.C. Yu, M. Essex, and T.H. Lee, *The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 5088-91.
141. Mangeot, P.E., K. Duperrier, D. Negre, B. Boson, D. Rigal, F.L. Cosset, and J.L. Darlix, *High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors*. Mol Ther, 2002. **5**(3): p. 283-90.
142. Goujon, C., L. Riviere, L. Jarrosson-Wuilleme, J. Bernaud, D. Rigal, J.L. Darlix, and A. Cimarelli, *SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells*. Retrovirology, 2007. **4**: p. 2.
143. Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane, *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 654-7.
144. Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E.C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, G. Pancino, S. Priet, B. Canard, N. Laguette, M. Benkirane, C. Transy, N.R. Landau, B. Kim, and F. Margottin-Goguet, *SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates*. Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 223-228.

145. Cohen, E.A., E.F. Terwilliger, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine, *Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1*. *Nature*, 1988. **334**(6182): p. 532-4.
146. Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson, *Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1*. *Nature*, 1990. **345**(6273): p. 356-9.
147. Gao, F., E. Bailes, D.L. Robertson, Y. Chen, C.M. Rodenburg, S.F. Michael, L.B. Cummins, L.O. Arthur, M. Peeters, G.M. Shaw, P.M. Sharp, and B.H. Hahn, *Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes**. *Nature*, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
148. Santiago, M.L., F. Bibollet-Ruche, E. Bailes, S. Kamenya, M.N. Muller, M. Lukasik, A.E. Pusey, D.A. Collins, R.W. Wrangham, J. Goodall, G.M. Shaw, P.M. Sharp, and B.H. Hahn, *Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee*. *J Virol*, 2003. **77**(3): p. 2233-42.
149. Dazza, M.C., M. Ekwilanga, M. Nende, K.B. Shamamba, P. Bitshi, D. Paraskevis, and S. Saragosti, *Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*)*. *J Virol*, 2005. **79**(13): p. 8560-71.
150. Takehisa, J., M.H. Kraus, A. Ayoub, E. Bailes, F. Van Heuverswyn, J.M. Decker, Y. Li, R.S. Rudicell, G.H. Learn, C. Neel, E.M. Ngole, G.M. Shaw, M. Peeters, P.M. Sharp, and B.H. Hahn, *Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas*. *J Virol*, 2009. **83**(4): p. 1635-48.
151. Dube, M., M.G. Bego, C. Paquay, and E.A. Cohen, *Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein*. *Retrovirology*, 2010. **7**: p. 114.
152. Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, and M.A. Martin, *Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein*. *J Virol*, 1989. **63**(9): p. 3784-91.
153. Maldarelli, F., M.Y. Chen, R.L. Willey, and K. Strebel, *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein*. *J Virol*, 1993. **67**(8): p. 5056-61.

154. Kueck, T., T.L. Foster, J. Weinelt, J.C. Sumner, S. Pickering, and S.J. Neil, *Serine Phosphorylation of HIV-1 Vpu and Its Binding to Tetherin Regulates Interaction with Clathrin Adaptors*. PLoS Pathog, 2015. **11**(8): p. e1005141.
155. Willey, R.L., F. Maldarelli, M.A. Martin, and K. Strebel, *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7193-200.
156. Schubert, U., L.C. Anton, I. Bacik, J.H. Cox, S. Bour, J.R. Bennink, M. Orłowski, K. Strebel, and J.W. Yewdell, *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2280-8.
157. Binette, J., M. Dube, J. Mercier, D. Halawani, M. Latterich, and E.A. Cohen, *Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum*. Retrovirology, 2007. **4**: p. 75.
158. Magadan, J.G., F.J. Perez-Victoria, R. Sougrat, Y. Ye, K. Strebel, and J.S. Bonifacino, *Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000869.
159. Yao, X.J., J. Friberg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R.P. Sekaly, and E.A. Cohen, *Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity*. Virology, 1995. **209**(2): p. 615-23.
160. Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1510-20.
161. Margottin, F., S.P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous, *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 565-74.
162. Neil, S.J., *The antiviral activities of tetherin*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **371**: p. 67-104.

163. Arias, J.F., Y. Iwabu, and K. Tokunaga, *Structural Basis for the Antiviral Activity of BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonism*. *Front Microbiol*, 2011. **2**: p. 250.
164. Venkatesh, S. and P.D. Bieniasz, *Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(7): p. e1003483.
165. Dube, M., B.B. Roy, P. Guiot-Guillain, J. Binette, J. Mercier, A. Chiasson, and E.A. Cohen, *Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(4): p. e1000856.
166. McNatt, M.W., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003299.
167. Vigan, R. and S.J. Neil, *Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein*. *J Virol*, 2010. **84**(24): p. 12958-70.
168. Skasko, M., Y. Wang, Y. Tian, A. Tokarev, J. Munguia, A. Ruiz, E.B. Stephens, S.J. Opella, and J. Guatelli, *HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(1): p. 58-67.
169. Janvier, K., A. Pelchen-Matthews, J.B. Renaud, M. Caillet, M. Marsh, and C. Berlioz-Torrent, *The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(2): p. e1001265.
170. Douglas, J.L., K. Viswanathan, M.N. McCarroll, J.K. Gustin, K. Fruh, and A.V. Moses, *Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a β -TrCP-dependent mechanism*. *J Virol*, 2009. **83**(16): p. 7931-47.
171. Mitchell, R.S., C. Katsura, M.A. Skasko, K. Fitzpatrick, D. Lau, A. Ruiz, E.B. Stephens, F. Margottin-Goguet, R. Benarous, and J.C. Guatelli, *Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via β -TrCP and endo-lysosomal trafficking*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000450.
172. Tokarev, A.A., J. Munguia, and J.C. Guatelli, *Serine-threonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2/tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu*. *J Virol*, 2011. **85**(1): p. 51-63.

173. Gustin, J.K., J.L. Douglas, Y. Bai, and A.V. Moses, *Ubiquitination of BST-2 protein by HIV-1 Vpu protein does not require lysine, serine, or threonine residues within the BST-2 cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 2012. **287**(18): p. 14837-50.
174. Schmidt, S., J.V. Fritz, J. Bitzegeio, O.T. Fackler, and O.T. Keppler, *HIV-1 Vpu blocks recycling and biosynthetic transport of the intrinsic immunity factor CD317/tetherin to overcome the virion release restriction*. mBio, 2011. **2**(3): p. e00036-11.
175. Dube, M., C. Paquay, B.B. Roy, M.G. Bego, J. Mercier, and E.A. Cohen, *HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1714-29.
176. Kueck, T. and S.J. Neil, *A cytoplasmic tail determinant in HIV-1 Vpu mediates targeting of tetherin for endosomal degradation and counteracts interferon-induced restriction*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002609.
177. Jia, X., E. Weber, A. Tokarev, M. Lewinski, M. Rizk, M. Suarez, J. Guatelli, and Y. Xiong, *Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1*. Elife, 2014. **3**: p. e02362.
178. Pham, T.N., S. Lukhele, F. Hajjar, J.P. Routy, and E.A. Cohen, *HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2*. Retrovirology, 2014. **11**: p. 15.
179. Arias, J.F., L.N. Heyer, B. von Bredow, K.L. Weisgrau, B. Moldt, D.R. Burton, E.G. Rakasz, and D.T. Evans, *Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6425-30.
180. Alvarez, R.A., R.E. Hamlin, A. Monroe, B. Moldt, M.T. Hotta, G. Rodriguez Caprio, D.S. Fierer, V. Simon, and B.K. Chen, *HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells*. J Virol, 2014. **88**(11): p. 6031-46.
181. Galao, R.P., A. Le Tortorec, S. Pickering, T. Kueck, and S.J. Neil, *Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(5): p. 633-44.

182. Bego, M.G., E. Cote, N. Aschman, J. Mercier, W. Weissenhorn, and E.A. Cohen, *Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells*. PLoS Pathog, 2015. **11**(7): p. e1005024.
183. Shah, A.H., B. Sowrirajan, Z.B. Davis, J.P. Ward, E.M. Campbell, V. Planelles, and E. Barker, *Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(5): p. 397-409.
184. Matusali, G., M. Potesta, A. Santoni, C. Cerboni, and M. Doria, *The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR*. J Virol, 2012. **86**(8): p. 4496-504.
185. Ramirez, P.W., M. Famiglietti, B. Sowrirajan, A.B. DePaula-Silva, C. Rodesch, E. Barker, A. Bosque, and V. Planelles, *Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu results in impaired migration and chemotactic signaling within CD4(+) T cells*. Cell Rep, 2014. **7**(6): p. 2019-30.
186. Moll, M., S.K. Andersson, A. Smed-Sorensen, and J.K. Sandberg, *Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1876-84.
187. Bachle, S.M., D. Sauter, S. Sibitz, J.K. Sandberg, F. Kirchhoff, and M. Moll, *Involvement of a C-terminal motif in the interference of primate lentiviral Vpu proteins with CD1d-mediated antigen presentation*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9675.
188. Apps, R., G.Q. Del Prete, P. Chatterjee, A. Lara, Z.L. Brumme, M.A. Brockman, S. Neil, S. Pickering, D.K. Schneider, A. Piechocka-Trocha, B.D. Walker, R. Thomas, G.M. Shaw, B.H. Hahn, B.F. Keele, J.D. Lifson, and M. Carrington, *HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(5): p. 686-95.
189. Matheson, N.J., J. Sumner, K. Wals, R. Rapiteanu, M.P. Weekes, R. Vigan, J. Weinelt, M. Schindler, R. Antrobus, A.S. Costa, C. Frezza, C.B. Clish, S.J. Neil, and P.J. Lehner, *Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(4): p. 409-23.
190. Sugden, S.M., T.N. Pham, and E.A. Cohen, *HIV-1 Vpu Downmodulates ICAM-1 Expression, Resulting in Decreased Killing of Infected CD4+ T Cells by NK Cells*. J Virol, 2017. **91**(8).

191. Jain, P., G. Boso, S. Langer, S. Soonthornvacharin, P.D. De Jesus, Q. Nguyen, K.C. Olivieri, A.J. Portillo, S.M. Yoh, L. Pache, and S.K. Chanda, *Large-Scale Arrayed Analysis of Protein Degradation Reveals Cellular Targets for HIV-1 Vpu*. Cell Rep, 2018. **22**(9): p. 2493-2503.
192. Haller, C., B. Muller, J.V. Fritz, M. Lamas-Murua, B. Stolp, F.M. Pujol, O.T. Keppler, and O.T. Fackler, *HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins*. J Virol, 2014. **88**(24): p. 14241-57.
193. Lambele, M., H. Koppensteiner, M. Symeonides, N.H. Roy, J. Chan, M. Schindler, and M. Thali, *Vpu is the main determinant for tetraspanin downregulation in HIV-1-infected cells*. J Virol, 2015. **89**(6): p. 3247-55.
194. Bolduan, S., P. Hubel, T. Reif, V. Lodermeier, K. Hohne, J.V. Fritz, D. Sauter, F. Kirchhoff, O.T. Fackler, M. Schindler, and U. Schubert, *HIV-1 Vpu affects the anterograde transport and the glycosylation pattern of NTB-A*. Virology, 2013. **440**(2): p. 190-203.
195. Bolduan, S., T. Reif, M. Schindler, and U. Schubert, *HIV-1 Vpu mediated downregulation of CD155 requires alanine residues 10, 14 and 18 of the transmembrane domain*. Virology, 2014. **464-465**: p. 375-384.
196. Vassena, L., E. Giuliani, H. Koppensteiner, S. Bolduan, M. Schindler, and M. Doria, *HIV-1 Nef and Vpu Interfere with L-Selectin (CD62L) Cell Surface Expression To Inhibit Adhesion and Signaling in Infected CD4+ T Lymphocytes*. J Virol, 2015. **89**(10): p. 5687-700.
197. Hopfensperger, K., J. Richard, C.M. Sturzel, F. Bibollet-Ruche, R. Apps, M. Leoz, J.C. Plantier, B.H. Hahn, A. Finzi, F. Kirchhoff, and D. Sauter, *Convergent Evolution of HLA-C Downmodulation in HIV-1 and HIV-2*. mBio, 2020. **11**(4).
198. Liu, Y., Y. Fu, Q. Wang, M. Li, Z. Zhou, D. Dabbagh, C. Fu, H. Zhang, S. Li, T. Zhang, J. Gong, X. Kong, W. Zhai, J. Su, J. Sun, Y. Zhang, X.F. Yu, Z. Shao, F. Zhou, Y. Wu, and X. Tan, *Proteomic profiling of HIV-1 infection of human CD4(+) T cells identifies PSGL-1 as an HIV restriction factor*. Nat Microbiol, 2019. **4**(5): p. 813-825.
199. Prevost, J., C.R. Edgar, J. Richard, S.M. Trothen, R.A. Jacob, M.J. Mumby, S. Pickering, M. Dube, D.E. Kaufmann, F. Kirchhoff, S.J.D. Neil, A. Finzi, and J.D.

- Dikeakos, *HIV-1 Vpu Downregulates Tim-3 from the Surface of Infected CD4(+) T Cells*. J Virol, 2020. **94**(7).
200. Liu, X., H. Kwon, Z. Li, and Y.X. Fu, *Is CD47 an innate immune checkpoint for tumor evasion?* J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 12.
201. Brown, E., L. Hooper, T. Ho, and H. Gresham, *Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2785-94.
202. Reinhold, M.I., F.P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M.G. Peters, and E.J. Brown, *In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 11)**: p. 3419-25.
203. Mordue, K.E., B.R. Hawley, T.J. Satchwell, and A.M. Toye, *CD47 surface stability is sensitive to actin disruption prior to inclusion within the band 3 macrocomplex*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2246.
204. Lee, E.H., Y.P. Hsieh, C.L. Yang, K.J. Tsai, and C.H. Liu, *Induction of integrin-associated protein (IAP) mRNA expression during memory consolidation in rat hippocampus*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(3): p. 1105-12.
205. Leclair, P., C.C. Liu, M. Monajemi, G.S. Reid, L.M. Sly, and C.J. Lim, *CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 544.
206. Vernon-Wilson, E.F., W.J. Kee, A.C. Willis, A.N. Barclay, D.L. Simmons, and M.H. Brown, *CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2130-7.
207. Barclay, A.N. and M.H. Brown, *The SIRP family of receptors and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 457-64.
208. Myers, L.M., M.C. Tal, L.B. Torrez Dulgeroff, A.B. Carmody, R.J. Messer, G. Gulati, Y.Y. Yiu, M.M. Staron, C.L. Angel, R. Sinha, M. Markovic, E.A. Pham, B. Fram, A. Ahmed, A.M. Newman, J.S. Glenn, M.M. Davis, S.M. Kaech, I.L. Weissman, and K.J. Hasenkrug, *A functional subset of CD8(+) T cells during chronic exhaustion is defined by SIRPalpha expression*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 794.
209. Sano, S., H. Ohnishi, A. Omori, J. Hasegawa, and M. Kubota, *BIT, an immune antigen receptor-like molecule in the brain*. FEBS Lett, 1997. **411**(2-3): p. 327-34.

210. Jiang, P., C.F. Lagenaur, and V. Narayanan, *Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 559-62.
211. Babic, I., A. Schallhorn, F.P. Lindberg, and F.R. Jirik, *SHPS-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3652-8.
212. Brooke, G.P., K.R. Parsons, and C.J. Howard, *Cloning of two members of the SIRP alpha family of protein tyrosine phosphatase binding proteins in cattle that are expressed on monocytes and a subpopulation of dendritic cells and which mediate binding to CD4 T cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 1-11.
213. Kharitonov, A., Z. Chen, I. Sures, H. Wang, J. Schilling, and A. Ullrich, *A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors*. Nature, 1997. **386**(6621): p. 181-6.
214. Ichigotani, Y., S. Matsuda, K. Machida, K. Oshima, T. Iwamoto, K. Yamaki, T. Hayakawa, and M. Hamaguchi, *Molecular cloning of a novel human gene (SIRP-B2) which encodes a new member of the SIRP/SHPS-1 protein family*. J Hum Genet, 2000. **45**(6): p. 378-82.
215. Hatherley, D., S.C. Graham, J. Turner, K. Harlos, D.I. Stuart, and A.N. Barclay, *Paired receptor specificity explained by structures of signal regulatory proteins alone and complexed with CD47*. Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 266-77.
216. Piccio, L., W. Vermi, K.S. Boles, A. Fuchs, C.A. Strader, F. Facchetti, M. Cella, and M. Colonna, *Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2421-7.
217. Brooke, G., J.D. Holbrook, M.H. Brown, and A.N. Barclay, *Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2562-70.
218. Gao, A.G. and W.A. Frazier, *Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29650-7.
219. Lawler, J.W., H.S. Slayter, and J.E. Coligan, *Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets*. J Biol Chem, 1978. **253**(23): p. 8609-16.

220. Baenziger, N.L., G.N. Brodie, and P.W. Majerus, *A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(1): p. 240-3.
221. Gao, A.G., F.P. Lindberg, M.B. Finn, S.D. Blystone, E.J. Brown, and W.A. Frazier, *Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 21-4.
222. Martinez-Torres, A.C., C. Quiney, T. Attout, H. Bouillet, L. Herbi, L. Vela, S. Barbier, D. Chateau, E. Chapiro, F. Nguyen-Khac, F. Davi, M. Le Garff-Tavernier, R. Moumne, M. Sarfati, P. Karoyan, H. Merle-Beral, P. Launay, and S.A. Susin, *CD47 agonist peptides induce programmed cell death in refractory chronic lymphocytic leukemia B cells via PLCgamma1 activation: evidence from mice and humans*. PLoS Med, 2015. **12**(3): p. e1001796.
223. Tulasne, D., B.A. Judd, M. Johansen, N. Asazuma, D. Best, E.J. Brown, M. Kahn, G.A. Koretzky, and S.P. Watson, *C-terminal peptide of thrombospondin-1 induces platelet aggregation through the Fc receptor gamma-chain-associated signaling pathway and by agglutination*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3346-52.
224. Barazi, H.O., Z. Li, J.A. Cashel, H.C. Krutzsch, D.S. Annis, D.F. Mosher, and D.D. Roberts, *Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42859-66.
225. Leclair, P. and C.J. Lim, *CD47-independent effects mediated by the TSP-derived 4N1K peptide*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98358.
226. Leclair, P., M.J. Kim, and C.J. Lim, *Peptide analogues PKHB1 and 4N1K induce cell death through CD47-independent mechanisms*. Cancer Sci, 2020. **111**(3): p. 1028-1030.
227. Oldenborg, P.A., A. Zheleznyak, Y.F. Fang, C.F. Lagenaur, H.D. Gresham, and F.P. Lindberg, *Role of CD47 as a marker of self on red blood cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-4.
228. Okazawa, H., S. Motegi, N. Ohyama, H. Ohnishi, T. Tomizawa, Y. Kaneko, P.A. Oldenborg, O. Ishikawa, and T. Matozaki, *Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2004-11.

229. Oldenborg, P.A., H.D. Gresham, and F.P. Lindberg, *CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 855-62.
230. Fujioka, Y., T. Matozaki, T. Noguchi, A. Iwamatsu, T. Yamao, N. Takahashi, M. Tsuda, T. Takada, and M. Kasuga, *A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6887-99.
231. Tonks, N.K. and B.G. Neel, *From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases*. Cell, 1996. **87**(3): p. 365-8.
232. Tsai, R.K. and D.E. Discher, *Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells*. J Cell Biol, 2008. **180**(5): p. 989-1003.
233. Barger, S.R., N.C. Gauthier, and M. Krendel, *Squeezing in a Meal: Myosin Functions in Phagocytosis*. Trends Cell Biol, 2020. **30**(2): p. 157-167.
234. Jaiswal, S., C.H. Jamieson, W.W. Pang, C.Y. Park, M.P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen, and I.L. Weissman, *CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis*. Cell, 2009. **138**(2): p. 271-85.
235. Gresham, H.D., J.L. Goodwin, P.M. Allen, D.C. Anderson, and E.J. Brown, *A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis*. J Cell Biol, 1989. **108**(5): p. 1935-43.
236. Zhao, X.W., E.M. van Beek, K. Schornagel, H. Van der Maaden, M. Van Houdt, M.A. Otten, P. Finetti, M. Van Egmond, T. Matozaki, G. Kraal, D. Birnbaum, A. van Elsas, T.W. Kuijpers, F. Bertucci, and T.K. van den Berg, *CD47-signal regulatory protein-alpha (SIRPalpha) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. 18342-7.
237. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E.J. Brown, C. Maliszewski, F.P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati, *Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2547-54.

238. Majeti, R., M.P. Chao, A.A. Alizadeh, W.W. Pang, S. Jaiswal, K.D. Gibbs, Jr., N. van Rooijen, and I.L. Weissman, *CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 286-99.
239. Chao, M.P., A.A. Alizadeh, C. Tang, J.H. Myklebust, B. Varghese, S. Gill, M. Jan, A.C. Cha, C.K. Chan, B.T. Tan, C.Y. Park, F. Zhao, H.E. Kohrt, R. Malumbres, J. Briones, R.D. Gascoyne, I.S. Lossos, R. Levy, I.L. Weissman, and R. Majeti, *Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 699-713.
240. Willingham, S.B., J.P. Volkmer, A.J. Gentles, D. Sahoo, P. Dalerba, S.S. Mitra, J. Wang, H. Contreras-Trujillo, R. Martin, J.D. Cohen, P. Lovelace, F.A. Scheeren, M.P. Chao, K. Weiskopf, C. Tang, A.K. Volkmer, T.J. Naik, T.A. Storm, A.R. Mosley, B. Edris, S.M. Schmid, C.K. Sun, M.S. Chua, O. Murillo, P. Rajendran, A.C. Cha, R.K. Chin, D. Kim, M. Adorno, T. Raveh, D. Tseng, S. Jaiswal, P.O. Enger, G.K. Steinberg, G. Li, S.K. So, R. Majeti, G.R. Harsh, M. van de Rijn, N.N. Teng, J.B. Sunwoo, A.A. Alizadeh, M.F. Clarke, and I.L. Weissman, *The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(17): p. 6662-7.
241. Chao, M.P., C. Tang, R.K. Pachynski, R. Chin, R. Majeti, and I.L. Weissman, *Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy*. *Blood*, 2011. **118**(18): p. 4890-901.
242. Sikic, B.I., N. Lakhani, A. Patnaik, S.A. Shah, S.R. Chandana, D. Rasco, A.D. Colevas, T. O'Rourke, S. Narayanan, K. Papadopoulos, G.A. Fisher, V. Villalobos, S.S. Prohaska, M. Howard, M. Beeram, M.P. Chao, B. Agoram, J.Y. Chen, J. Huang, M. Axt, J. Liu, J.P. Volkmer, R. Majeti, I.L. Weissman, C.H. Takimoto, D. Supan, H.A. Wakelee, R. Aoki, M.D. Pegram, and S.K. Padda, *First-in-Human, First-in-Class Phase I Trial of the Anti-CD47 Antibody Hu5F9-G4 in Patients With Advanced Cancers*. *J Clin Oncol*, 2019. **37**(12): p. 946-953.
243. Pettersen, R.D., K. Hestdal, M.K. Olafsen, S.O. Lie, and F.P. Lindberg, *CD47 signals T cell death*. *J Immunol*, 1999. **162**(12): p. 7031-40.

244. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati, *CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1277-84.
245. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3544-53.
246. Manna, P.P. and W.A. Frazier, *CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1026-36.
247. Uno, S., Y. Kinoshita, Y. Azuma, T. Tsunenari, Y. Yoshimura, S. Iida, Y. Kikuchi, H. Yamada-Okabe, and N. Fukushima, *Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia*. Oncol Rep, 2007. **17**(5): p. 1189-94.
248. Mateo, V., E.J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F.L. Deist, and M. Sarfati, *Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2882-90.
249. Lamy, L., M. Ticchioni, A.K. Rouquette-Jazdanian, M. Samson, M. Deckert, A.H. Greenberg, and A. Bernard, *CD47 and the 19 kDa interacting protein-3 (BNIP3) in T cell apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23915-21.
250. Roue, G., N. Bitton, V.J. Yuste, T. Montange, M. Rubio, F. Dessauge, C. Delettre, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S.A. Susin, *Mitochondrial dysfunction in CD47-mediated caspase-independent cell death: ROS production in the absence of cytochrome c and AIF release*. Biochimie, 2003. **85**(8): p. 741-6.
251. Bras, M., V.J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J.E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S.A. Susin, *Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 7073-88.
252. Shamas-Din, A., J. Kale, B. Leber, and D.W. Andrews, *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008714.
253. Giatromanolaki, A., M.I. Koukourakis, H.M. Sowter, E. Sivridis, S. Gibson, K.C. Gatter, and A.L. Harris, *BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein*

- expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2004. 10(16): p. 5566-71.*
254. Tang, C., H. Han, Z. Liu, Y. Liu, L. Yin, J. Cai, L. He, Y. Liu, G. Chen, Z. Zhang, X.M. Yin, and Z. Dong, *Activation of BNIP3-mediated mitophagy protects against renal ischemia-reperfusion injury. Cell Death Dis, 2019. 10(9): p. 677.*
 255. Lamy, L., A. Foussat, E.J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni, and A. Bernard, *Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. J Immunol, 2007. 178(9): p. 5930-9.*
 256. Kalas, W., E. Swiderek, A. Rapak, M. Kopij, J. Rak, and L. Strzadala, *H-ras up-regulates expression of BNIP3. Anticancer Res, 2011. 31(9): p. 2869-75.*
 257. Pagliuso, A., P. Cossart, and F. Stavru, *The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. Cell Mol Life Sci, 2018. 75(3): p. 355-374.*
 258. Wilson, N.S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, *Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nat Immunol, 2009. 10(4): p. 348-55.*
 259. Yamada, A., R. Arakaki, M. Saito, Y. Kudo, and N. Ishimaru, *Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. Front Immunol, 2017. 8: p. 403.*
 260. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem, 2000. 69: p. 217-45.*
 261. Manna, P.P., J. Dimitry, P.A. Oldenborg, and W.A. Frazier, *CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. J Biol Chem, 2005. 280(33): p. 29637-44.*
 262. Seiffert, M., P. Brossart, C. Cant, M. Cella, M. Colonna, W. Brugger, L. Kanz, A. Ullrich, and H.J. Buhring, *Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. Blood, 2001. 97(9): p. 2741-9.*
 263. Cameron, C.M., J.W. Barrett, M. Mann, A. Lucas, and G. McFadden, *Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. Virology, 2005. 337(1): p. 55-67.*
 264. Nath, P.R., A. Gangaplara, D. Pal-Nath, A. Mandal, D. Maric, J.M. Sipes, M. Cam, E.M. Shevach, and D.D. Roberts, *CD47 Expression in Natural Killer Cells Regulates*

- Homeostasis and Modulates Immune Response to Lymphocytic Choriomeningitis Virus.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2985.
265. Tal, M.C., L.B. Torrez Dulgeroff, L. Myers, L.B. Cham, K.D. Mayer-Barber, A.C. Bohrer, E. Castro, Y.Y. Yiu, C. Lopez Angel, E. Pham, A.B. Carmody, R.J. Messer, E. Gars, J. Kortmann, M. Markovic, M. Hasenkrug, K.E. Peterson, C.W. Winkler, T.A. Woods, P. Hansen, S. Galloway, D. Wagh, B.J. Fram, T. Nguyen, D. Corey, R.S. Kalluru, N. Banaei, J. Rajadas, D.M. Monack, A. Ahmed, D. Sahoo, M.M. Davis, J.S. Glenn, T. Adomati, K.S. Lang, I.L. Weissman, and K.J. Hasenkrug, *Upregulation of CD47 Is a Host Checkpoint Response to Pathogen Recognition.* mBio, 2020. **11**(3).
266. Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S.E. Jacobsen, J.W. Pollard, J. Frampton, K.J. Liu, and F. Geissmann, *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.* Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
267. Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M.B. Beasley, M. Leboeuf, C.D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S.W. Boyer, E.C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. Garcia-Sastre, E.R. Stanley, F. Ginhoux, P.S. Frenette, and M. Merad, *Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes.* Immunity, 2013. **38**(4): p. 792-804.
268. Epelman, S., K.J. Lavine, A.E. Beaudin, D.K. Sojka, J.A. Carrero, B. Calderon, T. Brija, E.L. Gautier, S. Ivanov, A.T. Satpathy, J.D. Schilling, R. Schwendener, I. Sergin, B. Razani, E.C. Forsberg, W.M. Yokoyama, E.R. Unanue, M. Colonna, G.J. Randolph, and D.L. Mann, *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation.* Immunity, 2014. **40**(1): p. 91-104.
269. Hoeffel, G., J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F.F. Almeida, P. See, A.E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E.C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L.G. Ng, J.K. Chan, M. Greter, B. Becher, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux, *C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages.* Immunity, 2015. **42**(4): p. 665-78.

270. Sheng, J., C. Ruedl, and K. Karjalainen, *Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells*. *Immunity*, 2015. **43**(2): p. 382-93.
271. Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M.F. de Bruijn, F. Geissmann, and H.R. Rodewald, *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. *Nature*, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
272. Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad, *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. *Science*, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
273. Kierdorf, K., D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E.G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D.N. Muller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer, and M. Prinz, *Microglia emerge from erythromyeloid precursors via *Pu.1*- and *Irf8*-dependent pathways*. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(3): p. 273-80.
274. Naito, M., F. Yamamura, S. Nishikawa, and K. Takahashi, *Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures*. *J Leukoc Biol*, 1989. **46**(1): p. 1-10.
275. Sevenich, L., *Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 697.
276. Guilliams, M., I. De Kleer, S. Henri, S. Post, L. Vanhoutte, S. De Prijck, K. Deswarte, B. Malissen, H. Hammad, and B.N. Lambrecht, *Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF*. *J Exp Med*, 2013. **210**(10): p. 1977-92.
277. Bain, C.C., A. Bravo-Blas, C.L. Scott, E.G. Perdiguero, F. Geissmann, S. Henri, B. Malissen, L.C. Osborne, D. Artis, and A.M. Mowat, *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(10): p. 929-937.

278. Chen, B., *Molecular Mechanism of HIV-1 Entry*. Trends Microbiol, 2019. **27**(10): p. 878-891.
279. Duncan, C.J. and Q.J. Sattentau, *Viral determinants of HIV-1 macrophage tropism*. Viruses, 2011. **3**(11): p. 2255-79.
280. Joseph, S.B. and R. Swanstrom, *The evolution of HIV-1 entry phenotypes as a guide to changing target cells*. J Leukoc Biol, 2018. **103**(3): p. 421-431.
281. Bertram, K.M., O. Tong, C. Royle, S.G. Turville, N. Nasr, A.L. Cunningham, and A.N. Harman, *Manipulation of Mononuclear Phagocytes by HIV: Implications for Early Transmission Events*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2263.
282. Sattentau, Q.J. and M. Stevenson, *Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(3): p. 304-10.
283. Ochsenbauer, C., T.G. Edmonds, H. Ding, B.F. Keele, J. Decker, M.G. Salazar, J.F. Salazar-Gonzalez, R. Shattock, B.F. Haynes, G.M. Shaw, B.H. Hahn, and J.C. Kappes, *Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages*. J Virol, 2012. **86**(5): p. 2715-28.
284. Salazar-Gonzalez, J.F., M.G. Salazar, B.F. Keele, G.H. Learn, E.E. Giorgi, H. Li, J.M. Decker, S. Wang, J. Baalwa, M.H. Kraus, N.F. Parrish, K.S. Shaw, M.B. Guffey, K.J. Bar, K.L. Davis, C. Ochsenbauer-Jambor, J.C. Kappes, M.S. Saag, M.S. Cohen, J. Mulenga, C.A. Derdeyn, S. Allen, E. Hunter, M. Markowitz, P. Hraber, A.S. Perelson, T. Bhattacharya, B.F. Haynes, B.T. Korber, B.H. Hahn, and G.M. Shaw, *Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1273-89.
285. Koppensteiner, H., R. Brack-Werner, and M. Schindler, *Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 82.
286. Baxter, A.E., R.A. Russell, C.J. Duncan, M.D. Moore, C.B. Willberg, J.L. Pablos, A. Finzi, D.E. Kaufmann, C. Ochsenbauer, J.C. Kappes, F. Groot, and Q.J. Sattentau, *Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(6): p. 711-21.

287. Ladinsky, M.S., W. Khamaikawin, Y. Jung, S. Lin, J. Lam, D.S. An, P.J. Bjorkman, and C. Kieffer, *Mechanisms of virus dissemination in bone marrow of HIV-1-infected humanized BLT mice*. *Elife*, 2019. **8**.
288. Calantone, N., F. Wu, Z. Klase, C. Deleage, M. Perkins, K. Matsuda, E.A. Thompson, A.M. Ortiz, C.L. Vinton, I. Ourmanov, K. Lore, D.C. Douek, J.D. Estes, V.M. Hirsch, and J.M. Brechley, *Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells*. *Immunity*, 2014. **41**(3): p. 493-502.
289. DiNapoli, S.R., A.M. Ortiz, F. Wu, K. Matsuda, H.L. Twigg, 3rd, V.M. Hirsch, K. Knox, and J.M. Brechley, *Tissue-resident macrophages can contain replication-competent virus in antiretroviral-naive, SIV-infected Asian macaques*. *JCI Insight*, 2017. **2**(4): p. e91214.
290. Ritter, U., F. Frischknecht, and G. van Zandbergen, *Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?* *Trends Parasitol*, 2009. **25**(11): p. 505-10.
291. Peters, N.C., J.G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M.P. Fay, R.N. Germain, and D. Sacks, *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 970-4.
292. Davis, J.M. and L. Ramakrishnan, *The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection*. *Cell*, 2009. **136**(1): p. 37-49.
293. Czuczman, M.A., R. Fattouh, J.M. van Rijn, V. Canadien, S. Osborne, A.M. Muise, V.K. Kuchroo, D.E. Higgins, and J.H. Brumell, *Listeria monocytogenes exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread*. *Nature*, 2014. **509**(7499): p. 230-4.
294. Ruggiero, E., R. Bona, C. Muratori, and M. Federico, *Virological consequences of early events following cell-cell contact between human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ cells*. *J Virol*, 2008. **82**(16): p. 7773-89.
295. Bracq, L., M. Xie, M. Lambele, L.T. Vu, J. Matz, A. Schmitt, J. Delon, P. Zhou, C. Randriamampita, J. Bouchet, and S. Benichou, *T Cell-Macrophage Fusion Triggers Multinucleated Giant Cell Formation for HIV-1 Spreading*. *J Virol*, 2017. **91**(24).
296. Xie, M., H. Leroy, R. Mascarau, M. Woottum, M. Dupont, C. Ciccone, A. Schmitt, B. Raynaud-Messina, C. Verollet, J. Bouchet, L. Bracq, and S. Benichou, *Cell-to-Cell*

- Spreading of HIV-1 in Myeloid Target Cells Escapes SAMHD1 Restriction.* mBio, 2019. **10**(6).
297. Granelli-Piperno, A., M. Pope, K. Inaba, and R.M. Steinman, *Coexpression of NF-kappa B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 10944-8.
298. Frankel, S.S., B.M. Wenig, A.P. Burke, P. Mannan, L.D. Thompson, S.L. Abbondanzo, A.M. Nelson, M. Pope, and R.M. Steinman, *Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid.* Science, 1996. **272**(5258): p. 115-7.
299. Dargent, J.L., L. Lespagnard, A. Kornreich, P. Hermans, N. Clumeck, and A. Verhest, *HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study.* Mod Pathol, 2000. **13**(12): p. 1293-9.
300. Geny, C., R. Gherardi, P. Boudes, F. Lionnet, P. Cesaro, and F. Gray, *Multifocal multinucleated giant cell myelitis in an AIDS patient.* Neuropathol Appl Neurobiol, 1991. **17**(2): p. 157-62.
301. Koenig, S., H.E. Gendelman, J.M. Orenstein, M.C. Dal Canto, G.H. Pezeshkpour, M. Yungbluth, F. Janotta, A. Aksamit, M.A. Martin, and A.S. Fauci, *Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy.* Science, 1986. **233**(4768): p. 1089-93.
302. Costiniuk, C.T. and M.A. Jenabian, *Cell-to-cell transfer of HIV infection: implications for HIV viral persistence.* J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 11): p. 2346-2355.
303. Sisakhtnezhad, S. and L. Khosravi, *Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells.* Eur J Cell Biol, 2015. **94**(10): p. 429-43.
304. McCoy-Simandle, K., S.J. Hanna, and D. Cox, *Exosomes and nanotubes: Control of immune cell communication.* Int J Biochem Cell Biol, 2016. **71**: p. 44-54.
305. Dupont, M., S. Souriant, G. Lugo-Villarino, I. Maridonneau-Parini, and C. Verollet, *Tunneling Nanotubes: Intimate Communication between Myeloid Cells.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 43.

306. Eugenin, E.A., P.J. Gaskill, and J.W. Berman, *Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking*. *Cell Immunol*, 2009. **254**(2): p. 142-8.
307. Austefjord, M.W., H.H. Gerdes, and X. Wang, *Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure*. *Commun Integr Biol*, 2014. **7**(1): p. e27934.
308. Hashimoto, M., F. Bhuyan, M. Hiyoshi, O. Noyori, H. Nasser, M. Miyazaki, T. Saito, Y. Kondoh, H. Osada, S. Kimura, K. Hase, H. Ohno, and S. Suzu, *Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages*. *J Immunol*, 2016. **196**(4): p. 1832-41.
309. Gendelman, H.E., J.M. Orenstein, M.A. Martin, C. Ferrua, R. Mitra, T. Phipps, L.A. Wahl, H.C. Lane, A.S. Fauci, D.S. Burke, and et al., *Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes*. *J Exp Med*, 1988. **167**(4): p. 1428-41.
310. Carter, C.A. and L.S. Ehrlich, *Cell biology of HIV-1 infection of macrophages*. *Annu Rev Microbiol*, 2008. **62**: p. 425-43.
311. Kelly, J., M.H. Beddall, D. Yu, S.R. Iyer, J.W. Marsh, and Y. Wu, *Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA*. *Virology*, 2008. **372**(2): p. 300-12.
312. Gavegnano, C. and R.F. Schinazi, *Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication*. *Antivir Chem Chemother*, 2009. **20**(2): p. 63-78.
313. Rose, R., S.L. Lamers, D.J. Nolan, E. Maidji, N.R. Faria, O.G. Pybus, J.J. Dollar, S.A. Maruniak, A.C. McAvoy, M. Salemi, C.A. Stoddart, E.J. Singer, and M.S. McGrath, *HIV Maintains an Evolving and Dispersed Population in Multiple Tissues during Suppressive Combined Antiretroviral Therapy in Individuals with Cancer*. *J Virol*, 2016. **90**(20): p. 8984-93.
314. Gonzalez-Scarano, F. and J. Martin-Garcia, *The neuropathogenesis of AIDS*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(1): p. 69-81.
315. Deneka, M., A. Pelchen-Matthews, R. Byland, E. Ruiz-Mateos, and M. Marsh, *In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53*. *J Cell Biol*, 2007. **177**(2): p. 329-41.

316. Jouve, M., N. Sol-Foulon, S. Watson, O. Schwartz, and P. Benaroch, *HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages*. *Cell Host Microbe*, 2007. **2**(2): p. 85-95.
317. Welsch, S., O.T. Keppler, A. Habermann, I. Allespach, J. Krijnse-Locker, and H.G. Krausslich, *HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(3): p. e36.
318. Mlcochova, P., A. Pelchen-Matthews, and M. Marsh, *Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages*. *BMC Biol*, 2013. **11**: p. 89.
319. Nkwe, D.O., A. Pelchen-Matthews, J.J. Burden, L.M. Collinson, and M. Marsh, *The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages*. *BMC Biol*, 2016. **14**: p. 50.
320. Berre, S., R. Gaudin, B. Cunha de Alencar, M. Desdouits, M. Chabaud, N. Naffakh, M. Rabaza-Gairi, F.X. Gobert, M. Jouve, and P. Benaroch, *CD36-specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to T cells*. *J Exp Med*, 2013. **210**(12): p. 2523-38.
321. Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze, *Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments*. *Traffic*, 2002. **3**(10): p. 718-29.
322. Sharova, N., C. Swingler, M. Sharkey, and M. Stevenson, *Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans*. *EMBO J*, 2005. **24**(13): p. 2481-9.
323. Agosto, L.M., P.D. Uchil, and W. Mothes, *HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(5): p. 289-95.
324. Hammonds, J.E., N. Beeman, L. Ding, S. Takushi, A.C. Francis, J.J. Wang, G.B. Melikyan, and P. Spearman, *Siglec-1 initiates formation of the virus-containing compartment and enhances macrophage-to-T cell transmission of HIV-1*. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(1): p. e1006181.
325. Gousset, K., S.D. Ablan, L.V. Coren, A. Ono, F. Soheilian, K. Nagashima, D.E. Ott, and E.O. Freed, *Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(3): p. e1000015.

326. Giese, S. and M. Marsh, *Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(7): p. e1004189.
327. Gaudin, R., B.C. de Alencar, M. Jouve, S. Berre, E. Le Bouder, M. Schindler, A. Varthaman, F.X. Gobert, and P. Benaroch, *Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages*. J Cell Biol, 2012. **199**(3): p. 467-79.
328. Groot, F., S. Welsch, and Q.J. Sattentau, *Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4660-3.
329. Alexaki, A., Y. Liu, and B. Wigdahl, *Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence*. Curr HIV Res, 2008. **6**(5): p. 388-400.
330. Saksena, N.K., B. Wang, L. Zhou, M. Soedjono, Y.S. Ho, and V. Conceicao, *HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites*. HIV AIDS (Auckl), 2010. **2**: p. 103-22.
331. Herbein, G. and K.A. Khan, *Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease?* Trends Immunol, 2008. **29**(2): p. 61-7.
332. Dahl, V., M. Gisslen, L. Hagberg, J. Peterson, W. Shao, S. Spudich, R.W. Price, and S. Palmer, *An example of genetically distinct HIV type 1 variants in cerebrospinal fluid and plasma during suppressive therapy*. J Infect Dis, 2014. **209**(10): p. 1618-22.
333. Costiniuk, C.T. and M.A. Jenabian, *The lungs as anatomical reservoirs of HIV infection*. Rev Med Virol, 2014. **24**(1): p. 35-54.
334. Zalar, A., M.I. Figueroa, B. Ruibal-Ares, P. Bare, P. Cahn, M.M. de Bracco, and L. Belmonte, *Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART*. Antiviral Res, 2010. **87**(2): p. 269-71.
335. Yukl, S.A., A.K. Shergill, T. Ho, M. Killian, V. Girling, L. Epling, P. Li, L.K. Wong, P. Crouch, S.G. Deeks, D.V. Havlir, K. McQuaid, E. Sinclair, and J.K. Wong, *The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence*. J Infect Dis, 2013. **208**(8): p. 1212-20.
336. Yukl, S.A., E. Sinclair, M. Somsouk, P.W. Hunt, L. Epling, M. Killian, V. Girling, P. Li, D.V. Havlir, S.G. Deeks, J.K. Wong, and H. Hatano, *A comparison of methods for*

- measuring rectal HIV levels suggests that HIV DNA resides in cells other than CD4+ T cells, including myeloid cells.* AIDS, 2014. **28**(3): p. 439-42.
337. Ganor, Y., F. Real, A. Sennepin, C.A. Dutertre, L. Prevedel, L. Xu, D. Tudor, B. Charmeteau, A. Couedel-Courteille, S. Marion, A.R. Zenak, J.P. Jourdain, Z. Zhou, A. Schmitt, C. Capron, E.A. Eugenin, R. Cheynier, M. Revol, S. Cristofari, A. Hosmalin, and M. Bomsel, *HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy.* Nat Microbiol, 2019. **4**(4): p. 633-644.
338. Shen, R., H.E. Richter, and P.D. Smith, *Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa.* Am J Reprod Immunol, 2011. **65**(3): p. 261-7.
339. Shen, R., G. Meng, C. Ochsenbauer, P.R. Clapham, J. Grams, L. Novak, J.C. Kappes, L.E. Smythies, and P.D. Smith, *Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF-kappaB activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages.* PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002060.
340. Lodge, R., J.A. Ferreira Barbosa, F. Lombard-Vadnais, J.C. Gilmore, A. Deshiere, A. Gosselin, T.R. Wiche Salinas, M.G. Bego, C. Power, J.P. Routy, P. Ancuta, M.J. Tremblay, and E.A. Cohen, *Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor.* Cell Rep, 2017. **21**(1): p. 141-153.
341. Guillemin, G.J. and B.J. Brew, *Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 388-97.
342. McMichael, A.J., P. Borrow, G.D. Tomaras, N. Goonetilleke, and B.F. Haynes, *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 11-23.
343. Crowe, S.M., C.L. Westhorpe, N. Mukhamedova, A. Jaworowski, D. Sviridov, and M. Bukrinsky, *The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis.* J Leukoc Biol, 2010. **87**(4): p. 589-98.
344. Wiley, C.A., R.D. Schrier, J.A. Nelson, P.W. Lampert, and M.B. Oldstone, *Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(18): p. 7089-93.

345. Williams, K.C. and W.F. Hickey, *Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS*. *Annu Rev Neurosci*, 2002. **25**: p. 537-62.
346. Williams, D.W., E.A. Eugenin, T.M. Calderon, and J.W. Berman, *Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis*. *J Leukoc Biol*, 2012. **91**(3): p. 401-15.
347. Yuan, J., X. Shi, C. Chen, H. He, L. Liu, J. Wu, and H. Yan, *High expression of CD47 in triple negative breast cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(3): p. 3249-3255.
348. Farre, D., P. Martinez-Vicente, P. Engel, and A. Angulo, *Immunoglobulin superfamily members encoded by viruses and their multiple roles in immune evasion*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(5): p. 780-796.
349. Gordon, S.R., R.L. Maute, B.W. Dulken, G. Hutter, B.M. George, M.N. McCracken, R. Gupta, J.M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A.M. Ring, A.J. Connolly, and I.L. Weissman, *PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity*. *Nature*, 2017. **545**(7655): p. 495-499.
350. Barkal, A.A., K. Weiskopf, K.S. Kao, S.R. Gordon, B. Rosental, Y.Y. Yiu, B.M. George, M. Markovic, N.G. Ring, J.M. Tsai, K.M. McKenna, P.Y. Ho, R.Z. Cheng, J.Y. Chen, L.J. Barkal, A.M. Ring, I.L. Weissman, and R.L. Maute, *Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy*. *Nat Immunol*, 2018. **19**(1): p. 76-84.
351. Barkal, A.A., R.E. Brewer, M. Markovic, M. Kowarsky, S.A. Barkal, B.W. Zaro, V. Krishnan, J. Hatakeyama, O. Dorigo, L.J. Barkal, and I.L. Weissman, *CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy*. *Nature*, 2019. **572**(7769): p. 392-396.
352. Chen, J., M.C. Zhong, H. Guo, D. Davidson, S. Mishel, Y. Lu, I. Rhee, L.A. Perez-Quintero, S. Zhang, M.E. Cruz-Munoz, N. Wu, D.C. Vinh, M. Sinha, V. Calderon, C.A. Lowell, J.S. Danska, and A. Veillette, *SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin*. *Nature*, 2017. **544**(7651): p. 493-497.
353. Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson, *Cell-surface*

- calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.* Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.
354. Chao, M.P., S. Jaiswal, R. Weissman-Tsukamoto, A.A. Alizadeh, A.J. Gentles, J. Volkmer, K. Weiskopf, S.B. Willingham, T. Raveh, C.Y. Park, R. Majeti, and I.L. Weissman, *Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47.* Sci Transl Med, 2010. **2**(63): p. 63ra94.
355. Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Henson, *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.* J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
356. Hafizi, S. and B. Dahlback, *Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily.* FEBS J, 2006. **273**(23): p. 5231-44.
357. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and S. Nagata, *Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.* Nature, 2002. **417**(6885): p. 182-7.
358. Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata, *Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor.* Nature, 2007. **450**(7168): p. 435-9.
359. Kobayashi, N., P. Karisola, V. Pena-Cruz, D.M. Dorfman, M. Jinushi, S.E. Umetsu, M.J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A.H. Sharpe, S. Ito, G. Dranoff, G.G. Kaplan, J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu, R.H. Dekruyff, and G.J. Freeman, *TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells.* Immunity, 2007. **27**(6): p. 927-40.
360. Nakayama, M., H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, M. Hashiguchi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura, *Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation.* Blood, 2009. **113**(16): p. 3821-30.
361. Murakami, Y., L. Tian, O.H. Voss, D.H. Margulies, K. Krzewski, and J.E. Coligan, *CD300b regulates the phagocytosis of apoptotic cells via phosphatidylserine recognition.* Cell Death Differ, 2014. **21**(11): p. 1746-57.
362. Choi, S.C., V.R. Simhadri, L. Tian, A. Gil-Krzewska, K. Krzewski, F. Borrego, and J.E. Coligan, *Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes*

- outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis.* J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3483-7.
363. Tian, L., S.C. Choi, Y. Murakami, J. Allen, H.C. Morse, 3rd, C.F. Qi, K. Krzewski, and J.E. Coligan, *p85alpha recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3146.
364. Park, D., A.C. Tosello-Trampont, M.R. Elliott, M. Lu, L.B. Haney, Z. Ma, A.L. Klibanov, J.W. Mandell, and K.S. Ravichandran, *BAIL is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module.* Nature, 2007. **450**(7168): p. 430-4.
365. He, M., H. Kubo, K. Morimoto, N. Fujino, T. Suzuki, T. Takahashi, M. Yamada, M. Yamaya, T. Maekawa, Y. Yamamoto, and H. Yamamoto, *Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells.* EMBO Rep, 2011. **12**(4): p. 358-64.
366. Park, S.Y., M.Y. Jung, H.J. Kim, S.J. Lee, S.Y. Kim, B.H. Lee, T.H. Kwon, R.W. Park, and I.S. Kim, *Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor.* Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 192-201.
367. Park, S.Y., S.Y. Kim, M.Y. Jung, D.J. Bae, and I.S. Kim, *Epidermal growth factor-like domain repeat of stabilin-2 recognizes phosphatidylserine during cell corpse clearance.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(17): p. 5288-98.
368. Park, S.Y., M.Y. Jung, S.J. Lee, K.B. Kang, A. Gratchev, V. Riabov, J. Kzhyshkowska, and I.S. Kim, *Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 18): p. 3365-73.
369. Doitsh, G., N.L. Galloway, X. Geng, Z. Yang, K.M. Monroe, O. Zepeda, P.W. Hunt, H. Hatano, S. Sowinski, I. Munoz-Arias, and W.C. Greene, *Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection.* Nature, 2014. **505**(7484): p. 509-14.
370. Gaudin, R., S. Berre, B. Cunha de Alencar, J. Decalf, M. Schindler, F.X. Gobert, M. Jouve, and P. Benaroch, *Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69450.

371. Chu, H., J.J. Wang, M. Qi, J.J. Yoon, X. Chen, X. Wen, J. Hammonds, L. Ding, and P. Spearman, *Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 360-72.
372. Welsch, S., F. Groot, H.G. Krausslich, O.T. Keppler, and Q.J. Sattentau, *Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages*. J Virol, 2011. **85**(15): p. 7922-7.
373. Koppensteiner, H., C. Banning, C. Schneider, H. Hohenberg, and M. Schindler, *Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies*. J Virol, 2012. **86**(5): p. 2826-36.
374. Price, J.V. and R.E. Vance, *The macrophage paradox*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 685-93.
375. Krapp, C., D. Hotter, A. Gawanbacht, P.J. McLaren, S.F. Kluge, C.M. Sturzel, K. Mack, E. Reith, S. Engelhart, A. Ciuffi, V. Hornung, D. Sauter, A. Telenti, and F. Kirchhoff, *Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(4): p. 504-14.
376. Tada, T., Y. Zhang, T. Koyama, M. Tobiume, Y. Tsunetsugu-Yokota, S. Yamaoka, H. Fujita, and K. Tokunaga, *MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins*. Nat Med, 2015. **21**(12): p. 1502-7.
377. Tartour, K., R. Appourchaux, J. Gaillard, X.N. Nguyen, S. Durand, J. Turpin, E. Beaumont, E. Roch, G. Berger, R. Mahieux, D. Brand, P. Roingeard, and A. Cimarelli, *IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity*. Retrovirology, 2014. **11**: p. 103.
378. Murakami, T., N. Carmona, and A. Ono, *Virion-incorporated PSGL-1 and CD43 inhibit both cell-free infection and transinfection of HIV-1 by preventing virus-cell binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(14): p. 8055-8063.
379. Hurley, J.H. and S.D. Emr, *The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 277-98.
380. Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor*

- kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors.* J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1299-311.
381. Bour, S., C. Perrin, H. Akari, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B.* J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15920-8.
382. Besnard-Guerin, C., N. Belaidouni, I. Lassot, E. Segeral, A. Jobart, C. Marchal, and R. Benarous, *HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates.* J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 788-95.
383. Verma, S., A. Ali, S. Arora, and A.C. Banerjea, *Inhibition of beta-TrCP-dependent ubiquitination of p53 by HIV-1 Vpu promotes p53-mediated apoptosis in human T cells.* Blood, 2011. **117**(24): p. 6600-6607.
384. Casella, C.R., E.L. Rapaport, and T.H. Finkel, *Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 92-100.
385. Monroe, K.M., Z. Yang, J.R. Johnson, X. Geng, G. Doitsh, N.J. Krogan, and W.C. Greene, *IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV.* Science, 2014. **343**(6169): p. 428-32.
386. Cooper, A., M. Garcia, C. Petrovas, T. Yamamoto, R.A. Koup, and G.J. Nabel, *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration.* Nature, 2013. **498**(7454): p. 376-9.
387. Sainski, A.M., H. Dai, S. Natesampillai, Y.P. Pang, G.D. Bren, N.W. Cummins, C. Correia, X.W. Meng, J.E. Tarara, M. Ramirez-Alvarado, D.J. Katzmann, C. Ochsenbauer, J.C. Kappes, S.H. Kaufmann, and A.D. Badley, *Casp8p41 generated by HIV protease kills CD4 T cells through direct Bak activation.* J Cell Biol, 2014. **206**(7): p. 867-76.
388. Cummins, N.W. and A.D. Badley, *Casp8p41 and HIV.* Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23042-3.
389. Dabrowska, A., N. Kim, and A. Aldovini, *Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8460-77.

390. Stewart, S.A., B. Poon, J.Y. Song, and I.S. Chen, *Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3105-11.
391. Chun, T.W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J.A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T.C. Quinn, Y.H. Kuo, R. Brookmeyer, M.A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R.F. Siliciano, *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
392. Finzi, D., J. Blankson, J.D. Siliciano, J.B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T.C. Quinn, R.E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R.F. Siliciano, *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.
393. Siliciano, J.D., J. Kajdas, D. Finzi, T.C. Quinn, K. Chadwick, J.B. Margolick, C. Kovacs, S.J. Gange, and R.F. Siliciano, *Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 727-8.
394. Wang, J., J.M. Shackelford, N. Selliah, D.K. Shivers, E. O'Neill, J.V. Garcia, K. Muthumani, D. Weiner, X.F. Yu, D. Gabuzda, and T.H. Finkel, *The HIV-1 Vif protein mediates degradation of Vpr and reduces Vpr-induced cell cycle arrest*. DNA Cell Biol, 2008. **27**(5): p. 267-77.
395. Wolf, D., V. Witte, B. Laffert, K. Blume, E. Stromer, S. Trapp, P. d'Aloja, A. Schurmann, and A.S. Baur, *HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1217-24.
396. Kuo, H.H., R. Ahmad, G.Q. Lee, C. Gao, H.R. Chen, Z. Ouyang, M.J. Szucs, D. Kim, A. Tsibris, T.W. Chun, E. Battivelli, E. Verdin, E.S. Rosenberg, S.A. Carr, X.G. Yu, and M. Lichterfeld, *Anti-apoptotic Protein BIRC5 Maintains Survival of HIV-1-Infected CD4(+) T Cells*. Immunity, 2018. **48**(6): p. 1183-1194 e5.
397. Honeycutt, J.B., A. Wahl, C. Baker, R.A. Spagnuolo, J. Foster, O. Zakharova, S. Wietgreffe, C. Caro-Vegas, V. Madden, G. Sharpe, A.T. Haase, J.J. Eron, and J.V. Garcia, *Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells*. J Clin Invest, 2016. **126**(4): p. 1353-66.

398. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
399. Eligini, S., M. Crisci, E. Bono, P. Songia, E. Tremoli, G.I. Colombo, and S. Colli, *Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes*. J Cell Physiol, 2013. **228**(7): p. 1464-72.
400. Honeycutt, J.B., W.O. Thayer, C.E. Baker, R.M. Ribeiro, S.M. Lada, Y. Cao, R.A. Cleary, M.G. Hudgens, D.D. Richman, and J.V. Garcia, *HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy*. Nat Med, 2017. **23**(5): p. 638-643.
401. Banerjee, R., S. Khandelwal, Y. Kozakai, B. Sahu, and S. Kumar, *CD47 regulates the phagocytic clearance and replication of the Plasmodium yoelii malaria parasite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(10): p. 3062-7.
402. Lee, Y.T., E.J. Ko, Y. Lee, Y.N. Lee, Z. Bian, Y. Liu, and S.M. Kang, *CD47 Plays a Role as a Negative Regulator in Inducing Protective Immune Responses to Vaccination against Influenza Virus*. J Virol, 2016. **90**(15): p. 6746-6758.
403. Ayi, K., Z. Lu, L. Serghides, J.M. Ho, C. Finney, J.C.Y. Wang, W.C. Liles, and K.C. Kain, *CD47-SIRPalpha Interactions Regulate Macrophage Uptake of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes and Clearance of Malaria In Vivo*. Infect Immun, 2016. **84**(7): p. 2002-2011.
404. Lavender, K.J., W.W. Pang, R.J. Messer, A.K. Duley, B. Race, K. Phillips, D. Scott, K.E. Peterson, C.K. Chan, U. Dittmer, T. Dudek, T.M. Allen, I.L. Weissman, and K.J. Hasenkrug, *BLT-humanized C57BL/6 Rag2^{-/-}-gammac^{-/-}-CD47^{-/-} mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection*. Blood, 2013. **122**(25): p. 4013-20.
405. Luscombe, C.A., A. Avihingsanon, K. Supparatpinyo, S. Gatechompol, W.M. Han, G.D. Ewart, A.S. Thomson, M. Miller, S. Becker, and R.L. Murphy, *Human immunodeficiency virus type-1 Vpu inhibitor, BIT225, in combination with 3-drug antiretroviral therapy modulates inflammation and immune cells functions*. J Infect Dis, 2020.

406. Khoury, G., G. Ewart, C. Luscombe, M. Miller, and J. Wilkinson, *Antiviral efficacy of the novel compound BIT225 against HIV-1 release from human macrophages*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(2): p. 835-45.
407. Khoury, G., G. Ewart, C. Luscombe, M. Miller, and J. Wilkinson, *The antiviral compound BIT225 inhibits HIV-1 replication in myeloid dendritic cells*. *AIDS Res Ther*, 2016. **13**: p. 7.

ANNEXE : ARTICLE 3

Differential control of BST2 restriction and plasmacytoid dendritic cell antiviral response by antagonists encoded by HIV-1 group M and O strains

Mariana G. Bego,^a Lijun Cong,^a Katharina Mack,^b Frank Kirchhoff,^b Éric A. Cohen^a.

Au début de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de participer à cette étude sur le contrôle de la restriction de BST2 et de la réponse antivirale médiée par les pDCs par Vpu et Nef. Ma contribution dans cet article été de générer la lignée de cellules MT4 BST2-déficient, et de produire des virus pour réaliser les expériences liées à la Figure 2.

Cet article a été publié dans Journal of virology en août 2016.

Differential Control of BST2 Restriction and Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Response by Antagonists Encoded by HIV-1 Group M and O Strains

Mariana G. Bego,^a Lijun Cong,^a Katharina Mack,^b Frank Kirchhoff,^b Éric A. Cohen^{a,c}

Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada^a; Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany^b; Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada^c

ABSTRACT

BST2/tetherin is a type I interferon (IFN-I)-stimulated host factor that restricts the release of HIV-1 by entrapping budding virions at the cell surface. This membrane-associated protein can also engage and activate the plasmacytoid dendritic cell (pDC)-specific immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7) inhibitory receptor to downregulate the IFN-I response by pDCs. Pandemic HIV-1 group M uses Vpu (M-Vpu) to counteract the two BST2 isoforms (long and short) that are expressed in human cells. M-Vpu efficiently downregulates surface long BST2, while it displaces short BST2 molecules away from viral assembly sites. We recently found that this attribute is used by M-Vpu to activate the BST2/ILT7-dependent negative-feedback pathway and to suppress pDC IFN-I responses during sensing of infected cells. However, whether this property is conserved in endemic HIV-1 group O, which has evolved Nef (O-Nef) to counteract specifically the long BST2 isoform, remains unknown. In the present study, we validated that O-Nefs have the capacity to downregulate surface BST2 and enhance HIV-1 particle release although less efficiently than M-Vpu. In contrast to M-Vpu, O-Nef did not efficiently enhance viral spread in T cell culture or displace short BST2 from viral assembly sites to prevent its occlusion by tethered HIV-1 particles. Consequently, O-Nef impairs the ability of BST2 to activate negative ILT7 signaling to suppress the IFN-I response by pDC-containing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) during sensing of infected cells. These distinctive features of BST2 counteraction by O-Nefs may in part explain the limited spread of HIV-1 group O in the human population.

IMPORTANCE

The geographical distributions and prevalences of different HIV-1 groups show large variations. Understanding drivers of distinctive viral spread may aid in the development of therapeutic strategies for controlling the spread of HIV-1 pandemic strains. The differential spread of HIV-1 groups appears to be linked to their capacities to antagonize the long and short isoforms of the BST2 restriction factor. We found that the endemic HIV-1 group O-encoded BST2 antagonist Nef is unable to counteract the restriction mediated by short BST2, a condition that impairs its ability to activate ILT7 and suppress pDC antiviral responses. This is in contrast to the pandemic HIV-1 group M-specified BST2 countermeasure Vpu, which displays a diverse array of mechanisms to counteract short and long BST2 isoforms, an attribute that allows the effective control of pDC antiviral responses. These findings may help explain the limited spread of HIV-1 group O as well as the continued predominance of HIV-1 group M throughout the world.

BST2/tetherin is a type I interferon (IFN-I)-inducible surface protein with an unusual topology. The protein consists of a N-terminal cytosolic tail followed by a transmembrane domain (TMD) and an ectodomain that is membrane associated through a C-terminal glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (1). BST2 inhibits the release of a broad array of enveloped viruses, including human immunodeficiency virus (HIV), by tethering budding virions to the surface of infected cells (2, 3). While the physical retention of progeny virions by BST2 was proposed to be a major obstacle limiting the initial local viral propagation needed for efficient transmission between individuals (4–6), increasing evidence indicates that this activity also has multiple immunological consequences that could restrict viral transmission fitness. Virion tethering by BST2 can sensitize infected cells to antibody (Ab)-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (7–9) as well as activate proinflammatory NF- κ B signaling via a dual-tyrosine motif in the cytoplasmic tail of the protein (10). Moreover, the physical limitation of HIV-1 particle release by BST2 was found to stimulate IFN-I production by plasmacytoid dendritic cells

(pDCs) in the context of cell contacts between HIV-1-producing cells and pDCs (11). In this regard, BST2 can act as a ligand of immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7), a pDC-specific inhibitory receptor that downregulates Toll-like receptor 7/9 (TLR7/9)-mediated IFN-I production upon pDC activation (11, 12). Mechanistic evidence suggests that virion tethering interferes with the ability of BST2 to act in conjunction with ILT7 as a negative regulator of the IFN response by pDCs (11).

Received 10 June 2016 Accepted 29 August 2016

Accepted manuscript posted online 31 August 2016

Citation Bego MG, Cong L, Mack K, Kirchhoff F, Cohen EA. 2016. Differential control of BST2 restriction and plasmacytoid dendritic cell antiviral response by antagonists encoded by HIV-1 group M and O strains. *J Virol* 90:10236–10246. doi:10.1128/JVI.01131-16.

Editor: G. Silvestri, Emory University

Address correspondence to Éric A. Cohen, eric.cohen@ircm.qc.ca.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

HIV-1 is divided into four distinct groups (groups M, N, O, and P), which represent independent cross-species transmissions of a simian immunodeficiency virus (SIV) to humans (13). It is thought that the viruses resulting from these transmissions have spread with different efficiencies in the human population in part because of their differential adaptation to human BST2 restriction (14). The SIV precursors of all HIV-1 groups and HIV-2 utilize the Nef accessory protein to antagonize BST2 from their respective primate hosts (6, 15, 16). However, a 5-amino-acid deletion in the cytoplasmic domain of human BST2 confers resistance to SIV Nef proteins. This species barrier is believed to have led the predominant HIV-1 group M and, less effectively, the minor group N strains to adapt and use Vpu to antagonize BST2 (6, 17), while HIV-2 adopted the envelope (Env) glycoproteins as a BST2 countermeasure (18). Although initial studies failed to identify a human BST2 viral antagonist in HIV-1 groups O and P (6, 19, 20), recent evidence reveals that HIV-1 O Nef can counteract human BST2, thus providing a potential explanation for the epidemic spread of HIV-1 group O in western central Africa (21, 22).

Two isoforms of human BST2 capable of restricting HIV-1 virion release have been described. They are derived from alternative translation initiation from two highly conserved methionine residues located in the cytoplasmic tail of the molecule (23). The short isoform lacks the first 12 N-terminal residues present in the long isoform, including conserved tyrosine and serine-threonine motifs. These isoforms have the ability to form homodimers and heterodimers, and while they display differential signaling activities (signaling is restricted to the long BST2 homodimer), they are all capable of interacting with ILT7 on pDCs (11). Primate lentivirus antagonists counteract BST2 restriction via intracellular sequestration, degradation, and/or displacement mechanisms to remove BST2 from sites of virus budding (24). The mechanisms differ significantly among the different viral countermeasures and according to the BST2 isoforms being targeted. For instance, both isoforms of human and rhesus macaque BST2 demonstrate similar sensitivities to HIV-2 Env and SIVmac Nef, respectively, and their counteraction involves the removal of the protein from the cell surface through enhanced internalization and intracellular sequestration (18, 25–27). The Vpu protein from the recently isolated highly pathogenic HIV-1 group N strain from Togo (N1.FR.2001) (17) also antagonizes both isoforms albeit without inducing their degradation or surface downregulation (28). In contrast, HIV-1 group M Vpu (M-Vpu) targets the long and short BST2 isoforms differentially using distinct mechanisms. While M-Vpu removes long BST2 molecules from the cell surface essentially via intracellular sequestration and degradation mechanisms, the short BST2 isoform is more resistant to M-Vpu-mediated downregulation and antagonism (23, 28) and, as such, appears to be counteracted by displacement from sites of virus budding (11, 29–31). Interestingly, the ability of M-Vpu to displace residual BST2 molecules away from sites of virus budding was found to have a downregulatory role in the pDC IFN-I response since it promoted the engagement of BST2 with the ILT7 inhibitory receptor upon cell contacts between infected cells and pDCs (11). Thus, differential targeting of long and short BST2 isoforms seems to be a specific property of HIV-1 M-Vpu (23, 28) and appears to be intended as a means to counteract BST2 restriction upon HIV-1 particle release, prevent the activation of NF- κ B signaling, and limit IFN-I production by pDCs upon sensing of infected cells.

HIV-1 group O Nef proteins (O-Nefs) counteract human

BST2 by targeting a domain in the N-terminal cytosolic region that is directly adjacent to the deleted residues that normally provide sensitivity to Nef. However, this domain is not present in short BST2, and as a result, O-Nefs can antagonize only the long BST2 isoform. Mechanistically, O-Nef, like M-Vpu, traps BST2 in the *trans*-Golgi network; although O-Nef slightly increases BST2 internalization, it is as efficient as M-Vpu in inhibiting BST2 anterograde transport to the cell surface (21). Interestingly, while Nef from the inferred group O most recent common ancestor (O-MRCA) was found to suppress BST2-mediated NF- κ B activation almost as efficiently as the prototypical group M NL4.3 Vpu protein, this function appeared to be lost in contemporary HIV-1 group O *nef* alleles. Instead, contemporary O-Nefs, like contemporary Nef proteins from HIV-1 group M (M-Nefs), are unable to prevent NF- κ B activation (21).

To define the functional consequences of the evolutionary adaptation of O-Nef to counteract BST2, we studied its fitness compared to that of M-Vpu in terms of its capacity to promote HIV-1 particle release and facilitate viral spread in CD4⁺ T cells *in vitro*. In addition, we analyzed the ability of O-Nef to exclude BST2 from sites of viral assembly and activate the ILT7 inhibitory receptor as a means to evade the IFN-I response by pDCs. The data presented in this study show that BST2 antagonists encoded by pandemic HIV-1 group M and endemic HIV-1 group O differentially control the pDC antiviral response despite their shared capacity to counteract BST2 restriction of HIV-1 release.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents. Rabbit polyclonal anti-BST2, anti-Vpu, anti-Nef, and anti-p17 Abs were previously described (32–35). Anti-ILT7 coupled with Alexa Fluor 647 was purchased from BioLegend. All secondary Abs used for flow cytometry and Western blotting were purchased from Life Technologies and Bio-Rad, respectively. Human recombinant interferon alpha 2a (rIFN- α 2a) was purchased from PBL. Raltegravir was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Cell lines and plasmids. SupT1 and MT4 T cells were obtained from the NIH AIDS Reagent Program (36), and HEK293T cells were acquired from the ATCC, while HEK-blue human IFN reporter cell lines were purchased from InvivoGen. HEK293T cells were transiently transfected by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Inc.). SupT1 cells stably expressing the short BST2 isoform (SupT1 ShortBST2) were established by lentiviral vector transduction based on pLenti-CMV/TO_Puro_DEST plasmids, as previously characterized (11). MT4 T cells transduced with a lentiviral vector encoding short hairpin RNA (shRNA) targeting BST2 (clone TRCN0000107018; OpenBiosystem) or control shRNA (target sequence 5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAA-3') were previously described and characterized (11).

The cell line CT550 (also known as ILT7 NFAT-GFP reporter cell line) was a generous gift from Yong-Jun Liu (37). In this reporter mouse cell line, which expresses ILT7 and Fc ϵ RI γ , green fluorescent protein (GFP) is driven by a nuclear factor of activated T cells (NFAT) promoter (NFAT-GFP) and results in GFP expression in response to ILT7 surface ligation.

The NL4.3-derived proviral constructs used in this study were previously described (21). Replication-competent NL4.3 proviral constructs encoding M-MRCA or N-MRCA Nef variants were generated by transferring HpaI-MluI fragments from NL4.3 dU Env-M-MRCA Nef_ires_GFP or NL4.3 dU Env-N-MRCA Nef_ires_GFP proviral constructs (previously described in reference 21), respectively, into NL4.3 dU Nef_ires_GFP. The sequences of the Vpu and Nef regions of all provirus constructs used were validated by automated sequencing. The plasmid encoding BST2 (pcDNA_Tetherin) was previously described (33).

HIV-1 production and infections. Infectious GFP-marked HIV-1 NL4.3 constructs with or without vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVg) were generated by Lipofectamine transfection of HEK293T cells. Virus-containing supernatants were harvested at 2 days posttransfection, clarified, pelleted by ultracentrifugation, and titrated by using TZM-bl indicator cells as described previously (33). T cells were infected with the different GFP-expressing pNL4.3 viruses at different multiplicities of infection (MOIs) ranging from 0.005 to 0.05. Infection rates were calculated by measurement of GFP-positive (GFP⁺) cells by flow cytometry, as previously described (11).

Virus particle release assay. The release of virus particles was assessed by Western blotting as described previously (38). Viral particle release efficiency was evaluated by determining the ratio of the virion-associated Gag (p24) signal over the total intracellular Gag (p24 plus p55) signal measured by scanning densitometry analysis of Western blots. Viral release efficiency was normalized to the value obtained from cells infected with the wild-type (WT) virus, which was set at 100%.

Surface antigen staining and flow cytometry analysis. Cell surface BST2 staining and flow cytometry analysis of live cells were performed as previously described (33). Samples were analyzed by using a Cyan flow cytometer with FlowJo software (TreeStar).

Confocal microscopy. Primary CD4⁺ T cells and MT4 and SupT1 cell lines were infected with NL4.3 viruses. VSVg-pseudotyped viruses were used for infection of primary CD4⁺ T cells. MT4 T cells were infected in the presence of raltegravir to limit infection to a single round of replication (25 ng/ml of raltegravir was added at 8 h postinfection [hpi]). At 48 h postinfection, T cells were immunostained with anti-BST2 Abs at 4°C for 45 min prior to extensive washes. Cells were then plated onto poly-D-lysine-treated coverslips and fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde (PFA). Viral matrix p17, a product of Gag polyprotein processing by the viral protease, was used as a marker of assembling HIV-1 particles and was detected with a specific antibody that does not recognize immature Gag products (34). To detect p17, fixed cells were permeabilized in 0.2% Triton for 5 min, incubated for 2 h at 37°C in 5% milk-phosphate-buffered saline (PBS) containing anti-p17 Abs, washed, and incubated with the appropriate secondary Ab for 30 min at room temperature. All analyses were conducted by using a 63× Plan Apochromat oil immersion objective with an aperture of 1.4 on an LSM710 Observer Z1 laser scanning confocal microscope coupled with a Kr-Ar laser (Zeiss). Signals from assembling viral particles stained with anti-p17 or from surface BST2 were quantified by measuring the raw integrated signal density on manually selected cells using ImageJ software.

Preparation of PBMCs and primary CD4⁺ T cells. Peripheral blood samples were obtained from healthy adult donors who gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocols approved by the research ethics review board of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque centrifugation (GE Healthcare) and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). CD4⁺ T lymphocytes were isolated by negative selection using a CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Enriched CD4⁺ T cells were then activated by using phytohemagglutinin-L (PHA-L; 5 µg/ml) for 48 h and maintained in complete RPMI 1640 medium supplemented with interleukin-2 (IL-2) (100 U/ml). Activated primary T cells were infected at 5 days postisolation.

Coculture assay with PBMCs. Two days prior to coculture, T cells were infected with the different GFP-expressing pNL4.3 viruses at different MOIs. Infection rates were calculated by measurement of GFP⁺ cells by flow cytometry, as previously described (11). Briefly, cultures with a range of 20 to 50% infected cells were subsequently used for cocultures. Target and donor cells were mixed at a ratio of 3:1 (PBMCs to T cells) in a final volume of 250 µl and cultured in U-bottom 96-well plates for 18 to 22 h. Cocultures were then transferred to a V-bottom 96-well plate and centrifuged for 5 min at 400 × g. Supernatants were then used to quantify

the amounts of IFN-I produced. Each experimental replicate was performed by using cells from a different donor.

Quantification of IFN-I concentrations. Detection of bioactive human IFN-I was performed by using the reporter cell line HEK-Blue IFN-α/β (InvivoGen) as previously reported (39). The IFN-I concentration (units per milliliter) was extrapolated from the linear range of a standard curve generated using known amounts of IFN-I.

Activation of ILT7 using ILT7⁺ NFAT-GFP reporter cells. HEK293T cells were mock transfected or cotransfected with a BST2-encoding plasmid and GFP-expressing HIV proviruses (50,000 cells/well) and plated onto 24-well plates for 18 to 24 h. The following day, ILT7⁺ NFAT-GFP reporter cells (100,000 cells/well) were added, and cocultures were incubated for an additional 18 to 24 h at 37°C, at which time samples were collected and analyzed by flow cytometry for BST2, ILT7, and GFP expression. HEK293T and NFAT-GFP reporter cells can be distinguished by flow cytometry based on their overall size and morphology (side scatter and forward scatter) as well as by monitoring ILT7 expression on reporter cells. The HEK293T cell transfection efficiency was determined in ILT7-negative cells as the percentage of cells expressing both GFP and surface BST2. Activation of ILT7 reporter cells was determined as the percentage of ILT7⁺ cells that were GFP⁺.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed by using repeated-measures or one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple-comparison test or two-tailed paired Student's *t* tests, as indicated. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Group O Nef enhances HIV-1 particle release and downmodulates surface BST2 but does not accelerate viral spread. To examine the effect of O-Nefs on the BST2 restriction exerted on HIV-1 particle release and spread, we used previously characterized replication-competent GFP-marked NL4.3 derivatives encoding different O-Nefs in a Vpu-defective (dU) background. Two O-Nefs were selected: the O-MRCA and primary isolate HJ162 (21). First, MT4 T cells were infected with the same NL4.3-derived viruses, and similar percentages of infected cells (~30% GFP⁺ cells) were analyzed for HIV-1 release and surface BST2 downmodulation. Even in the context of viral infection, O-Nefs were capable of counteracting the restriction imposed on viral particle release by BST2 (Fig. 1A and B), and this effect correlated with a reduction of BST2 levels at the cell surface (Fig. 1C and D). NL4.3 Vpu was more effective at enhancing HIV particle release than O-Nefs during infection of MT4 T cells (Fig. 1A and B). Next, the kinetics of viral spread in MT4 cells expressing or not expressing BST2 were studied (Fig. 2A). Viral spread assays initiated at a low MOI revealed that the WT NL4.3 virus disseminated more rapidly than did Vpu-deficient viruses expressing O-Nefs, consistent with the fact that O-Nef-expressing viruses displayed less-effective antagonism toward BST2 (Fig. 1 and 2B). Depletion of BST2 in MT4 cells abolished the differential kinetics of viral spread observed between Vpu-expressing viruses and those deficient for Vpu but expressing O-Nef, indicating that this effect was entirely BST2 dependent (Fig. 2C). Two recent reports identified the cellular serine incorporator (SERINC) proteins SERINC3 and SERINC5 as potent inhibitors of HIV-1 particle infectivity, which are counteracted by HIV-1 Nef (40, 41). Therefore, the positive effect of M-Nef on virus infectivity and spread is restricted to cells expressing SERINCs, a group that does not include MT4 cells (41). Consequently, due to the lack of anti-BST2 activity of M-Nef and the absence of SERINC expression in MT4 cells, viruses lacking both Vpu and Nef behaved very similarly to viruses lacking Vpu but expressing M-Nef (40, 41). Overall, these results suggest that

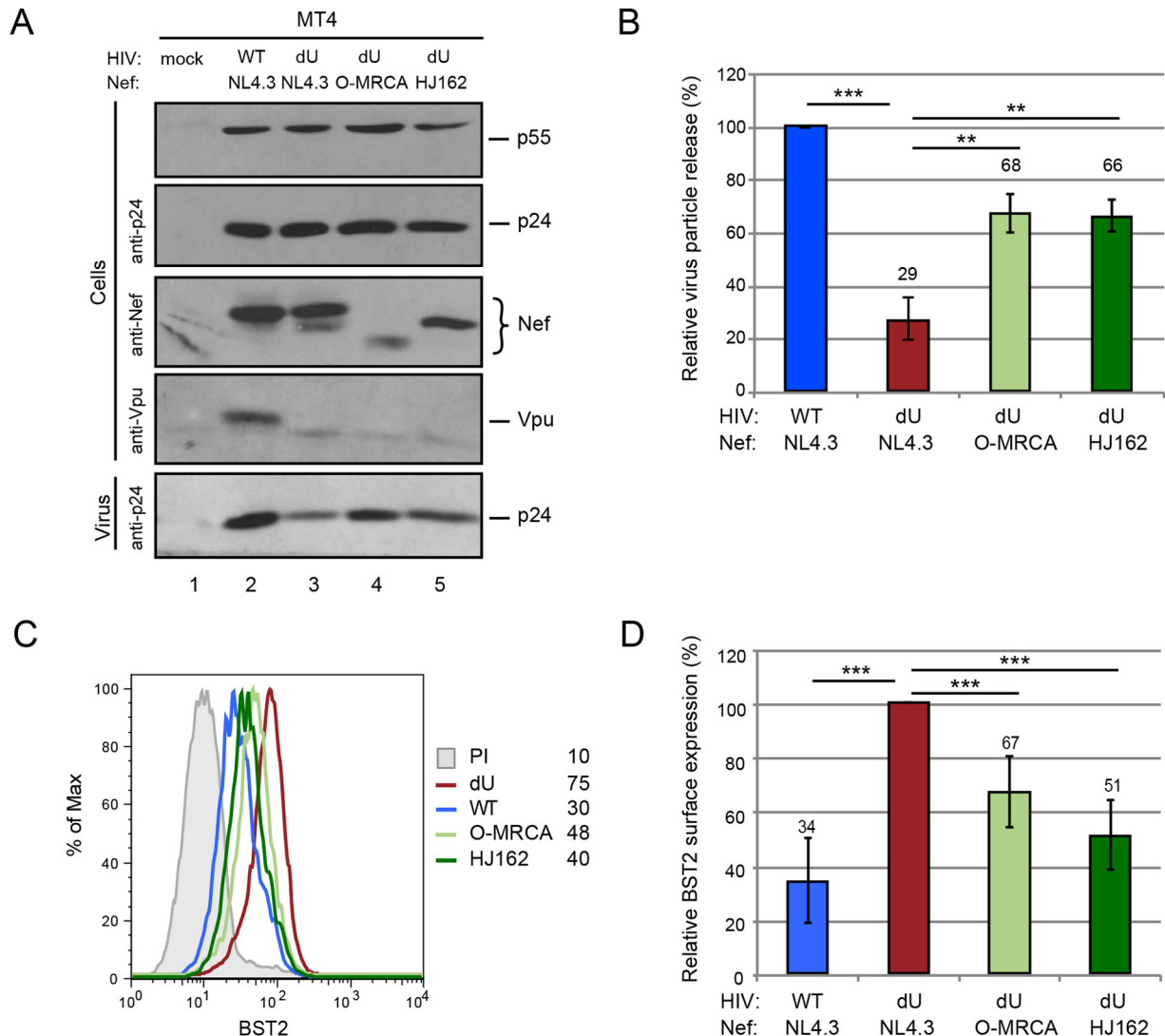


FIG 1 Group O Nefs retain some BST2 antagonism. (A and B) MT4 T cells were mock infected or infected with GFP-expressing NL4.3 WT and dU viruses expressing either NL4.3 Nef or O-Nefs, as indicated. Infected cell populations with ~30% GFP⁺ cells at 48 hpi were selected for comparison. (A) Cells and virion-containing supernatants were analyzed for the presence of Gag, Nef, and Vpu proteins by Western blotting. (B) The relative virus particle release efficiency was calculated as described in Materials and Methods and normalized to the value obtained for the WT virus, which was set at 100% ($n = 3$). (C) Flow cytometry analysis of surface BST2 in GFP-positive MT4 T cells infected with the indicated viruses. Mean fluorescence intensity values are indicated for each sample (staining using preimmune rabbit serum [PI]). (D) Relative BST2 surface expression levels after infection with the indicated HIVs ($n = 4$). The percent mean fluorescence intensity values were calculated relative to dU HIV-producing cells (100%). A two-tailed paired t test was used (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$). Error bars represent standard deviations.

although O-Nef variants have evolved some activity against human BST2, this activity does not appear to be sufficient to enhance the kinetics of viral dissemination at a low virus input, at least *in vitro*.

Group O Nef does not displace BST2 from sites of virus assembly. M-Vpu downmodulates a large proportion of long BST2 from the cell surface, while it excludes many of the remaining molecules (long BST2 remaining at the cell surface and Vpu downmodulation-resistant short BST2) from sites of viral assembly by virtue of its ability to target the BST2 TMD (11). Although HIV-1 O-Nef proteins efficiently reduce the cell surface expression of the long but not the short human BST2 isoform, it is unclear if they have the ability to displace BST2 away from virus assembly sites. To address this question, we evaluated the fre-

quency of surface BST2 molecules that are not engaged in the restriction of progeny virions in the presence or the absence of O-Nefs. To this end, we performed colocalization studies of BST2 and HIV-1 Gag-p17, a marker of assembling HIV, on infected MT4 and primary CD4⁺ T cells. T cells were infected with the above-described viruses and stained for surface BST2 and intracellular p17. As previously reported (11), clusters of BST2 molecules not colocalizing with p17 were detected on WT- but not on dU-infected MT4 and primary CD4⁺ T cells, consistent with the ability of NL4.3 Vpu to displace a pool of surface BST2 away from virus assembly sites (Fig. 3A and B). Hence, in the absence of BST2 countermeasures, the majority of surface BST2 appears to be engaged in restricting assembling viruses. Indeed, consistent with the viral particle release data shown in Fig. 1A and B, significant

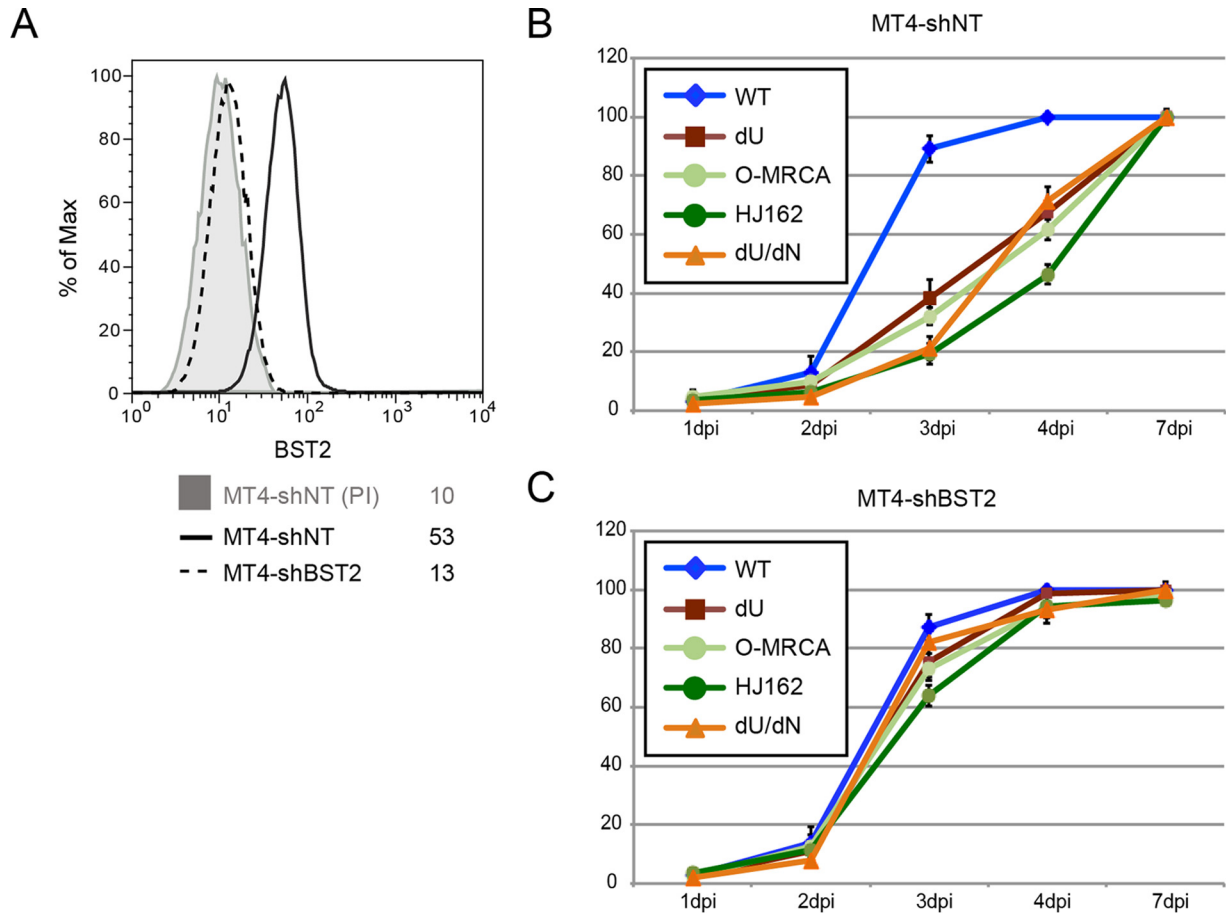


FIG 2 Group O Nefs cannot overcome BST2 restriction in viral spread assays. (A) Flow cytometry analysis of surface BST2 in control (MT4-shNT) or BST2-depleted (MT4-shBST2) cells. (B and C) MT4-shNT (B) and MT4-shBST2 (C) cells were infected with GFP-expressing NL4.3 WT and dU viruses expressing either no Nef (dN), NL4.3 Nef, or O-Nefs, as indicated ($n = 3$). A fraction of the cells was collected every day, and the percentage of GFP⁺ cells was evaluated by flow cytometry. Error bars represent standard deviations.

accumulation of the MA signal, reflecting assembling viral particles, was detected in infected MT4 and primary CD4⁺ T cells in the absence of BST2 countermeasures (Fig. 3C). While reduced levels of the MA signal were observed when either Vpu or O-Nefs were expressed, higher levels of the MA signal accumulated in the presence of O-Nef than in the presence of Vpu, reflective of the less-effective BST2 antagonism of Nefs (Fig. 3C). As shown by the flow cytometry data in Fig. 1C and D, surface BST2 levels were significantly decreased in infected MT4 and primary CD4⁺ T cells in the presence of M-Vpu and, to a lesser extent, O-Nefs (Fig. 3D). This reduction of surface BST2 levels correlated with decreased p17 accumulation at the cell periphery (Fig. 3A and C), the degree of which was commensurate with the increase in virus particle release observed in MT4 T cells (Fig. 1A and B). Interestingly, although the presence of O-Nefs reduced the levels of p17 detected at the cell periphery, the large majority of the remaining p17 localized perfectly with BST2. Indeed, no free BST2 was detected on cells infected with dU/O-Nef viruses (Fig. 3A and B), suggesting that in contrast to HIV-1 Vpu, O-Nef is unable to displace BST2 from virus budding sites.

Since Vpu is unable to downregulate and degrade the short BST2 isoform, yet can counteract it to some degree via displacement from virus assembly sites (11, 29), we next assessed if O-Nefs

could affect the distribution of short BST2 isoforms relative to assembling virions. To this end, we used a SupT1 T cell line that expresses only this isoform of BST2 (SupT1 ShortBST2). Despite the lack of downregulation of the short isoform by Vpu (Fig. 3D), we did not observe a marked accumulation of p17 staining at the periphery of SupT1 ShortBST2 cells infected with WT viruses (Fig. 3A and C). This was in sharp contrast to dU- or O-Nef-expressing HIV-infected cells, which expressed similar levels of surface BST2 but displayed a noticeable accumulation of cell-associated p17 (Fig. 3A, C, and D). Consistent with our observations of MT4 and primary CD4⁺ T cells, no significant amounts of free BST2 were detected in the absence of Vpu regardless of whether or not O-Nefs were expressed in infected SupT1 ShortBST2 cells (Fig. 3B). Overall, these results suggest that O-Nefs are unable to displace BST2 from sites of virus assembly.

Group O Nef is unable to suppress the production of IFN-I during innate sensing of HIV-1-infected cells. We previously postulated that BST2 molecules found outside sites of WT HIV assembly are free to bind and activate ILT7, a condition that reduces IFN-I production by pDCs upon contact with infected cells (11). Using ILT7⁺ NFAT-GFP reporter cells that express GFP upon ILT7 activation (Fig. 4A), we previously found that Vpu-mediated BST2 antagonism generates a pool of surface BST2 mol-

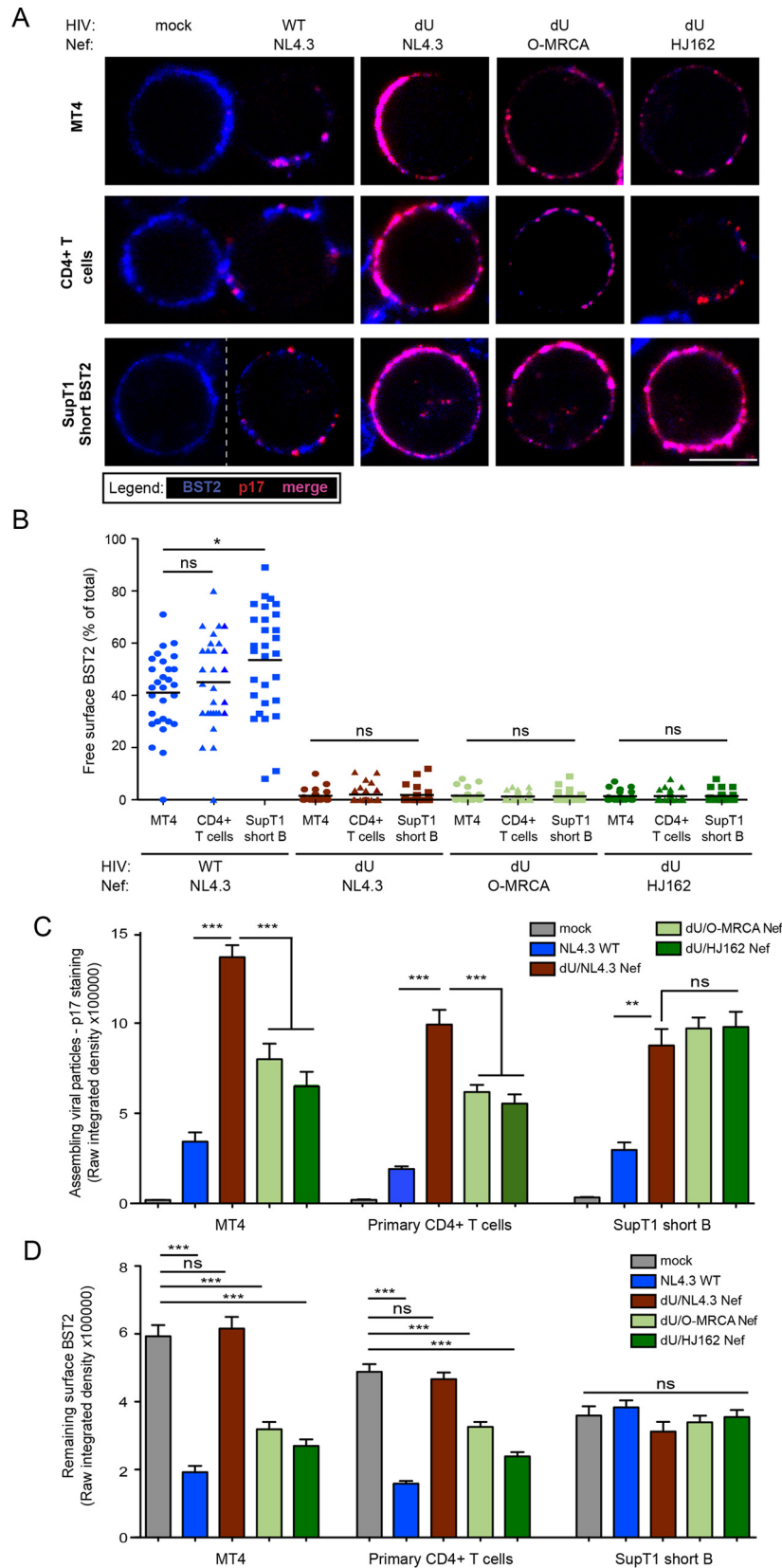


FIG 3 O-Nef, unlike M-Vpu, cannot displace BST2 from sites of virus assembly. MT4 cells, primary CD4⁺ T cells, and SupT1 ShortBST2 cells were mock infected (mock) or infected with GFP-expressing NL4.3 WT and dU viruses expressing either NL4.3 Nef or O-Nefs, as indicated. (A) Cells were stained with anti-BST2 Abs, fixed, permeabilized, and then sequentially stained with anti-p17 Abs. An uninfected cell (mock) is shown next to WT-infected cells, as indicated. Bar = 10 μ m. (B) The number of residual BST2 clusters not colocalizing with p17 (designated free BST2) per cell was calculated and expressed as the percentage of the total number of surface BST2 clusters. (C and D) The signal from assembling viral particles stained with p17 (C) or surface BST2 (D) was quantified by measuring the raw integrated signal density on manually selected cells using ImageJ software. Error bars indicate standard errors of the means after analysis of at least 50 distinct cells. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test was used (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant [$P > 0.05$]).

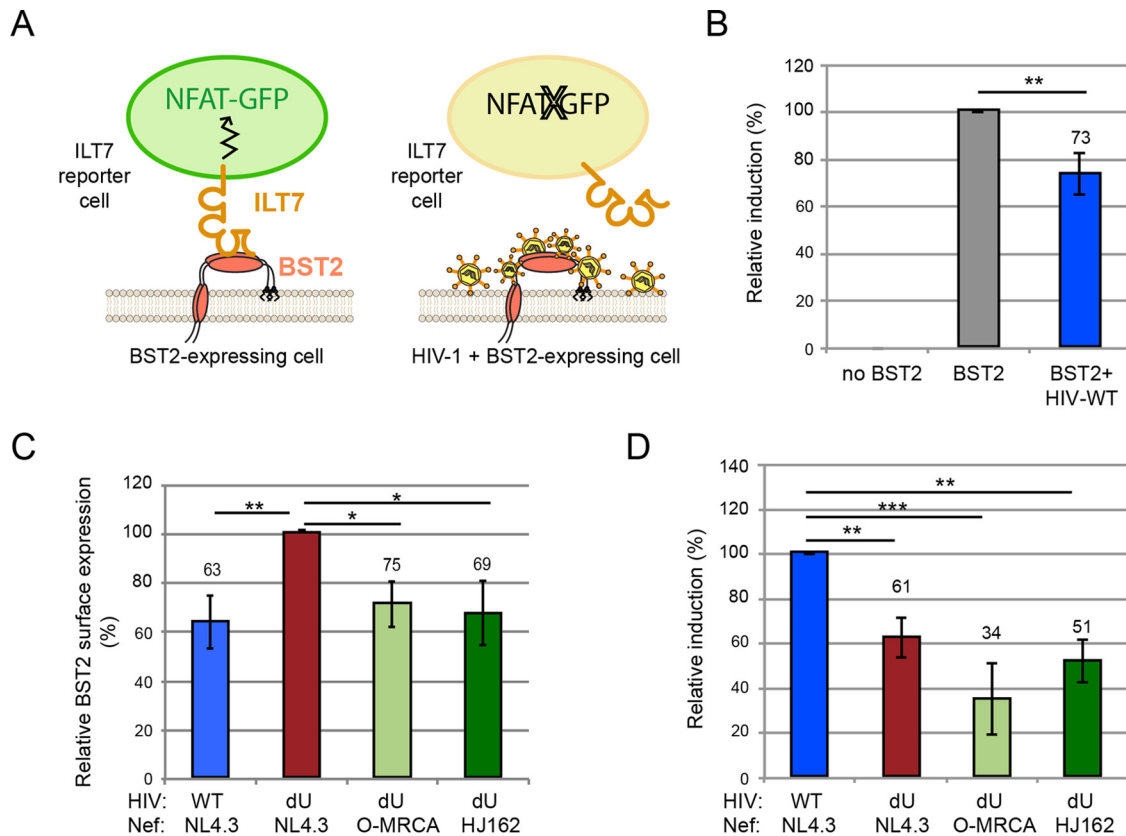


FIG 4 BST2 antagonism by group O Nefs does not lead to BST2-dependent activation of ILT7. (A) Schematic representation of the experimental ILT7 NFAT-GFP reporter coculture system. (B to D) ILT7⁺ NFAT-GFP reporter cells were cocultured with control transfected HEK293T (no BST2) or BST2-expressing HEK293T (BST2) cells that were mock transfected or cotransfected with GFP-expressing NL4.3 WT and dU proviruses expressing either NL4.3 Nef or O-Nefs, as indicated. The degrees of surface BST2 downmodulation and ILT7 activation were determined by flow cytometry. ILT7 activation was evaluated as the percentage of GFP⁺ reporter cells. (B) Percentage of ILT7 activation after coculture with the indicated HEK293T cells relative to BST2-expressing HEK293T cells (100%) ($n = 3$). (C) Relative BST2 surface expression levels in cells cotransfected with BST2 and the indicated HIV proviruses ($n = 3$). Percent mean fluorescence intensities were calculated relative to values for dU HIV-producing cells (100%). (D) Percentage of ILT7 activation after coculture with the indicated BST2-expressing HEK293T cells relative to WT NL4.3-producing HEK293T cells (100%) ($n = 3$). Repeated-measures ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test was used (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$). Error bars represent standard deviations.

ecules capable of engaging and activating ILT7 upon cell-to-cell contact (11). To examine whether the presence of O-Nef in HIV-producing cells could affect ILT7 activation through BST2, we cocultured ILT7⁺ NFAT-GFP reporter cells with control or BST2-expressing HEK293T cells cotransfected with our panel of pNL4.3 derivatives. While ILT7 activation was very effective in coculture with BST2-expressing cells, it was significantly reduced when these cells were coexpressing WT HIV, consistent with Vpu-mediated BST2 downmodulation (Fig. 3B and C). As previously reported (11), BST2⁺ HEK293T cells expressing WT HIV activated ILT7 to a higher degree than did identical cells expressing dU HIV (Fig. 4D). Despite the ability of O-Nef to downregulate surface BST2 (Fig. 4C), BST2⁺ HEK293T cells expressing dU/O-Nef HIV were the least potent activators of the ILT7 reporter cell line (Fig. 4D). In this context, it is expected that a large proportion of the remaining surface BST2 molecules are engaged in restricting progeny viruses, as shown in Fig. 3A.

We next examined the role of O-Nefs during innate sensing of infected T cells by PBMCs, a system where innate sensing and IFN-I production were almost entirely dependent on the presence of pDCs (11, 42). MT4 T cells were infected with GFP-encoding

NL4.3 WT and dU viruses expressing M-Nefs (NL4.3) or O-Nefs. In these experiments, we also introduced a dU NL4.3 virus encoding Nef genes belonging to HIV-1 group M and N MRCA. Infected MT4 T cell populations with a similar percentage of infected cells (GFP⁺ cells) were cocultured with freshly isolated human PBMCs for 18 to 24 h, and the level of IFN-I production in the culture supernatant was measured (Fig. 5A). Consistent with previously reported results (11, 42), IFN-I was very efficiently detected only after coculture of infected T cells with PBMCs (Fig. 5B and C). Analysis of innate sensing of HIV-1-infected cells by PBMCs from different donors revealed that the presence of Vpu in infected donor cells led to a significant reduction of IFN-I production (Fig. 5C). In agreement with the lack of free surface BST2 potentially accessible for interaction with ILT7 in MT4 cells infected with dU virus expressing O-MRCA or contemporary Nefs (Fig. 3), no reduction of IFN-I production was observed when these infected cells were cocultured with PBMCs. Similar results were obtained when MT4 cells were infected with dU viruses expressing M-MRCA and N-MRCA Nef proteins (Fig. 5B and C), thus highlighting the lack of activity of these Nef variants.

Collectively, these results suggest that O-Nef cannot act in con-

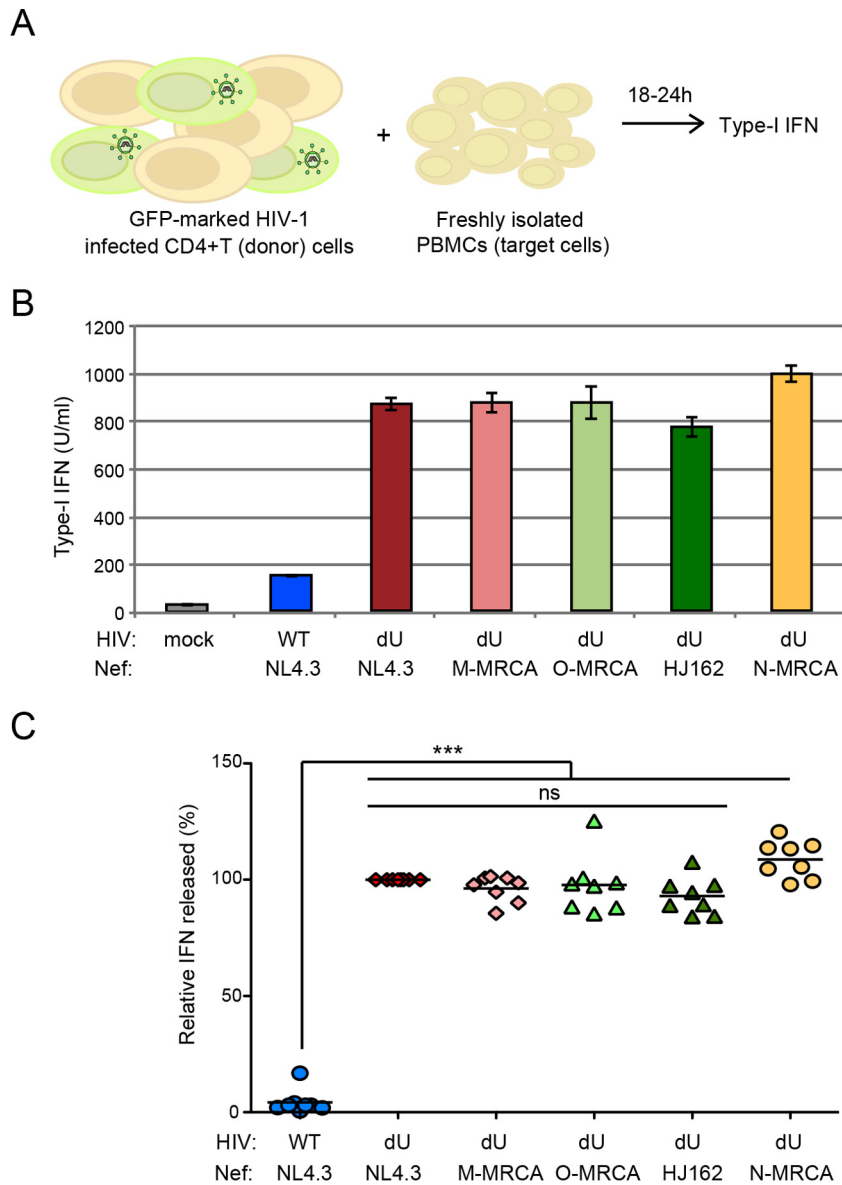


FIG 5 Group O Nefs cannot attenuate innate sensing of infected cells by pDC-containing PBMCs. (A) Schematic representation of the experimental system. WT or dU HIV-infected T cells were cocultured with freshly isolated PBMCs, and levels of bioactive IFN-I released into the supernatants were measured 18 to 24 h later. (B and C) MT4 T cells were mock infected or infected with GFP-expressing NL4.3 WT or dU viruses expressing either NL4.3 Nef, M-MRCA Nef, O-Nefs, or N-MRCA Nef, as indicated, and cell populations harboring similar percentages of infected T cells were cocultured with PBMCs. After 24 h of coculture, levels of IFN-I released into the supernatants were measured. Representative examples of absolute levels (B) and relative percentages (C) of IFN-I detected after coculture of HIV-1-infected MT4 donor cells with PBMCs ($n = 8$) are shown. The amount of IFN-I released by PBMCs in contact with dU/NL4.3 Nef-infected cells was set at 100%. Repeated-measures ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test was used (***, $P < 0.001$; ns, not significant [$P > 0.05$]). Error bars represent standard deviations.

junction with ILT7 to suppress the production of IFN-I triggered upon the sensing of HIV-1-infected cells by PBMCs. Indeed, O-Nef, unlike M-Vpu, is unable to displace BST2 from sites of virus budding and consequently cannot generate a pool of surface BST2 with the capacity to engage and activate ILT7 upon cell contacts between infected cells and pDCs.

DISCUSSION

Genetic and functional evidence strongly suggests that the ability of lentiviruses to counteract BST2 represents a critical property for viral transmission *in vivo* (6, 14). However, despite the fact that

HIV-1 group O strains account for infections of 100,000 individuals, mostly in western central Africa (22), several reports suggested that these viruses failed to evolve an effective antagonist of human BST2 (6, 20). Recent functional analyses of group O Nef proteins in transient-expression model systems as well as in infected primary CD4⁺ T cells revealed that HIV-1 group O strains have evolved the ability to counteract human BST2 through Nef (21). In the present study, we confirmed that HIV-1 group O MRCA and contemporary Nefs reduce the cell surface expression of BST2 and enhance virus particle release (Fig. 1). We further

show that despite having the capacity to mediate the release of significant amounts of virus, O-Nefs are unable to efficiently overcome the BST2 restriction imposed on viral spread in CD4⁺ MT4 T cells at a low initial virus input (Fig. 2). In contrast to M-Vpu, O-Nefs do not appear to displace short BST2 away from sites of viral assembly, and as a result, cell surface BST2 molecules not colocalizing with assembling viruses (free BST2) are not detected at the surface of infected CD4⁺ T cells (Fig. 3). Hence, O-MRCA and contemporary Nefs do not allow BST2-dependent activation of the pDC-inhibitory receptor ILT7 (Fig. 4) to suppress IFN-I production by pDCs during innate sensing of HIV-infected T cells (Fig. 5). Thus, in contrast to M-Vpu, O-Nefs are unable to activate the BST2/ILT7-dependent negative-feedback pathway that impedes the IFN-I response by pDCs. These distinctive features of BST2 counteraction by O-Nefs may play a role in the limited spread of HIV-1 group O strains in the human population compared to the predominant group M viruses.

Our data showing that O-Nefs downregulate human BST2 and enhance the release of virus particles in MT4 T cells are consistent with previously reported observations and indeed confirm that during adaptation to human hosts, O-Nefs have gained activity against human BST2. However, the degree to which it counteracted human BST2, as measured by surface BST2 downregulation or virus particle release, was reduced compared to that for Vpu. Indeed, our analysis of viral spread at a low virus input, a condition that likely reflects the environment prevailing during early stages following HIV transmission (the “eclipse period”), revealed that O-Nef-expressing viruses are spreading with reduced kinetics compared to those of Vpu-expressing viruses; in fact, their spread is more comparable to that of Vpu-defective viruses. These results suggest that despite the ability of O-Nef to enhance virus particles, the amounts of released viruses for cell-free virus transmission remain quantitatively limited in the initial rounds of infection. Kluge and colleagues (21) found that in primary CD4⁺ T cells pretreated with type I IFN (which enhances surface BST2 levels and restriction), viruses expressing M-Vpu or O-Nef proteins replicated with near-identical kinetics and released very similar amounts of virus at late time points after infection. However, at early time points (3 days postinfection [dpi]), significantly less virus was produced from cultures infected with O-Nef-expressing viruses than from those infected with M-Vpu-expressing viruses. Thus, our findings in MT4 cells are consistent with the results of Kluge and colleagues in primary CD4⁺ T cells except that the delay of O-Nef-expressing virus spread at early time points seems to be amplified in MT4 cells. Indeed, similar to our findings in MT4 cells lacking BST2, no significant difference in virus production was observed in the context of primary CD4⁺ T cells infected with viruses expressing M-Vpu or O-Nef in the absence of type I IFN pretreatment, a condition where primary CD4⁺ T cells express very low basal levels of BST2. Thus, O-Nefs appear to be less effective at overcoming BST2-dependent restriction of viral spread, especially under conditions where BST2 is highly expressed.

Group O strains emerged relatively early in the HIV pandemic, alongside group M, suggesting that this group had fair opportunities to disseminate, as group M did. Its limited spread among the population could be due to viral and/or host factors (43). Relative to group M, many infection parameters in HIV-1 group O-infected patients remain largely understudied. During prototypical disease progression in individuals infected with HIV-1 group M, neutralization escape variants are generated, and infecting CCR5

viruses (R5) switch tropism to CXCR4 (X4) or dual-tropic viruses. This change in tropism is followed by a marked depletion of CD4⁺ T cells, an increase in the plasma viral load, and poor disease prognosis. Data from a small number of studied cases of group O infection suggest a disease course and pathogenesis similar to those reported previously for group M infection (44, 45). Nonetheless, tropism studies revealed a significant R5 prevalence even during late stages of infection (46). The coreceptor switch from R5 to X4 may be uncommon within this group and could imply that group O-infected patients potentially progress to disease more slowly than do group M-infected patients, and indeed, some of these patients could behave as long-term nonprogressors (47). HIV-1 group O is the least fit among all HIV types and groups. HIV-1 group M was found to be typically 100-fold more fit than group O in cell culture (48). The reduced replication and transmission fitness were proposed to be responsible for the low prevalence and limited geographical spread of HIV-1 group O in the human population. Whether the reduced transmission fitness of HIV-1 group O could be due in part to its limited capacity to overcome BST2, as shown by our *in vitro* observations, remains a reasonable possibility. Even though HIV-1 group O Nef is capable of facilitating virus particle release by targeting essentially long BST2 isoforms, it is unable to downregulate short BST2 molecules from the cell surface (21) or displace them from sites of viral assembly, as shown by our surface BST2-p17Gag colocalization studies. This attribute of O-Nef proteins may be responsible for the inefficient viral spread observed *in vitro* under conditions of limiting virus input. Previous studies using humanized mice suggested that BST2 antagonism by Vpu facilitated HIV-1 replication and propagation *in vivo*, in particular during early stages following infection, where transmission by cell-free virus may play a critical role (4, 5). In contrast to M-Vpu, O-Nef may not be effective at promoting the initial burst of viral proliferation and expansion that is most likely necessary to enable dissemination to local lymphoid tissues and the establishment of systemic infection (49).

pDCs constitute a major source of IFN-I production during acute HIV infection, and their activation results primarily from TLR7-mediated sensing of HIV-infected cells (11, 42, 50). We previously proposed a mechanism of innate immune evasion whereby M-Vpu mediates the activation of a BST2/ILT7-dependent negative-feedback pathway that normally impedes the IFN-I response when pDCs are activated (11). This mechanism is dependent on Vpu's ability to displace surface BST2 molecules, in particular the short isoforms, away from sites of viral assembly where they would be free to engage and activate the pDC-inhibitory receptor ILT7 upon cell-to-cell contacts. The mechanism of BST2 displacement by Vpu was shown to involve a physical association of the two proteins through their respective TMDs as well as a highly conserved dileucine sorting motif (ExxxLV, where x represents any amino acid) in the Vpu cytoplasmic domain capable of binding the major cellular clathrin adaptor proteins AP1 and AP2 (29, 31, 51, 52). Data from our surface BST2-p17Gag colocalization analysis suggest that the mechanism underlying human BST2 antagonism by O-Nefs does not involve a displacement of surface BST2 molecules from sites of virus budding, even though a highly conserved dileucine motif (ExxxLL) in O-Nef was found to be required for human BST2 counteraction (21). Thus, in contrast to Vpu, it appears that O-Nefs have not evolved any activity to counteract surface BST2 molecules that are resistant to downregulation, such as the short isoform. While short BST2 retains an intact

TMD required to bind Vpu, it lost the determinants required to bind O-Nef. Indeed, Kluge and colleagues mapped the O-Nef binding site to a region of the cytoplasmic tail of BST2, which is missing in short BST2, thus providing a rationale as to why O-Nefs do not antagonize short BST2 (21). Therefore, the absence of a physical association between O-Nef and short BST2 is likely to explain the lack of exclusion of short BST2 from virus budding sites and the almost undetectable levels of free cell surface BST2 capable of interacting with the pDC-inhibitory receptor ILT7. Consistent with these findings, the presence of O-Nefs in virus-producing cells did not induce BST2-dependent ILT7 activation or suppress IFN-I production by pDC-containing PBMCs during innate sensing of HIV-infected T cells. These findings highlight the crucial role of surface BST2 displacement in the modulation of the pDC IFN-I response via ILT7.

The lack of activation of the BST2/ILT7-dependent negative-feedback pathway by O-Nefs is expected to make infected cells more prone to triggering the release of IFN-I by pDCs during innate sensing. It is thus tempting to speculate that the absence of disease progression or effective control of pDC antiviral responses by HIV-1 group O strains during early stages following HIV transmission may have also contributed to their reduced transmission fitness. Indeed, studies in humanized mice demonstrated that the depletion of pDCs prior to HIV-1 infection prevented the induction of IFN-I and increased viral replication and dissemination (50). Furthermore, manipulation of IFN signaling in rhesus macaques during SIV transmission and acute infection via IFN receptor blockade or IFN- α 2a administration was found to condition the local environment for the expression of antiviral genes and influence the establishment of systemic infection and disease progression (53). Enhanced IFN-I production by pDCs during the initial phase of infection is well known to condition the local environment for the expression of IFN-stimulating genes (including BST2), thus further affecting transmission fitness and viral spread *in vivo* (53).

The antiviral functions of BST2 go beyond simply restricting virus particle release and limiting viral spread in contexts where cell-free virus transmission is critical. It is also important to consider the role of BST2 in modulating many immune effector functions, including the control of IFN-I production by pDCs through ILT7, the activation of proinflammatory NF- κ B signaling, as well as its effects on antibody opsonization. Clearly, a better understanding of the repertoire of BST2 antiviral activities and how these activities are counteracted by primate immunodeficiency virus antagonists will provide important insights into virus-host interactions governing viral transmission fitness and pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fadi Hajjar for technical support; Robert Lodge, Scott Sugden, and Chris Leeks for helpful discussions; W. Todd Farmer for assistance and support with ImageJ analysis; E. Massicotte for assistance with flow cytometry; the IRCM clinic staff; and all volunteers for providing blood samples. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program: Sup-T1 from D. Ablashi, MT4 from D. Richman, and raltegravir (catalog number 11680) from Merck & Company, Inc.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-111226, by Canadian HIV Cure Enterprise grant HIG-133050 from the CIHR partnership with CANFAR and IAS, and by a grant from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS) to E.A.C.

E.A.C. is the recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV Research. F.K. is supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), a European FP7 Hit Hidden HIV grant (305762), and an Advanced ERC Investigator grant.

REFERENCES

- Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 4:694–709. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00129.x>.
- Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425–430. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06553>.
- Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.001>.
- Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad E, Cohen EA. 2013. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10:128. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-128>.
- Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, Koyanagi Y. 2012. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J Virol* 86:5000–5013. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.07062-11>.
- Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayoub A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatzioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409–421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.10.004>.
- Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen EA. 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4⁺ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11:15. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-11-15>.
- Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, Rakasz EG, Evans DT. 2014. Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6425–6430. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1321507111>.
- Alvarez RA, Hamlin RE, Monroe A, Moldt B, Hotta MT, Rodriguez Caprio G, Fierer DS, Simon V, Chen BK. 2014. HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells. *J Virol* 88:6031–6046. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00449-14>.
- Galao RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ. 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by tetherin induces NF- κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* 12:633–644. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.007>.
- Bego MG, Cote E, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen EA. 2015. Vpu exploits the cross-talk between BST2 and the ILT7 receptor to suppress anti-HIV-1 responses by plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* 11:e1005024. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005024>.
- Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang YH, Shaw JL, Du Q, Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu YJ. 2009. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 206:1603–1614. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090547>.
- Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006841. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>.
- Sauter D, Specht A, Kirchhoff F. 2010. Tetherin: holding on and letting go. *Cell* 141:392–398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.022>.
- Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, Fofana IB, Johnson WE, Westmoreland S, Evans DT. 2009. Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. *PLoS Pathog* 5:e1000429. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000429>.
- Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, Johnson MC, Munch J, Kirchhoff F, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2009. Nef proteins

- from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe* 6:54–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.008>.
17. Sauter D, Unterwieser D, Vogl M, Usmani SM, Heigele A, Kluge SF, Hermkes E, Moll M, Barker E, Peeters M, Learn GH, Bibollet-Ruche F, Fritz JV, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2012. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. *PLoS Pathog* 8:e1003093. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003093>.
 18. Le Tortorec A, Neil SJ. 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J Virol* 83:11966–11978. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01515-09>.
 19. Vigan R, Neil SJ. 2011. Separable determinants of subcellular localization and interaction account for the inability of group O HIV-1 Vpu to counteract tetherin. *J Virol* 85:9737–9748. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00479-11>.
 20. Yang SJ, Lopez LA, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM. 2011. Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 group O and P. *Retrovirology* 8:78. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-78>.
 21. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH, Usmani SM, Sauter D, Joas S, Hotter D, Bibollet-Ruche F, Plenderleith LJ, Peeters M, Geyer M, Sharp PM, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2014. Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe* 16:639–650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.002>.
 22. Mourez T, Simon F, Plantier JC. 2013. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev* 26:448–461. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00012-13>.
 23. Cocka LJ, Bates P. 2012. Identification of alternatively translated tetherin isoforms with differing antiviral and signaling activities. *PLoS Pathog* 8:e1002931. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002931>.
 24. Neil SJ. 2013. The antiviral activities of tetherin. *Curr Top Microbiol Immunol* 371:67–104. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5_3.
 25. Zhang F, Landford WN, Ng M, McNatt MW, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2011. SIV Nef proteins recruit the AP-2 complex to antagonize tetherin and facilitate virion release. *PLoS Pathog* 7:e1002039. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002039>.
 26. Serra-Moreno R, Zimmermann K, Stern LJ, Evans DT. 2013. Tetherin/BST-2 antagonism by Nef depends on a direct physical interaction between Nef and tetherin, and on clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Pathog* 9:e1003487. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003487>.
 27. Lau D, Kwan W, Guatelli J. 2011. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. *J Virol* 85:9834–9846. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02633-10>.
 28. Weinelt J, Neil SJ. 2014. Differential sensitivities of tetherin isoforms to counteraction by primate lentiviruses. *J Virol* 88:5845–5858. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03818-13>.
 29. McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD. 2013. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog* 9:e1003299. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003299>.
 30. Lewinski MK, Jafari M, Zhang H, Opella SJ, Guatelli J. 2015. Membrane anchoring by a C-terminal tryptophan enables HIV-1 Vpu to displace bone marrow stromal antigen 2 (BST2) from sites of viral assembly. *J Biol Chem* 290:10919–10933. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.630095>.
 31. Pujol FM, Laketa V, Schmidt F, Mukenhirn M, Muller B, Boulant S, Grimm D, Keppeler OT, Fackler OT. 2016. HIV-1 Vpu antagonizes CD317/tetherin by adaptor protein-1-mediated exclusion from virus assembly sites. *J Virol* 90:6709–6723. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00504-16>.
 32. Bego MG, Dube M, Mercier J, Cohen EA. 2009. Effect of calcium-modulating cyclophilin ligand on human immunodeficiency virus type 1 particle release and cell surface expression of tetherin. *J Virol* 83:13032–13036. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01786-09>.
 33. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, Cohen EA. 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog* 6:e1000856. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000856>.
 34. Dube M, Paquay C, Roy BB, Bego MG, Mercier J, Cohen EA. 2011. HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface. *Traffic* 12:1714–1729. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01277.x>.
 35. Zazopoulos E, Haseltine WA. 1992. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 El1 Nef function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6634–6638. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.14.6634>.
 36. Ablashi DV, Berneman ZN, Kramarsky B, Whitman J, Jr, Asano Y, Pearson GR. 1995. Human herpesvirus-7 (HHV-7): current status. *Clin Diagn Virol* 4:1–13. [http://dx.doi.org/10.1016/0928-0197\(95\)00005-S](http://dx.doi.org/10.1016/0928-0197(95)00005-S).
 37. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL, Liu YJ. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 203:1399–1405. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20052454>.
 38. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Mercier J, Binette J, Leung G, Cohen EA. 2009. Suppression of tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J Virol* 83:4574–4590. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01800-08>.
 39. Bego MG, Mercier J, Cohen EA. 2012. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *J Virol* 86:3513–3527. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06971-11>.
 40. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526:218–223. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15400>.
 41. Rosa A, Chande A, Ziglio A, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M. 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526:212–217. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15399>.
 42. Lepelletier A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, Chaperot L, Plumas J, Randall RE, Si-Tahar M, Mammato F, Albert ML, Schwartz O. 2011. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog* 7:e1001284. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001284>.
 43. Bush S, Tebit DM. 2015. HIV-1 group O origin, evolution, pathogenesis, and treatment: unraveling the complexity of an outlier 25 years later. *AIDS Rev* 17:147–158.
 44. Nkengasong JN, Fransen K, Willems B, Karita E, Vingerhoets J, Kestens L, Colebunders R, Piot P, van der Groen G. 1997. Virologic, immunologic, and clinical follow-up of a couple infected by the human immunodeficiency virus type one, group O. *J Med Virol* 51:202–209.
 45. Mas A, Quinones-Mateu E, Soriano V, Domingo E. 1996. Env gene characterization of the first HIV type 1 group O Spanish isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1647–1649. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.1996.12.1647>.
 46. Dittmar MT, Zekeng L, Kaptue L, Eberle J, Krausslich HG, Gurtler L. 1999. Coreceptor requirements of primary HIV type 1 group O isolates from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:707–712. <http://dx.doi.org/10.1089/088922299310791>.
 47. Buckheit RW, III, Sexauer SB, Sedaghat AR, Wilke CO, Laeyendecker O, Basseth CR, Blankson JN. 2014. Long-term control of viral replication in a group O, human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30:511–513. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2014.0054>.
 48. Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. 2005. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 79:8979–8990. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.14.8979-8990.2005>.
 49. Haase AT. 2010. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464:217–223. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08757>.
 50. Li G, Cheng M, Nunoya J, Cheng L, Guo H, Yu H, Liu YJ, Su L, Zhang L. 2014. Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog* 10:e1004291. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004291>.
 51. Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J, Xiong Y. 2014. Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *eLife* 3:e02362. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.02362>.
 52. Kueck T, Foster TL, Weinelt J, Sumner JC, Pickering S, Neil SJ. 2015. Serine phosphorylation of HIV-1 Vpu and its binding to tetherin regulates interaction with clathrin adaptors. *PLoS Pathog* 11:e1005141. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005141>.
 53. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Sharp GK, Boritz E, Levin D, Wijeyesinghe S, Makamdop KN, del Prete GQ, Hill BJ, Timmer JK, Reiss E, Yarden G, Darko S, Contijoch E, Todd JP, Silvestri G, Nason M, Norgren RB, Jr, Keele BF, Rao S, Langer JA, Lifson JD, Schreiber G, Douek DC. 2014. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511:601–605. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13554>.