

Université de Montréal

Impact du petit inhibiteur temsavir sur la conformation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Par
Marianne Boutin

Département de microbiologie et immunologie
Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc) en
microbiologie et immunologie

Mai 2023

© Marianne Boutin, 2023

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

Impact du petit inhibiteur temsavir sur la conformation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Présenté par
Marianne Boutin

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Marylise Duperthuy
Présidente-rapporteuse

Andrés Finzi
Directeur de recherche

Laurent Chatel-Chaix
Membre du jury

George Szatmari
Représentant du doyen

RÉSUMÉ

Un obstacle important dans l'éradication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est l'établissement de réservoirs viraux où le virus reste à l'état latent ainsi que l'absence de vaccin efficace. Bien que les molécules antivirales actuelles permettent d'augmenter l'espérance de vie des personnes vivant avec le VIH-1 (PLWH) ainsi que de diminuer la réplication virale chez celles-ci, elles ne contribuent pas à l'élimination de ces réservoirs. La hausse de résistance envers ces molécules inhibitrices nécessite le développement constant de nouvelles molécules. L'une d'entre elles, temsavir (BMS-626529), est un nouvel inhibiteur d'attachement approuvé par la FDA depuis 2020. Sa cible, la glycoprotéine d'enveloppe (Env), est le seul antigène viral présent à la surface des cellules infectées et des virions, représentant donc la cible idéale des anticorps. L'Env mature se trouve sous forme d'hétérodimère (gp120 et gp41) suite au clivage de son précurseur gp160. Temsavir lie sous la boucle β 20- β 21 de la gp120 et prévient donc, par compétition, l'interaction entre l'Env et le récepteur CD4 de l'hôte. En plus de son rôle en tant qu'inhibiteur d'attachement, temsavir permet de stabiliser le trimère dans sa conformation dite «fermée». Un ancien analogue de temsavir, BMS-806, a montré réduire l'addition de glycans ainsi que de diminuer le clivage du précurseur gp160. Nos études démontrent que temsavir possède également un impact sur ces mécanismes impliqués dans la maturation et la flexibilité de l'Env de plusieurs souches du VIH-1. De ce fait, nous avons investigué l'effet de cette altération sur la conformation des différentes Env. Nos observations montrent que l'effet de temsavir sur le clivage protéolytique est associé à une diminution de la reconnaissance de l'Env par des anticorps ciblant différentes régions de celle-ci. Cette modification de la reconnaissance de l'Env est également associée à l'efficacité de la réponse cytotoxique cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) à éliminer les cellules infectées. Les résultats présentés dans ce mémoire, notamment l'effet de temsavir sur la conformation de l'Env, devrait être considéré lors du développement d'immunothérapies ciblant le réservoir viral.

Mots-clés : VIH-1, glycoprotéine d'enveloppe (Env), temsavir (BMS-626529), anticorps, glycosylation, clivage protéolytique.

ABSTRACT

An important obstacle in the eradication of the human immunodeficiency virus (HIV-1) is the establishment of viral reservoirs where the virus remains in a latent state and the absence of a potent vaccine. Although current antiretroviral molecules increase the life expectancy of people living with HIV-1 (PLWH) as well as reduce viral replication, they do not contribute to the elimination of these reservoirs. Also, the increase in drug resistances towards these inhibitory molecules requires the constant development of new molecules. One of them, temsavir (BMS-626529), is a new attachment inhibitor approved by the FDA since 2020. Its target, the envelope glycoprotein (Env), is the only viral antigen present at the surface of infected cells and virions and thus, is also the main target of antibodies. This mature Env consists of three gp120-gp41 heterodimers after the proteolytic cleavage of its gp160 precursor. Temsavir binds under the β 20- β 21 loop of gp120 and prevents the interaction between Env and the host CD4 receptor. In addition to its role as an attachment inhibitor, temsavir stabilizes the trimer in its "closed" conformation. A previous analog of temsavir, BMS-806, has been shown to affect the addition of glycans as well as the cleavage of the gp160 precursor. Our studies demonstrate that temsavir also has an impact on these mechanisms involved in the maturation and flexibility of Env of several strains of HIV-1. Therefore, we investigated the effect of this alteration on the conformation of different Env. Our observations showed that the effect of temsavir on proteolytic cleavage is associated with a decrease in Env recognition by antibodies targeting different regions of Env. This modification in Env recognition also appears to be associated with the efficacy of antibody to mediate potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against infected-cells. The results presented in this master thesis, should be considered when developing immunotherapies aimed at targeting the viral reservoir in Fostemsavir-treated individuals.

Keywords : HIV-1, envelope glycoprotein (Env), temsavir (BMS-626529), antibodies, glycosylation, proteolytic cleavage.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE I - INTRODUCTION	1
1. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	1
1.1 Classification du VIH-1	1
1.2 Épidémiologie	1
1.3 Phases d'infection du VIH-1 et progression vers le SIDA	2
1.4 Structure de la particule virale du VIH-1.....	4
1.5 Organisation génomique	5
1.6 Cycle réplcatif.....	6
1.7 Facteurs de restrictions	9
1.8 Protéines accessoires.....	11
1.9 Les glycoprotéines d'enveloppe virales	13
1.10 Anticorps neutralisants et non-neutralisants	16
1.11 Fonctions effectrices des anticorps	19
1.12 Traitements.....	20
CHAPITRE II – JUSTIFICATION ET HYPOTHÈSE	24
CHAPITRE III – ARTICLES	26
ARTICLE #1: Temsavir Treatment of HIV-1-Infected Cells Decreases Envelope Glycoprotein Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies	26
3.1.1 RÉSUMÉ	27
3.1.2 ABSTRACT	27
3.1.3 MAIN TEXT	28
3.1.4 ACKNOWLEDGMENTS.....	37
3.1.5 REFERENCES.....	38
3.1.6 SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS	41
3.1.7 REFERENCES.....	46
ARTICLE #2: Temsavir modulates HIV-1 Envelope conformation by decreasing its proteolytic cleavage	47
3.2.1 RÉSUMÉ	48
3.2.2 ABSTRACT	48
3.2.3 INTRODUCTION.....	48
3.2.4 MATERIALS AND METHODS	50
3.2.5 RESULTS	55
3.2.6 DISCUSSION	62
3.2.7 REFERENCES.....	66

3.2.8 SUPPLEMENTARY	71
<i>CHAPITRE IV - DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i>	75
4.1 Résumé des nouvelles connaissances.....	75
4.2 Implication de temsavir sur la glycosylation.....	77
4.3 Implication de temsavir sur le clivage protéolytique	79
4.4 Implication de la queue cytoplasmique sur l'effet de temsavir	79
4.5 Les multiples fonctions de l'inhibiteur d'attachement temsavir.....	80
4.6 Impact de temsavir sur les différentes souches du VIH-1.....	82
4.7 La différence entre temsavir et les autres inhibiteurs d'entrée virale ciblant la gp120	83
4.8 Limites de l'étude.....	84
4.9 Les perspectives futures	85
4.10 Conclusion.....	86
<i>CHAPITRE V - RÉFÉRENCES</i>	87
<i>CHAPITRE VI – ANNEXE</i>	107
Liste des articles additionnels auxquels la candidate a contribué au cours de ses études de maîtrise	107

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Figure 1.1 - Infection naturelle par le VIH-1 et progression vers la phase SIDA

Figure 1.2 - Structure de la particule virale du VIH-1

Figure 1.3 - Organisation provirale du VIH-1

Figure 1.4 - Processus d'entrée virale du VIH-1

Figure 1.5 - Cycle répliatif du VIH-1

Figure 1.6 - Composition de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1

Figure 1.7 - Site de liaison des différents anticorps sur l'Env du VIH-1

Figure 1.8 - Interaction entre temsavir (BMS-626529) et la gp120 de l'Env du VIH-1

CHAPITRE III – ARTICLES

ARTICLE #1: Temsavir Treatment of HIV-1-Infected Cells Decreases Envelope Glycoprotein Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies

Figure 3.1.1 - Temsavir alters Env glycosylation, cleavage, and bNAb binding.

Figure 3.1.2 - Impact of temsavir treatment on the recognition and elimination of infected primary CD4⁺ T cells by ADCC.

Figure 3.1.S1 - Temsavir's effect on Env glycosylation and ligand binding at different concentrations.

Figure 3.1.S2 - Normalization of cell surface Env expression by anti-gp41 MPER 10E8 bNAb.

Figure 3.1.S3 - Impact of temsavir treatment on the recognition of the Env S375W mutant by bNAbs.

ARTICLE #2: Temsavir modulates HIV-1 Envelope conformation by decreasing its proteolytic cleavage

Figure 3.2.1 - Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition.

Figure 3.2.2 - Temsavir modifies glycosylation and processing of HIV-1 Env.

Figure 3.2.3 - Temsavir treatment affects Env recognition by bNAbs.

Figure 3.2.4 - Temsavir modifies recognition of HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells by bNAbs.

Figure 3.2.5 - Impact of temsavir on ADCC responses mediated by selected bNAbs.

Figure 3.2.S1 - Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition of CH058 and CH077 Envs at the surface of HEK 293T cells.

Figure 3.2.S2 - Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition of CH058 and CH077 Envs at the surface of primary CD4⁺ T cells.

Figure 3.2.S3 - Temsavir treatment does not affect ligand recognition for the resistant-mutants Env_{S375W} and Env_{S375W CI-}.

Figure 3.2.S4 - Effect of temsavir on Env cleavage.

Table 3.2.S1 - Half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of multiples HIV-1 strains by temsavir.

CHAPITRE IV – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Figure 4.1 - Corrélation entre le niveau de reconnaissance de l'Env par les anticorps ainsi que leur capacité à éliminer les cellules infectées par ADCC.

Figure 4.2 - Effet de temsavir sur la glycosylation à la surface des cellules exprimant l'Env

Figure 4.3 - L'effet de temsavir sur la reconnaissance des anticorps sur l'Env de JRFL ΔCT et JRFL ΔCT CI-.

Figure 4.4 - Impact de temsavir sur la reconnaissance de l'Env par des plasmas provenant d'individus infectés par le VIH-1.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ADCML	Lyse par le complément dépendante des anticorps (antibody-dependent complement-mediated lysis)
ADCP	Phagocytose dépendante des anticorps (antibody-dependant cellular phagocytosis)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP1	Protéine activatrice 1 (Activator protein 1)
AP-2	Complexe de protéines adaptatrices de la clathrine 2 (Adaptor Protein 2)
APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
bNAbs	Anticorps neutralisant à large spectre (Broadly neutralizing antibody)
BST-2	Bone marrow stromal antigen 2
β -TrCP	Beta-transducin repeat containing protein
CA	Capside virale
CCDC137	Coiled-coil domain containing 137
CCR	Récepteur de chimiokine C-C (C-C chemokine receptor)
CD	Cluster de différenciation
CD4BS	Site de liaison à CD4 (CD4 binding site)
CD4i	Induits par CD4 (CD4-induced)
CD4mc	Mimétique moléculaire de CD4 (CD4 mimetic compound)
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CoRBS	Site de liaison au corécepteur (Coreceptor binding site)
CRF	Forme recombinante en circulation (circulating recombinant form)
CT	Cytoplasmic tail (Queue cytoplasmique)
CXCR	Récepteur de chimiokine C-X-C (C-X-C chemokine receptor)
DCAF1	DDB1 and CUL4 associated factor 1
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecular-3-grabbing non-integrin

dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
Env	Glycoprotéines d'enveloppe virale
ERAD	Système de dégradation de protéines associé au réticulum endoplasmique (ER-associated protein degradation)
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Fc	Fragment cristallisable
FcR	Récepteur Fc
FcγR	Récepteur Fc des immunoglobulines G
FDA	Food and Drug Administration
Gag	Group-Specific Antigen
GBP5	Guanylate binding protein 5
GPI	Glycosylphosphatidilinositol
gp41	Glycoprotéine d'enveloppe de 41 KDa
gp120	Glycoprotéine d'enveloppe de 120 KDa
gp160	Glycoprotéine d'enveloppe de 160 KDa
HEK	Human embryonic kidney
HR1	Helical heptad repeat 1
HR2	Helical heptad repeat 2
Ig	Immunoglobuline
IMC	Clone moléculaire infectieux (Infectious molecular clone)
IN	Intégrase
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor
LLP	Peptide lytique lentiviral (Lentiviral lytic peptide)
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MAC	Complexe d'attaque membranaire (Membrane attack complex)
mAb	Anticorps monoclonal (monoclonal antibody)
μL	microlitre
MPER	Membrane-proximal external region
nnAbs	Anticorps neutralisants
NC	Nucléocapside

Nef	Negative factor
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
NRTI	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (Nucleoside reverse transcriptase inhibitor)
NNRTI	Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor)
ONUSIDA	Programme commun de l'Organisation des Nations Unis sur le VIH/SIDA
p6	Protéine de 6 kDa
PF	Peptide de fusion
PI	Inhibiteur de protéase
PIC	Complexe de préintégration (Pre-Integration Complex)
PLWH	People living with HIV-1 (Personnes vivant avec le VIH-1)
Pol	Polymérase
PR	Protéase
Pr55Gag	Précurseur Gag de 55 kDa
Pr160Gag-Pol	Précurseur Gag-Pol de 160 kDa
PS	Peptide signal
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
Rev	Regulator of expression of virion proteins
RRE	Élément de réponse à Rev (Rev-responsive element)
RT	Transcriptase inverse (Reverse transcriptase)
RTC	Complexe de rétrotranscription (Reverse transcription complex)
SAMHD1	Sterile Alpha Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	Virus d'immunodéficience simienne (simian immunodeficiency virus)
smFRET	Single molecule Förster resonance energy transfer
SP1	Peptide intercalaire 1 (Spacer Peptide 1)

SP2	Peptide intercalaire 2 (Spacer Peptide 2)
T20	Enfuvirtide
TAR	Élément de réponse de trans-activation (Trans-Activating Response element)
Tat	Transactivateur transcriptionnel
T/F	Transmis/fondateur
TGN	Réseau trans-Golgi (Trans-Golgi network)
TMD	Domaine transmembranaire
TMR	Temsavir (BMS-626529)
TRIM5 α	Tripartite motif-containing protein 5 isoform α
Ub	Ubiquitine
Vif	Virus infectivity factor
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U
Vpx	Viral protein X

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Andrés Finzi, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour mon stage du cheminement Honor et pour ma maîtrise. Ce laboratoire m'a beaucoup appris au niveau académique et scientifique, mais également sur l'éthique de travail et le professionnalisme. J'ai acquis plusieurs valeurs qui me suivront tout au long de ma prochaine carrière, et j'en suis extrêmement reconnaissante. J'aimerais également remercier le Dr. Andrés Finzi de m'avoir appuyé du début à la fin. Effectivement, même avec un changement de carrière majeur en tête, il n'a pas cessé de m'aider à atteindre mes objectifs ainsi que de me supporter dans mon parcours. Merci pour les opportunités offertes, j'en sors véritablement grandi.

J'aimerais également remercier les membres du laboratoire avec qui j'ai énormément appris et eu du plaisir. Que ce soit au laboratoire, en fin de soirée ou lors des conférences, votre présence a définitivement embelli mon expérience. Merci au Dr. Jonathan Richard, Dr. Halima Medjahed, Lorie Marchitto (future Dr. ou Toto pour les intimes), Guillaume Beaudoin-Bussièrès (futur Dr.), Dr. Alexandra Tauzin, Dr. Annemarie Laumaea, Mehdi Benlarbi (futur Dr.), Shang Yu Gong, Dani Vézina, Gabrielle Gendron-Lepage, Catherine Bourassa, Dr. Guillaume Goyette, Dr. Debashree Chatterjee, Dr. Shilei Ding, Dr. Manon Nayrac, Dr. Jérémie Prévost et Dr. Sai Priya Anand.

Enfin, merci à mes parents (Marise Fugère et Luc Boutin) de m'avoir supporté, encouragé et appuyé financièrement jusqu'à la fin de ce parcours. Merci à ma sœur, Roxanne Boutin, de m'avoir accompagné lors des longues soirées d'études et d'avoir fait le même programme que moi, car nous pouvions nous supporter mutuellement dans cette même réalité. Merci à mes amis au baccalauréat pour ce beau parcours et toutes les soirées 5 à tard. Merci à mon fiancé, Isaac Chagnon, de m'avoir appuyé et d'avoir écouté mes présentations à de multiples reprises, malgré son incompréhension face aux sujets et concepts présentés. Merci à mes amies (Maude Major et Noémie Morin) et ma belle-famille pour tous les moments qui me permettaient de décrocher un peu.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

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

1.1 Classification du VIH-1

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un *Lentivirus* appartenant à la famille des rétrovirus (*Retroviridae*) (1, 2). Dans cette même famille, il est également possible d'y retrouver le VIH de type 2 et le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), soit le virus qui aurait été transmis du singe à l'homme entre les années 1920 et 1940 (3-5). Le VIH, soit l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), est un virus à ARN simple brin. Une des caractéristiques différenciant cette famille de virus est la présence d'une enzyme nommée transcriptase inverse. Celle-ci permet de générer de l'ADN à partir de l'ARN (6). Cet ADN proviral nouvellement synthétisé peut ensuite être intégré au génome de cellules ciblées par ce virus (7). Lors de l'étape de transcription inverse, de multiples mutations sont produites. La transcriptase inverse est donc la source de l'importante diversité génétique observée (8). Les études phylogénétiques divisent présentement le VIH-1 en 4 groupes distincts, soit le groupe M responsable de la pandémie mondiale et les groupes N, O et P. Le groupe pandémique M est lui-même divisé en différents sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) ainsi que de multiples formes recombinantes circulantes (CRF) (9-11). Suite à la découverte du groupe M, certains virus, représentant moins de 1% des infections à travers le monde, ont été classés dans le nouveau groupe O (12, 13). Ensuite, le groupe N (non O et non M) a été découvert et celui-ci est encore moins observé que le groupe précédent (14). Finalement, très peu de cas sont détectés dans le groupe P, soit un groupe découvert plus récemment (2009) (15, 16). Les cas des groupes minoritaires sont majoritairement retrouvés au Cameroun (12, 14-16).

1.2 Épidémiologie

Le virus responsable du SIDA est l'un des plus grands problèmes dans le domaine de la santé depuis les 40 dernières années. Selon les dernières données (2021) du Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA), 38.4 millions de personnes vivaient avec le virus et 1.5 million de personnes ont été infectées. Uniquement en 2021, 650 000 personnes sont décédées d'une maladie liée au SIDA (17). À ce jour, bien que de nombreux progrès soient effectués

concernant les traitements et l'accès au service de santé, ceci n'est pas observé de manière égale à travers le monde. Effectivement, encore dix millions de personnes n'ont toujours pas accès à ceux-ci. Par exemple, en plus d'être la région la plus touchée par cette maladie s'attaquant au système immunitaire, l'Afrique subsaharienne fait partie des régions en voie de développement ayant un accès plus restreint à ces traitements (17).

1.3 Phases d'infection du VIH-1 et progression vers le SIDA

Le VIH-1 peut se transmettre de différentes façons. L'une des voies de transmissions les plus observées est lors des relations sexuelles non protégées avec une personne infectée. Le VIH-1 se transmet également à l'aide des fluides corporels, tel que le sang, le sperme, le lait maternel et autres sécrétions (vaginales, pré-séminaux et rectales). La transmission du virus peut également survenir lors du contact mère-enfant ou lors de l'utilisation d'aiguilles souillées servant aux injections de drogues (18). L'infection non traitée est divisée en trois phases importantes : la phase aiguë, la phase chronique ainsi que la phase SIDA. La phase aiguë est caractérisée par l'établissement de l'infection dans les muqueuses ainsi qu'à la multiplication et la propagation exponentielle du virus. En effet, le virus est rapidement observé dans le sang ainsi que les tissus lymphoïdes (18). Infectant majoritairement les cellules T CD4⁺, une déplétion importante de ce type cellulaire est observée lors de cette phase (19, 20). Dû à au taux de virémie élevé, cette phase est critique pour l'établissement des réservoirs viraux ainsi que la transmission du virus (21, 22). Les personnes vivant avec le VIH-1 à cette étape-ci de l'infection possèdent des symptômes normalement associés à ceux de la grippe, soient la fièvre, la fatigue, des maux de tête, etc (23). Pour sa part, la phase chronique débute lorsque la réponse anti-virale est amorcée. En effet, bien que la multiplication du virus soit toujours perçue, celle-ci est plus faible et donc un niveau d'ARN viraux relativement stable est observé. Cette phase est donc souvent caractérisée comme étant asymptomatique et peut durer plusieurs années (24). Malgré que la virémie soit contrôlée, il y a toujours une diminution graduelle des niveaux de cellules T CD4⁺. En effet, l'hyper-activation du système immunitaire favorise la mort des cellules T CD4⁺ infectées et non infectées. Lorsque le niveau de cellules T CD4⁺ est sous 200 cellules / mm³, la phase SIDA est alors observée (25). Lors

de celle-ci, les pathogènes opportunistes profitent de la dysfonction du système immunitaire pour s'établir et ainsi, éventuellement causer la mort des individus infectés (Figure 1.1) (26).

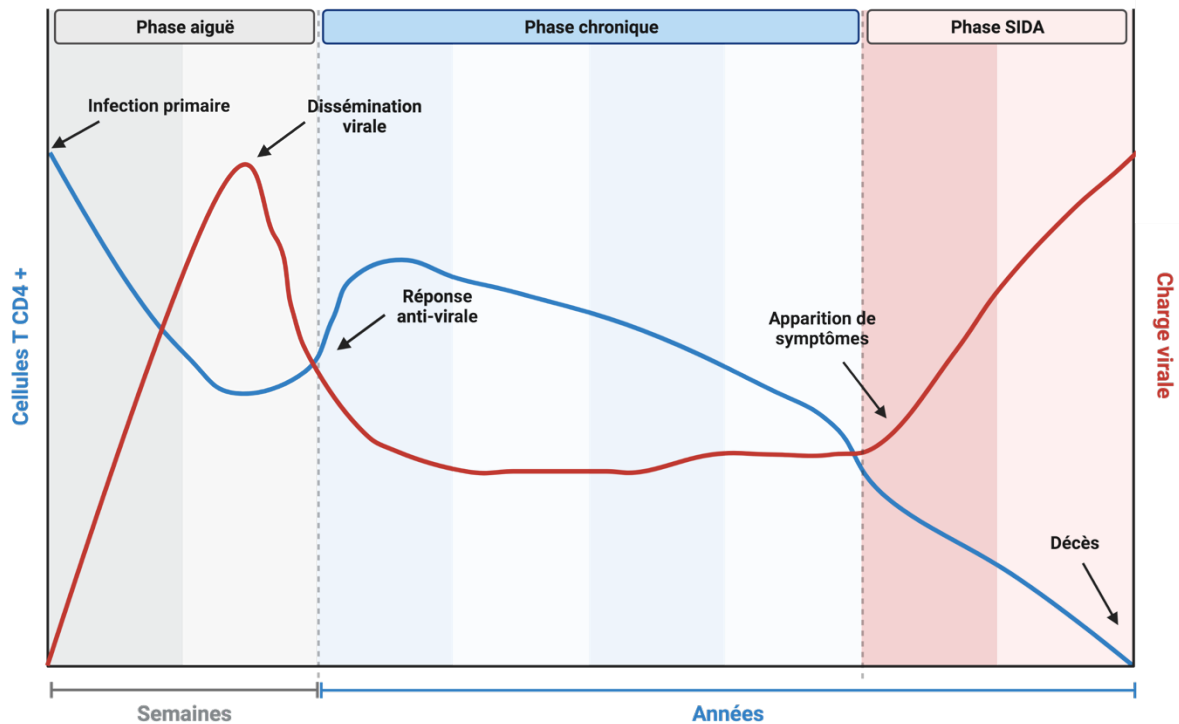


Figure 1.1 Infection naturelle par le VIH-1 et progression vers la phase SIDA. Schématisation de l'infection par le VIH-1 non traitée, divisée en trois phases : phase aiguë, phase chronique et la phase SIDA. Il est possible d'observer que dès l'infection primaire, il y a une diminution de cellules T CD4⁺ ainsi qu'une augmentation de la charge virale. Lors d'un certain contrôle immunologique, la charge virale diminue et permet donc une récupération du niveau de cellules T CD4⁺, pour ensuite atteindre un certain plateau. Cependant, lors de l'atteinte d'un faible niveau de ces cellules T, l'apparition d'infections opportunistes mène au décès des gens vivant avec le virus. Diagramme fait à partir de BioRender.com (inspiré de (27)).

1.4 Structure de la particule virale du VIH-1

Le diamètre d'une particule virale sphérique du VIH-1 est d'une taille moyenne de 80 à 120 nm (28, 29). Celle-ci contient toutes les protéines nécessaires pour l'infection et la réplication du virus (Figure 1.2). Le virion est couvert d'une bicouche lipidique provenant de la membrane de la cellule infectée (30). À sa surface se trouvent de 8 à 10 glycoprotéines d'enveloppe composées de trois sous-unités de surface gp120 et de trois sous-unités transmembranaires gp41 (31, 32). Sous la membrane lipidique se situent les protéines de la matrice (MA) qui interagissent avec la queue cytoplasmique de la gp41 afin de faciliter l'incorporation, l'assemblage et le transport de l'Env (33-36). MA recouvre la capside conique composée des protéines de la capside (CA). Cette capside contient deux copies d'ARN génomique monocaténaire de polarité positive en complexe avec les protéines de la nucléocapside (NC), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (37-39). D'autres protéines importantes sont également présentes au sein de la particule virale, soit la protéase virale (PR), la protéine p6 et certaines protéines accessoires (Vpr, Vif et Nef) (40-42).

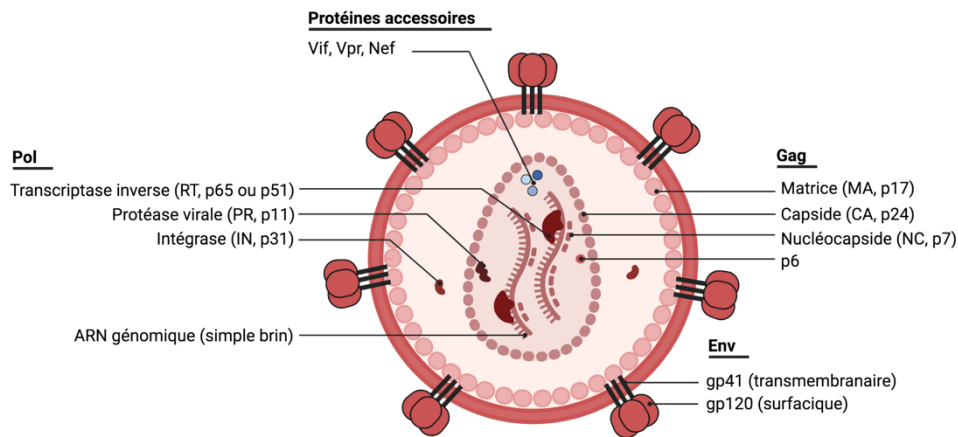


Figure 1.2 Structure de la particule virale du VIH-1. Schématisation d'une particule virale du VIH-1. Les protéines enzymatiques codées par la polyprotéine Gag-Pol, soit la RT, la PR et IN sont présentes dans le virion mature, en plus de celles encodées par Gag, soit la MA, la CA, la NC et p6. L'Env est composée des sous-unités de surface gp120 et transmembranaires gp41. Les protéines accessoires Vif, Vpr ainsi que Nef sont également présentes dans le virus. Finalement, le virus possède son matériel génétique. Diagramme fait à partir de BioRender.com

1.5 Organisation génomique

Le VIH de type 1 code pour 15 protéines virales distinctes (Figure 1.3). Les protéines structurales sont produites à partir de trois gènes importants, soit *gag*, *pol* et *env*, situés entre deux longues répétitions terminales (« Long Terminal Repeats, LTR »). Ces gènes sont synthétisés sous forme de précurseurs polyprotéiques clivés par la protéase présente dans le virion ou par des protéases cellulaires (43, 44). Pour sa part, Gag (Pr55^{Gag}) code pour les protéines de la matrice (MA, p17), de la capside (CA, p24), de la nucléocapside (NC, p7), la protéine p6 et les peptides SP1 et SP2 (45, 46). Ensuite, les protéines enzymatiques, soit la protéase (PR, p11), la transcriptase inverse (RT, p51/p65 (domaine RNase H)) et l'intégrase (IN, p31) sont formées à partir du précurseur Pr160^{GagPol} généré par un changement de cadre de lecture des ribosomes lors de la traduction (47, 48). À la suite du gène *pol*, le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe (gp160) est à son tour synthétisé, pour ensuite être clivé par des protéases cellulaires de type furine en deux sous-unités distinctes, soit la gp120 (sous-unité de surface) et la gp41 (sous-unité transmembranaire) (49). En plus de ces protéines structurales, le VIH code pour des protéines régulatrices nécessaires à l'initiation de la réplication du virus, tel que Tat (transactivator protein) et Rev (RNA splicing-regulator). Finalement, le VIH-1 code pour des protéines accessoires, telles que Nef (*negative factor*), Vpu (*viral protein u*), Vif (*viral infectivity factor*) et Vpr (*viral protein r*) (44).

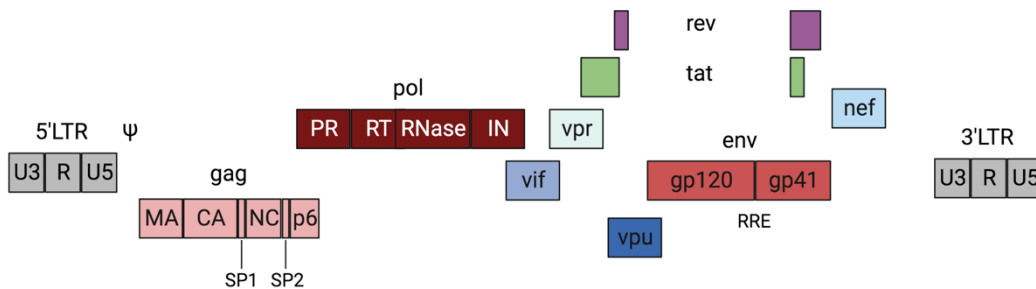


Figure 1.3 Organisation provirale du VIH-1. Le génome possède des séquences LTR à ses deux extrémités, soit 5' et 3'. Entre celles-ci se retrouvent plusieurs polyprotéines (*gag*, *pol*, *env*) ainsi que d'autres gènes (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* et *nef*) codants pour les autres protéines. Diagramme fait à partir de BioRender.com

1.6 Cycle répliatif

La première étape du cycle de répliation du VIH-1 est l'entrée virale (Figure 1.4). Celle-ci débute par l'adhésion du virion à la cellule hôte à l'aide de différentes interactions, soit à l'aide de la glycoprotéine d'enveloppe (Env) ou à l'aide de protéines cellulaires intégrées à la membrane de la particule virale, telle que ICAM-1, CD44 et CD62L avec leurs ligands (50-54). L'interaction peut être non-spécifique, telle que l'interaction entre l'Env et des protéoglycanes de sulfates d'héparanes de surface ou spécifique, telle que l'interaction à des intégrines ou protéines d'adhérence cellulaires spécifiques aux cellules dendritiques (DC-SIGN) avec les sucres de la gp120 (55-57). Bien que ces associations entre différentes protéines soient non essentielles à l'infection, elles permettent probablement d'augmenter l'infection en rapprochant l'Env du récepteur CD4, soit une interaction essentielle à l'entrée du virus dans la cellule hôte (58, 59). Cette interaction entre la sous-unité gp120 de l'Env et le récepteur primaire permet plusieurs réarrangements de conformation permettant l'exposition du site du co-récepteur (CoRBS). Le choix de celui-ci permet de classer les virus selon leur tropisme, R5 si le virus utilise le récepteur de chimiokine CCR5 ou X4 s'il utilise préférentiellement CXCR4 (60-63). Il est également possible que le virus soit en mesure d'utiliser les deux récepteurs (R5X4) (64). Cette interaction permet d'exposer le peptide de fusion de la sous-unité gp41 de l'Env qui s'insère dans la membrane de la cellule hôte (65, 66). Les régions de répétitions d'heptades (HR1 et HR2) de la sous-unité de la gp41 s'associent et permettent de former un fagot à six hélices rapprochant ainsi la membrane virale et cellulaire nécessaire à la formation du pore de fusion (67, 68). Suite à ceci, le contenu viral peut donc entrer dans le cytoplasme de la cellule hôte.

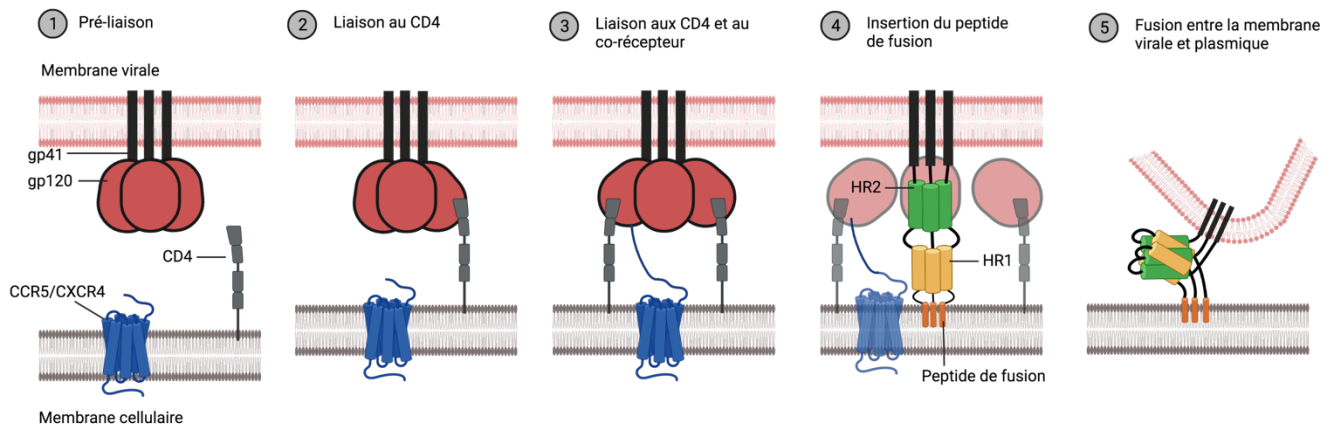


Figure 1.4 Processus d'entrée virale du VIH-1. La première étape de l'entrée du virus dans la cellule cible est l'attachement au récepteur CD4, menant ensuite à l'attachement au co-récepteur CCR5 ou CXCR4. Des réarrangements de conformation permettent la formation d'un fagot de six-hélices et du pore de fusion. Diagramme fait à partir de BioRender.com

Le principe de la décapsulation du noyau viral semble encore très controversé. Certaines études suggèrent que la déstabilisation de la capsid s'effectue dès l'arrivée de celle-ci au cytoplasme, donc immédiatement après la fusion entre la membrane virale et cellulaire (69-71). Des études plus récentes proposent que la décapsulation soit effectuée aux pores nucléaires (72). En effet, la capsid virale semble avoir des fonctions importantes lors du cycle de réplication en protégeant le début de la transcription inverse et ainsi permettre d'échapper au système immunitaire inné. Une décapsulation précoce pourrait donc avoir un impact sur le taux et l'efficacité de l'infection virale (73, 74). Finalement, un autre modèle proposé serait que le noyau intact ou presque intact du VIH-1 pénètre dans le noyau de la cellule et finalise la décapsulation une fois arrivé près des sites d'intégration (72, 75-78). Néanmoins, la conversion de l'ARN viral en ADN par le complexe de rétrotranscription (RTC) est enclenchée lors de son transport vers le noyau. Cette étape est assurée par la transcriptase inverse (RT) qui possède plusieurs activités distinctes : une polymérase d'ARN-dépendante (polymériser l'ADN à partir d'un brin d'ARN), une activité ribonucléase permettant de dégrader l'ARN associé à l'ADN (RNase H) et une polymérase ADN-dépendante (polymériser l'ADN à partir d'un brin d'ADN) (79). La transcription inverse permet également de générer les régions LTR à chaque extrémité des régions codantes, dont l'un d'entre eux servira de promoteur pour la transcription. Ensuite, le RTC est transformé en complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe nouvellement formé contient l'ADN viral, l'intégrase, les protéines de la matrice, la RT

ainsi que la protéine accessoire Vpr (80-82). Une autre étape essentielle à l'infection du VIH-1 est l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte, soit une étape médiée par la protéine virale IN (83). Une des protéines de l'hôte requise pour l'intégration est le facteur LEDGF/p75 qui interagit directement avec IN et aide l'association au chromosome aux sites privilégiés, soit les unités de transcription actives (84-86). L'intégration de l'ADN proviral complète donc la phase précoce du cycle de réplication du VIH-1.

Les étapes tardives du cycle débutent avec la transcription de l'ADN proviral et se terminent avec le relâchement de virions matures. L'expression des gènes viraux est dépendante de SP1, AP1, NF- κ B et NFAT, soit des facteurs de transcription cellulaire liant des séquences promotrice dans la région LTR. Ceux-ci permettent le recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire qui transcrit en premier lieu les gènes *Tat*, *Rev* et *Nef* (87-89). Étant complètement épissé, l'ARNm de ces gènes peut être exporté du noyau au cytoplasme. Tat est une protéine transactivatrice nécessaire pour l'expression efficace des gènes (90, 91). Une fois produite, elle retourne au noyau afin d'augmenter la processivité de la polymérase. Pour ce faire, Tat se lie à une région nommée l'élément de réponse à la transactivation (TAR) et recrute le facteur positif d'élongation de la transcription (P-TEFb) (92-95). Ensuite, les ARNm codants pour les protéines virales structurales, accessoires et pour l'ARN génomique du virus sont produits. Ces ARN viraux possèdent des introns et sont donc retenus au noyau (91). C'est le rôle de la protéine Rev, qui retourne également au noyau une fois produite, de transporter ces ARNm partiellement ou non épissés du noyau au cytoplasme par la voie d'exportation nucléaire Crm1 en interagissant avec l'élément de réponse à Rev (RRE) de l'ARN viral (96, 97). Les ARNm mono-épissés codent pour les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env tandis que les ARNm non épissés codent pour les précurseurs protéiques de Gag et Gag-Pol et sont utilisés comme ARN génomique (98, 99). Suite à leur multimérisation, les précurseurs myristoylés à l'extrémité N-terminale peuvent donc s'associer à la membrane plasmique dans les radeaux lipidiques où les glycoprotéines d'enveloppe (Env) seront également recrutées via l'interaction avec la matrice. Le domaine NC de Gag recrute l'ARN génomique tandis que le domaine p6 recrute le complexe de tri endosomaux requis pour le transport (ESCRT) qui permet le déclenchement du processus de bourgeonnement (100-102). Les particules virales libérées sont présentes sous une forme immature. Afin de permettre leur maturation, la protéase virale activée lors du processus d'assemblage et codée par la polyprotéine Gag-Pol clive le précurseur Gag. Ceci permet la

réorganisation morphologique des protéines présentes dans le virion, tel que les protéines de la capside formant le noyau, afin rendre celui-ci infectieux (102, 103) (Figure 1.5).

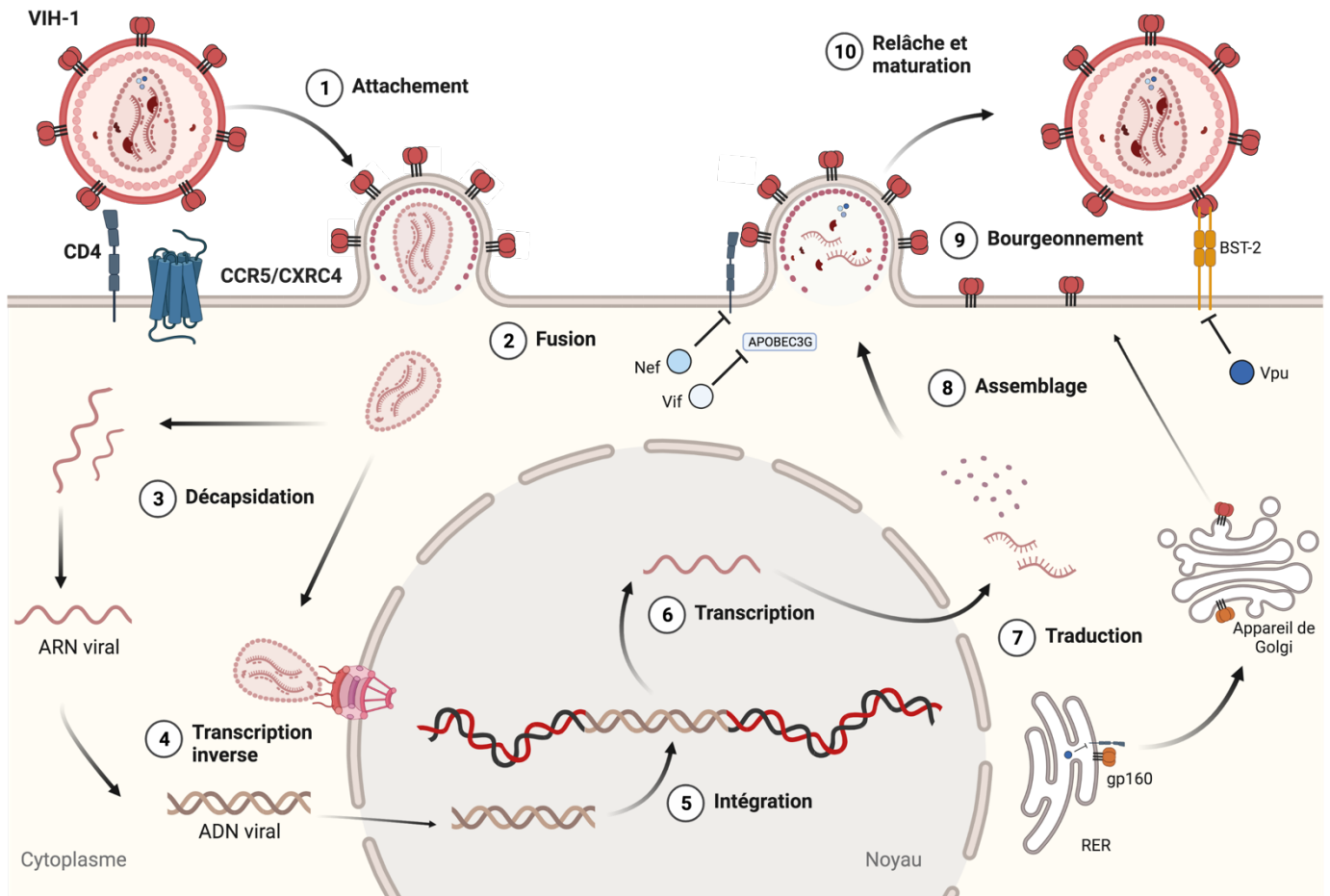


Figure 1.5 Cycle réplcatif du VIH-1. Schématisation représentant les étapes principales du cycle réplcatif du VIH-1. La première étape consiste à l'attachement (1) du virus à la cellule cible en liant le CD4 et CCR5/CXCR4, menant ainsi à la fusion (2) entre les deux membranes. La décapsidation (3) et la transcription inverse (4) ont ensuite lieu avant l'intégration (5) de l'ADN proviral au génome cellulaire. L'ADN viral est transcrit (6) comme un gène cellulaire et est ensuite traduit (7). Finalement, le virus s'assemble (8) et bourgeonne (9) de la cellule cible afin d'être relâché et clivé par la protéase virale (10) afin de produire une particule virale mature. Diagramme fait à partir de BioRender.com

1.7 Facteurs de restrictions

L'un des mécanismes de défense de l'hôte est la présence de protéines cellulaires nommées facteurs de restriction. Ces protéines antivirales, APOBEC3G, BST-2 (tétérine), TRIM5 α et SAMHD1, permettent de bloquer différentes étapes du cycle de réplcation du virus et sont donc connues pour

contrecarrer l'infection du VIH-1. Cependant, le virus a élaboré des stratégies afin d'empêcher l'action de ces protéines cellulaires (104).

APOBEC3G est une enzyme appartenant à la famille des cytidine désaminases (105). Lorsque la protéine Vif, soit l'antagoniste de ce facteur de restriction, est absente, APOBEC3G est incorporé dans les virions grâce à son association avec la protéine de la nucléocapside (106, 107). Bien que présent dans la particule virale, APOBEC3G n'agit seulement qu'une fois la cellule cible infectée. En effet, cette protéine agit sur l'ADN simple brin et permet la modification des cytidines en uridines (C à U) sur le brin d'ADN à polarité négative. Ceci provoque donc un phénomène d'hypermutation dans l'ADN proviral où la présence de guanines (G) est remplacée par une accumulation d'adénines (A) (108, 109). APOBEC3G permet donc d'altérer la transcription inverse, soit par le changement d'acides aminés menant à des mutations non-synonymes ou par la présence de codons de terminaison prématurés (108, 110, 111). Dans les deux cas, ceci peut mener à l'inactivation virale en créant des protéines virales défectueuses.

BST-2, également connu sous le nom de tétherine ou CD317, est une protéine cellulaire ayant un impact lors du relâchement des virions nouvellement synthétisés (112, 113). BST-2 est ancré à la membrane plasmique par son extrémité N-terminale et son ancre lipidique GPI (glycosylphosphatidylinositol) en C-terminale situé dans les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire (114, 115). Dû au fait que le VIH-1 bourgeonne principalement à cet endroit enrichi de cholestérol, BST-2 peut donc lier la membrane plasmique et virale de façon simultanée, permettant ainsi une accumulation de virions à la surface de la cellule infectée (102). Cette protéine induite par l'interféron de type I est contrecarrée par la protéine accessoire Vpu, limitant ainsi l'exposition des virions au système immunitaire (112, 113).

TRIM5 α est un facteur de restriction permettant de bloquer l'infection du VIH-1 lors des étapes précoces de sa réplication. En effet, TRIM5 α est une protéine cytoplasmique interagissant avec les protéines de la capsid du virus dès l'arrivée de celle-ci dans le cytoplasme de la cellule cible (116). Ce facteur de restriction est composé de quatre domaines distincts, dont le domaine RING qui possède une activité E3 ubiquitine ligase. Cette activité permet une auto-ubiquitination de la protéine, favorisant ainsi la dissociation précoce de la capsid et donc l'inhibition de la

transcription inverse (117, 118). Cependant, l'interaction entre la Cyclophile A et la capsidie prévient l'impact de ce facteur de restriction et rend ainsi le VIH-1 peu sensible à son effet (119).

SAMHD1 est une enzyme ayant comme activité l'hydrolase des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs). Ce facteur de restriction permet de diminuer la quantité de dNTPs disponibles en clivant ceux-ci (120). De ce fait, le taux faible de nucléotides ne permet pas à l'étape de transcription inverse de procéder normalement et empêche donc une réplication virale productive. Contrairement au VIH-2 où la protéine Vpx prévient l'action de SAMHD1, le VIH-1 ne possède aucune défense directe envers cette protéine cellulaire (104, 121). Cependant, la transcriptase inverse du VIH-1 aurait la capacité de fonctionner même lorsque le nombre de dNTPs est restreint (122).

1.8 Protéines accessoires

Les protéines accessoires du VIH-1 sont facultatives pour la réplication *in vitro*, mais possèdent des fonctions essentielles pour la réplication *in vivo*. Ces protéines (Vif, Vpr, Nef et Vpu) jouent un rôle important dans la progression de la maladie ainsi que dans l'intensité de l'infection virale en empêchant l'action de protéines bloquant certaines étapes du cycle de réplication du virus.

1.8.1 Vif

Vif est une protéine de 23 kDa exprimée tardivement lors du cycle répliatif (123). Cette protéine accessoire est principalement connue pour son rôle en tant qu'antagoniste de la cytidine désaminase APOBEC3G. Vif interagit avec un complexe E3 ubiquitine ligase permettant ainsi la poly-ubiquitination d'APOBEC3G dirigeant cet enzyme vers le protéasome pour sa dégradation (124, 125). De ce fait, Vif inhibe l'incorporation de ce facteur de restriction dans les nouvelles particules virales produites. Vif est également connu pour son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, Vif lie et active le gène suppresseur de tumeur p53, entraînant ainsi une cascade d'évènement conduisant à l'arrêt de la phase G2 (126-128).

1.8.2 Vpr

Vpr est une protéine multifonctionnelle de 14 kDa exprimée tardivement lors du cycle viral (129, 130). Étant une protéine incorporée au niveau de la particule virale grâce à son interaction avec le

précurseur de la protéine p6, cette protéine accessoire joue un rôle précoce lors de l'infection (41). L'une des fonctions principales de cette protéine hautement conservée chez les lentivirus est son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M. Vpr induit cette fonction en liant DCAF1, un élément permettant de recruter le complexe DCAF1-DDB1-Cul4 E3 ubiquitine ligase. Cette interaction mène principalement à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'activation de la voie de dommages à l'ADN (131-135). Il est maintenant connu que la protéine Vpr permet la dégradation par le protéasome de CCDC137, ce qui permettrait l'induction de l'arrêt de cycle cellulaire G2/M ainsi que la régulation positive de l'expression des gènes du VIH-1 (136). Vpr possède également plusieurs autres fonctions, dont un rôle dans l'importation du complexe du pré-intégration (PIC) au noyau (137).

1.8.3 Nef

Nef est une protéine de 27 kDa exprimée simultanément avec Tat et Rev lors de la phase précoce de l'infection du VIH-1 (91). Nef possède la capacité de moduler à la baisse plusieurs protéines présentes à la surface de la cellule hôte, permettant ainsi de promouvoir la pathogénicité virale. L'une des principales cibles de cette protéine accessoire est le récepteur CD4 de la cellule hôte (138). Bien que ce récepteur soit nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule, la présence de celui-ci à la surface des cellules infectées devient problématique à plusieurs niveaux. En effet, la présence de ce récepteur peut prévenir la maturation adéquate de l'Env ainsi que la relâche de nouveaux virions. De plus, en étant présent à la surface, le récepteur peut lier l'Env à nouveau et ainsi exposer des épitopes vulnérables aux réponses humorales. Effectivement, ces épitopes sont reconnus par des anticorps nAbs ayant la capacité de médier les réponses de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (139). En régulant l'expression de ce récepteur, Nef prévient également la surinfection pouvant causer la mort prématurée de la cellule productrice de nouveaux virus (140-142). Nef est une protéine cytoplasmique associée à la membrane plasmique grâce à son groupement myristoyl en position N-terminale (42). De ce fait, par l'entremise du complexe de protéines adaptatrices de la clathrine AP-2, Nef interagit avec le récepteur CD4 présent à la surface de la cellule et induit l'endocytose de ce récepteur vers la voie de dégradation lysosomale (143, 144). Nef joue également un rôle dans la modulation de l'expression des CMH de classe I et II, assurant ainsi une faible présentation des antigènes du VIH-1 au système immunitaire (145).

1.8.4 Vpu

La protéine transmembranaire Vpu de 16 kDa est connue pour être spécifique au VIH-1, ainsi que certains virus simiens (SIVcpz, SIVgor, SIVgsn, SIVmon, SIVmus, SIVdent) (146, 147). Vpu est généré tardivement lors du cycle de réplication du virus à partir de l'ARNm bicistronique encodant les gènes de l'Env et Vpu (148, 149). Les fonctions principales de cette protéine accessoire sont de moduler la présence de protéines de surface, telles que CD4 et BST-2 (112, 113, 150). En ce qui concerne le récepteur d'entrée CD4, contrairement à la protéine Nef, Vpu cible les CD4 nouvellement synthétisés. Afin de procéder à la dégradation de ce récepteur, la protéine Vpu est phosphorylée aux sérines en position 52 et 56 (151). Vpu interagit avec plusieurs protéines, tel que β -TrCP, des molécules adaptatrices (SKP1-cullin-F-Box) ainsi que le complexe E3 ubiquitine ligase (152, 153). Ceci permet donc aux CD4 d'être poly-ubiquitinés et d'être dirigés, à l'aide de la voie de transport ERAD (ER-associated degradation), à l'extérieur du réticulum endoplasmique pour être dégradé par le protéasome (154). Tout comme la protéine Nef, la présence de Vpu diminue la capacité des anticorps à médier de façon efficace l'ADCC en permettant de garder l'Env sous sa conformation «fermée» (139). Vpu favorise également la relâche des virions en étant un antagoniste de BST-2 (112, 113). Le domaine transmembranaire (TMD) de Vpu interagit avec le TMD de BST-2 afin de réguler les niveaux du facteur de restriction à la surface cellulaire avec l'aide des adaptateurs de clathrine (155-160). De plus, Vpu limite le recyclage de la protéine ainsi que le transport de celle-ci à la membrane plasmique (161-164). Par le même processus que le récepteur CD4, Vpu séquestre BST-2. Cependant, le facteur de restriction est dégradé dans les lysosomes (113). Finalement, Vpu module le niveau de plusieurs autres substrats, tel que les ligands nécessaires à l'activation des cellules NK (Natural-killer), permettant ainsi d'évader les réponses du système immunitaire innées (165).

1.9 Les glycoprotéines d'enveloppe virales

1.9.1 Synthèse et maturation de l'enveloppe

La formation des glycoprotéines d'enveloppe (Env) débute avec la synthèse d'un ARNm bicistronique comprenant les gènes codant pour Vpu et Env (148, 149). Le précurseur de la glycoprotéine (gp160) se lie au réticulum endoplasmique rugueux (RER) à l'aide de sa séquence signal en position N-terminale, soit un peptide signal éventuellement clivé par des peptidases

cellulaires (166, 167). Lorsque la traduction du précurseur est amorcée, la gp160 est glycosylée principalement aux résidus asparagines (N-glycans) et se produit ensuite l'oligomérisation des monomères de gp160 en trimères (168). Les trimères de gp160 sont alors transportés vers le réseau *trans*-Golgi (TGN) où les modifications du précurseur continuent, dont l'addition d'oligosaccharides riches en mannoses (169, 170). Une fois dans le Golgi, des protéases cellulaires de type furine procèdent au clivage protéolytique de la gp160 en avant du motif ⁵⁰⁸REKR⁵¹¹, permettant ainsi de créer la sous-unité surfacique gp120 et la sous-unité transmembranaire gp41 (171-173). Cette étape est essentielle à la maturation de l'Env pour la production de virus infectieux. Suite au clivage, les trois sous-unités gp120 et gp41 restent liées de façon non-covalente pour former une glycoprotéine hétérodimère. Cette glycoprotéine mature se retrouve à la membrane plasmique où elle pourra être internalisée à l'aide de facteurs cellulaires ou incorporé en faible quantité aux virions avant leur relâche.

1.9.2 Structure de la gp120

La sous-unité de surface gp120 possède cinq régions variables (V1-V5) ainsi que cinq régions constantes (C1-C5) (Figure 1.6) (174, 175). Une importante partie de la masse moléculaire de la gp120, plus particulièrement dans la boucle V1/V2, est composée de glycans permettant de mieux échapper au système immunitaire de l'hôte en camouflant des épitopes importants pour la reconnaissance de l'Env (168, 176). La gp120 possède trois domaines principaux, soit le domaine interne, le domaine externe ainsi qu'une passerelle en feuillet β (bridging sheet). Le domaine interne est celui responsable de l'association entre la gp120 et la gp41. Pour ce qui a trait à la liaison du virus à la cellule cible, les domaines C1, C3 et C4 sont principalement responsables de la liaison au récepteur primaire CD4 (177-179). Plus précisément, le résidu phénylalanine 43 du récepteur CD4 interagit dans la cavité hydrophobique Phe43 retrouvée à l'intersection des trois domaines de la gp120 (180, 181). Dans le domaine externe se trouve la boucle β 20- β 21, soit une région également importante pour la liaison du récepteur primaire (182, 183). En plus de son interaction avec le récepteur CD4, la région V3 est importante, car elle interagit avec le co-récepteur CCR5/CXCR4, permettant ainsi de déterminer le tropisme du virus. Cette interaction fournit l'énergie requise afin de procéder à l'exposition de régions importantes pour la fusion membranaire (184).

1.9.3 Structure de la gp41

La sous-unité transmembranaire gp41 est responsable de la fusion entre les membranes cellulaire et virale. Trois domaines distincts composent cette sous-unité, soit le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire (TMD) ainsi qu'une queue cytoplasmique en position C-terminale (Figure 1.6) (68, 185, 186). Le domaine extracellulaire est celui possédant les régions importantes essentielles à la fusion. Entre autres, il contient le peptide de fusion, les régions de répétitions d'heptades (HR1 et HR2) et un domaine externe proximal à la membrane (MPER). Le TMD, un domaine très conservé, permet à l'Env d'être ancrée dans la bicouche lipidique (187). L'une des particularités du VIH-1 est sa longue queue cytoplasmique d'environ 150 acides aminés (188). La queue cytoplasmique (CT) possède plusieurs fonctions, telles que l'incorporation de l'Env aux virions. En effet, la CT code pour plusieurs signaux facilitant le transport des Envs au site d'assemblage. Elle peut également influencer la conformation de l'Env, son niveau d'expression à la surface des cellules et elle joue un rôle dans l'infectivité virale. Celle-ci est composée de séquences peptidiques lytiques du lentivirus (LLP1, LLP2 et LLP3), soit des structures conservées et impliquées dans plusieurs propriétés de la CT, dont la stabilité et l'incorporation (188-195). La CT détient également un motif $^{712}YXXL^{715}$ permettant l'endocytose dépendante de la clathrine (196).

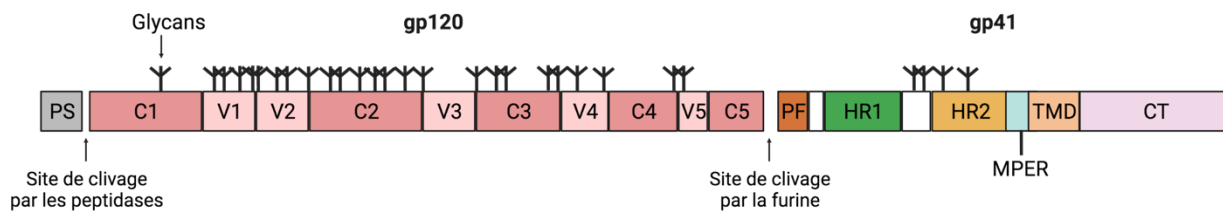


Figure 1.6 Composition de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. Schématisation du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe (gp160) et des deux sous-unités gp120 et gp41 composant la glycoprotéine d'enveloppe mature. La séquence débute avec le peptide signal (PS) éventuellement clivé par des peptidases pour permettre au précurseur de quitter le RER. La sous-unité gp120 est composée de cinq régions constantes (C1-C5) ainsi que cinq régions variables (V1-V5). La gp120 est également très glycosylée. Suite au site de clivage par la furine, se retrouve le peptide de fusion (PF) qui débute la sous-unité gp41. Celle-ci comprend les régions de répétitions d'heptades (HR1 et HR2), le domaine externe proximal à la membrane (MPER), le domaine transmembranaire (TMD) ainsi que la longue queue cytoplasmique (CT). Diagramme fait à partir de BioRender.com

1.9.4 Conformation de l'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 est très dynamique et peut être perçue sous plusieurs conformations. Cependant, celle-ci est principalement caractérisée par trois conformations : une conformation dite «fermée» (State 1), une conformation intermédiaire asymétrique (State 2) ainsi qu'une conformation «ouverte» (State 3) (197, 198). La conformation «fermée» de l'Env est celle retrouvée à la surface des virions et est celle majoritairement perçue à la surface des cellules infectées. L'Env non liée possède une très forte énergie potentielle, permettant la fusion entre les membranes cellulaires et virales (199, 200). Les conformations subséquentes sont dépendantes de la liaison de l'Env avec les récepteurs et co-récepteurs. En effet, lorsque le récepteur CD4 interagit avec un protomère de l'Env dans la cavité Phe43, la transition entre la conformation fermée et intermédiaire est enclenchée (199). La présence du petit résidu sérine en position 375 permet également de conserver l'Env dans une conformation de pré-fusion. Par contre, certaines souches possèdent de gros résidus hydrophobiques, tels que l'histidine ou le tryptophane, et ont naturellement une conformation plus ouverte (201, 202). Une fois chaque protomère lié, la conformation ouverte est atteinte par des réarrangements des boucles V1/V2 et V3. Cette conformation permet donc l'exposition du site du co-récepteur CCR5 ou CXCR4 (203-205). Récemment, une nouvelle conformation, nommée State 2A, a été étudiée. Celle-ci est induite lorsque les cellules exposant l'Env sont traitées avec des mimétiques moléculaires de CD4 (CD4mc), dans anticorps liant le site du co-récepteurs ainsi que l'anti-cluster A ou lorsque l'Env est lié au CD4 membranaire en cis (206). La technique smFRET démontre cette conformation asymétrique qui ne correspond ni à la conformation intermédiaire, ni à la conformation «ouverte» (206).

1.10 Anticorps neutralisants et non-neutralisants

La glycoprotéine d'enveloppe est le seul antigène viral présent à la surface du virion et est donc la cible des anticorps. Une des caractéristiques de l'Env est la présence importante de glycans. Bien que principalement connus pour contribuer à l'évasion du système immunitaire dû au fait où ceux-ci sont reconnus comme du «soi», les glycans représentent des épitopes conservés entre les différentes souches du VIH-1 pouvant être ciblés par les anticorps neutralisants à large spectre

(bNAbs) (207). Ces anticorps reconnaissent particulièrement l'Env sous sa conformation non liée, soit «fermée» et possèdent une activité neutralisante efficace pour contrer l'infection du VIH-1. Cependant, suite à l'exposition virale pendant 2 à 3 ans, seulement 10 à 30% des individus vivant avec ce virus développent ce type d'anticorps (208-210). La génération de ce type d'anticorps est en effet très complexe et dépend de plusieurs facteurs, tels que la charge virale, la diversité virale et la stimulation antigénique requis pour les mutations hyper somatiques (211, 212). Pour leur part, les anticorps non-neutralisants (nnAbs) sont produits dès le début de l'infection et sont donc abondants dans le plasma des individus infectés par le VIH-1. Cependant, ces anticorps ne reconnaissent que des épitopes exposés lorsque l'Env possède une conformation «ouverte».

1.10.1 Anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs)

Les anticorps neutralisants à large spectre possèdent la capacité de neutraliser le VIH-1 en ciblant des régions nécessaires à l'entrée virale. Ceux-ci sont regroupés selon différentes classes ciblant des sites distincts. L'une des classes importantes est celle des anticorps ciblant le site de liaison du récepteur CD4, soit l'une des premières interactions entre le virus et la cellule hôte. Certains des anticorps de cette catégorie sont les suivants : VRC01, VRC03, 3BNC117, N6, b12 et CH106 (213-216). Une autre classe importante est celle des anticorps ciblant les glycanes de la boucle V3 : 10-1074, PGT121, PGT122, PGT125, PGT126, PGT128, PGT130 et PGT135 (217-219). 2G12 est un anticorps particulier puisqu'il cible spécifiquement les glycanes du domaine externe de la gp120 et reconnaît l'Env sous sa conformation fermée et ouverte (139, 220, 221). D'autres bNAbs connus ciblent la boucle V2 située à l'apex du trimère : PG9, PG16 et PGT145 (217, 222, 223). L'anticorps PGT151 cible l'interface entre la gp120 et la gp41 d'une enveloppe clivée (224, 225). Certains anticorps ciblent la région externe proximale à la membrane, tels que 10E8, 4E10 et 2F5 (226-228). Finalement, la façade silencieuse de l'enveloppe du VIH-1 est également reconnue par des anticorps neutralisants, tels que SF12 (229, 230) (Figure 1.7).

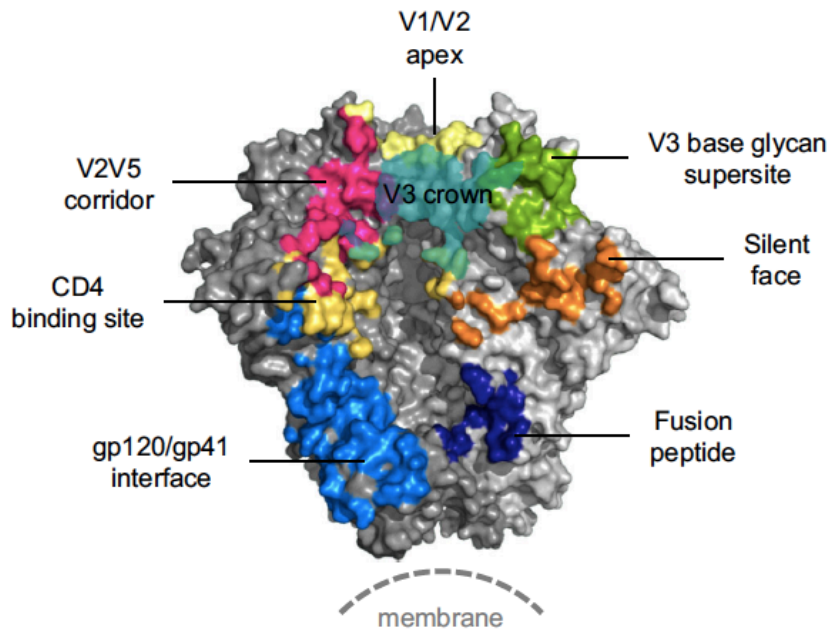


Figure 1.7 Site de liaison des différents anticorps sur l'Env du VIH-1 (231). Schématisation des principaux sites de liaison des bNAbs, soit le site de liaison du récepteur CD4, les glycanes de la boucle V3, la boucle V2 située à l'apex du trimère, l'interface entre la gp120 et la gp41 ainsi que la façade silencieuse.

1.10.2 Anticorps non-neutralisants (nnAbs)

Les anticorps non-neutralisants sont nommés ainsi dû à leur incapacité de reconnaître la glycoprotéine d'enveloppe à la surface de virions ou de cellules infectées. En effet, pour avoir accès aux épitopes, l'enveloppe doit subir des changements de conformation normalement induits par la présence du récepteur CD4 (CD4i) (232-237). Durant l'infection, cette conformation «ouverte» est prévenue par les protéines accessoires Nef et Vpu, tel que discuté précédemment (139, 238). Les anticorps non-neutralisants sont également divisés en plusieurs classes ciblant des régions distinctes : le site de liaison du co-récepteur (17b) (239), l'extrémité de la boucle V3 (19b) (240), le domaine interne de la gp120 (Cluster A) (A32) (241-243) et les épitopes du Cluster I (F240 et 246D) et II (244-246).

1.11 Fonctions effectrices des anticorps

Les anticorps possèdent un rôle important lors du contrôle de l'infection du VIH-1. En effet, bien qu'ils aient un rôle bien connu dans la neutralisation des pathogènes, ils ont également la capacité d'initier des fonctions effectrices à médiation cellulaire. Pour ce faire, une interaction entre le récepteur Fc (FcR), présent à la surface de multiples cellules, et la région Fc de l'anticorps doit être effectuée. Cette interaction peut par la suite mener à plusieurs réponses immunitaires, telles que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) et la lyse par le complément dépendante des anticorps (ADCML).

1.11.1 La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est médiée par différents types cellulaires, tels que les cellules tueuses naturelles (NK), les monocytes/macrophages et les neutrophiles (247). Cette fonction cellulaire survient lorsqu'un anticorps reconnaît sa cible et que celui-ci est reconnu par une cellule immunitaire exprimant un récepteur Fc γ R, majoritairement les cellules NK. Cette interaction permet une cascade de signalisation déclenchant la relâche de perforines et de granzymes, des molécules lytiques menant à la lyse de la cellule cible. Les cellules produisant activement du virus peuvent ainsi être éliminées (248).

1.11.2 La phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP)

Cette fonction effectrice médiée par les anticorps survient lorsqu'un anticorps procède à l'opsonisation d'un pathogène, ce qui favorise donc la phagocytose du virion ou de la cellule infectée. Suite à l'internalisation, la cellule infectée peut être dégradée dans les phagolysosomes (248). Ce processus peut être assuré par les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles (249, 250).

1.11.3 La lyse par le complément dépendante des anticorps (ADCML)

La lyse par le complément est un mécanisme important de l'immunité innée et acquise. Ce mécanisme est enclenché lorsqu'un anticorps est reconnu par la molécule C1q. À la suite de plusieurs événements, la convertase C3 clive C3 en C3a et C3b. Une cascade d'activation et de signalisation permet donc la formation de plusieurs autres molécules, résultant éventuellement au complexe d'attaque membranaire (MAC). Ce complexe possède la capacité de former des pores

dans la bicouche lipidique, permettant ainsi le passage de l'eau et de soluté dans la cellule. L'intégrité de la membrane est compromise et ceci mène donc à la mort cellulaire ou du virus (251, 252).

1.12 Traitements

L'un des obstacles majeurs empêchant la guérison complète du VIH-1 est la présence de réservoirs cellulaires stables. Ces réservoirs peuvent se retrouver dans différents tissus et types cellulaires, tels que les cellules lymphocytes T CD4⁺, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules Langerhans, les lymphocytes B ainsi que les granulocytes (253, 254). Les traitements antirétroviraux actuels permettent de diminuer la charge virale à un niveau indétectable et donc intransmissible. Par contre, ceux-ci ne permettent pas d'éradiquer complètement la présence du virus chez les gens vivant avec celui-ci (255). L'objectif est de trouver une solution curative permettant l'arrêt de prise de médicaments tous les jours afin de minimiser la toxicité. Pour ce faire, les études afin de trouver un vaccin thérapeutique ou prophylactique devront continuer.

1.12.1 Stratégies vaccinales

Les défis actuels pour la conception d'un vaccin sont nombreux : la diversité entre les différentes souches du VIH-1, l'établissement de réservoirs viraux tôt lors de l'infection, l'évasion virale au système immunitaire de l'hôte, la difficulté de générer une réponse humorale efficace, etc. Depuis la découverte du VIH-1, plusieurs essais vaccinaux ont vu le jour. Les premières approches vaccinales étaient des vaccins bivalents comprenant la gp120 : du clade B et E (Vax 003) et du clade B seulement (Vax 004). Par contre, ces deux stratégies ne se sont pas avérées efficaces (256). Ensuite, l'essai vaccinal le plus connu est celui du RV144 pour son efficacité de 31.2%. Il a été démontré que son efficacité serait due à la souche utilisée (CRF01_AE). En effet, dû à la présence d'un résidu histidine en position 375, l'Env est normalement plus «ouverte» et donc plus propice d'être reconnue par le système immunitaire et ainsi, d'être éliminée par ADCC (257). Pour sa part, l'essai vaccinal HVTN 505, soit un vecteur Ad5 codant pour les protéines Gag, Pol, Env et Nef du VIH-1, n'a montré aucune efficacité (256). L'une des approches présentement convoitées est le développement d'un vaccin en mesure d'induire une réponse immunitaire capable de produire des bNAbs ou un traitement impliquant l'administration de ceux-ci. La conception d'un vaccin/traitement est complexe, car il est important de bien comprendre les différentes voies de

développement de ces anticorps, incluant l'importance des mutations hyper somatiques ainsi que des délétions et/ou insertions lors de leur formation.

1.12.2 Inhibiteurs du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 est complexe et nécessite plusieurs enzymes, récepteurs, et différentes interactions pour sa complétion. De ce fait, chacun de ces facteurs est une cible potentielle pour les inhibiteurs. À ce jour, 50 molécules antirétrovirales sont approuvées par la *Federal Drugs Administration* (FDA) (258). Celles-ci sont divisées en six classes distinctes : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI) (259, 260), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI) (261, 262), les inhibiteurs de la protéase virale (263-265), les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs d'entrée (266) et les inhibiteurs d'intégrase (267). La première molécule anti-virale à avoir été approuvée par la FDA est la zidovudine, également connue sous le nom de AZT. Cette molécule appartenant à la classe des NRTI est un analogue de la thymidine ne possédant pas de groupement -OH en 3'. Lorsque la RT incorpore cet analogue, ceci cause l'arrêt de la synthèse du brin d'ADN. Le VIH-1 est un virus possédant un taux de mutations important et donc des résistances aux médicaments peuvent souvent être observées. Pour cette raison, les traitements actuels combinent les différentes molécules afin de permettre une charge virale indétectable et une augmentation de l'espérance de vie (258). Bien que les inhibiteurs les plus couramment utilisés sont ceux ciblant la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase, il y a de nombreux avantages à cibler le processus d'entrée du virus (268). En effet, le virus est bloqué avant même d'entrer dans la cellule, la molécule inhibitrice n'a pas besoin d'entrer dans la cellule cible et plusieurs facteurs peuvent être ciblés. Deux inhibiteurs d'entrée bien connus sont le Maraviroc qui agit comme un antagoniste du co-récepteur CCR5 et T20 (Enfuvirtide) qui prévient les changements de conformation nécessaire pour la fusion entre la membrane cellulaire et virale (269-272).

1.12.3 Molécules inhibitrices d'Env

En plus de ces nombreux inhibiteurs, certaines molécules inhibitrices ciblent directement l'Env. Le mimétique moléculaire de CD4 (CD4mc) n'est toujours pas approuvé pour l'utilisation en tant que traitement, mais semble prometteur lorsque combiné avec des anticorps non-neutralisants (273-277). Effectivement, en liant la cavité Phe43, la molécule prévient l'interaction entre Env et

le récepteur primaire CD4. De plus, cette molécule enclenche l'Env de façon prématurée menant ainsi à son inactivation. Une autre caractéristique encourageante de cette molécule est sa capacité d'éliciter une réponse immunitaire. En effet, en liant la cavité Phe43, le CD4mc permet des changements de conformation de l'Env semblable à ceux observés lorsque la glycoprotéine d'enveloppe lie le récepteur CD4. Le système immunitaire a donc accès aux épitopes normalement occlus dans la forme native de l'Env, ce qui favorise les réponses ADCC (206, 275, 278-280). Récemment, une molécule inhibitrice d'attachement ciblant directement la gp120 de l'Env a été approuvée par la FDA en combinaison avec d'autres molécules antirétrovirales. Fostemsavir (BMS-663068/GSK3684934/Rukobia), un composé chimique synthétisé, est présentement administré aux patients vivant avec le VIH-1 ayant des options thérapeutiques limitées dues à de multiples résistances/toxicité aux traitements actuels (281-284). La molécule active de ce médicament, temsavir (BMS-626529/ GSK2616713), lie sous la boucle β 20- β 21, soit une région conservée de la gp120, prévenant ainsi l'interaction entre l'Env et le récepteur CD4 (282, 285). Temsavir lie la gp120 principalement à l'aide d'interactions hydrophobes avec de multiples résidus (Figure 1.8). Par contre, certaines mutations de ces résidus importants pour la liaison de temsavir sont déjà perçues chez certaines personnes, telles que M426L, M434I/V, M475I et S375M/H/W (282, 285). Par exemple, en ce qui concerne la mutation S375W, la substitution de la sérine pour le tryptophane remplit la cavité Phe43 et prévient ainsi la liaison de l'inhibiteur à la gp120. De plus, il a également été démontré que la liaison de ce petit inhibiteur à l'Env prévient des changements de conformation subséquents et donc stabilise l'Env dans sa conformation «fermée» (198, 286-288).

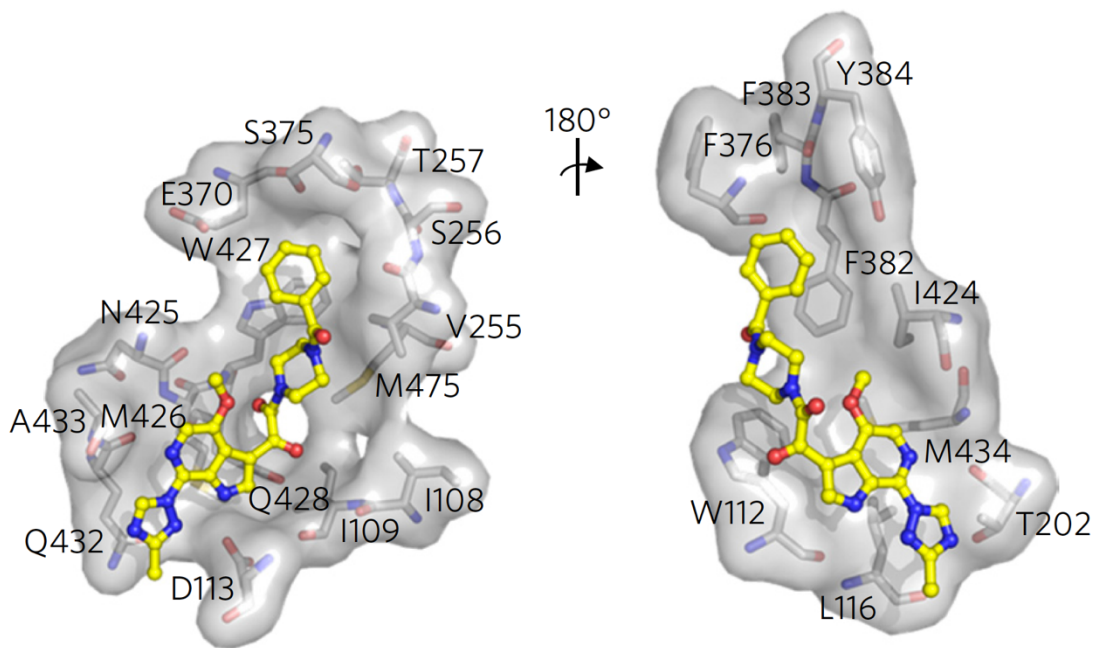


Figure 1.8 Interaction entre tamsavir (BMS-626529) et la gp120 de l'Env du VIH-1 (285). Schématisation de l'inhibiteur d'attachement tamsavir (jaune) lors de sa liaison avec l'Env du VIH-1. L'illustration à gauche représente la vue selon la membrane virale tandis que celle à droite est selon la vue du haut du trimère. Les résidus près de la molécule inhibitrice sont indiqués.

CHAPITRE II – JUSTIFICATION ET HYPOTHÈSE

Dû au nombre important de résistances continuellement perçues lors du traitement des personnes vivant avec le VIH-1, la quête vers de nouvelles molécules, stratégies vaccinales ou thérapeutiques est primordiale. En effet, bien que la thérapie antirétrovirale permette de réduire le taux de mortalité associé à ce virus ainsi que d'augmenter l'espérance de vie de ces individus, cette médication n'est pas curative. De ce fait, la recherche constante de nouvelles approches qui permettraient l'élimination complète des réservoirs viraux est nécessaire.

Étant une nouvelle molécule approuvée par la FDA, la caractérisation de l'inhibiteur d'attachement temsavir est importante. Bien que cette molécule ne soit présentement pas connue pour affecter les réservoirs viraux, temsavir est un puissant inhibiteur d'attachement qui pourrait réduire l'établissement des réservoirs en étant administré rapidement. Il était préalablement connu que temsavir possède la capacité de stabiliser le trimère de l'Env ainsi que d'empêcher l'entrée virale en liant près de la cavité où interagit le récepteur primaire CD4.

Le commencement de cette étude a débuté par l'observation d'une modification au niveau de la gp120 suite au traitement de cellules exprimant l'Env à l'aide de temsavir. D'autres études effectuées en parallèle à la nôtre suggéraient qu'un analogue de temsavir, BMS-378806, empêchait l'addition de glycanes à la surface de l'Env en plus de moduler le clivage du précurseur. De ce fait, les hypothèses étaient que temsavir aurait un effet similaire à cet analogue et que ces modifications au niveau de la maturation de l'Env auraient un impact sur la conformation de celle-ci. Les objectifs de ce mémoire étaient donc les suivants :

- Caractériser l'effet de temsavir sur la maturation de l'Env.
- Déterminer l'impact de l'altération de ces mécanismes sur la conformation de l'Env à la surface des virions, des cellules transfectées ainsi que des cellules primaires infectées.
- Investiguer l'effet à large spectre de ce nouvel inhibiteur.

- Évaluer si l'impact de tenvsavir sur la conformation de l'Env pourrait affecter les réponses effectrices médiées par les anticorps tels que l'ADCC.

CHAPITRE III – ARTICLES

ARTICLE #1: Temsavir Treatment of HIV-1-Infected Cells Decreases Envelope Glycoprotein Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies

Auteurs:

Marianne Boutin^{1,2}, Dani Vézina¹, Shilei Ding¹, Jérémie Prévost^{1,2}, Annemarie Laumaea^{1,2}, Lorie Marchitto^{1,2}, Sai Priya Anand³, Halima Medjahed¹, Gabrielle Gendron-Lepage¹, Catherine Bourassa¹, Guillaume Goyette¹, Andrew Clark⁴, Jonathan Richard^{1,2}, Andrés Finzi^{1,2,3,#}

Affiliations:

¹Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), QC H2X 0A9, Canada

²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

³Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC H3A 2B4, Canada

⁴ViiV Healthcare, Global Medical Affairs, GSK House, 980 Great West Road Brentford, Middlesex, TW8 9GS, UK.

Contributions des auteurs:

Conceptualisation : **M.B.**, J.P., J.R., et A.F. Méthodologie : **M.B.**, J.R., et A.F. Analyses, interprétations et expériences : **M.B.**, D.V., S.D., J.P., A.L., L.M., S.P.A., H.M., G.G.-L., C.B., G.G., A.C., J.R., et A.F. Rédaction – version originale : **M.B.**, J.P., J.R., et A.F. Rédaction – édition et révision : **tous les auteurs.**

Statut:

Cet article a été publié dans mBio, le 27 avril 2022.

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00577-22>

3.1.1 RÉSUMÉ

La glycoprotéine d'enveloppe (Env) du VIH-1 est le seul antigène présent à la surface des virions et des cellules infectées, représentant donc la cible principale de la réponse humorale. Temsavir (BMS-626529), un inhibiteur d'attachement approuvé par la FDA, prévient l'interaction entre Env et le récepteur CD4 de la cellule hôte en liant la gp120 de l'Env. Cette molécule stabilise également l'Env dans sa conformation «fermée», soit une conformation connue pour être principalement ciblée par les anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs). Une étude récente a démontré que l'analogue de temsavir (BMS-377806) affecte le clivage et l'addition de glycanes complexes à la surface de l'Env. Lors de cette étude, nous avons investigué l'impact de temsavir sur la glycosylation, le clivage protéolytique, l'expression de surface ainsi que l'antigénicité de l'Env. Nous avons observé que temsavir impact la glycosylation et le clivage à des concentrations physiologiques. Ceci affecte significativement la reconnaissance de l'Env présente à la surface des virions et des cellules infectées par plusieurs bNAbs. Le traitement des cellules par temsavir réduit également la capacité des bNAbs à éliminer les cellules infectées par le VIH-1 par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Dans l'ensemble, l'impact de temsavir sur la glycosylation et l'antigénicité devrait être considéré pour le développement de nouvelles approches basées sur les anticorps chez les individus traités avec temsavir.

3.1.2 ABSTRACT

The heavily glycosylated HIV-1 envelope glycoprotein (Env) is the sole viral antigen present at the surface of virions and infected cells, representing the main target for antibody responses. The FDA-approved small molecule temsavir acts as an HIV-1 attachment inhibitor by preventing Env-CD4 interaction. This molecule also stabilizes Env in a prefusion “closed” conformation that is preferentially targeted by several broadly neutralizing antibodies (bNAbs). A recent study showed that an analog of temsavir (BMS-377806) affects the cleavage and addition of complex glycans on Env. In this study, we investigated the impact of temsavir on the overall glycosylation, proteolytic cleavage, cell surface expression, and antigenicity of Env. We found that temsavir impacts Env glycosylation and processing at physiological concentrations. This significantly alters the capacity of several bNAbs to recognize Env present on virions and HIV-1-infected cells. Temsavir treatment also reduces the capacity of bNAbs to eliminate HIV-1-infected cells by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Consequently, the impact of temsavir on Env glycosylation and

antigenicity should be considered for the development of new antibody-based approaches in temsavir-treated individuals.

3.1.3 MAIN TEXT

HIV-1 envelope glycoproteins (Env) mediate viral entry and are synthesized as a gp160 precursor, which is then trimerized and cleaved by host furin-like proteases (1, 2). This generates the mature Env composed of three gp120 exterior and three gp41 transmembrane subunits. Env is the only virus-specific antigen on the surface of the virus and infected cells, and as such, it is the target of neutralizing and nonneutralizing antibodies (nnAbs) (3). Over the years, significant developments have been made in the generation of HIV-1 entry inhibitors, such as maraviroc (CCR5 antagonist), enfuvirtide (gp41 fusion inhibitor), and ibalizumab (CD4 antagonist): however, none of them directly targets gp120 (4–6). In July 2020, a new small molecule attachment inhibitor, fostemsavir (BMS-663068 [Rukobia]), obtained FDA approval to treat HIV-1-infected individuals who had developed multidrug resistance (7).

Temsavir (BMS-626529), the active compound of fostemsavir, binds a conserved pocket under the β 20- β 21 loop of gp120 (8). The binding of this drug prevents the interaction with CD4 and stabilizes Env in a prefusion “closed” state 1 conformation, which is preferentially targeted by broadly neutralizing antibodies (bNAbs) (8–11). By stabilizing Env in this “closed” conformation, temsavir might be helpful in exposing Env in its untriggered native state to the immune system. However, an analog of temsavir, BMS-377806, was recently shown to decrease the cleavage of gp160 as well as the addition of complex glycans, two processes related to Env conformational flexibility (12). Since most bNAbs preferentially recognize conformation-dependent epitopes that are composed of or adjacent to glycans, we evaluated the impact of temsavir on overall Env glycosylation, its proteolytic cleavage, and the binding capacity of bNAbs to Env present on the surface of virions and infected primary CD4⁺ T cells. Since the combination of temsavir with certain bNAbs is being explored (13), we also evaluated whether temsavir treatment affected the capacity of bNAbs to eliminate infected cells by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

Because BMS-377806 limits Env conformational flexibility (12), we first investigated the impact of temsavir on overall Env processing and glycosylation. To do this, HEK 293T cells were

transfected with a plasmid encoding the gp160 of the primary tier 2 JR-FL isolate. This Env was selected since it has been extensively characterized structurally (14), used for ADCC responses (15, 16), and was previously used to measure the impact of short-term temsavir treatment on the conformational landscape of incorporated Env (9, 10). Transfected cells were radioactively labeled, followed by immunoprecipitation of whole-cell lysates and supernatants with HIV+ plasma, as previously reported (17). We observed an impact of temsavir on gp120 glycosylation, as illustrated by the presence of a lower-molecular-weight band of gp120 in the cell lysate and the supernatant from treated cells (**Fig. 3.1.1**). This phenotype was dose dependent and observed at biologically relevant doses (see **Fig. 3.1.S1A** in the supplemental material) since its effect was visualized at 100 nM, which is below the concentration achieved in treated individuals (18). As previously observed with BMS-377806, temsavir treatment also significantly ($P < 0.01$) reduced Env processing (12) (**Fig. 3.1.1A and B; Fig. 3.1.S1A**).

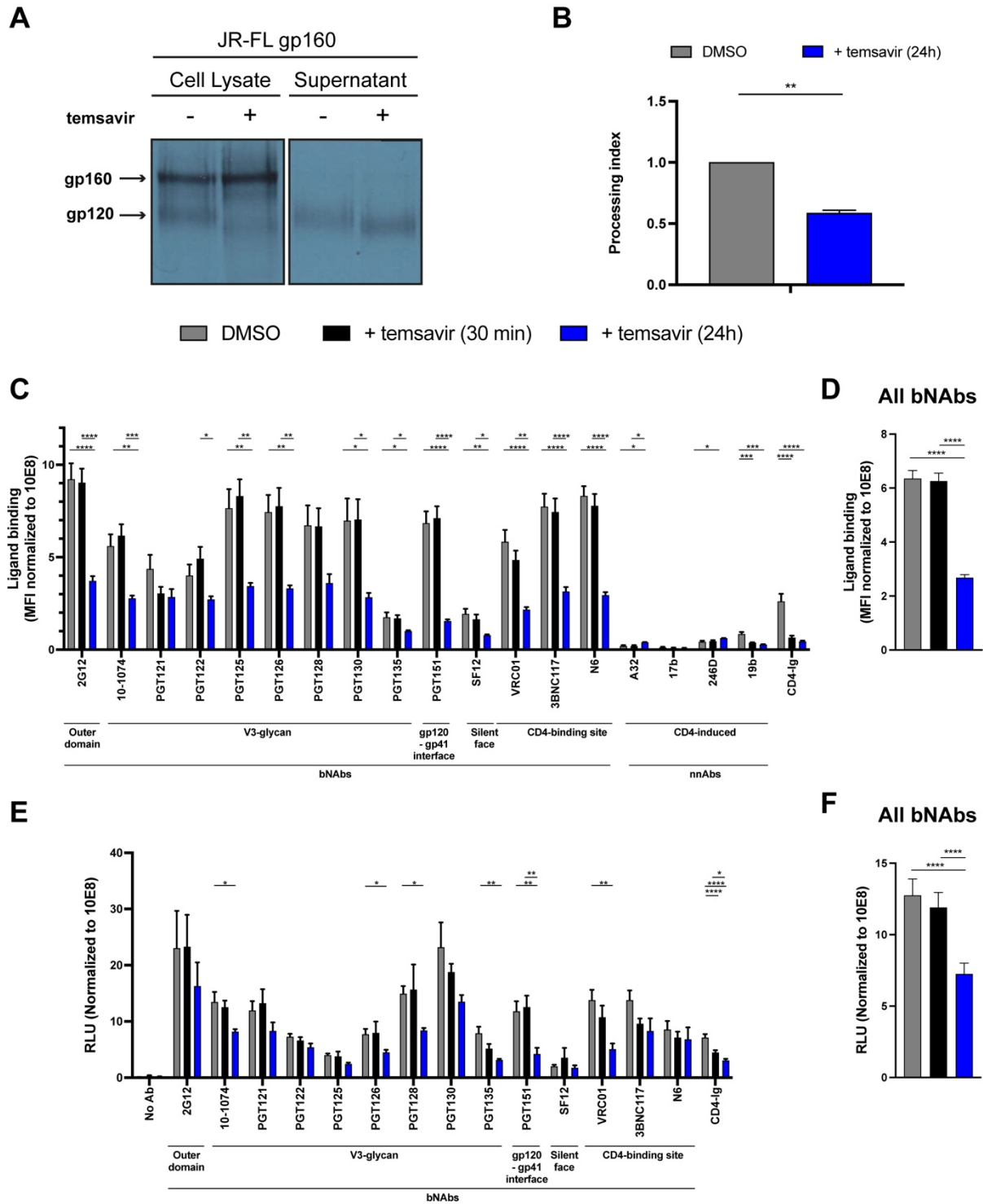


Figure 3.1.1 Temsavir alters Env glycosylation, cleavage, and bNAb binding. (A) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env and metabolically labeled for 24 h with [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine in the presence of 10 μM temsavir or the equivalent volume of DMSO. Cell lysates and supernatants were immunoprecipitated with plasma from HIV-1-infected individuals. The precipitated proteins were loaded onto SDS-PAGE gels and analyzed by

autoradiography. (B) Quantification of the impact of temsavir on Env processing on Env-expressing HEK 293T cells in cell lysates and supernatants. (C) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env together with a plasmid expressing the GF and treated with 10 μ M temsavir for 24 h or the equivalent volume of DMSO. Cells were then stained for recognition of cell-surface Env by the indicated ligands in the presence (30 min) or absence of temsavir (10 μ M). Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the different ligands normalized to the signal obtained with the glycan-independent 10E8 MAb. MFI values were measured on the transfected (green fluorescent protein-positive [GFP⁺]) population. (D) The graph shown represents the compilation of normalized MFI for all bNAbs for each condition. (E) The capacity of the indicated ligands to capture viral particles bearing HIV-1JR-FL Env was assessed by a virus capture assay. Temsavir was added for 24 h on virus-producing cells or only during the assay (30 min). Relative light units (RLU) obtained using a given ligand were normalized to the signal obtained with the 10E8 MAb. (F) The graph shown represents the compilation of normalized RLU for all bNAbs for each condition. Error bars indicate the mean \pm standard error of the mean (SEM). The data shown are representative of results from at least three independent experiments. Statistical significance was tested using (B) a Mann-Whitney test or (C to F) one-way analysis of variance (ANOVA) (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

Having corroborated that treatment of Env-expressing cells with temsavir decreases Env glycosylation and cleavage, we then evaluated whether it affects its recognition by a panel of bNAbs and nonneutralizing antibodies. Our panel comprises the gp120 outer domain glycan-dependent 2G12 antibody (Ab), V3 glycan (10-1074, PGT121, PGT122, PGT125, PGT126, PGT128, PGT130, and PGT135), gp120-gp41 interface (PGT151), silent face (SF12), CD4-binding site (VRC01, 3BNC117, and N6), as well as CD4-induced (CD4i) antibodies (A32, 17b, 246D, and 19b). The CD4-Ig protein was used as a readout for CD4 binding. HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing the full-length HIV-1 isolate JR-FL Env wild type (WT) and subsequently treated with temsavir for 24 h. To differentiate the impact of temsavir on Env glycosylation/cleavage from its state 1 stabilizing effect, temsavir was also added only during the 30-min incubation period with monoclonal antibodies (MAbs). Since no major effects were observed with the anti-gp41 MPER 10E8 bNAbs upon short or long treatment (see Fig. S2 in the supplemental material), we used this antibody to normalize cell surface Env expression. We observed no major changes in the recognition of Env by our panel of bNAbs when temsavir was added at the same time as the antibodies. Remarkably, long temsavir treatment (24 h) significantly decreased recognition by several bNAbs targeting the outer domain, the V3-glycans, the gp120-gp41 interface, or the CD4-binding site ($P < 0.0001$) (**Fig. 3.1.1C and D**), thus, suggesting that modulation of Env glycosylation/cleavage by temsavir significantly affects Env antigenicity. The intrinsic contribution of each of these mechanisms (i.e., impaired Env cleavage and/or

glycosylation changes) to the overall decrease in bNAb recognition remains unknown. Importantly, this effect was dose dependent and observed with concentrations as low as 10 nM (**Fig. 3.1.S1B**). While temsavir also reduced CD4-Ig binding, this phenotype could be linked to its capacity to compete with CD4 and the treatment's effect on glycosylation (8), especially since CD4-Ig binding was also reduced upon short-term temsavir treatment. As previously reported, nonneutralizing epitopes were poorly exposed at the surface of Env-expressing cells (19). Env proteolytic cleavage decreases its flexibility and exposure of epitopes recognized by nnAbs (15, 20, 21). Accordingly, uncleaved Envs are readily recognized by CD4i nnAbs (20). Despite its effect on Env cleavage, temsavir treatment did not significantly increase Env recognition by CD4i nnAbs (**Fig. 3.1.1C**). This is likely due to its capacity to stabilize Env in its “closed” state 1 conformation (10). Importantly, the impact of temsavir on Env antigenicity was specific since no effect was observed with the temsavir-resistant Env S375W mutant (see **Fig. 3.1.S3** in the supplemental material) (22).

To evaluate whether temsavir treatment also affected the capacity of bNAbs to bind Env presented at the surface of viral particles, we used a previously described virus capture assay (VCA) (23). Viral particles expressing the JR-FL Env produced in the presence or absence of temsavir were added to plates coated with bNAbs or CD4-Ig, and viral capture was measured as previously described (23). Similar to the observations with Env-expressing cells, temsavir treatment of virus-producing cells significantly decreased Env recognition by multiple bNAbs and ligands, including 10-1074 ($P < 0.05$), PGT126 ($P < 0.05$), PGT128 ($P < 0.05$), PGT151 ($P < 0.01$), VRC01 ($P < 0.01$), and CD4-Ig ($P < 0.0001$) (**Fig. 3.1.1E**). Taking all tested bNabs together, a significant reduction of binding was observed upon 24 h of temsavir treatment ($P < 0.0001$) (**Fig. 3.1.1F**). In contrast, short-term (30 min) temsavir treatment did not significantly reduce the capacity of bNAbs to capture viral particles bearing JR-FL Env. This result suggests that the impact of temsavir on Env glycosylation and/or cleavage, rather than its direct impact on Env conformation, decreases the capacity of tested anti-Env ligands to bind viral particles.

To evaluate the impact of temsavir treatment on the capacity of bNAbs to recognize HIV-1-infected cells, we used HIV-1JR-FL-infected primary CD4⁺ T cells subjected to temsavir or dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment for 24 h prior to measuring MAb binding. Consistent with our observations obtained using Env-expressing HEK 293T cells, productively infected cells (p24⁺)

were significantly less recognized by several bNAbs upon temsavir treatment ($P < 0.0001$) (Fig. 3.1.2A and and B).

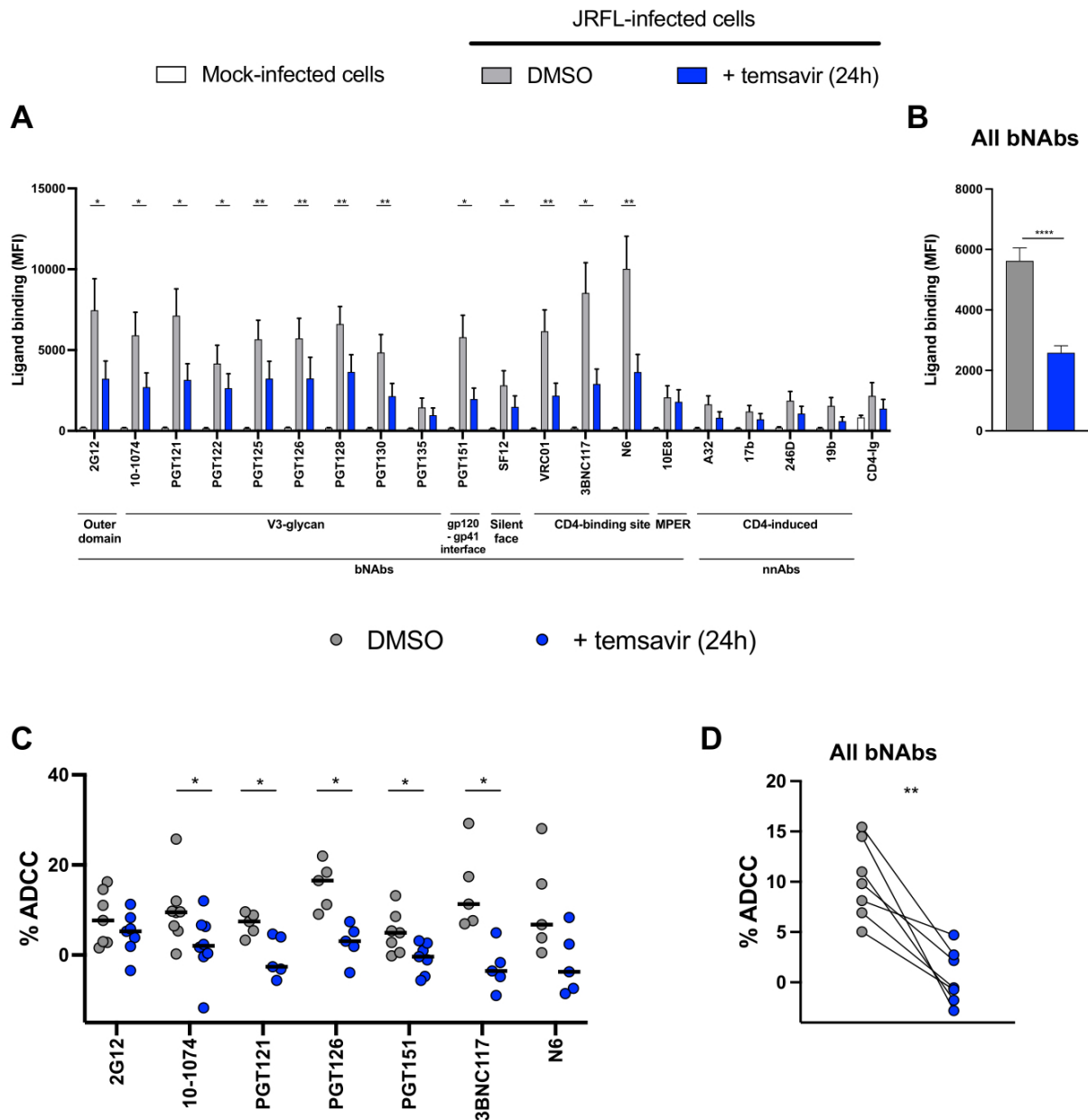


Figure 3.1.2 Impact of temsavir treatment on the recognition and elimination of infected primary CD4⁺ T cells by ADCC. (A) Primary CD4⁺ T cells infected with HIV-1_{JR-FL} virus were treated with 10 μ M temsavir for 24 h or the equivalent volume of DMSO and were stained for recognition of cell surface Env by the indicated ligands. Mock-infected cells were used as a control for anti-Env ligand specificity. Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) measured on the infected (p24⁺) population of the average of 3 different donors. (B) The graph shown represents

the compilation of MFI for all bNAbs for each condition. (C) Primary CD4⁺ T cells infected with HIV-1_{JR-FL} virus were used as target cells and autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as effector cells in a FACS-based ADCC assay. The graphs shown represent the percentages of ADCC mediated by 2G12, 10-1074, PGT121, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6 with target cells treated for 24 h with 10 μ M temsavir or the equivalent volume of DMSO. (D) The graph shown represents the mean percentage of ADCC obtain for each tested antibody with DMSO and temsavir treatment. Ligand binding and ADCC responses were obtained in at least 5 independent experiments using cells from 6 different donors. Error bars indicate means \pm SEM. Statistical significance was tested using a paired t test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

With this phenotype, we next evaluated whether the capacity of bNAbs to eliminate infected cells by ADCC was also affected. After a 24 h treatment, ADCC mediated by the bNAbs 2G12, 10-1074, PGT121, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6 was measured using a fluorescence-activated cell sorter (FACS)-based assay that measures the elimination of productively infected cells (24). In agreement with decreased recognition, temsavir-treated cells were significantly more resistant to ADCC responses mediated by the majority of these bNAbs ($P < 0.01$) (**Fig. 3.1.2C and D**).

In summary, we have demonstrated that temsavir treatment of Env-producing cells alters the overall antigenicity of Env present at the surface of virions and infected cells. This information is important for the development of immunotherapies aimed at decreasing the size of the viral reservoir in temsavir-treated individuals.

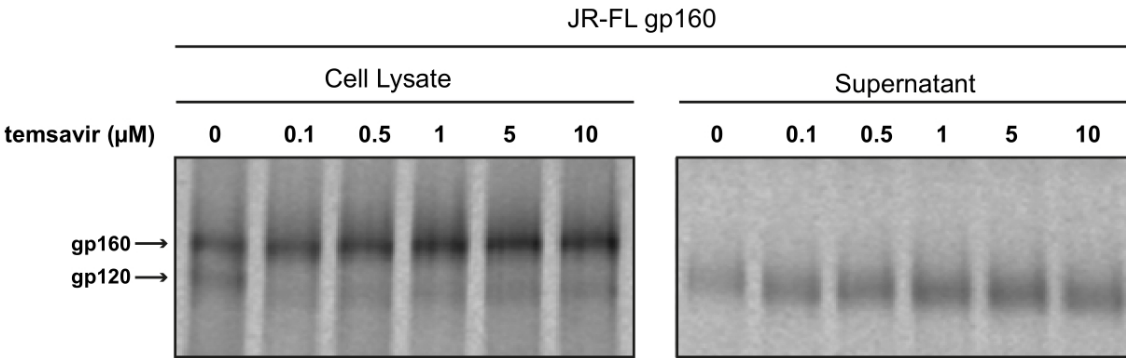
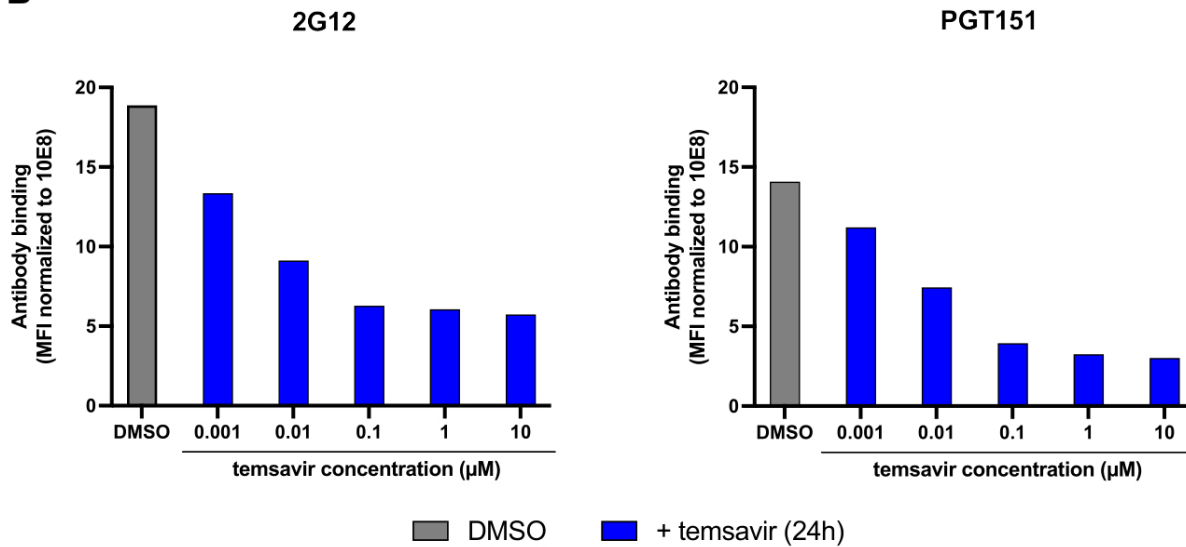
A**B**

Figure 3.1.S1. Temsavir's effect on Env glycosylation and ligand binding at different concentrations. (A) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env and metabolically labeled for 24 h with [^{35}S]methionine and [^{35}S]cysteine in the presence of increasing concentrations of temsavir (0.1, 0.5, 1, 5, and 10 μM) or the equivalent volume of DMSO. Cell lysates and supernatants were immunoprecipitated with plasma from HIV-1-infected individuals. The precipitated proteins were loaded onto SDS-PAGE gels and analyzed by autoradiography (B) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env together with a plasmid expressing the green fluorescence protein (GFP) and treated with increasing concentrations of temsavir (0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 μM) for 24 h or with the equivalent volume of DMSO. Cells were then stained for recognition of cell surface Env by 2G12 and PGT151. Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the different ligands normalized to the signal obtained with the glycan-independent 10E8 MAb. MFI values were measured on the transfected (GFP⁺) population.

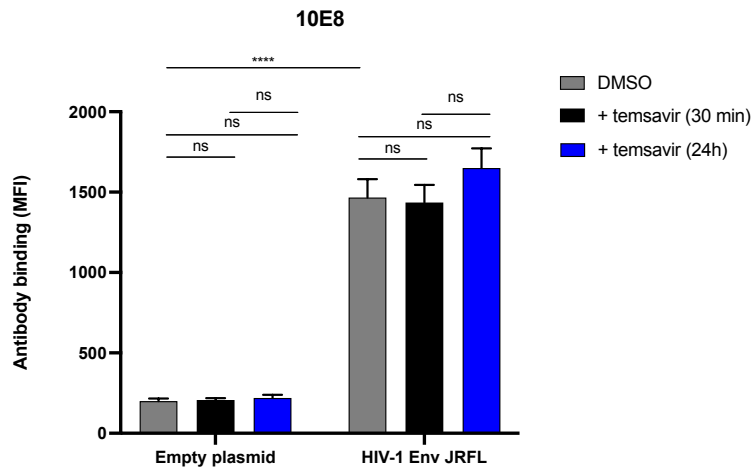


Figure 3.1.S2. Normalization of cell surface Env expression by anti-gp41 MPER 10E8 bNAb. HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env together with a plasmid expressing the GFP and treated with 10 μ M temsavir for 24 h or the equivalent volume of DMSO. Cells were then stained for recognition of cell surface Env by the indicated ligands in the presence (30 min) or absence of temsavir (10 μ M). Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the glycan-independent 10E8 MAb. MFI values were measured on the transfected (GFP⁺) population. Statistical significance was measured using ordinary one-way ANOVA. The data shown are representative of results from 14 experiments.

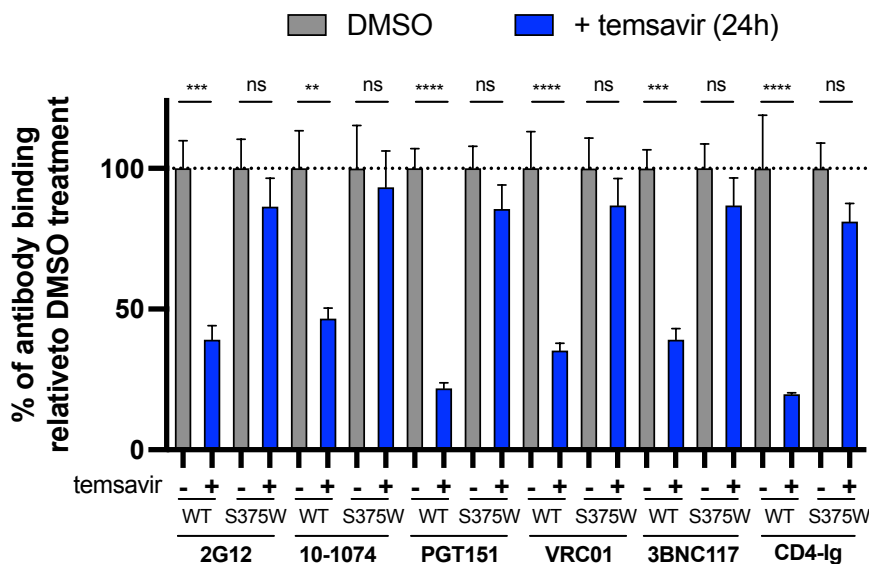


Figure 3.1.S3. Impact of temsavir treatment on the recognition of the Env S375W mutant by bNAbs. HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing JR-FL Env WT together with a plasmid expressing the GFP or the temsavir-resistant S375W mutant. Cells were treated with 10

μ M temsavir for 24 h or the equivalent volume of DMSO. Cells were then stained for recognition of cell surface Env by the indicated ligands in the presence or absence of temsavir (10 μ M). Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the different ligands normalized to the signal obtained with the glycan-independent 10E8 MAb. MFI values were measured on the transfected (GFP⁺) population. Error bars indicate the mean \pm SEM. The data shown are representative of results from five experiments. Statistical significance was tested using ordinary one-way ANOVA (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001).

3.1.4 ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CRCHUM BSL3 and Flow Cytometry Platforms for technical assistance and Mario Legault from the FRQS AIDS and Infectious Diseases network for cohort coordination and clinical samples. We thank Dennis Burton (The Scripps Research Institute) for kindly providing the JR-FL infectious molecular clone, Michel Nussenzweig (The Rockefeller University) for antibodies 10-1074, 3BNC117, and SF12, and Susan Zolla-Pazner (Icahn School of Medicine at Mount Sinai) for the 246D antibody. This study was supported by grants from National Institutes of Health grants AI148379, AI129769, and R01 AI150322 to A.F. This work was also partially supported by the following: 1UM1AI164562-01, cofunded by the National Heart, Lung and Blood Institute, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institute on Drug Abuse, and National Institute of Allergy and Infectious Diseases; CIHR Foundation grant 352417; CIHR Team grant 422148; and Canada Foundation for Innovation grant 41027 to A.F. Funds were also provided by ViiV Healthcare to A.F. A.F. is the recipient of a Canada Research Chair on Retroviral Entry (RCHS0235 950-232424). J.P. and S.P.A. are recipients of a CIHR doctoral fellowship. A.L. is supported by a MITACS Accélération postdoctoral fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. A.F. received funding from ViiV Healthcare and an advisory board. A.C. is a full-time employee of ViiV Healthcare.

3.1.5 REFERENCES

1. Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B. 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* 76:7863–7867. doi: 10.1128/jvi.76.15.7863-7867.2002.
2. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53:55–67. doi: 10.1016/0092-8674(88)90487-4.
3. Wang Q, Finzi A, Sodroski J. 2020. The conformational states of the HIV-1 envelope glycoproteins. *Trends Microbiol* 28:655–667. doi: 10.1016/j.tim.2020.03.007.
4. Wood A, Armour D. 2005. The discovery of the CCR5 receptor antagonist, UK-427,857, a new agent for the treatment of HIV infection and AIDS. *Prog Med Chem* 43:239–271. doi: 10.1016/S0079-6468(05)43007-6.
5. Clercq ED. 2002. New anti-HIV agents and targets. *Med Res Rev* 22:531–565. doi: 10.1002/med.10021.
6. Burkly LC, Olson D, Shapiro R, Winkler G, Rosa J, Thomas D, Williams C, Chisholm P. 1992. Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion. *J Immunol* 149:1779–1787.
7. FDA. 2020. FDA approves new HIV treatment for patients with limited treatment options. RELEASE FN, fda.gov. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-hiv-treatment-patients-limited-treatment-options>.
8. Pancera M, Lai Y-T, Bylund T, Druz A, Narpala S, O'Dell S, Schön A, Bailer RT, Chuang G-Y, Geng H, Louder MK, Rawi R, Soumana DI, Finzi A, Herschhorn A, Madani N, Sodroski J, Freire E, Langley DR, Mascola JR, McDermott AB, Kwong PD. 2017. Crystal structures of trimeric HIV envelope with entry inhibitors BMS-378806 and BMS-626529. *Nat Chem Biol* 13:1115–1122. doi: 10.1038/nchembio.2460.
9. Munro JB, Gorman J, Ma X, Zhou Z, Arthos J, Burton DR, Koff WC, Courter JR, Smith AB, Kwong PD, Blanchard SC, Mothes W. 2014. Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science* 346:759–763. doi: 10.1126/science.1254426.
10. Lu M, Ma X, Castillo-Menendez LR, Gorman J, Alshafi N, Ermel U, Terry DS, Chambers M, Peng D, Zhang B, Zhou T, Reichard N, Wang K, Grover JR, Carman BP, Gardner MR, Nikić-Spiegel I, Sugawara A, Arthos J, Lemke EA, Smith AB, Farzan M, Abrams C, Munro JB,

- McDermott AB, Finzi A, Kwong PD, Blanchard SC, Sodroski JG, Mothes W. 2019. Associating HIV-1 envelope glycoprotein structures with states on the virus observed by smFRET. *Nature* 568:415–419. doi: 10.1038/s41586-019-1101-y.
11. Si Z, Madani N, Cox JM, Chruma JJ, Klein JC, Schön A, Phan N, Wang L, Biorn AC, Cocklin S, Chaiken I, Freire E, Smith AB, Sodroski JG. 2004. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5036–5041. doi: 10.1073/pnas.0307953101.
 12. Zhang S, Wang K, Wang WL, Nguyen HT, Chen S, Lu M, Go EP, Ding H, Steinbock RT, Desaire H, Kappes JC, Sodroski J, Mao Y. 2021. Asymmetric structures and conformational plasticity of the uncleaved full-length human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein trimer. *J Virol* 95:e00529-21. doi: 10.1128/JVI.00529-21.
 13. Zhang Y, Chapman JH, Ulcay A, Sutton RE. 2019. Neutralization synergy between HIV-1 attachment inhibitor fostemsavir and anti-CD4 binding site broadly neutralizing antibodies against HIV. *J Virol* 93:e01446-18. doi: 10.1128/JVI.01446-18.
 14. Lee JH, Ozorowski G, Ward AB. 2016. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 351:1043–1048. doi: 10.1126/science.aad2450.
 15. Alshafi N, Bakouche N, Kazemi M, Richard J, Ding S, Bhattacharyya S, Das D, Anand SP, Prévost J, Tolbert WD, Lu H, Medjahed H, Gendron-Lepage G, Ortega Delgado GG, Kirk S, Melillo B, Mothes W, Sodroski J, Smith AB, III, Kaufmann DE, Wu X, Pazgier M, Rouiller I, Finzi A, Munro JB. 2019. An asymmetric opening of HIV-1 envelope mediates antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cell Host Microbe* 25:578–587.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.03.002.
 16. Prévost J, Richard J, Gasser R, Medjahed H, Kirchhoff F, Hahn BH, Kappes JC, Ochsenbauer C, Duerr R, Finzi A. 2022. Detection of the HIV-1 accessory proteins Nef and Vpu by flow cytometry represents a new tool to study their functional interplay within a single infected CD4+ T cell. *J Virol* 96:e01929-21. doi: 10.1128/jvi.01929-21.
 17. Finzi A, Xiang S-H, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong PD, Sodroski J. 2010. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell* 37:656–667. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.012.

18. Lagishetty C, Moore K, Ackerman P, Llamoso C, Magee M. 2020. Effects of temsavir, active moiety of antiretroviral agent fostemsavir, on QT interval: results from a phase I study and an exposure-response analysis. *Clin Transl Sci* 13:769–776. doi: 10.1111/cts.12763.
19. Prévost J, Richard J, Ding S, Pacheco B, Charlebois R, Hahn BH, Kaufmann DE, Finzi A. 2018. Envelope glycoproteins sampling states 2/3 are susceptible to ADCC by sera from HIV-1-infected individuals. *Virology* 515:38–45. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.002.
20. Prévost J, Medjahed H, Vézina D, Chen H-C, Hahn BH, Smith AB, Finzi A. 2021. HIV-1 envelope glycoproteins proteolytic cleavage protects infected cells from ADCC mediated by plasma from infected individuals. *Viruses* 13:2236. doi: 10.3390/v13112236.
21. Haim H, Salas I, Sodroski J. 2013. Proteolytic processing of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor decreases conformational flexibility. *J Virol* 87:1884–1889. doi: 10.1128/JVI.02765-12.
22. Madani N, Perdigoto AL, Srinivasan K, Cox JM, Chruma JJ, LaLonde J, Head M, Smith AB, III, Sodroski JG. 2004. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J Virol* 78:3742–3752. doi: 10.1128/JVI.78.7.3742-3752.2004.
23. Ding S, Gasser R, Gendron-Lepage G, Medjahed H, Tolbert WD, Sodroski J, Pazgier M, Finzi A. 2019. CD4 incorporation into HIV-1 viral particles exposes envelope epitopes recognized by CD4-induced antibodies. *J Virol* 93:e01403-19. doi: 10.1128/JVI.01403-19.
24. Richard J, Prévost J, Baxter AE, von Bredow B, Ding S, Medjahed H, Delgado GG, Brassard N, Stürzel CM, Kirchhoff F, Hahn BH, Parsons MS, Kaufmann DE, Evans DT, Finzi A. 2018. Uninfected bystander cells impact the measurement of HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *mBio* 9:e00358-18. doi: 10.1128/mBio.00358-18.

3.1.6 SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all study participants and research adhered to the ethical guidelines of CRCHUM and was reviewed and approved by the CRCHUM institutional review board (ethics committee, approval number CE 16.164 - CA). Research adhered to the standards indicated by the Declaration of Helsinki. All participants were adult and provided informed written consent prior to enrolment in accordance with Institutional Review Board approval.

Cell lines and primary cells.

HEK 293T human embryonic kidney cells (obtained from ATCC) were maintained at 37°C under 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent) containing 5% fetal bovine serum (FBS; VWR) and 100 µg/mL of penicillin–streptomycin (Wisent). Primary human PBMCs and CD4⁺ T cells were isolated, activated and cultured as previously described (1). Briefly, PBMCs were obtained by leukapheresis from seven HIV-negative individuals (five males and two females). CD4⁺ T cells were purified from rested PBMCs by negative selection kit (EasySep human CD4⁺ T cell enrichment kit; STEMCELL Technologies) and were activated with phytohemagglutinin-L (10µg/mL) for 48 hours and then maintained in RPMI 1640 complete medium supplemented with rIL-2 (100 U/mL).

Plasmids.

The sequence of full-length clade B JR-FL Env was codon optimized (GenScript) and cloned into expression plasmid pcDNA3.1(-) (Invitrogen) (2). The S375W mutation was introduced in the JR-FL Env expressor using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis protocol (Agilent Technologies) (3). The presence of the desired mutations was determined by automated DNA sequencing. The HIV-1_{JR-FL} IMC was previously described (4). Vesicular stomatitis virus G (VSV-G)-encoding plasmid was also previously reported (5). The reporter proviral vector pNL4.3 Luc R-E- was obtained through the NIH AIDS Reagent Program.

Antibodies.

The following Abs were used as primary antibodies for cell-surface Env staining: 10e8, 2G12, VRC01, N6, CD4-Ig, A32, 17b and 19b (NIH AIDS Reagent Program), 10-1074, 3BNC117, SF12 (kindly provided by Michel Nussenzweig), 246D (kindly provided by Susan Zolla-Pazner), PGT121, PGT122, PGT125, PGT126, PGT128, PGT130, PGT135, PGT151 (IAVI) and the soluble CD4-immunoglobulin fusion protein (CD4-Ig) (NIH AIDS Reagent Program). Goat anti-human IgG (H+L) antibodies pre-coupled to Alexa Fluor 647 (Invitrogen) were used as secondary antibodies in flow cytometry experiments.

Small molecules.

The HIV-1 attachment inhibitor temsavir (BMS-626529) was purchased from APEX BIO. The compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a stock concentration of 10 mM and diluted to 10 μ M in phosphate-buffered saline (PBS) for cell-surface staining and virus capture assay or RPMI 1640 complete medium for ADCC assays or for 24h treatment.

Radioactive labeling and immunoprecipitation of envelope glycoproteins.

HEK 293T cells (5×10^5) were transfected by the calcium phosphate method with the JR-FL Env expressor. One day after transfection, cells were metabolically labeled for 16-24 h with 100 μ Ci/mL of [35 S] methionine-cysteine ([35 S] Protein Labeling Mix; PerkinElmer) in DMEM lacking methionine and cysteine and supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and 1% GlutaMAXTM supplement (Thermo Fisher Scientific). Cells were subsequently lysed in RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% IGEPAL[®] CA-630 (Sigma-Aldrich), 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1.2 mM sodium deoxycholate). Precipitation of radiolabeled envelope glycoproteins from the whole-cell lysates or found in the supernatant was performed with a pool of sera from HIV-1-infected individuals in the presence of 45 μ L of 10% Protein A-Sepharose beads (Cytiva) at 4 °C. The precipitated proteins were loaded onto SDS-PAGE gels and analyzed by autoradiography and densitometry to calculate their processing indices. The processing index is a measure of the conversion of the temsavir-treated gp160 Env precursor to mature gp120, relative to mock-treated Env trimers and takes into account the total amount of Env-related bands present in the cell lysate and supernatant. The processing index is calculated with the following formula:
$$\text{processing index} = \frac{[\text{total gp120}]_{\text{treated}}}{[\text{gp160}]_{\text{mock-}}}$$

treated)/([gp160]treated × [total gp120]mock-treated). Total refers to the gp120 in the cell lysate and supernatant.

Transfection.

HEK 293T cells (3×10^5) were transfected with 10 μg of a plasmid expressing JR-FL WT gp160, JRFL S375W gp160 (or pcDNA3.1 as negative control) and 2.5 μg of a green fluorescent protein (GFP) expressor (pIRES2-GFP; Clontech) using the standard calcium phosphate method. The next day, media were changed for fresh media containing 10 μM of temsavir (temsavir 24h) or the equivalent volume of DMSO (conditions DMSO and temsavir 30 min)

Virus production and infections.

To obtain the same level of infection among the different experiments, vesicular stomatitis virus G (VSV-G)-pseudotyped HIV-1_{JR-FL} viruses were produced and titrated as previously described (6). HIV-1_{JR-FL} viruses were used to infect activated primary CD4⁺ T cells from healthy donors by spin infection at $800 \times g$ for 1h in 96-well plates at room temperature.

Virus capture assay.

The assay was modified from a previous published method (7). Briefly, pseudoviral particles were produced by transfecting 2×10^6 HEK 293T cells with pNL4.3 Luc R-E- (3.5 μg), plasmids encoding for JR-FL WT gp160 or JR-FL S375W gp160 (3.5 μg) and VSV-G (1 μg) using the standard calcium phosphate protocol. Twenty-four hours later, media of the transfected cells was changed with full DMEM medium containing 10 μM temsavir or the equivalent volume of DMSO. Virion-containing supernatants were collected after 24h treatment and cell debris were removed through centrifugation ($486 \times g$ for 10 min). Half of the supernatant treated with DMSO was incubated with 10 μM temsavir for 30 minutes before adding to the ELISA plate. To immobilize antibodies on ELISA plates, white MaxiSorp ELISA plates (Thermo Fisher Scientific) were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of antibodies in 100 μL PBS overnight at 4°C. Unbound antibodies were removed by washing the plates twice with PBS. Plates were subsequently blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1h at room temperature. After two washes with PBS, 200 μL of virion-containing supernatant were added per well. After 4 to 6 hours incubation, supernatants were removed, and the wells were washed with PBS 3 times. Viral capture by any given antibody was

visualized by adding 1×10^4 HIV-1 resistant 293T cells in full DMEM medium per well. Forty-eight hours post-infection, cells were lysed by the addition of 30 μ L of passive lysis buffer (Promega) and one freeze-thaw cycle. An LB942 TriStar luminometer (Berthold Technologies) was used to measure the luciferase activity of each well after the addition of 100 μ L of luciferin buffer (15 mM MgSO₄, 15 mM KH₂PO₄ [pH 7.8], 1 mM ATP, and 1mM dithiothreitol) and 50 μ L of 1 mM D-luciferin potassium salt (Prolume).

Flow cytometry analysis of cell-surface staining

For cell surface staining, HEK 293T or primary CD4⁺ T cells were incubated for 30 min at 37°C 48h post-transfection/infection with 5 μ g/mL of anti-Env monoclonal antibodies in PBS. Cells were then washed twice with PBS and stained with 2 μ g/mL goat anti-human IgG Alexa Fluor 647 secondary antibodies for 20 min in PBS. After two more PBS washing, cells were fixed in a 2% PBS-formaldehyde solution. For the detection of intracellular p24 protein, infected primary CD4⁺ T cells were permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) and stained intracellularly using the PE-conjugated mouse anti-p24 mAb (clone KC57; Beckman Coulter; 1:100 final concentration). The percentage of infected cells (p24⁺ cells) was determined by gating the living cell population on the basis of viability dye staining (AquaVivid, Thermo Fisher Scientific). Samples were analyzed on an LSRII cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed using FlowJo v10.5.3 (Tree Star).

FACS-based ADCC assay

Measurement of ADCC using the FACS-based assay was performed at 48h post- infection as previously described (1, 8). Briefly, HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells were stained with AquaVivid viability dye and cell proliferation dye (eFluor670; eBioscience) and used as target cells. Autologous PBMC effector cells, stained with another cellular marker (cell proliferation dye eFluor450; eBioscience), were added at an effector: target ratio of 10:1 in 96-well V-bottom plates (Corning). For evaluation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), 5 μ g/mL of anti-Env mAbs were added to appropriate wells and cells were incubated for 5 min at room temperature. The plates were subsequently centrifuged for 1 min at $300 \times g$, and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 5 h before being fixed in a 2% PBS-formaldehyde solution. Cells were than permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) and stained intracellularly

using the PE-conjugated mouse anti-p24 mAb (clone KC57; Beckman Coulter; 1:100 final concentration). Samples were acquired on an LSRII cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed using FlowJo v10.5.3 (Tree Star). The percentage of ADCC was calculated with the following formula: $(\% \text{ of p24+ cells in Targets plus Effectors}) - (\% \text{ of p24+ cells in Targets plus Effectors plus antibody}) / (\% \text{ of p24+ cells in Targets})$ by gating on infected lived target cells.

Statistical analyses

Statistics were analyzed using GraphPad Prism version 9.1.0 (GraphPad). Every dataset was tested for statistical normality and this information was used to apply the appropriate (parametric or nonparametric) statistical test. P values < 0.05 were considered significant; significance values are indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. Corrections for multiple comparisons were performed with the Holm-Sidak post-test.

3.1.7 REFERENCES

1. Veillette M, Désormeaux A, Medjahed H, Gharsallah N-E, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH. 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of virology* 88:2633-2644.
2. Mao Y, Wang L, Gu C, Herschhorn A, Xiang S-H, Haim H, Yang X, Sodroski J. 2012. Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nature structural & molecular biology* 19:893-899.
3. Prévost J, Tolbert WD, Medjahed H, Sherburn RT, Madani N, Zoubchenok D, Gendron-Lepage G, Gaffney AE, Grenier MC, Kirk S, Vergara N, Han C, Mann BT, Chénine AL, Ahmed A, Chaiken I, Kirchoff F, Hahn BH, Haim H, Abrams CF, Smith AB, 3rd, Sodroski J, Pazgier M, Finzi A. 2020. The HIV-1 Env gp120 Inner Domain Shapes the Phe43 Cavity and the CD4 Binding Site. *mBio* 11.
4. O'Brien WA, Koyanagi Y, Namazie A, Zhao JQ, Diagne A, Idler K, Zack JA, Chen IS. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348:69-73.
5. Emi N, Friedmann T, Yee JK. 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 65:1202-7.
6. Veillette M, Coutu M, Richard J, Batraverse L-A, Dagher O, Bernard N, Tremblay C, Kaufmann DE, Roger M, Finzi A. 2015. The HIV-1 gp120 CD4-bound conformation is preferentially targeted by antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies in sera from HIV-1-infected individuals. *Journal of virology* 89:545-551.
7. Ding S, Gasser R, Gendron-Lepage G, Medjahed H, Tolbert WD, Sodroski J, Pazgier M, Finzi A. 2019. CD4 Incorporation into HIV-1 Viral Particles Exposes Envelope Epitopes Recognized by CD4-Induced Antibodies. *J Virol* 93.
8. Richard J, Veillette M, Brassard N, Iyer SS, Roger M, Martin L, Pazgier M, Schön A, Freire E, Routy JP, Smith AB, 3rd, Park J, Jones DM, Courter JR, Melillo BN, Kaufmann DE, Hahn BH, Permar SR, Haynes BF, Madani N, Sodroski JG, Finzi A. 2015. CD4 mimetics sensitize HIV-1-infected cells to ADCC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2687-94.

ARTICLE #2: Temsavir modulates HIV-1 Envelope conformation by decreasing its proteolytic cleavage

Marianne Boutin^{1,2}, Halima Medjahed¹, Manon Nayrac^{1,2}, Rishikesh Lotke³, Gabrielle Gendron-Lepage¹, Catherine Bourassa¹, Daniel Sauter^{3,4} Jonathan Richard^{1,2} and Andrés Finzi^{1,2,*}

Affiliations:

¹Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), QC H2X 0A9, Canada

²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

³Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, University Hospital Tübingen, 72076, Tübingen, Germany

⁴Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, 89081, Ulm, Germany

*Correspondence: Andrés Finzi, andres.finzi@umontreal.ca

Contributions des auteurs:

Conceptualisation : **M.B.**, J.R., et A.F. Méthodologie : **M.B.**, J.R., et A.F. Analyses, interprétations et expériences : **M.B.**, H.M., M.N., G.G.-L., C.B., D.S., J.R., et A.F. Génération d'expression d'Env : R.L., D.S., Rédaction – version originale : **M.B.**, J.R., et A.F. Rédaction – édition et révision : **tous les auteurs.**

Statut:

Cet article a été publié dans Viruses, le 18 mai 2023.

<https://www.mdpi.com/1999-4915/15/5/1189>

3.2.1 RÉSUMÉ

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (Env) médient l'entrée virale et représentent une cible de choix pour les petites molécules inhibitrices. L'une d'entre elles, temsavir (BMS-626529), empêche l'interaction entre le récepteur CD4 de l'hôte et l'Env en se liant sous la boucle β 20- β 21 de la sous-unité gp120. En plus de sa capacité à prévenir l'entrée virale, temsavir stabilise l'Env dans sa conformation « fermée ». Nous avons récemment observé que temsavir affecte la glycosylation, le clivage protéolytique ainsi que la conformation globale de l'Env. Nous avons donc étendu ces résultats à un panel d'Env primaire et de clones moléculaires infectieux (IMC) où nous observons un impact hétérogène sur le clivage et la conformation d'Env. Nos résultats suggèrent que l'effet de temsavir sur la conformation d'Env est associé à sa capacité à diminuer le clivage de l'Env. En effet, nous montrons que l'effet de temsavir sur le clivage de l'Env affecte la reconnaissance des cellules infectées par le VIH-1 par les bNAbs et corrèle avec leur capacité à médier la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

3.2.2 ABSTRACT

HIV-1 envelope glycoproteins (Envs) mediate viral entry and represent a target of choice for small molecule inhibitors. One of them, temsavir (BMS-626529) prevents the interaction of the host cell receptor CD4 with Env by binding the pocket under the β 20- β 21 loop of the Env subunit gp120. Along with its capacity to prevent viral entry, temsavir stabilizes Env in its “closed” conformation. We recently reported that temsavir affects glycosylation, proteolytic processing, and overall conformation of Env. Here, we extend these results to a panel of primary Envs and infectious molecular clones (IMCs), where we observe a heterogeneous impact on Env cleavage and conformation. Our results suggest that the effect of temsavir on Env conformation is associated with its capacity to decrease Env processing. Indeed, we found that the effect of temsavir on Env processing affects the recognition of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies and correlates with their capacity to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

3.2.3 INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein (Env) is synthesized in the endoplasmic reticulum, where the gp160 precursor undergoes trimerization and the addition of glycans. During its transport to the Golgi, in addition to further modifications of complex sugars,

each gp160 molecule is proteolytically cleaved by cellular proteases into the gp120 surface protein and a gp41 transmembrane subunit [1,2,3]. Env is then transported to the cell surface, where it is incorporated into budding viral particles. Env interaction with CD4 enables coreceptor binding and the subsequent gp41 conformational changes required for a fusion between the virus and the cell membrane [4]. The native unliganded Env is a metastable molecule sampling different conformations. Non-neutralizing antibodies (nnAbs) bind epitopes that are normally occluded in the unliganded trimer and, therefore, fail to recognize the native “closed” trimer, whereas broadly neutralizing antibodies (bNAbs) preferentially recognize this Env conformation [5,6,7,8,9,10]. Clinical trials are currently evaluating the potential of several bNAbs to control viral replication and decrease the size of the viral reservoir [11,12].

In addition to the recent progress made with the development of bNAbs used as prevention and treatment, new inhibitors of HIV-1 are being considered to treat infected individuals. Among them, temsavir (BMS-626529 and GSK2616713), a small molecule entry inhibitor administered as a prodrug for fostemsavir (BMS-663068, GSK3684934, and RUKOBIA), was recently approved for the treatment of patients who have limited therapeutic options [13,14]. Temsavir is known to bind a conserved pocket in gp120 under its β 20– β 21 loop, thereby preventing CD4 interaction [15,16]. This molecule also stabilizes the “closed” State 1 Env conformation, which is preferentially recognized by bNAbs [5,7].

We and others have reported that temsavir or its BMS-806 analog alter Env glycosylation and cleavage, thereby impacting its recognition by bNAbs [17,18]. Here, we used a panel of primary infectious molecular clones of HIV-1, expression plasmids for wild-type Env, or a cleavage-deficient mutant to evaluate the impact of temsavir on proteolytic Env processing and the recognition of bNAbs. Our findings suggest that the effect of temsavir on Env conformation is linked to its impact on Env cleavage. Albeit to different extents, this effect was observed with multiple Envs and was generally associated with a decreased recognition and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) response mediated by bNAbs.

3.2.4 MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all study participants, and research adhered to the ethical guidelines of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), which was reviewed and approved by the CRCHUM institutional review board (ethics committee; approval number: CE 16.164–CA; approval date: 19 October 2021). The research adhered to the standards indicated by the Declaration of Helsinki.

Cell lines and isolation of primary cells

HEK 293T human embryonic kidney cells (obtained from ATCC) were maintained at 37 °C under 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent, St. Bruno, QC, Canada) containing 5% fetal bovine serum (FBS; VWR, Radnor, PA, USA) and 100 µg/mL penicillin–streptomycin (Wisent). Primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and CD4⁺ T cells were isolated, activated, and cultured, as previously described [19]. Briefly, PBMCs were obtained by leukapheresis from six HIV-negative individuals (3 males and 3 females). CD4⁺ T cells were purified from rested PBMCs by negative selection (EasySep human CD4⁺ T cell enrichment kit; STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) and were activated with phytohemagglutinin-L (10 µg/mL) for 48 h and then maintained in an RPMI 1640 complete medium supplemented with rIL-2 (100 U/mL).

Plasmids and proviral constructs

The vesicular stomatitis virus G (VSV-G)-encoding plasmid was previously described [20]. The sequence of full-length clade B HIV-1JRFL Env and clade A HIV-1BG505 (N332) were codon-optimized (GenScript) and cloned into the pcDNA3.1(-) expression plasmid (Invitrogen, Rockford, IL, USA) [21,22]. The plasmids expressing full-length S375W or cleavage-deficient (Cl-) (R508S/R511S) HIV-1JRFL Env were previously described [9]. The R508S/R511S mutations were introduced into the full-length HIV-1JRFL Env S375W by overlapping the PCR to generate the S375W Cl- mutant. The presence of the desired mutations was confirmed by automated DNA sequencing. pSVIIIenv-expressing full-length HIV-1YU2 Env and Tat-expressing plasmid pLTR-

Tat were previously described [23]. Transmitted/Founder (T/F) and chronic infectious molecular clones (IMCs) of patients CH058, CH077, RHGA, STCO1, and ZM246F-10 were inferred, constructed, and biologically characterized, as previously described [24,25,26,27]. The IMCs encoding for the HIV-1 reference strains JRFL, YU2, and BG505 (T332N) were described elsewhere [28,29,30,31]. Expression plasmids for CH040, RHGA, STCO1, CH198, and ZM246F-10 Env were generated by PCR amplification, inserting the respective Env genes into pCAGGS via EcoRI/XmaI.

Viral production and infections

To obtain similar levels of infection in primary CD4⁺ T cells for the different IMCs tested, VSV-G-pseudotyped HIV-1 was produced and titrated as previously described [32]. Viruses were then used to infect activated primary CD4⁺ T cells from healthy HIV-1-negative donors by spin infection at 800× g for 1 h in 96-well plates at 25 °C.

Antibodies and HIV+ plasma

The following Abs were used as primary antibodies for cell-surface Env staining: 10E8, 2G12, N6, VRC01, VRC03, F105, b12, CH106, CD4-Ig, A32, 17b and 19b (NIH AIDS Reagent Program), 3BNC117 (kindly provided by Michel Nussenzweig), F240 (kindly provided by Marzena Pazgier), PGT126, and PGT151 (IAVI). Goat anti-human IgG (H+L) antibodies pre-coupled to Alexa Fluor 647 (Invitrogen) were used as secondary antibodies in the flow cytometry experiments.

Small molecules

The HIV-1 attachment inhibitor temsavir (BMS-626529) was purchased from APExBIO. The compound was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a stock concentration of 10 mM and diluted to 10 μM in the RPMI 1640 complete medium for cell-surface staining and ADCC assays for a 24 h treatment.

Radioactive labeling and immunoprecipitation of envelope glycoproteins.

HEK 293T cells (5×10^5) were transfected with an expression plasmid for JRFL Env using the calcium phosphate method. One day post-transfection, cells were metabolically labeled for 16–24 h with 100 μCi/mL of [³⁵S] methionine–cysteine ([³⁵S] Protein Labeling Mix; PerkinElmer,

Waltham, MA, USA) in DMEM lacking methionine and cysteine and supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum and a 1% GlutaMAX™ supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were then lysed with a RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 1.2 mM sodium deoxycholate). Precipitation of radiolabeled envelope glycoproteins from the whole-cell lysates or found in the supernatant was performed with a pool of plasma from HIV-1-infected individuals in the presence of 45 µL of 10% Protein A-Sepharose beads (Cytiva, Marlborough, MA) at 4 °C. We then loaded the precipitated proteins onto SDS-PAGE gels and analyzed them using autoradiography and densitometry to calculate their processing indices. The processing index was a measure of the conversion of the temsavir-treated gp160 Env precursor to mature gp120 relative to mock-treated Env trimers and took into account the total amount of Env-related bands present in the cell lysate and supernatant. The processing index was calculated with the following formula: processing index = ([total gp120] treated × [gp160] mock-treated)/([gp160] treated × [total gp120] mock-treated). Total referred to gp120 in the cell lysate and supernatant [18,33].

Transfection

Using a standard calcium phosphate method, HEK 293T cells (3×10^6) were co-transfected with 10 µg of a plasmid expressing the gp160 (JRFL WT, JRFL Cl- (R508S/R511S), JRFL S375W, JRFL S375W Cl- (R508S/R511S), CH058, CH077, YU2, BG505, ZM246F-10, STCO1, RHGA, CH040, or CH198) or the pcDNA3.1 plasmid (as a negative control) and 2.5 µg of a green fluorescent protein (GFP) expression plasmid (pIRES2-GFP; Clontech, Mountain View, CA, USA). Cells transfected with the pSVIIIenv YU2 plasmid were co-transfected with 1 µg of a plasmid-encoding pLTR-Tat. Alternatively, cells were transfected with 7 µg of a provirus (CH058 (WT, Cl-) and CH077 (WT, Cl-)) using the calcium phosphate method [33]. The next day, the media were changed for fresh media containing 10 µM temsavir or the equivalent volume of DMSO.

Virus neutralization assay

JRFL, CH058, CH077, YU2, BG505, ZM246F-10, STCO1, RHGA, CH040, and CH198 infectious molecular clones of HIV-1 were produced by the calcium phosphate transfection of HEK 293T

cells. Two days after transfection, the cell supernatants were harvested. Twenty-four hours before infection, the Cf2Th-T4R5 cells were seeded at a density of 6×10^3 cells/well in 96-well luminometer-compatible tissue culture white plates (Perkin Elmer). Viruses at a final volume of 200 μ L were incubated with the indicated temsavir or DMSO dilution (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, or 0.078 nM) for 1 h at 37 °C and were then added to the target cells in triplicate, followed by an incubation of 48 h at 37 °C. Cells were then lysed by the addition of 40 μ L of a lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA), followed by at least 1 h at -80 °C. An LB942 Tri-Star luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) was used to measure the luciferase activity of each well after the addition of 100 μ L of a luciferin buffer (15 mM MgSO₄, 15 mM KPO₄ (pH 7.8), 1 mM ATP, and 1 mM dithiothreitol) and 50 μ L of 1 mM d-luciferin potassium salt (ThermoFisher Scientific). The neutralization half-maximal inhibitory dilution (IC₅₀) represented the temsavir dilution to inhibit 50% of the infection of Cf2Th-T4R5 cells by viruses bearing the indicated surface glycoproteins.

Flow cytometry analysis of cell-surface staining

For cell-surface staining, HEK 293T or primary CD4⁺ T cells were incubated for 30 min at 37 °C for 48 h post-transfection/infection with 5 μ g/mL of anti-Env monoclonal antibodies or 1:1000 of HIV-1+ plasma in PBS. Cells were then washed twice with PBS and stained with 2 μ g/mL goat anti-human IgG Alexa Fluor 647 secondary antibodies for 20 min in PBS. After two more PBS washing steps, cells were fixed in a 2% PBS-formaldehyde solution. For the detection of intracellular p24 protein, infected primary CD4⁺ T cells or transfected HEK293T cells were permeabilized using a Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and intracellularly stained using a PE-conjugated mouse anti-p24 mAb (clone KC57; Beckman Coulter; 1:100 final dilution). The percentage of infected cells (p24⁺ cells) was determined by gating the living cell population on the basis of viability dye staining (AquaVivid, Thermo Fisher Scientific). Samples were analyzed on an LSRII cytometer (BD Biosciences) and the data analysis was performed using FlowJo v10.5.3 (Tree Star).

FACS-based ADCC assay

ADCC was measured with a FACS-based assay 48 h post-infection, as previously described [18,19]. HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells were used as target cells and stained with AquaVivid

viability dye and cell proliferation dye (eFluor670; eBioscience). Autologous PBMC effector cells, stained with another cellular marker (cell proliferation dye eFluor450; eBioscience, Waltham, MA, USA), were added at an effector:target ratio of 10:1 in 96-well V-bottom plates (Corning, Glendale, AZ, USA). mAbs (5 µg/mL) were added to the appropriate wells and the cells were incubated for 5 min at room temperature. The plates were subsequently centrifuged for 1 min at 300× g and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 5 h before being fixed in a 2% PBS-formaldehyde solution. Cells were then permeabilized using a Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) and intracellularly stained using a PE-conjugated mouse anti-p24 mAb (clone KC57; Beckman Coulter; 1:100 final dilution). Samples were acquired on an LSRII cytometer (BD Biosciences) and the data analysis was performed using FlowJo v10.5.3 (Tree Star). ADCC (%) was calculated with the following formula: $(\% \text{ of p24}^+ \text{ cells in targets plus effectors}) - (\% \text{ of p24}^+ \text{ cells in targets plus effectors plus antibody}) / (\% \text{ of p24}^+ \text{ cells in targets})$ by gating on living target cells.

Detection of soluble gp120 by sandwich ELISA

The concentration of soluble gp120 in the supernatant of gp160-expressing cells was determined by an anti-gp120 sandwich ELISA. A combination of nnAbs 17b and A32 was prepared in PBS and adsorbed to plates (MaxiSorp; Nunc) overnight at 4 °C. The coated wells were subsequently blocked with a blocking buffer (Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 2% BSA) for 90 min at room temperature. The wells were then washed four times with a washing buffer (Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20). Supernatants from gp160-expressing cells were incubated with the nnAbs-coated wells for 120 min at room temperature. The plates were washed four times with a washing buffer, followed by incubation with HRP-conjugated C11 nnAbs (3 mg/mL) for 90 min at room temperature. HRP enzyme activity was determined after the addition of a 1:1 mix of Western Lightning oxidizing and luminol reagents (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA). Light emission was measured with an LB942 Tri-Star luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). A standard curve using known concentrations of purified recombinant gp120YU2 was used to quantify the precise concentration of soluble gp120 in each supernatant.

Statistical analysis

Statistics were analyzed using GraphPad Prism version 9.1.0 (GraphPad). Every dataset was tested for statistical normality and this information was used to apply the appropriate (parametric or non-parametric) statistical test based on statistical normality. p values < 0.05 were considered to be significant; significance values were indicated as * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

3.2.5 RESULTS

3.2.5.1 *The Effect of Temsavir on Env Depends on Proteolytic Env Processing*

We recently reported that the treatment of Env-expressing cells with temsavir for 24 h resulted in a decrease in the proteolytic processing and bNAbs recognition of HIV-1JRFL Env [18]. To better characterize the role of Env cleavage in bNAbs recognition, we evaluated the impact of temsavir on a gp160 cleavage-deficient (Cl-) Env mutant. In this mutant, the two conserved arginine residues at positions 508 and 511 were replaced by two serine residues. Mutations of the primary cleavage site were shown to almost completely abrogate the JRFL Env cleavage [34]. To confirm the impact of these mutations on Env processing, we used the cleavage-dependent PGT151 bNAb as a control. As expected, PGT151 recognized Cl- Env less efficiently than its wild-type counterpart (**Figure 3.2.1 and Figures 3.2.S1 and 3.2.S2**). Of note, previous work has shown that nnAbs do not bind the unliganded “closed” Env trimer [9,33,35], which is stabilized by Env cleavage [17,36,37,38]. A mutation of the furin cleavage site results in the spontaneous sampling of downstream “open” conformations, thus enabling recognition by nnAbs [9,17,39]. We, therefore, evaluated the effect of temsavir on bNAbs recognition. Env-expressing cells (**Figure 3.2.1 and Figure 3.2.S1**) and infected primary CD4⁺ T cells (**Figure 3.2.S2**) were treated (or not) with temsavir for 24 h before measuring the binding of bNAbs by flow cytometry. Although the temsavir treatment significantly reduced the detection of wild-type Env by bNAbs at the cell surface, no major differences were observed for its cleavage-deficient counterpart. As controls, we included CD4 binding site mAbs (3BNC117, N6, VRC01, VRC03, b12, and CH106) and ligands (CD4-Ig), and observed that temsavir competed with them, with the most profound effect detected in CD4-Ig (**Figure 3.2.1**).

Similar results were obtained with the CH058 and CH077 Cl- strains (**Figures 3.2.S1 and 3.2.S2**). Finally, the effect of temsavir was specific because no effect was observed with the temsavir-resistant Env S375W mutant (**Figure 3.2.S3**) [18]. The presence of tryptophan residue instead of a serine filled the cavity and, therefore, prevented temsavir from binding [40].

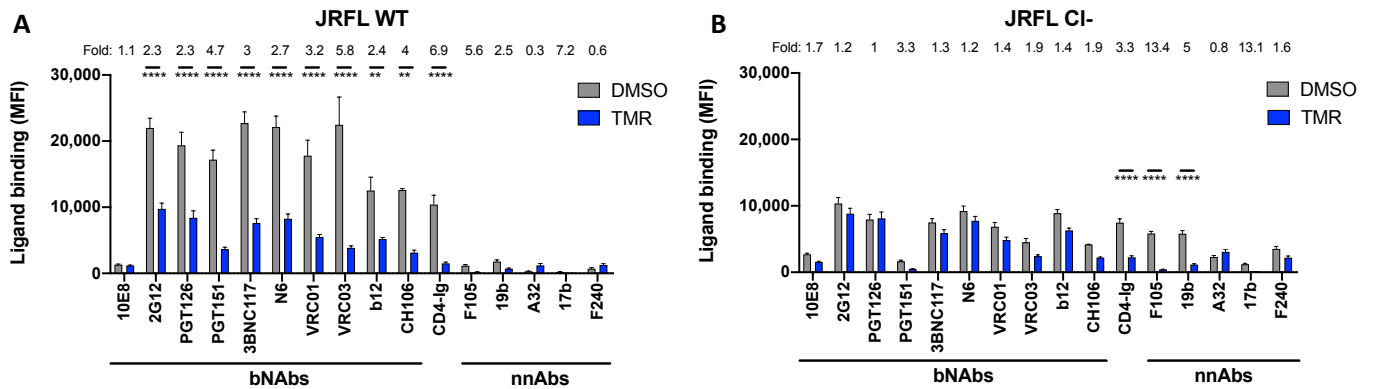


Figure 3.2.1 Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAbs recognition. HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing the (A) HIV-1_{JR-FL} Env WT or (B) its cleavage deficient counterpart (Cl-), together with a plasmid expressing GFP. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6, VRC01, VRC03, b12, and CH106), nnAbs (F105, 19b, A32, 17b, and F240), and CD4-Ig. Shown are mean fluorescence intensities (MFI) \pm standard error of the mean (SEM). MFI values were determined on the transfected (GFP+) population. The data shown represents results obtained from at least four independent experiments per ligand. Statistical significance was tested using a two-way analysis of variance (ANOVA) (**, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

3.2.5.2 Temsavir Decreases Glycosylation and the Proteolytic Cleavage of Env, Resulting in Decreased Recognition by bNAbs

As Env cleavage appeared to be important for the effect of temsavir on recognition by some bNAbs, we investigated the impact of temsavir on the processing of Env from different HIV-1 strains, including transmitted/founder and chronic viruses. Briefly, we transfected HEK 293T cells with plasmids encoding Env from HIV-1 clades A (BG505), B (JRFL, CH058, CH077, YU2, CH040, RHGA, and STCO1), or C (ZM246F and CH198). Cells were treated (or not) with temsavir for 24 h before measuring Env processing by radioactive labelling, followed by immunoprecipitation. The treatment of Env-expressing cells with temsavir decreased the cleavage of most of the Envs tested (**Figure 3.2.2 and Figure 3.2.S4**), thereby confirming the broad impact of temsavir on Env

processing. Of note, we observed that upon temsavir treatment, gp120 migrated faster for the different Envs tested, particularly evident in the supernatant (**Figure 3.2.2A**). This accelerated migration pattern was consistent with the effect of temsavir on glycosylation. In addition, the levels of shed gp120 in the supernatant decreased upon temsavir treatment, as previously shown [41].

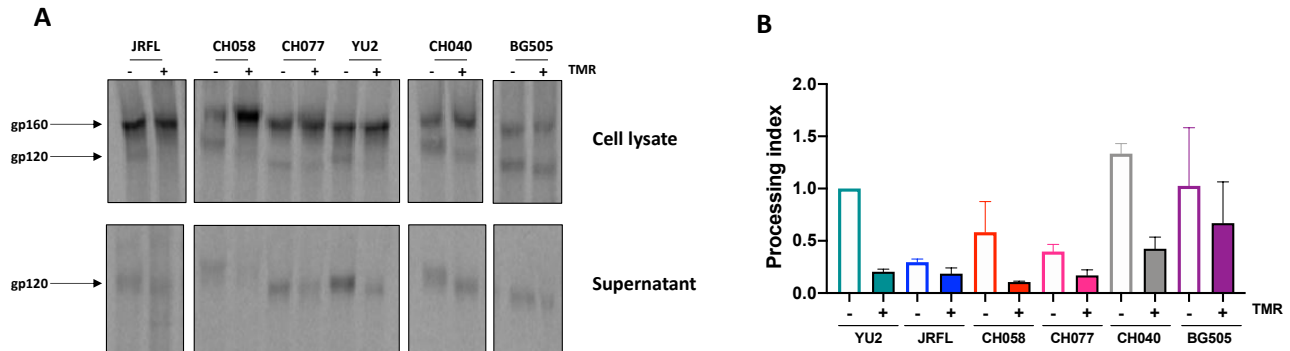


Figure 3.2.2 Temsavir modifies glycosylation and processing of HIV-1 Env. (A) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing HIV-1 Env (JRFL, CH058, CH077, YU2, CH040, BG505) and labeled for 24 h with [35S] methionine and [35S] cysteine. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO. Cell lysates and supernatants were immunoprecipitated with plasma from HIV-1-infected individuals. The precipitated proteins were loaded on SDS-PAGE gels and analyzed by autoradiography. (B) Quantification of the effect of temsavir on Env processing normalized to YU2 in the presence of the vehicle (DMSO).

To determine if the changes in Env processing and glycosylation described above affected Env conformation, we analyzed Env recognition with a panel of bNAbs. Briefly, HEK 293T cells transfected with plasmids encoding Env from HIV-1 clades A, B, and C were treated with temsavir, or the vehicle alone (DMSO), 24 h post-transfection. The binding of bNAbs was evaluated by flow cytometry 48 h post-transfection. The most striking phenotype observed was a significant decrease in PGT151 recognition upon temsavir treatment for all Envs tested (**Figure 3.2.3A**). As expected, from competition for the CD4 binding site, CD4BS antibodies (3BNC117 and N6) and CD4-Ig bound cell-surface Env less efficiently upon temsavir treatment. Of note, we observed a positive correlation between a temsavir-mediated decrease in Env processing and bNAbs (2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6) recognition (**Figure 3.2.3B**), suggesting that bNAbs interaction in the presence of temsavir is affected by Env cleavage. Accordingly, the effect of temsavir on bNAbs recognition was also associated, albeit not statistically significantly, with its effect on gp120 shedding (**Figure 3.2.3C**).

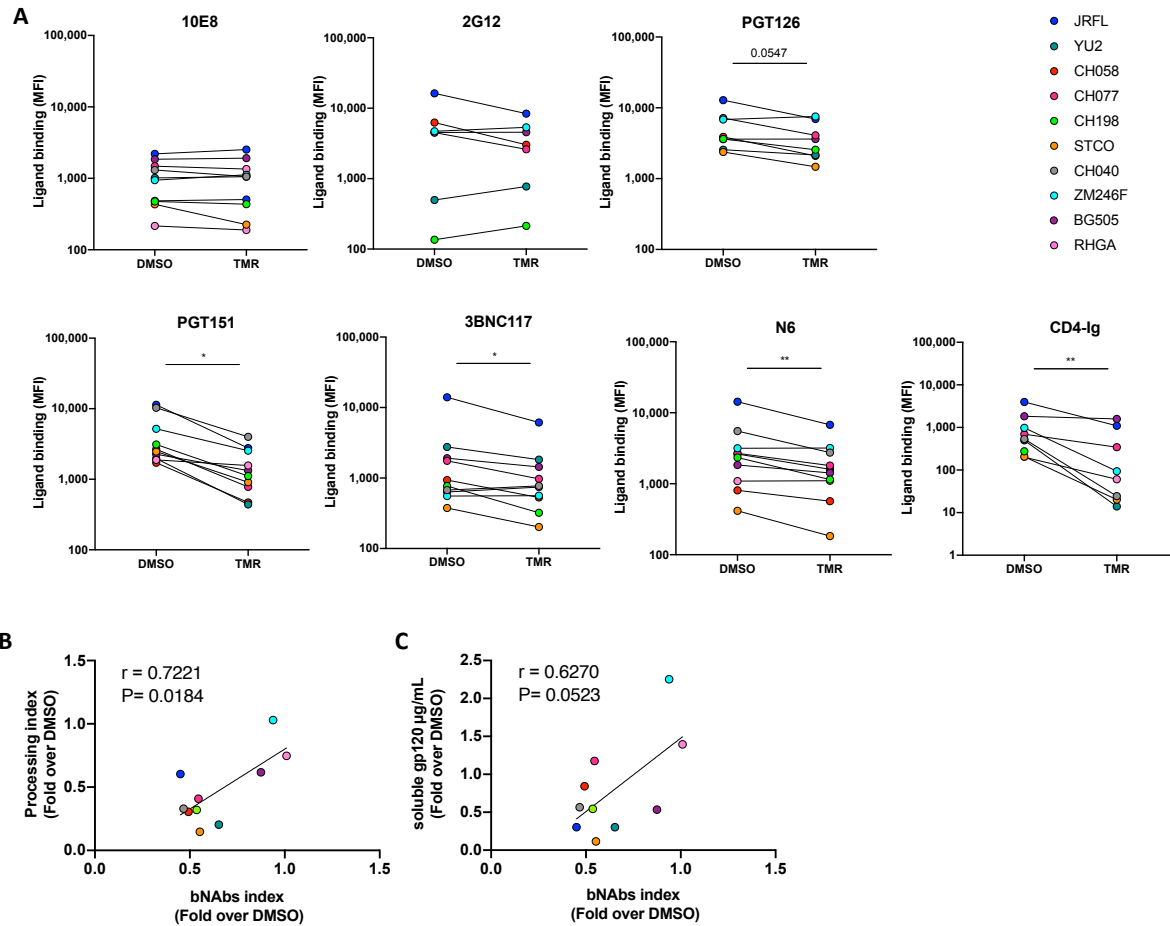


Figure 3.2.3 TMSVIR treatment affects Env recognition by bNAbs. (A) HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing HIV-1 clade A (BG505), B (JRFL, YU2, CH058, CH077, CH040, RHGA, and STCO), or C (ZM246F and CH198) Env, together with a plasmid expressing GFP. Cells were then treated with 10 μM TMSVIR (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6) and the ligand CD4-Ig 24 h post-treatment and 48 h post-transfection. Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the different ligands. MFI values were measured on the transfected (GFP+) population. Data shown represents results obtained from at least five independent experiments. (B) Correlation of the Env processing index and bNAbs (2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6) index (C) Correlation of the soluble gp120 and bNAbs (2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6) index. (B,C) are represented as fold TMR over DMSO for each Env tested. Statistical significance was tested using (A) a paired t test or Wilcoxon signed-rank test based on statistical normality (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) or (B,C) a Pearson correlation test.

3.2.5.3 *Temsavir Affects Env Recognition of Infected Primary CD4⁺ T cells*

To evaluate whether our results could be translated to the recognition of infected primary CD4⁺ T cells, we produced infectious viral particles from the corresponding infectious molecular clones. Primary CD4⁺ T cells were then infected with these viruses and treated (or not) with temsavir for 24 h before measuring the binding of bNAbs by flow cytometry, as previously described [18]. Again, we observed a significant decrease in the recognition of HIV-1-infected cells by PGT151, which was consistent with decreased Env processing. This phenotype was observed with most IMCs, with the exception of RHGA and ZM246F, for which temsavir had a minimal impact on Env cleavage (**Figure 3.2.3B and Figure 3.2.S4**). We observed a differential impact of temsavir treatment on Env recognition among the different strains with the other bNAbs (**Figure 3.2.4**). Although all these Envs were susceptible to temsavir-mediated viral inhibition, as measured in a single-round pseudoviral neutralization assay, their susceptibility to temsavir varied (**Table 3.2.S1**).

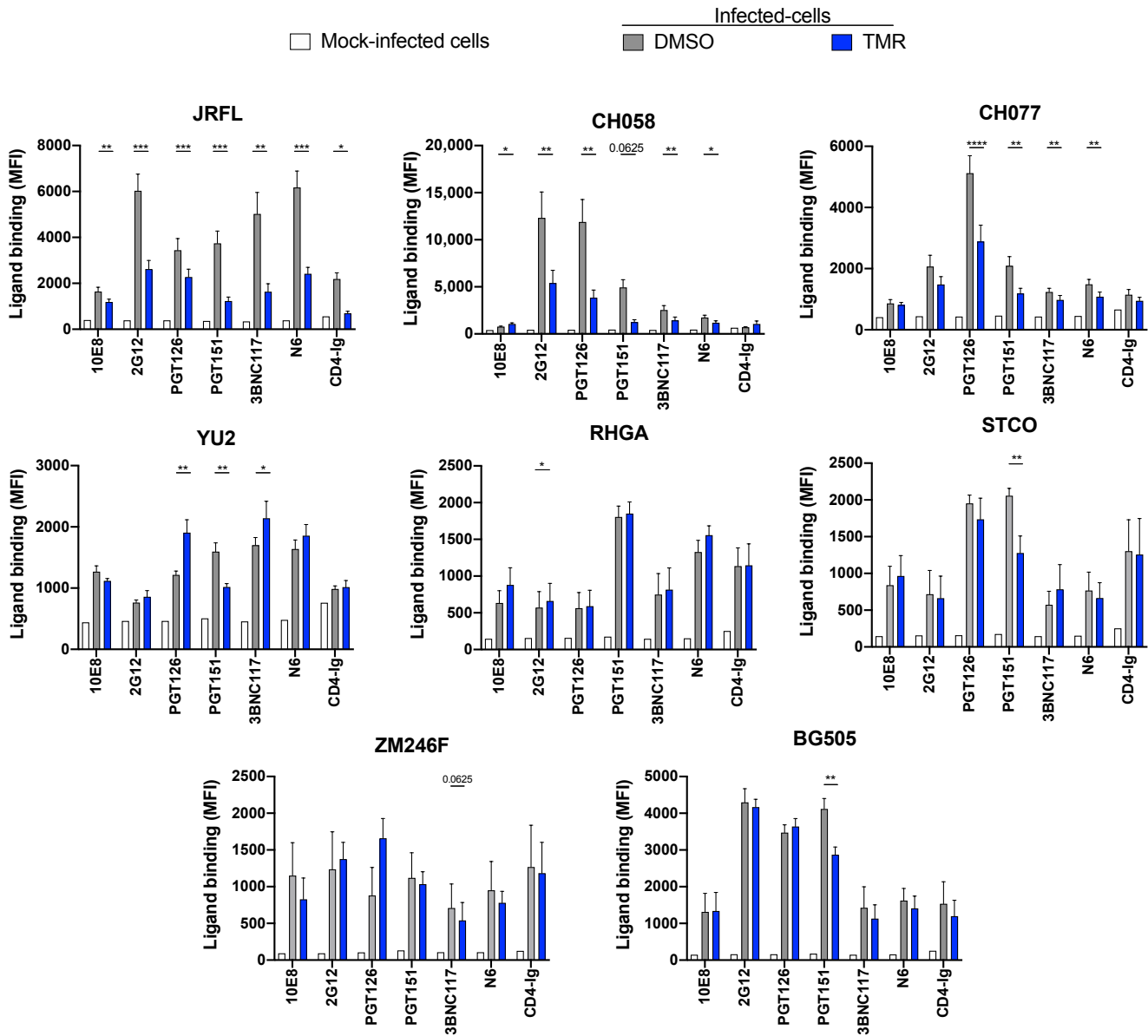


Figure 3.2.4 Temsavir modifies recognition of HIV-1-infected primary CD4⁺ T cells by bNAbs. Primary CD4⁺ T cells were infected with HIV-1 clade A (BG505), B (JRFL, YU2, CH058, CH077, RHGA, and STCO), and C (ZM246F). Cells were then treated with 10 μM temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6) and the ligand CD4-Ig. Shown are the mean fluorescence intensities (MFI) using the different ligands ± standard error of the mean (SEM). MFI values were measured on the infected (p24⁺) population. The data shown represents results obtained from at least five independent experiments per ligand. Statistical significance was tested using a paired t test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

3.2.5.4 Impact of Temsavir on bNAb Recognition Affects ADCC Responses

To evaluate whether the differences in Env recognition at the surface of the infected cells translated into a functional consequence, we measured their capacity to mediate ADCC. Indeed, the decreased recognition of JRFL- and CH058-infected cells by 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6 mAbs (**Figure 3.2.4**) translated into decreased ADCC responses (**Figure 3.2.5**). Of note, we observed no differences in ADCC for CH077 (**Figure 3.2.5**). Interestingly, for YU2-infected cells, we observed an increase in ADCC, mediated by 2G12, PGT126, 3BNC117, and N6 (Figure 3.2.5), which was consistent with an improved recognition by these bNAbs (**Figure 3.2.4**). These seemingly counterintuitive results could be related to the capacity of temsavir to reduce YU2 gp120 shedding and, therefore, enhance the level of cell-surface Envs (**Figure 3.2.2, Figure 3.2.3 and Figure 3.2.4**), as previously reported [41]. Although the mechanisms explaining these phenotypes are not completely clear at the moment, the pleiotropic effect of temsavir on processing, glycosylation, shedding, and Env conformation might account for this. Another possibility that could have contributed to this phenotype is the potential effect of temsavir treatment on Env expression at the cell surface. However, we did not observe any effect of temsavir treatment on 10E8 binding (**Figure 3.2.1, Figure 3.2.3 and Figure 3.2.4**), suggesting that Env cell-surface expression was not the main driver of this effect. Further work to identify the mechanisms behind the heterogeneity of temsavir treatment on Env conformation is therefore warranted.

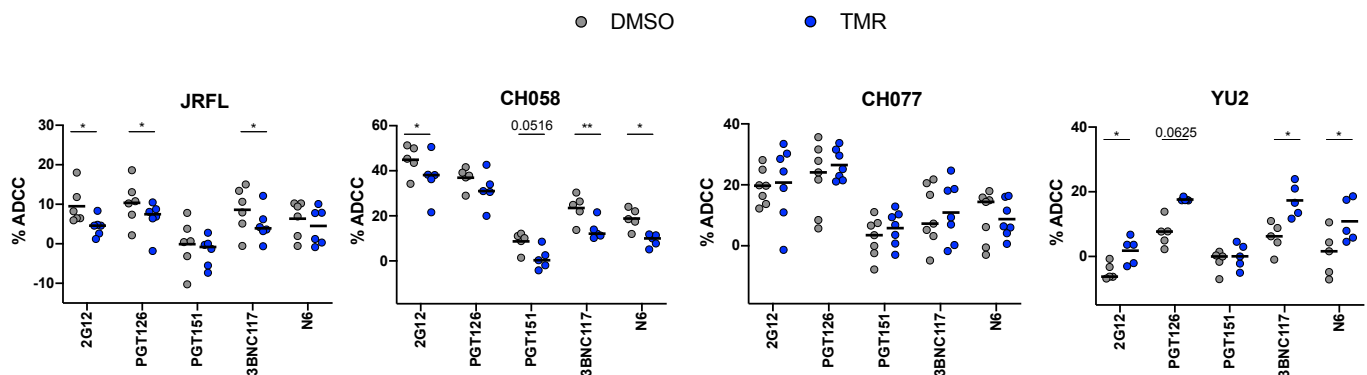


Figure 3.2.5 Impact of temsavir on ADCC responses mediated by selected bNAbs. Primary CD4⁺ T cells were infected with HIV-1 JRFL, YU2, CH058, and CH077. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. These primary infected cells were used as target cells and co-cultured with autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as effector cells in a FACS-based ADCC assay using 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, and N6. The graphs shown represent the mean percentage of ADCC obtained for each antibody after DMSO or TMR treatment. The data shown represents results obtained from at least five independent experiments. Statistical significance was tested using a paired t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.2.6 DISCUSSION

Strategies aiming at the elimination of HIV-1-infected cells are the focus of intense research. Env expression at the surface of infected cells makes it a target of choice for antibody-based interventions, thus the characterization of the Env conformational landscape remains an important topic of research. Multiple factors can influence Env conformation such as accessory proteins, Env proteolytic cleavage, and small molecule inhibitors [35,42]. The small molecule inhibitor temsavir is an attachment inhibitor reported to stabilize the pre-triggered (State 1) “closed” conformation. Likely resulting from the intracellular stabilization of the “closed” conformation, the addition of temsavir to Env-expressing cells affects glycosylation and proteolytic cleavage [17,18]. Here, we extended these observations to additional primary Envs, and explored the effect of temsavir on Env cleavage as the underlying mechanism for its impact on bNAb recognition. Accordingly, a cleavage-deficient Env was resistant to temsavir, as highlighted by an absence of a decrease in recognition by bNAbs, whereas recognition by the CD4-Ig ligand was decreased, likely due to competition with the small molecule. This was consistent with recent structural studies revealing that temsavir engages gp120 in a pocket under the β 20– β 21 loop, sequestering three key CD4 contact residues, N425, M426, and W427 [15,16]. Altogether, these results suggest that temsavir mostly modifies Env conformation by altering its cleavage. Although we could not rule out a potential impact of temsavir on cell-surface Env expression, we noted that temsavir did not affect the binding of all bNAbs to the same extent. Future studies are needed to better characterize the mechanism by which temsavir affects Env conformation.

Supporting a conserved mode-of-action for different HIV-1 Envs, we observed a decrease in proteolytic processing for most of the Envs tested. The effect of temsavir on cleavage and, therefore, Env conformation was reflected in a decreased recognition of most bNAbs tested. We observed, however, some heterogeneity related to this phenotype. This heterogeneity could not be totally explained by the neutralization sensitivity of the different Env pseudotype particles to temsavir (**Table 3.2.S1**). However, we observed a variability in the effect of temsavir on intrinsic Env properties such as processing, glycosylation, and shedding. Therefore, the susceptibility of the different Envs to the pleiotropic effects of temsavir likely explains why some Envs are more sensitive (JRFL, CH058, CH077, CH040, and CH198) than others (RHGA, STCO1, ZM246F, BG505, and YU2) to temsavir treatment.

We noted that the effect of temsavir on Env expressed at the surface of primary CD4⁺ T cells showed differences in some instances to what was seen in CD4-negative Env-expressing cells. We believe that several factors likely explain these differences, including differential gp160 processing among these cell types and the presence of the CD4 receptor. Of note, we observed a consistent and significant decrease in Env recognition by the cleavage-sensitive PGT151 bNAb for most Envs. When a decrease in bNAbs recognition was observed at the surface of infected primary CD4⁺ T cells, this was usually translated into a decreased ADCC. Temsavir is a potent attachment inhibitor, but given its impact on Env processing, glycosylation, and conformation, we believe that these additional activities need to be considered for the development of future immunotherapies combining temsavir with antibody-based treatments.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15051189/s1>. Figure S1: Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition on CH058 and CH077 strains at the surface of HEK 293T cells. Figure S2: Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition on CH058 and CH077 strains at the surface of primary CD4⁺ T cells. Figure S3: Temsavir treatment does not affect ligand recognition for the resistant mutants EnvS375W and EnvS375W CI-. Figure S4: Effect of temsavir on Env cleavage. Table S1: Temsavir neutralization half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of multiple HIV-1 strains.

Author Contributions: M.B., J.R. and A.F. conceived the study. M.B., J.R. and A.F. designed the experimental approaches. M.B., H.M., M.N., C.B., G.G.-L., D.S., J.R. and A.F. performed, analyzed, and interpreted the experiments. M.B. and J.R. performed the statistical analysis. M.B., H.M., C.B., G.G.-L., J.R. and A.F. contributed the unique reagents. R.L. and D.S. generated some of the Env expression plasmids. M.B., D.S., J.R. and A.F. wrote the manuscript, with input from others. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the National Institutes of Health (grants AI148379, AI129769, and R01 AI150322) to A.F. This work was also partially supported by 1UM1AI164562-01 and co-funded by the National Heart, Lung and Blood Institute, National

Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institute on Drug Abuse, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases as well as a CIHR foundation grant (#352417), a CIHR Team grant (#422148), and a Canada Foundation for Innovation grant (#41027) to A.F. A.F. is the recipient of the Canada Research Chair on Retroviral Entry #RCHS0235 950-232424. D.S. was supported by SPP1923 and the Heisenberg Program of the German Research Foundation (SA 2676/3-1; SA 2676/1-2). M.B. was supported by a FRQS fellowship. M.N. was supported by a ViiV fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) Institutional Review Board (ethics committee, approval number CE 16.164–CA, approval date: 19 October 2021).

Informed Consent Statement

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement

Further information, data reported in this paper, and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Andrés Finzi (andres.finzi@umontreal.ca) upon request.

Acknowledgments: The authors thank Isabell Haußmann and the CRCHUM BSL3 and Flow Cytometry Platforms for technical assistance, as well as Mario Legault from the FRQS AIDS and Infectious Diseases network for cohort coordination and clinical samples. The authors thank Andrew Clark for helpful discussions. The authors thank Michel Nussenzweig (The Rockefeller University) for kindly providing the 3BNC117 antibody, Dennis Burton (The Scripps Research Institute) for providing the JRFL IMC, as well as Julie Overbaugh (Fred Hutchinson Cancer Research Center) for providing the plasmid encoding gp160 from BG505 and its corresponding

IMC. We also thank Beatrice H. Hahn (University of Pennsylvania) for providing the plasmids expressing the gp160 from CH058 and CH077 as well as the following IMCs: CH058, CH077, RHGA, STCO, and ZM246F.

Conflicts of Interest: This study was partially supported by ViiV Healthcare

3.2.7 REFERENCES

1. Center, R.J.; Leapman, R.D.; Lebowitz, J.; Arthur, L.O.; Earl, P.L.; Moss, B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J. Virol.* 2002, 76, 7863–7867.
2. McCune, J.M.; Rabin, L.B.; Feinberg, M.B.; Lieberman, M.; Kosek, J.C.; Reyes, G.R.; Weissman, I.L. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 1988, 53, 55–67.
3. Freed, E.; Myers, D.; Risser, R. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* 1989, 63, 4670–4675.
4. Wilen, C.B.; Tilton, J.C.; Doms, R.W. HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2, a006866.
5. Lu, M.; Ma, X.; Castillo-Menendez, L.R.; Gorman, J.; Alshafi, N.; Ermel, U.; Terry, D.S.; Chambers, M.; Peng, D.; Zhang, B.; et al. Associating HIV-1 envelope glycoprotein structures with states on the virus observed by smFRET. *Nature* 2019, 568, 415–419.
6. Li, Z.; Li, W.; Lu, M.; Bess, J.; Chao, C.W.; Gorman, J.; Terry, D.S.; Zhang, B.; Zhou, T.; Blanchard, S.C.; et al. Subnanometer structures of HIV-1 envelope trimers on aldrithiol-2-inactivated virus particles. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020, 27, 726–734.
7. Munro, J.B.; Gorman, J.; Ma, X.; Zhou, Z.; Arthos, J.; Burton, D.R.; Koff, W.C.; Courter, J.R.; Smith, A.B., III; Kwong, P.D.; et al. Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science* 2014, 346, 759–763.
8. Stadtmueller, B.M.; Bridges, M.D.; Dam, K.-M.; Lerch, M.T.; Huey-Tubman, K.E.; Hubbell, W.L.; Bjorkman, P.J. DEER spectroscopy measurements reveal multiple conformations of HIV-1 SOSIP envelopes that show similarities with envelopes on native virions. *Immunity* 2018, 49, 235–246.e4.
9. Alshafi, N.; Bakouche, N.; Kazemi, M.; Richard, J.; Ding, S.; Bhattacharyya, S.; Das, D.; Anand, S.P.; Prévost, J.; Tolbert, W.D.; et al. An Asymmetric Opening of HIV-1 Envelope Mediates Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Cell Host Microbe* 2019, 25, 578–587.e5.
10. Pancera, M.; Wyatt, R. Selective recognition of oligomeric HIV-1 primary isolate envelope glycoproteins by potently neutralizing ligands requires efficient precursor cleavage. *Virology* 2005, 332, 145–156.

11. Ledgerwood, J.E.; Coates, E.E.; Yamshchikov, G.; Saunders, J.G.; Holman, L.; Enama, M.E.; DeZure, A.; Lynch, R.M.; Gordon, I.; Plummer, S.; et al. Safety, pharmacokinetics and neutralization of the broadly neutralizing HIV-1 human monoclonal antibody VRC01 in healthy adults. *Clin. Exp. Immunol.* 2015, 182, 289–301.
12. Schoofs, T.; Klein, F.; Braunschweig, M.; Kreider, E.F.; Feldmann, A.; Nogueira, L.; Oliveira, T.; Lorenzi, J.C.; Parrish, E.H.; Learn, G.H.; et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* 2016, 352, 997–1001.
13. Cahn, P.; Fink, V.; Patterson, P. Fostemsavir: A new CD4 attachment inhibitor. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2018, 13, 341–345.
14. Muccini, C.; Canetti, D.; Castagna, A.; Spagnuolo, V. Efficacy and Safety Profile of Fostemsavir for the Treatment of People with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1): Current Evidence and Place in Therapy. *Drug Des. Dev. Ther.* 2022, 16, 297–304.
15. Pancera, M.; Lai, Y.T.; Bylund, T.; Druz, A.; Narpala, S.; O’Dell, S.; Schön, A.; Bailer, R.T.; Chuang, G.Y.; Geng, H.; et al. Crystal structures of trimeric HIV envelope with entry inhibitors BMS-378806 and BMS-626529. *Nat. Chem. Biol.* 2017, 13, 1115–1122.
16. Prévost, J.; Chen, Y.; Zhou, F.; Tolbert, W.D.; Gasser, R.; Medjahed, H.; Gottumukkala, S.; Hessel, A.J.; Rao, V.B.; Pozharski, E.; et al. Structure-function Analyses Reveal Key Molecular Determinants of HIV-1 CRF01_AE Resistance to the Entry Inhibitor Temsavir. *bioRxiv* 2023.
17. Zhang, S.; Wang, K.; Wang, W.L.; Nguyen, H.T.; Chen, S.; Lu, M.; Go, E.P.; Ding, H.; Steinbock, R.T.; Desaire, H.; et al. Asymmetric structures and conformational plasticity of the uncleaved full-length human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein trimer. *J. Virol.* 2021, 95, e0052921.
18. Boutin, M.; Vézina, D.; Ding, S.; Prévost, J.; Laumaea, A.; Marchitto, L.; Anand, S.P.; Medjahed, H.; Gendron-Lepage, G.; Bourassa, C.; et al. Temsavir Treatment of HIV-1-Infected Cells Decreases Envelope Glycoprotein Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies. *mBio* 2022, 13, e0057722.
19. Veillette, M.; Désormeaux, A.; Medjahed, H.; Gharsallah, N.-E.; Coutu, M.; Baalwa, J.; Guan, Y.; Lewis, G.; Ferrari, G.; Hahn, B.H.; et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* 2014, 88, 2633–2644.

20. Emi, N.; Friedmann, T.; Yee, J.K. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 1991, 65, 1202–1207.
21. Mao, Y.; Wang, L.; Gu, C.; Herschhorn, A.; Xiang, S.-H.; Haim, H.; Yang, X.; Sodroski, J. Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012, 19, 893–899.
22. Wu, X.; Parast, A.B.; Richardson, B.A.; Nduati, R.; John-Stewart, G.; Mbori-Ngacha, D.; Rainwater, S.M.; Overbaugh, J. Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *J. Virol.* 2006, 80, 835–844.
23. Finzi, A.; Xiang, S.-H.; Pacheco, B.; Wang, L.; Haight, J.; Kassa, A.; Danek, B.; Pancera, M.; Kwong, P.D.; Sodroski, J. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol. Cell* 2010, 37, 656–667.
24. Salazar-Gonzalez, J.F.; Salazar, M.G.; Keele, B.F.; Learn, G.H.; Giorgi, E.E.; Li, H.; Decker, J.M.; Wang, S.; Baalwa, J.; Kraus, M.H.; et al. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 1273–1289.
25. Ochsenbauer, C.; Edmonds, T.G.; Ding, H.; Keele, B.F.; Decker, J.; Salazar, M.G.; Salazar-Gonzalez, J.F.; Shattock, R.; Haynes, B.F.; Shaw, G.M.; et al. 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, 2715–2728.
26. Parrish, N.F.; Wilen, C.B.; Banks, L.B.; Iyer, S.S.; Pfaff, J.M.; Salazar-Gonzalez, J.F.; Salazar, M.G.; Decker, J.M.; Parrish, E.H.; Berg, A.; et al. Transmitted/founder and chronic subtype C HIV-1 use CD4 and CCR5 receptors with equal efficiency and are not inhibited by blocking the integrin $\alpha 4\beta 7$. *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1002686.
27. Parrish, N.F.; Gao, F.; Li, H.; Giorgi, E.E.; Barbian, H.J.; Parrish, E.H.; Zajic, L.; Iyer, S.S.; Decker, J.M.; Kumar, A. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 6626–6633.
28. O'Brien, W.A.; Koyanagi, Y.; Namazie, A.; Zhao, J.Q.; Diagne, A.; Idler, K.; Zack, J.A.; Chen, I.S. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 1990, 348, 69–73.
29. Li, Y.; Kappes, J.C.; Conway, J.A.; Price, R.W.; Shaw, G.; Hahn, B. Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue:

Identification of replication-competent and-defective viral genomes. *J. Virol.* 1991, 65, 3973–3985.

30. Theodore, T.S.; Englund, G.; Buckler-White, A.; Buckler, C.E.; Martin, M.A.; Peden, K.W. Construction and characterization of a stable full-length macrophage-tropic HIV type 1 molecular clone that directs the production of high titers of progeny virions. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1996, 12, 191–194.

31. Sanders, R.W.; Derking, R.; Cupo, A.; Julien, J.-P.; Yasmeeen, A.; de Val, N.; Kim, H.J.; Blattner, C.; de la Peña, A.T.; Korzun, J.; et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003618.

32. Prévost, J.; Zoubchenok, D.; Richard, J.; Veillette, M.; Pacheco, B.; Coutu, M.; Brassard, N.; Parsons, M.S.; Ruxrungtham, K.; Bunupuradah, T.; et al. Influence of the envelope gp120 Phe 43 cavity on HIV-1 sensitivity to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity responses. *J. Virol.* 2017, 91, e02452-16.

33. Prévost, J.; Medjahed, H.; Vézina, D.; Chen, H.-C.; Hahn, B.H.; Smith, A.B.; Finzi, A. HIV-1 Envelope Glycoproteins Proteolytic Cleavage Protects Infected Cells from ADCC Mediated by Plasma from Infected Individuals. *Viruses* 2021, 13, 2236.

34. Crooks, E.T.; Tong, T.; Osawa, K.; Binley, J.M. Enzyme digests eliminate nonfunctional Env from HIV-1 particle surfaces, leaving native Env trimers intact and viral infectivity unaffected. *J. Virol.* 2011, 85, 5825–5839.

35. Haim, H.; Salas, I.; Sodroski, J. Proteolytic processing of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor decreases conformational flexibility. *J. Virol.* 2013, 87, 1884–1889.

36. Castillo-Menendez, L.R.; Witt, K.; Espy, N.; Princiotta, A.; Madani, N.; Pacheco, B.; Finzi, A.; Sodroski, J. Comparison of uncleaved and mature human immunodeficiency virus membrane envelope glycoprotein trimers. *J. Virol.* 2018, 92, e00277-18.

37. Ringe, R.P.; Sanders, R.W.; Yasmeeen, A.; Kim, H.J.; Lee, J.H.; Cupo, A.; Korzun, J.; Derking, R.; van Montfort, T.; Julien, J.-P.; et al. Cleavage strongly influences whether soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers adopt a native-like conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 18256–18261.

38. Chakrabarti, B.K.; Pancera, M.; Phogat, S.; O'Dell, S.; McKee, K.; Guenaga, J.; Robinson, J.; Mascola, J.; Wyatt, R.T. HIV type 1 Env precursor cleavage state affects recognition by both neutralizing and nonneutralizing gp41 antibodies. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2011, 27, 877–887.
39. Lu, M.; Ma, X.; Reichard, N.; Terry, D.S.; Arthos, J.; Smith, A.B., III; Sodroski, J.G.; Blanchard, S.C.; Mothes, W. Shedding-resistant HIV-1 envelope glycoproteins adopt downstream conformations that remain responsive to conformation-preferring ligands. *J. Virol.* 2020, 94, e00597-20.
40. Madani, N.; Perdigoto, A.L.; Srinivasan, K.; Cox, J.M.; Chruma, J.J.; LaLonde, J.; Head, M.; Smith, A.B., III; Sodroski, J.G. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J. Virol.* 2004, 78, 3742–3752.
41. Richard, J.; Prévost, J.; Bourassa, C.; Brassard, N.; Boutin, M.; Benlarbi, M.; Goyette, G.; Medjahed, H.; Gendron-Lepage, G.; Gaudette, F.; et al. Temsavir blocks the immunomodulatory activities of HIV-1 soluble gp120. *Cell Chem. Biol.* 2023.
42. Richard, J.; Prévost, J.; Alshafi, N.; Ding, S.; Finzi, A. Impact of HIV-1 envelope conformation on ADCC responses. *Trends Microbiol.* 2018, 26, 253–265.

3.2.8 SUPPLEMENTARY

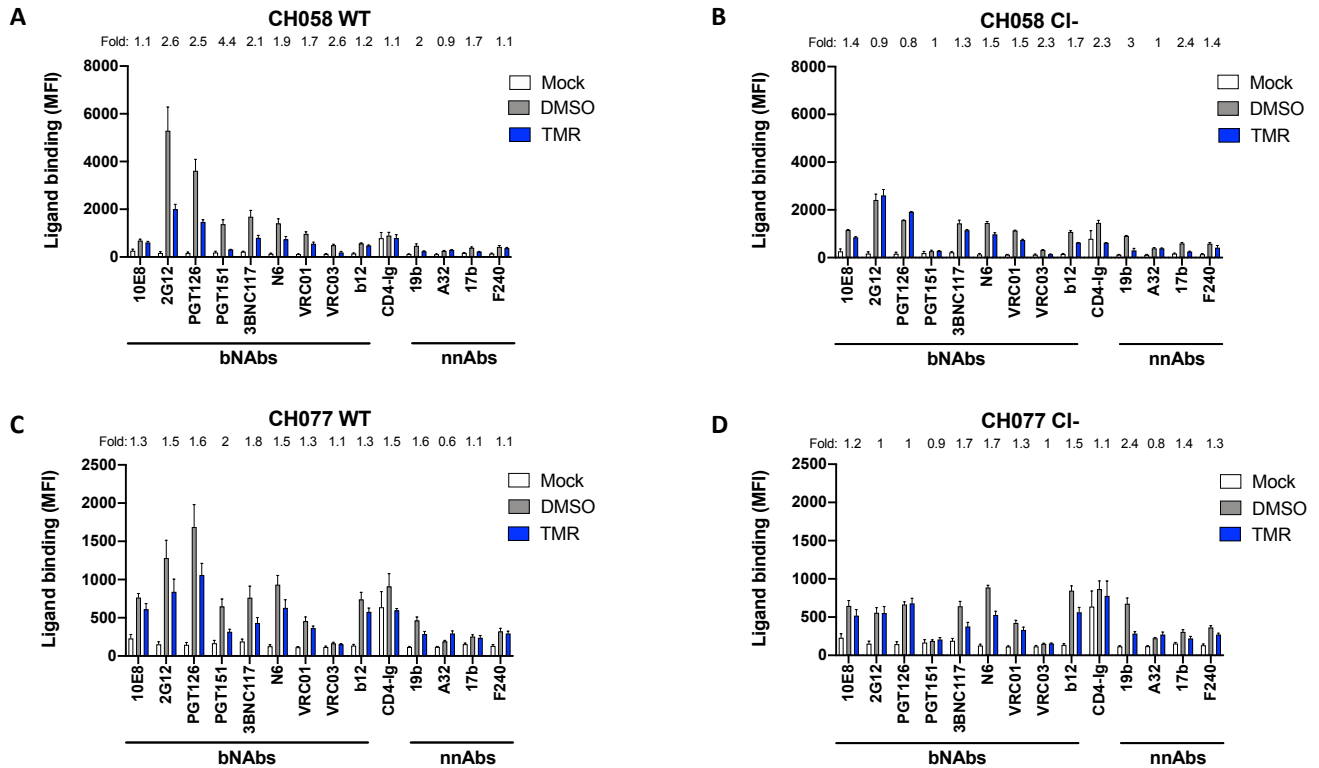


Figure 3.2.S1: Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition of CH058 and CH077 Envs at the surface of HEK 293T cells. HEK 293T cells were transfected with primary IMCs (A) CH058 WT, (B) CH058 Cl-, (C) CH077 WT, and (D) CH077 Cl-. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6, VRC01, VRC03, and b12), nnAbs (19b, A32, 17b, and F240), and CD4-Ig. Shown are mean fluorescence intensities (MFI) \pm standard error of the mean (SEM). MFI values were determined on the transfected (p24+) population. The data shown represents results obtained from at least 2 independent experiments per ligand.

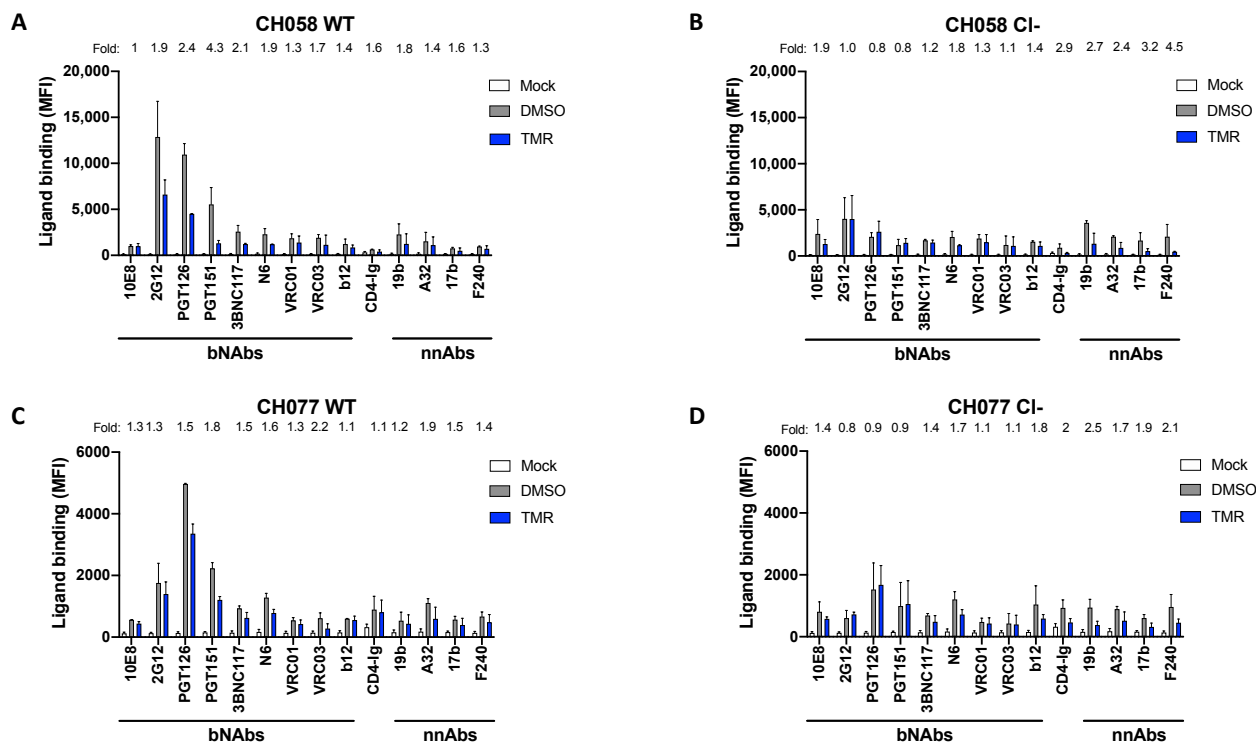


Figure 3.2.S2: Env cleavage affects the capacity of temsavir to modulate bNAb recognition of CH058 and CH077 Envs at the surface of primary CD4⁺ T cells. Primary CD4⁺ T cells were infected with (A) CH058 WT, (B) CH058 Cl-, (C) CH077 WT, and (D) CH077 Cl- viruses. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6, VRC01, VRC03, and b12), nnAbs (19b, A32, 17b, and F240), and CD4-Ig. Shown are mean fluorescence intensities (MFI) \pm standard error of the mean (SEM). MFI values were determined on the transfected (p24⁺) population. The data shown represents results obtained from at least 2 independent experiments per ligand.

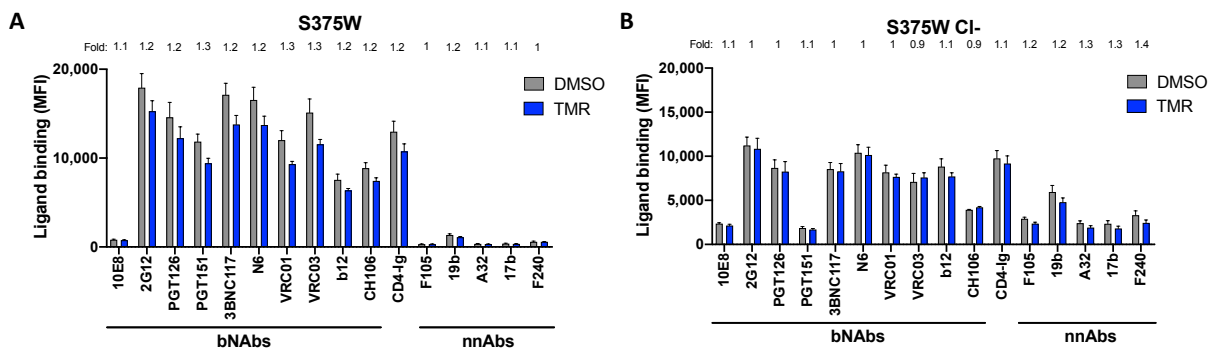


Figure 3.2.S3: Temsavir treatment does not affect ligand recognition for the resistant-mutants Env_{S375W} and Env_{S375W CI-}. HEK 293T cells were transfected with a plasmid expressing (A) HIV-1_{JR-FL} Env S375W or (B) HIV-1_{JR-FL} Env S375W CI-, together with a plasmid expressing GFP. Cells were then treated with 10 μ M temsavir (TMR) or the equivalent volume of DMSO for 24 h. Cell surface staining was performed using a panel of bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6, VRC01, VRC03, b12, and CH106), nnAbs (F105, 19b, A32, 17b, and F240), and the ligand CD4-Ig. Shown are mean fluorescence intensities (MFI) \pm standard error of the mean (SEM). MFI values were measured on the transfected (GFP+) population. The data shown represents results obtained from at least four independent experiments for each ligand. Statistical significance was tested using a two-way analysis of variance (ANOVA).

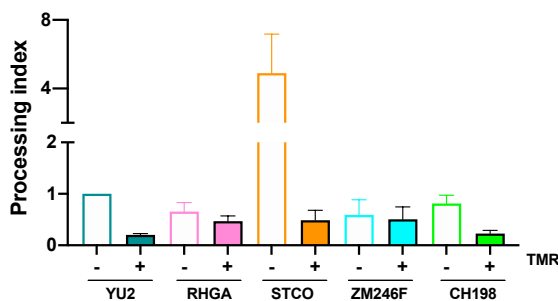


Figure 3.2.S4: Effect of temsavir on Env cleavage. HEK 293T cells were transfected with plasmids expressing Env (YU2, RHGA, STCO, ZM246F, and CH198) and labeled for 24 h with [³⁵S] methionine and [³⁵S] cysteine in the presence of 10 μ M temsavir or the equivalent volume of DMSO. Cell lysates and supernatants were immunoprecipitated with plasma from HIV-1-infected individuals. The precipitated proteins were load on SDS-PAGE gels and analyzed by autoradiography. The effect of temsavir on Env processing was quantified and normalized to YU2 in the presence vehicle (DMSO)

Env	Neutralization IC₅₀ (nM)
YU2	0,22
JRFL	0,16
CH058	0,22
CH077	0,13
CH198	0,08
STCO	1,30
CH040	0,18
ZM246F	0,08
BG505	6,40
RHGA	0,18

Table 3.2.S1: Half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of multiples HIV-1 strains by temsavir. Pseudoviral particles coding for the luciferase reporter gene and bearing the following glycoproteins: JRFL, CH058, CH077, YU2, CH040, RHGA, BG505, STCO, ZM246F, and CH198 were used to infect Cf2Th-T4R5 cells. Pseudoviruses were incubated with increasing concentrations of temsavir for 1 h at 37°C prior infection. Data represents the average from at least three independent experiments are shown.

CHAPITRE IV - DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les avancements concernant les molécules antirétrovirales ont permis d'empêcher la réplication virale à un niveau indétectable chez les PLWH. Cependant, bien que celles-ci soient efficaces afin de contrer l'infection du VIH-1, les études impliquant de nouvelles molécules sont nécessaires dû à l'apparition de résistances et de toxicité envers les traitements actuels. En effet, plusieurs personnes vivant avec le VIH-1 possèdent des options thérapeutiques limitées. L'une des stratégies utilisées chez les patients ayant des résistances importantes aux traitements actuels est la molécule inhibitrice temsavir, approuvée par la FDA en 2020.

4.1 Résumé des nouvelles connaissances

Lors de ce mémoire, nous avons observé l'effet de temsavir sur la conformation d'Env. Premièrement, nous avons utilisé le modèle des cellules HEK 293T afin d'exprimer l'Env de la souche JRFL, soit un virus primaire bien caractérisé. Après avoir traité ces cellules pendant 24 h avec 10 μ M de l'inhibiteur d'attachement, nous avons effectué un marquage radioactif ainsi qu'une immunoprécipitation des lysats cellulaires et des surnageants. Nous avons alors observé que deux mécanismes importants pour la maturation des glycoprotéines d'enveloppe sont altérés en présence de temsavir. En effet, temsavir prévient l'addition de glycans à la surface de l'Env, tel qu'observé par une migration plus rapide de la gp120 suite au traitement des cellules avec temsavir. En plus de son impact sur la glycosylation, temsavir empêche le clivage protéolytique efficace des précurseurs de l'Env (gp160). En effet, en présence de temsavir, un plus grand nombre de précurseurs sont retrouvés dans la cellule que lors de l'utilisation du contrôle DMSO.

Nous avons aussi investigué l'impact de temsavir sur la conformation d'Env. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de cellules HEK 293T où l'Env de JRFL est exprimée à la surface ainsi que l'infection des cellules primaires T CD4⁺ afin d'observer ce phénotype dans un modèle plus physiologique. La modulation de la conformation d'Env par temsavir a été démontrée à l'aide de plusieurs anticorps ciblant différents épitopes. Nous avons observé qu'en présence de temsavir, la reconnaissance de l'Env par les anticorps, principalement les bNAbs, diminue significativement. Ce phénotype est également perçu lors de l'utilisation des cellules primaires. De manière intéressante, l'effet de temsavir est observé à des concentrations inférieures à 10 μ M, soit jusqu'à 0.1 μ M. Cet effet est spécifique puisque la molécule n'a eu aucun impact sur le mutant S375W de

l'Env. En effet, la substitution de la sérine pour le tryptophane remplit la cavité Phe43 et prévient ainsi la liaison de l'inhibiteur à la gp120. Un autre fait intéressant est que temsavir possède également un effet sur la conformation de l'Env à la surface des virions du virus JRFL. Cette diminution de la reconnaissance de l'Env corrèle avec une diminution de l'élimination des cellules infectées par l'ADCC.

Ensuite, afin de mieux distinguer les différents effets de temsavir sur la conformation de l'Env, nous avons effectué un marquage de surface de cellules exprimant l'Env sauvage (WT) de JRFL et de cellules exprimant l'Env mutées au site de clivage (Cl- : R508S/R511S). Nous avons remarqué que l'effet de temsavir est significativement moins important en présence d'une enveloppe mutée pour le site de clivage. En effet, les bNAbs utilisés reconnaissent autant l'Env non clivé en présence de DMSO que de temsavir. Par contre, par compétition, temsavir a toujours un effet sur la liaison du ligand CD4-Ig. Ceci suggère donc que l'effet de temsavir sur le clivage est plus important que son effet sur la glycosylation en ce qui a trait à la liaison des anticorps à l'Env.

Bien que temsavir altère l'Env de JRFL, cette souche du VIH-1 n'est pas la seule à circuler, il est donc important de connaître son effet sur d'autres virus. Pour ce faire, nous avons mesuré l'effet de temsavir sur le clivage protéolytique des Envs suivantes : sous-type A (BG505), sous-type B (JRFL, CH058, CH077, CH040, YU2, RHGA, et STCO) et certaines du sous-type C (ZM246F et CH198). Nous avons alors observé que temsavir diminue le clivage de plusieurs souches, mais certaines, telles que RHGA et ZM246F, semblent plus résistantes. Nous avons ensuite remarqué que temsavir possède un effet différent sur la conformation de l'Env des multiples souches du VIH-1. La différence perçue ne peut pas être expliquée seulement à la capacité de temsavir à neutraliser les différentes souches. Bien que nous ayons observé des différences au niveau de leur susceptibilité à l'inhibiteur, cette différence ne peut expliquer à elle seule le phénotype observé sur la reconnaissance par les différents anticorps. En ce sens, nous avons observé que l'impact de temsavir sur la reconnaissance de l'Env par les anticorps corrèle avec la capacité de temsavir à altérer le clivage du précurseur et la dissociation de la gp120 au trimère de l'Env. De ce fait, notre hypothèse est que l'hétérogénéité observée est basée sur l'effet de temsavir sur les propriétés intrinsèques distinctes de chacune des Envs, soit la glycosylation, le clivage et la stabilisation du

trimère. Nous avons également démontré que l'effet sur la reconnaissance de l'Env par les anticorps est associé à l'efficacité de la réponse ADCC (Figure 4.1).

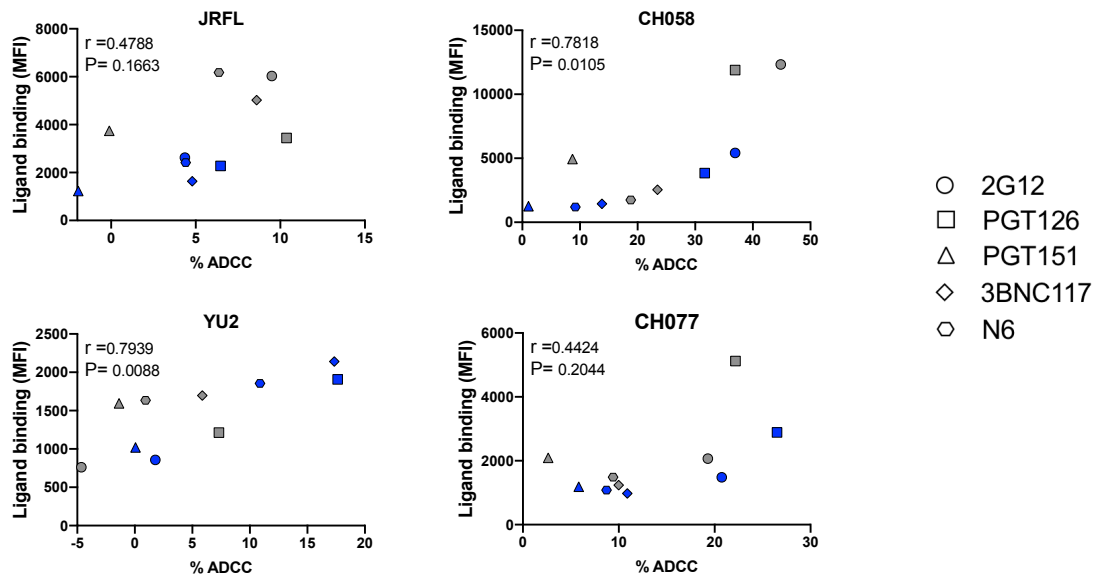


Figure 4.1 Corrélation entre le niveau de reconnaissance de l'Env par les anticorps ainsi que leur capacité à éliminer les cellules infectées par ADCC. Cette corrélation représente le niveau de reconnaissance de l'Env par les différents bNAbs (2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117 et N6) en fonction de leur capacité à médier la réponse ADCC. En gris : résultats obtenus avec le contrôle DMSO, en bleu : résultats obtenus avec l'inhibiteur d'attachement tamsavir.

4.2 Implication de tamsavir sur la glycosylation

L'Env est le seul antigène viral présent à la surface des cellules infectées et des virions. De ce fait, elle est une cible importante pour les anticorps. Le virus a donc évolué avec plusieurs mécanismes afin d'évader au système immunitaire de l'hôte. En effet, dû à la pression de l'hôte, des mutations sont continuellement observées chez le VIH-1 (289). Cette importante diversité génétique favorise ainsi l'échappement aux réponses immunitaires. En plus de varier entre les différentes souches, l'Env peut se retrouver sous différentes conformations et ainsi limiter l'exposition de certains épitopes (290). Il est également connu que la moitié de la masse moléculaire de l'Env soit constituée de glycans, empêchant ainsi la reconnaissance de l'Env par les anticorps (168, 291-293). En effet, ces glycans sont perçus en tant que du «soi» et donc non reconnus par les réponses humorales de l'hôte. Cependant, plusieurs de ces glycans sont très conservés et sont donc devenus

la cible de certains bNAbs, tels que 2G12, PGT121, PGT128, PGT135, PGT151, 10-1074, VRC01 et d'autres (294, 295). La présence de glycans est donc un facteur important pour la liaison de certains anticorps à l'Env et pourrait donc être exploitée davantage pour la conception de thérapies futures. Certaines études, dont la nôtre, ont démontré que temsavir et son analogue BMS-806 possèdent la capacité d'affecter la glycosylation de l'Env (296, 297). Bien qu'il ne soit toujours pas connu quels sont les glycans spécifiquement altérés par temsavir, il est évident que cet inhibiteur empêche l'addition de plusieurs glycans à la surface de l'Env. Ceci a été démontré par immunoprécipitation, représentant l'Env intracellulaire et extracellulaire ainsi que par Western Blot, représentant l'Env uniquement exprimée à la surface des cellules. En effet, temsavir affecte la glycosylation du trimère en entier. Nous avons démontré que la gp120, dans les lysats cellulaires ainsi que dans le surnageant, possède un défaut de glycosylation. De plus, de façon intéressante, la gp41 du trimère est également affectée (Figure 4.2). Il a été démontré que la mutation de sites de glycosylation entraîne une diminution de l'infectivité virale ainsi que la reconnaissance de l'Env par les anticorps (298).

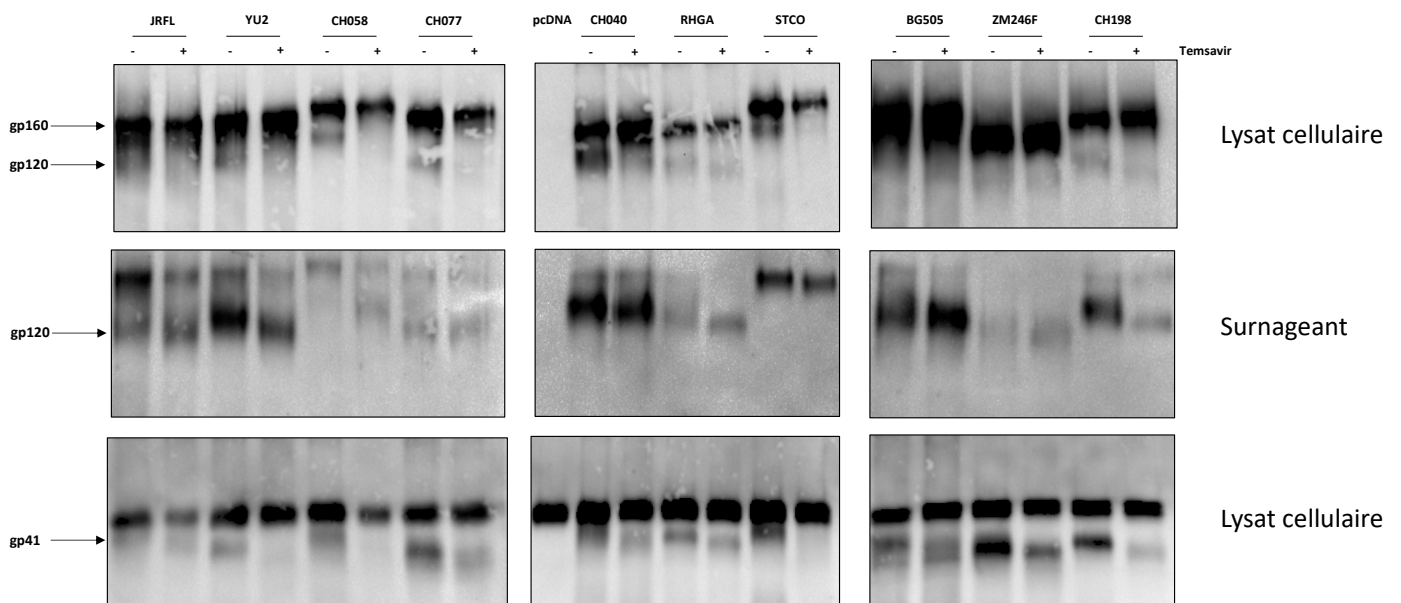


Figure 4.2 Effet de temsavir sur la glycosylation à la surface des cellules exprimant l'Env. Les cellules HEK 293T ont été transfectées à l'aide d'un plasmide exprimant différentes Envs (JRFL, YU2, CH058, CH077, CH040, RHGA, STCO, BG505, ZM246F, CH198) ou qu'un plasmide contrôle (pcDNA). 24 h suite à la transfection, les cellules ont été traitées à l'aide de 10 μ M temsavir (TMR(+)) ou le volume équivalent de DMSO. 24 h plus tard, un marquage de l'Env a été effectué à l'aide de 2G12 et N6 avant la lyse cellulaire pour ensuite

être immunoprécipité à l'aide de plasma de patients infectés. Les protéines ont ensuite été ajoutées à un gel SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La gp120 a été captée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-gp120 tandis que la gp41 a été captée à l'aide de l'anticorps 4E10.

4.3 Implication de temsavir sur le clivage protéolytique

Le clivage du précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe (gp160) est une étape post-traductionnelle cruciale pour la maturation de l'Env et l'infectivité virale. Suite au clivage du précurseur par la furine, l'Env mature est constitué des sous-unités gp120 et gp41. Cet hétérodimère est responsable de l'entrée du virus dans la cellule hôte et est donc essentielle pour l'infection virale. Il a également été démontré que cette enveloppe efficacement clivée est mieux reconnue par les bNAbs, tandis qu'une enveloppe non clivée est principalement reconnue par les nnAbs (299). De ce fait, cette forme native clivée de l'Env est souvent considérée en tant qu'immunogène pour le développement de vaccin dans le but de générer une réponse humorale efficace rarement produite chez les PLWH (208-210). Cependant, la génération de ce type de vaccin s'est avérée difficile (300). Effectivement, l'immunogène impliqué doit permettre de cibler la lignée germinale des cellules B précurseurs de bNAbs et permettre les mutations nécessaires pour leur efficacité (301). De ce fait, l'administration de bNAbs en combinaison avec des inhibiteurs antirétroviraux, de nouvelles stratégies vaccinales ou autres molécules est envisagée. Effectivement, dû au fait que temsavir stabilise le trimère dans sa conformation «fermée», soit la conformation principalement reconnue par les bNAbs, la combinaison de ce petit inhibiteur et de bNAbs a été suggérée (302). Donc, bien que temsavir et les bNAbs démontrent beaucoup de potentiels, plus d'efforts devraient être effectués sur ces alternatives aux traitements actuels de façon séparée.

4.4 Implication de la queue cytoplasmique sur l'effet de temsavir

La longueur de la queue cytoplasmique (CT) est une caractéristique importante des Lentivirus. Tel que mentionné dans la section **1.8.3**, la CT possède plusieurs rôles différents. Lors de ce mémoire, les études effectuées n'étaient pas concentrées sur la CT. Par contre, les résultats préliminaires obtenus démontrent que la queue cytoplasmique n'est pas impliquée sur l'impact que temsavir possède sur la conformation de l'Env. En effet, si l'on compare les résultats obtenus lorsque les cellules HEK 293T expriment l'Env de JRFL WT ou Δ CT en présence de temsavir, le phénotype général est similaire (Figure 4.3). Par contre, une observation intéressante est que, lorsque le site

de clivage est muté sur le plasmide où la CT est tronquée (Δ CT Cl-), l'effet de temsavir sur la reconnaissance de certains anticorps, majoritairement les CD4BS, est toujours perçu, ce qui n'est pas le cas pour l'Env de JRFL Cl-, suggérant que l'effet de temsavir sur la conformation d'Env est intrinsèquement lié à sa capacité à bloquer le clivage du précurseur gp160.

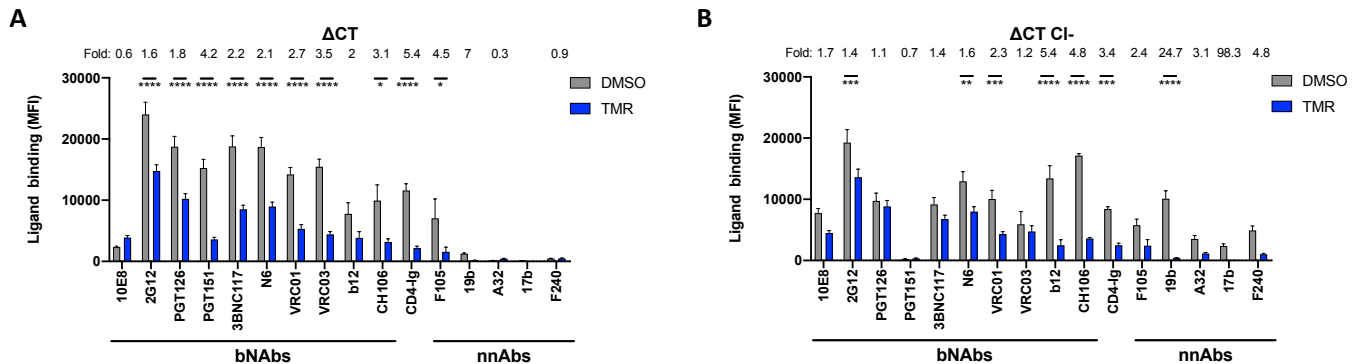


Figure 4.3 L'effet de temsavir sur la reconnaissance des anticorps sur l'Env de JRFL Δ CT et JRFL Δ CT Cl-. Les cellules HEK 293T ont été transfectées à l'aide d'un plasmide exprimant (A) l'Env JRFL Δ CT ou (B) l'Env JRFL Δ CT Cl-, avec un plasmide exprimant la GFP. 24 h suite à la transfection, les cellules ont ensuite été traitées à l'aide de 10 μ M temsavir (TMR) ou le volume équivalent de DMSO pour 24 h. Un marquage de surface sur les cellules a ensuite été performé à l'aide de différents bNAbs (10E8, 2G12, PGT126, PGT151, 3BNC117, N6, VRC01, VRC03, b12 et CH106), nnAbs (F105, 19b, A32, 17b, et F240) et le ligand CD4-Ig. Le MFI (mean fluorescence intensities) est montré \pm erreur type de la moyenne (SEM), basé sur la population de cellules transfectées (GFP+). Les résultats ont été obtenues à partir d'au moins 3 expériences indépendantes par ligand. Les statistiques sont basés sur une analyse de variance à 2 voies (ANOVA) (**, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001).

4.5 Les multiples fonctions de l'inhibiteur d'attachement temsavir

Bien que principalement connu en tant que molécule inhibitrice d'entrée virale, des études récentes ont montré que temsavir possède plusieurs autres rôles. En effet, dans le cadre de ce mémoire, il a été démontré que temsavir possède un rôle sur la glycosylation ainsi que le clivage protéolytique. Ces altérations au processus de maturation de l'Env contribuent à une diminution de la reconnaissance de l'Env par les bNAbs ainsi que les plasmas provenant d'individus vivant avec le VIH-1 (Figure 4.4).

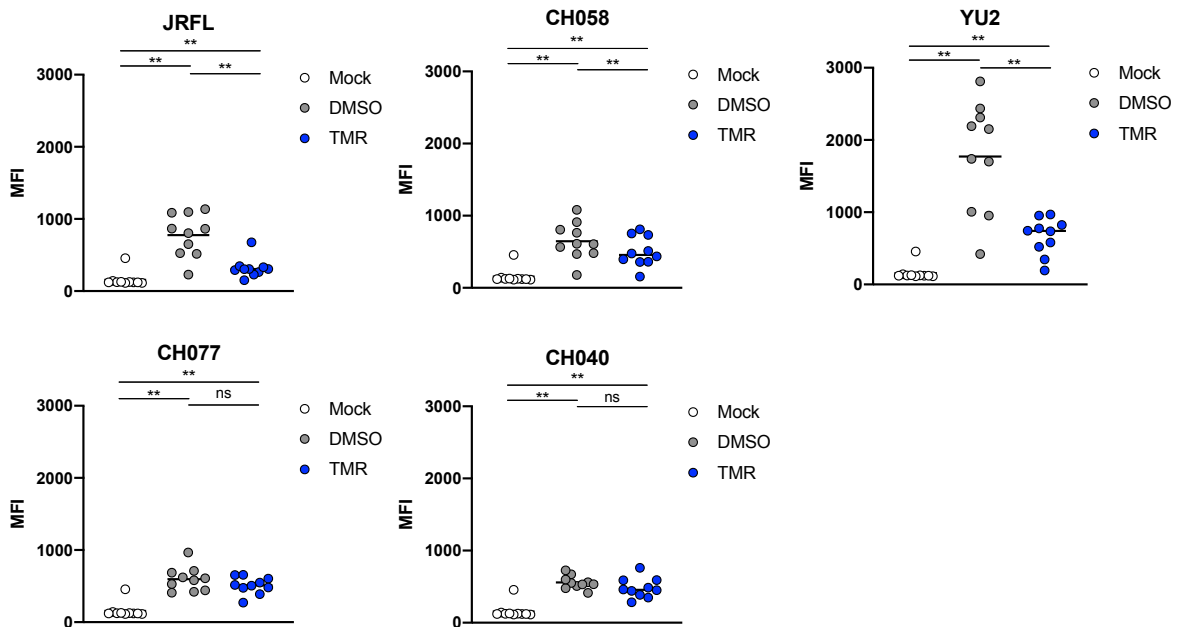


Figure 4.4 Impact de temsavir sur la reconnaissance de l'Env par des plasmas provenant d'individus infectés par le VIH-1. Les cellules primaires T CD4⁺ ont été infectées à l'aide de différents virus (JRFL, CH058, CH077, YU2 et CH040). 24 h suite à la transfection, les cellules ont ensuite été traitées à l'aide de 10 μ M temsavir (TMR) ou le volume équivalent de DMSO pour 24 h. Un marquage de surface sur les cellules a ensuite été performé à l'aide de 10 différents plasmas provenant d'individus infectés par le VIH-1. Le MFI (mean fluorescence intensities) est montré \pm erreur type de la moyenne (SEM), basé sur la population de cellules transfectées (GFP⁺). Les statistiques sont basés sur une analyse de paired t test ou Wilcoxon signed-rank basé sur la normalité des résultats (**, P < 0.01; ns : non significatif).

Cependant, cette modulation de l'Env empêche également la reconnaissance adéquate du récepteur CD4 à la surface des cellules cibles. Donc, en plus d'agir en tant qu'inhibiteur d'attachement par allostérie, temsavir prévient l'attachement de l'Env au récepteur CD4 en affectant la maturation de l'Env. Par ailleurs, temsavir possède des propriétés immunorégulatrices. Il est bien connu que les sous-unités gp120 et gp41 du trimère de l'Env sont liées de façon non-covalente. De ce fait, la gp120 peut spontanément se dissocier du trimère. Cette gp120 soluble peut ainsi lier les cellules T CD4⁺ non infectées et induire l'élimination de celle-ci par une réponse ADCC (221, 303, 304). Par contre, en présence de temsavir, par compétition pour le récepteur CD4 et par le changement d'antigénicité de la gp120 soluble, la gp120 lie de façon moins importante les cellules T CD4⁺ non infectées (305). En plus de permettre l'élimination de cellules T CD4⁺ saines, la gp120 soluble peut

également induire une libération non contrôlée de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (306-308). En effet, bien que sous traitement antirétroviral, des dysfonctions immunitaires peuvent tout de même être observé chez les PLWH. Cette persistance immunitaire pourrait être due à la présence de gp120 soluble toujours observée chez les PLWH traitées (308-310). Donc, en prévenant l'attachement de cette gp120 aux différentes cellules, temsavir pourrait prévenir l'établissement de cet environnement pro-inflammatoire (305). Tous ces différents rôles de temsavir pourraient jouer un rôle dans l'augmentation du niveau de cellules T CD4⁺ perçu chez les individus lors des essais cliniques (311).

4.6 Impact de temsavir sur les différentes souches du VIH-1

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'importante diversité génétique du VIH-1, dont l'absence d'une activité de relecture de la transcriptase inverse qui induit plusieurs mutations dans le génome du virus ainsi que la pression immunitaire sélective de l'hôte (8, 289, 312). Les souches du VIH-1 appartiennent majoritairement au groupe pandémique M qui est divisé en plusieurs sous-types. Le sous-type C prédomine mondialement, mais est principalement retrouvé en Afrique du Sud et en Inde, bien que le nombre de cas augmente également en Afrique et en Europe de l'Est. Pour sa part, le sous-type B, soit le deuxième sous-type le plus prévalent, est majoritairement observé en Amérique, en Europe occidentale et centrale ainsi qu'en Océanie. La majorité des infections perçues en Europe de l'Est, en Afrique de l'Est ainsi qu'en Asie Centrale font partie du sous-type A, soit le troisième sous-type le plus présent. Finalement, le nombre de cas de formes recombinantes circulantes sont également en augmentation (313). L'une d'entre elle, CRF01_AE, est principalement connue car c'est la souche en circulation où l'essai vaccinal RV144 a été effectué (Thaïlande). Cette hétérogénéité des souches à travers le monde rend donc la conception d'un vaccin ou traitement efficace très complexe. L'objectif est donc de développer un immunogène ou de nouvelles petites molécules ayant la capacité de prévenir l'infection de multiples souches du VIH-1. Pour cela, il est donc important de connaître si temsavir peut agir à large spectre. Il est déjà connu que plusieurs mutations, tel que M426L, M434I/V, M475I et S375M/H/W (282, 285), empêchent la liaison de la molécule inhibitrice. C'est pour cette raison que temsavir n'affecte pas le VIH-2 et les souches simiennes qui possèdent un résidu tryptophane en position 375 ou la souche CRF01_AE qui possède une histidine à cet endroit (285, 314, 315).

Une étude récente démontre que temsavir aurait la capacité de s'ajuster à son environnement, donc de modifier la façon auquel celui-ci peut lier l'Env. À long terme, cette fonction permettrait probablement d'éviter certaines résistances qui pourraient être observées en cas d'utilisation massive (316). Certaines études ainsi que ce mémoire démontrent que, mise à part les souches ayant ces mutations, la majorité des souches sont neutralisées par temsavir, à un niveau différent (285). Par contre, nous montrons que, bien que les souches testées dans ce mémoire soient tous sensibles à la neutralisation par cette petite molécule, temsavir n'affecte pas le clivage protéolytique de chacune d'entre elles. De ce fait, lorsque les cellules et virions sont traités avec temsavir, une différence est perçue au niveau de la reconnaissance de l'Env par les différents anticorps et plasmas selon les souches.

4.7 La différence entre temsavir et les autres inhibiteurs d'entrée virale ciblant la gp120

Trois molécules dérivées de l'indole glyoxamide (BMS-378806, BMS-488043 et BMS-626529) ont montré une activité antivirale potentielle et ont donc été utilisées pour des essais cliniques. Le premier inhibiteur, BMS-378806, ne répondait pas aux critères d'efficacité et le développement de la molécule a donc été interrompu. Ceci a donc mené à la production de BMS-488043 qui s'est montré efficace. Par contre, la solubilité du médicament dépendait de la prise d'un repas riche en graisses, ce qui représentait un problème au niveau des utilisateurs. Le nouvel inhibiteur montrant un véritable potentiel et qui est maintenant approuvé par la FDA est la molécule BMS-626529 (285). La majeure différence avec les molécules précédentes est son groupement méthyltriazole, permettant ainsi des interactions supplémentaires avec Thr202 et Gln432 de la gp120 (285). Un autre inhibiteur d'entrée qui attire l'attention est le CD4mc. Bien que la molécule temsavir et le CD4mc possèdent des fonctions communes, tels que l'inhibition de l'entrée virale, la prévention de l'élimination de cellules saines et l'induction de cytokines pro-inflammatoires, elles n'ont pas le même mécanisme d'action (305, 317, 318). En effet, les deux molécules inhibitrices, temsavir et CD4mc, lient deux régions distinctes, soit entre le domaine interne et externe sous la boucle β 20- β 21 ou la cavité Phe43, respectivement. Bien que ces inhibiteurs ne lient pas au même endroit, ils lient des résidus communs et ne peuvent donc pas lier l'Env de façon simultanée. Contrairement à temsavir, le CD4mc rend l'Env exprimée à la surface des cellules infectées sensibles aux réponses ADCC. En effet, la liaison de cette molécule dans la cavité Phe43 permet l'ouverture de l'Env,

exposant ainsi des épitopes reconnus par les nnAbs présents dans le plasma des PLWH (198, 279, 319).

4.8 Limites de l'étude

L'impact de temsavir sur la conformation de l'Env a été testé sur dix différentes souches. Par contre, pour certaines d'entre elles, la réponse ADCC n'a pas pu être observée. En effet, le niveau d'infectivité des virus choisis était insuffisant pour permettre de calculer le pourcentage de réponses d'ADCC. Ensuite, afin d'avoir une meilleure vision globale de l'effet de temsavir à large spectre, plus de souches provenant de différents sous-types devraient être testées. En effet, les souches testées lors de ce mémoire appartiennent principalement au sous-type B.

L'effet de temsavir a été observé en utilisant une lignée cellulaire ainsi que les cellules T CD4⁺ primaires. Bien que les cellules T CD4⁺ primaires sont celles principalement infectées par le VIH-1, elles ne sont pas les seules cellules infectées par ce virus. De ce fait, comprendre comment temsavir agit sur la conformation de l'Env de d'autres types cellulaires, tel que les macrophages, serait nécessaire.

L'effet de temsavir sur la glycosylation ainsi que le clivage d'Env a été principalement observé et quantifié à l'aide de la technique d'immunoprécipitation utilisant le marquage radioactif. Lors de cette expérience, la lyse des cellules précède l'étape d'immunoprécipitation. De ce fait, les protéines immunoprécipitées sont celles retrouvées de façon intracellulaire et extracellulaire. Afin de valider si le phénotype observé pour le total des Envs était le même pour les Env seulement exprimées à la surface, nous avons effectué une immunoprécipitation suivie d'un Western Blot. Contrairement à la technique d'immunoprécipitation seule, nous avons utilisé des anticorps (2G12 et N6) afin de concentrer l'Env exprimée à la surface des cellules, avant de lyser celles-ci. De ce fait, les billes de Sépharose A ont retenu uniquement ces Envs. Donc, bien que nous ayons observé un effet similaire et que cette méthode nous a permis de voir l'effet de la glycosylation sur la gp41, la qualité de la technique doit être optimisée davantage. De plus, certaines Envs possèdent deux sites de clivages actifs. Bien que le site de clivage muté soit le site principal, il aurait pu être pertinent de muter les deux sites sur le même plasmide, ce qui devra donc être envisagé.

4.9 Les perspectives futures

Bien évidemment, l'une des perspectives évidentes de cette étude serait de tester plus d'Envs. Étant approuvé comme traitement pour les PLWH avec des options thérapeutiques limitées, il est important de connaître si l'effet de temsavir est à large spectre. Dû au fait où le sous-type C est le plus prévalent dans le monde et que certaines de ces régions sont celles où l'accès au traitement est restreint, il serait pertinent d'évaluer l'effet de temsavir sur plusieurs souches appartenant à ce sous-type. Les nouvelles connaissances sur cette molécule démontrent que temsavir possède un effet au niveau de la glycosylation ainsi que sur le clivage protéolytique. En ce qui concerne la glycosylation, il serait intéressant de caractériser le profil des glycans présent en absence et en présence de temsavir. Les prochaines études devraient également viser à mieux comprendre l'effet de temsavir sur le clivage. Comment est-ce que temsavir prévient la furine de cliver le précurseur de l'Env? Est-ce que ce défaut de clivage prévient ainsi les modifications post-traductionnelles et donc l'ajout de glycans? Tel qu'observé, l'effet de temsavir est toujours observé lorsque le site de clivage ainsi que la queue cytoplasmique sont mutés. De ce fait, une meilleure caractérisation de la queue cytoplasmique pourrait également contribuer à mieux comprendre le mode d'action de l'inhibiteur d'attachement. De plus, lorsque le site de clivage est altéré, il semble avoir un défaut d'expression à la surface des cellules. Plus d'expériences devront donc être effectuées pour séparer l'effet de temsavir sur la conformation et l'expression de surface de l'Env. De plus, pour des études au plus long terme, il serait pertinent de répondre à différentes questions, telles que : comment est-ce que la réponse humorale de l'hôte s'adapte à la nouvelle conformation/expression de surface de l'Env? Est-ce que les anticorps subissent des modifications supplémentaires afin de reconnaître cette conformation?

4.10 Conclusion

En conclusion, les études effectuées pour ce mémoire démontrent l'efficacité de temsavir en tant qu'inhibiteur d'attachement. Bien que temsavir prévienne l'interaction entre l'Env et le récepteur CD4 par allostérie, temsavir modifie également l'antigénicité de l'Env par des mécanismes importants pour sa maturation. En effet, temsavir altère la glycosylation ainsi que le clivage protéolytique du précurseur des différentes Envs de diverses souches. En modifiant la flexibilité de l'Env, temsavir affecte la reconnaissance de l'Env par les différents anticorps, principalement les anticorps neutralisants à large spectre. En effet, la majorité des Envs testées sont moins reconnus par les anticorps et plasmas de PLWH, ce qui est associé à une diminution des réponses effectrices ADCC. En bref, temsavir est un nouvel inhibiteur d'attachement efficace qui pourrait avoir des effets immunomodulateurs bénéfiques pour les personnes vivant avec le VIH-1, surtout si celui-ci est administré rapidement dès les premiers signes d'infection. Effectivement, en bloquant l'infection et en modifiant l'antigénicité de la gp120, temsavir pourrait diminuer l'établissement des réservoirs ainsi que de diminuer les effets toxiques de la gp120.

CHAPITRE V - RÉFÉRENCES

1. Barré-Sinoussi F, Chermann J-C, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann E, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman V, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):865-7.
3. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011;1(1):a006841.
4. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
5. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *science*. 2000;288(5472):1789-96.
6. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226(5252):1209-11.
7. Panganiban AT, Temin HM. The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(24):7885-9.
8. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988;242(4882):1171-3.
9. Robertson DL, Anderson J, Bradac J, Carr J, Foley B, Funkhouser R, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 2000;288(5463):55-.
10. McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS. HIV-1 genetic diversity. *AIDS (London, England)*. 1996;10:S13-20.
11. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British medical bulletin*. 2001;58(1):19-42.
12. Maucière P, Loussert-Ajaka I, Damond F, Fagot P, Souquières S, FX MK, et al. Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *AIDS (London, England)*. 1997;11(4):445-53.
13. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, et al. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS (London, England)*. 1997;11(4):493-8.
14. Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndemi N, Mbanya D, et al. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(1):109-15.
15. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871-2.
16. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology*. 2011;85(3):1403-7.
17. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. UNAIDS. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.

18. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(11):a006965.
19. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(14):954-60.
20. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(14):961-4.
21. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278(5341):1295-300.
22. Chun T-W, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387:183-8.
23. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological reviews*. 1993;57(1):183-289.
24. Lemp GF, Payne SF, Rutherford GW, Hessel NA, Winkelstein W, Wiley JA, et al. Projections of AIDS morbidity and mortality in San Francisco. *Jama*. 1990;263(11):1497-501.
25. Tough RH, McLaren PJ. Interaction of the host and viral genome and their influence on HIV disease. *Frontiers in Genetics*. 2019;9:720.
26. Vergis EN, Mellors JW. Natural history of HIV-1 infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(4):809-25, v-vi.
27. Mbogo RW. Intra-Host stochastic models for HIV dynamics and management. 2013.
28. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Kräusslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo j*. 2003;22(7):1707-15.
29. Garnier L, Ratner L, Rovinski B, Cao SX, Wills JW. Particle size determinants in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*. 1998;72(6):4667-77.
30. Aloia RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(11):5181-5.
31. Zhu P, Chertova E, Bess J, Jr., Lifson JD, Arthur LO, Liu J, et al. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15812-7.
32. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids*. 1991;5(6):617-38.
33. Prasad VM, Leaman DP, Lovendahl KN, Croft JT, Benhaim MA, Hodge EA, et al. Cryo-ET of Env on intact HIV virions reveals structural variation and positioning on the Gag lattice. *Cell*. 2022;185(4):641-53. e17.
34. Tedbury PR, Novikova M, Ablan SD, Freed EO. Biochemical evidence of a role for matrix trimerization in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(2):E182-E90.
35. Samal AB, Green TJ, Saad JS. Atomic view of the HIV-1 matrix lattice; implications on virus assembly and envelope incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119(23):e2200794119.

36. Murakami T, Freed EO. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):343-8.
37. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science*. 1999;283(5398):80-3.
38. Kessl JJ, Kutluay SB, Townsend D, Rebensburg S, Slaughter A, Larue RC, et al. HIV-1 integrase binds the viral RNA genome and is essential during virion morphogenesis. *Cell*. 2016;166(5):1257-68. e12.
39. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006924.
40. Fouchier R, Simon J, Jaffe AB, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *Journal of virology*. 1996;70(12):8263-9.
41. Paxton W, Connor R, Landau N. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *Journal of virology*. 1993;67(12):7229-37.
42. Welker R, Harris M, Cardel B, Kräusslich H-G. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *Journal of virology*. 1998;72(11):8833-40.
43. Reicin AS, Kalpana G, Paik S, Marmon S, Goff S. Sequences in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for in vivo and in vitro integration. *Journal of virology*. 1995;69(9):5904-7.
44. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry*. 1998;67(1):1-25.
45. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998;251(1):1-15.
46. Kräusslich H-G, Fäcke M, Heuser A-M, Konvalinka J, Zentgraf H. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *Journal of Virology*. 1995;69(6):3407-19.
47. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331(6153):280-3.
48. Park J, Morrow CD. The nonmyristylated Pr160gag-pol polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 interacts with Pr55gag and is incorporated into viruslike particles. *Journal of virology*. 1992;66(11):6304-13.
49. Decroly E, Vandenbranden M, Ruyschaert J-M, Cogniaux J, Jacob GS, Howard SC, et al. The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(16):12240-7.
50. Bounou S, Leclerc JE, Tremblay MJ. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4+-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *Journal of Virology*. 2002;76(3):1004-14.

51. Fortin J-F, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *Journal of virology*. 1997;71(5):3588-96.
52. Tremblay MJ, Fortin J-F, Cantin R. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology today*. 1998;19(8):346-51.
53. Thibault S, Tardif MR, Gilbert C, Tremblay MJ. Virus-associated host CD62L increases attachment of human immunodeficiency virus type 1 to endothelial cells and enhances trans infection of CD4+ T lymphocytes. *Journal of general virology*. 2007;88(9):2568-73.
54. GUO MML, HILDRETH JE. HIV acquires functional adhesion receptors from host cells. *AIDS research and human retroviruses*. 1995;11(9):1007-13.
55. Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *Journal of virology*. 1998;72(5):3623-34.
56. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Gallay PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *Journal of virology*. 2001;75(19):9187-200.
57. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, Van Vliet SJ, Van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-97.
58. Orloff GM, Orloff S, Kennedy M, Maddon P, McDougal J. Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1991;146(8):2578-87.
59. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984;312:767-8.
60. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996;272(5270):1955-8.
61. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381(6584):661-6.
62. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996;85(7):1135-48.
63. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272(5263):872-7.
64. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996;85(7):1149-58.
65. Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nature structural biology*. 1998;5(4):276-9.
66. He Y, Vassell R, Zaitseva M, Nguyen N, Yang Z, Weng Y, et al. Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites. *Journal of virology*. 2003;77(3):1666-71.
67. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature structural biology*. 1995;2(12):1075-82.

68. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S, Skehel J, Wiley D. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. 1997;387(6631):426-30.
69. Hulme AE, Kelley Z, Foley D, Hope TJ. Complementary assays reveal a low level of CA associated with viral complexes in the nuclei of HIV-1-infected cells. *Journal of virology*. 2015;89(10):5350-61.
70. Ingram Z, Taylor M, Okland G, Martin R, Hulme AE. Characterization of HIV-1 uncoating in human microglial cell lines. *Virology journal*. 2020;17:1-12.
71. Hulme AE, Kelley Z, Okocha EA, Hope TJ. Identification of capsid mutations that alter the rate of HIV-1 uncoating in infected cells. *Journal of virology*. 2015;89(1):643-51.
72. Francis AC, Melikyan GB. 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):536-48. e6.
73. Jacques DA, McEwan WA, Hilditch L, Price AJ, Towers GJ, James LC. HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis. *Nature*. 2016;536(7616):349-53.
74. Mallery DL, Marquez CL, McEwan WA, Dickson CF, Jacques DA, Anandapadamanaban M, et al. IP6 is an HIV pocket factor that prevents capsid collapse and promotes DNA synthesis. *Elife*. 2018;7:e35335.
75. Francis AC, Marin M, Shi J, Aiken C, Melikyan GB. Time-resolved imaging of single HIV-1 uncoating in vitro and in living cells. *PLoS pathogens*. 2016;12(6):e1005709.
76. Zurnic Bönisch I, Dirix L, Lemmens V, Borrenberghs D, De Wit F, Vernailen F, et al. Capsid-labelled HIV to investigate the role of capsid during nuclear import and integration. *Journal of virology*. 2020;94(7):e01024-19.
77. Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JM, Nagashima K, Hu W-S, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(10):5486-93.
78. Li C, Burdick RC, Nagashima K, Hu W-S, Pathak VK. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(10):e2019467118.
79. Hu W-S, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(10):a006882.
80. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of virology*. 1997;71(7):5382-90.
81. Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reiling N, Lee M-A, Ratner L, et al. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *The EMBO journal*. 1998;17(4):909-17.
82. Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, et al. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Journal of molecular biology*. 2000;299(2):359-68.
83. Craigie R, Bushman FD. Hiv dna integration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006890.
84. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. 1990;249(4976):1555-8.
85. Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency

virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(13):6125-9.

86. Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, Walker WH, et al. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*. 2006;314(5798):461-4.

87. Li Y, Flanagan PM, Tschochner H, Kornberg RD. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science*. 1994;263(5148):805-7.

88. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*. 1987;326(6114):711-3.

89. Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmerman LA, Kaneshima H, Nolan GP. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*. 1997;6(3):235-44.

90. Kim S, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *Journal of virology*. 1989;63(9):3708-13.

91. Purcell D, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of virology*. 1993;67(11):6365-78.

92. Selby MJ, Bain ES, Luciw PA, Peterlin BM. Structure, sequence, and position of the stem-loop in *tat* determine transcriptional elongation by *tat* through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes & development*. 1989;3(4):547-58.

93. Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science*. 1985;229(4708):74-7.

94. Wei P, Garber ME, Fang S-M, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 *Tat* and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 1998;92(4):451-62.

95. Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell*. 1986;44(6):941-7.

96. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 1997;90(6):1051-60.

97. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 *rev* protein. *Annual review of microbiology*. 1998;52(1):491-532.

98. Ocwieja KE, Sherrill-Mix S, Mukherjee R, Custers-Allen R, David P, Brown M, et al. Dynamic regulation of HIV-1 mRNA populations analyzed by single-molecule enrichment and long-read sequencing. *Nucleic acids research*. 2012;40(20):10345-55.

99. Emery A, Zhou S, Pollom E, Swanstrom R. Characterizing HIV-1 splicing by using next-generation sequencing. *Journal of virology*. 2017;91(6):e02515-16.

100. Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P. Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *Journal of virology*. 2000;74(16):7238-49.

101. Khorchid A, Halwani R, Wainberg MA, Kleiman L. Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *Journal of virology*. 2002;76(8):4131-7.

102. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):484-96.

103. Tabler CO, Wegman SJ, Chen J, Shroff H, Alhusaini N, Tilton JC. The HIV-1 Viral Protease Is Activated during Assembly and Budding Prior to Particle Release. *J Virol*. 2022;96(9):e0219821.

104. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(49):40875-83.
105. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002;418(6898):646-50.
106. Friew YN, Boyko V, Hu W-S, Pathak VK. Intracellular interactions between APOBEC3G, RNA, and HIV-1 Gag: APOBEC3G multimerization is dependent on its association with RNA. *Retrovirology*. 2009;6(1):1-20.
107. Huthoff H, Autore F, Gallois-Montbrun S, Fraternali F, Malim MH. RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000330.
108. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*. 2003;424(6944):94-8.
109. Yu Q, König R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(5):435-42.
110. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003;424(6944):99-103.
111. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*. 2003;300(5622):1112-.
112. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451(7177):425-30.
113. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell host & microbe*. 2008;3(4):245-52.
114. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*. 2009;139(3):499-511.
115. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. Bst-2/HM1. 24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic*. 2003;4(10):694-709.
116. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 2004;427(6977):848-53.
117. Roa A, Hayashi F, Yang Y, Lienlaf M, Zhou J, Shi J, et al. RING domain mutations uncouple TRIM5 α restriction of HIV-1 from inhibition of reverse transcription and acceleration of uncoating. *Journal of virology*. 2012;86(3):1717-27.
118. Ganser-Pornillos BK, Pornillos O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(9):546-56.
119. Selyutina A, Persaud M, Simons LM, Bulnes-Ramos A, Buffone C, Martinez-Lopez A, et al. Cyclophilin A Prevents HIV-1 Restriction in Lymphocytes by Blocking Human TRIM5 α Binding to the Viral Core. *Cell Rep*. 2020;30(11):3766-77.e6.
120. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringiard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-7.

121. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*. 2011;474(7353):658-61.
122. Ayinde D, Casartelli N, Schwartz O. Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):675-80.
123. Barraud P, Paillart JC, Marquet R, Tisné C. Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr HIV Res*. 2008;6(2):91-9.
124. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature medicine*. 2003;9(11):1398-403.
125. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature medicine*. 2003;9(11):1404-7.
126. Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(9):3369-74.
127. Wang J, Shackelford JM, Casella CR, Shivers DK, Rapaport EL, Liu B, et al. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology*. 2007;359(2):243-52.
128. Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(48):20798-803.
129. Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of HIV-1 vpr product and function. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 1990;3(1):11-8.
130. Yuan X, MATSUDA Z, MATSUDA M, Essex M, LEE T-H. Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS research and human retroviruses*. 1990;6(11):1265-71.
131. Hrecka K, Gierszewska M, Srivastava S, Kozaczekiewicz L, Swanson SK, Florens L, et al. Lentiviral Vpr usurps Cul4–DDB1 [VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(28):11778-83.
132. Belzile J-P, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen ÉA. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS pathogens*. 2007;3(7):e85.
133. Le Rouzic E, Belaïdouni N, Estrabaud E, Morel M, Rain J-C, Transy C, et al. HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell cycle*. 2007;6(2):182-8.
134. DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Monteiro-Filho CM, Argañaraz ER, Planelles V. HIV-1 Vpr activates the G 2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virology journal*. 2007;4:1-8.
135. Schröfelbauer B, Hakata Y, Landau NR. HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(10):4130-5.
136. Zhang F, Bieniasz PD. HIV-1 Vpr induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137. *Elife*. 2020;9:e55806.
137. Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 2011;8(1):1-20.

138. Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*. 1991;350(6318):508-11.
139. Veillette M, Désormeaux A, Medjahed H, Gharsallah N-E, Coutu M, Baalwa J, et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of virology*. 2014;88(5):2633-44.
140. Kwon Y, Kaake RM, Echeverria I, Suarez M, Shamsabadi MK, Stoneham C, et al. Structural basis of CD4 downregulation by HIV-1 Nef. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2020;27(9):822-8.
141. Benson R, Sanfridson A, Ottinger J, Doyle C, Cullen B. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(6):1561-6.
142. Tanaka M, Ueno T, Nakahara T, Sasaki K, Ishimoto A, Sakai H. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology*. 2003;311(2):316-25.
143. Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *The EMBO journal*. 1997;16(23):6964-76.
144. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 1994;76(5):853-64.
145. Schwartz O, Maréchal V, Gall SL, Lemonnier F, Heard J-M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature medicine*. 1996;2(3):338-42.
146. Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol*. 1993;67(8):5056-61.
147. Khan N, Geiger JD. Role of Viral Protein U (Vpu) in HIV-1 Infection and Pathogenesis. *Viruses*. 2021;13(8).
148. Schwartz S, Felber B, Fenyö E, Pavlakis G. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology*. 1990;64(11):5448-56.
149. Schwartz S, Felber B, Pavlakis G. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(1):207-19.
150. Chen BK, Gandhi RT, Baltimore D. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *Journal of virology*. 1996;70(9):6044-53.
151. Schubert U, Henklein P, Boldyreff B, Wingender E, Strebel K, Porstmann T. The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted α -helix-turn- α -helix-motif. *Elsevier*; 1994. p. 16-25.
152. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, et al. A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular cell*. 1998;1(4):565-74.

153. Evrard-Todeschi N, Gharbi-Benarous J, Bertho G, Coadou G, Megy S, Benarous R, et al. NMR studies for identifying phosphopeptide ligands of the HIV-1 protein Vpu binding to the F-box protein β -TrCP. peptides. 2006;27(1):194-210.
154. Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS. Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. PLoS pathogens. 2010;6(4):e1000869.
155. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. PLoS pathogens. 2009;5(9):e1000574.
156. Skasko M, Wang Y, Tian Y, Tokarev A, Munguia J, Ruiz A, et al. HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions. Journal of Biological Chemistry. 2012;287(1):58-67.
157. McNatt MW, Zang T, Hatzioannou T, Bartlett M, Fofana IB, Johnson WE, et al. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. PLoS pathogens. 2009;5(2):e1000300.
158. Vigan RI, Neil SJ. Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. Journal of virology. 2010;84(24):12958-70.
159. Masuyama N, Kuronita T, Tanaka R, Muto T, Hirota Y, Takigawa A, et al. HM1. 24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with α -adaptin. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(23):15927-41.
160. Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Jepson M, Banting G. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. Journal of Cell Biology. 2009;184(5):721-36.
161. Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, et al. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via β -TrCP and endo-lysosomal trafficking. PLoS pathogens. 2009;5(5):e1000450.
162. Dubé M, Paquay C, Roy BB, Bego MG, Mercier J, Cohen ÉA. 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):1714-29.
163. Lau D, Kwan W, Guatelli J. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. Journal of virology. 2011;85(19):9834-46.
164. Schmidt S, Fritz JV, Bitzegeio J, Fackler OT, Keppler OT. 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):e00036-11.
165. Matusali G, Potesta M, Santoni A, Cerboni C, Doria M. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. Journal of virology. 2012;86(8):4496-504.
166. McCaul N, Quandt M, Bontjer I, van Zadelhoff G, Land A, Crooks ET, et al. Intramolecular quality control: HIV-1 envelope gp160 signal-peptide cleavage as a functional folding checkpoint. Cell Reports. 2021;36(9):109646.
167. Snapp EL, McCaul N, Quandt M, Cabartova Z, Bontjer I, Källgren C, et al. Structure and topology around the cleavage site regulate post-translational cleavage of the HIV-1 gp160 signal peptide. Elife. 2017;6:e26067.

168. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory T. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(18):10373-82.
169. Bernstein HB, Tucker SP, Hunter E, Schutzbach JS, Compans RW. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides. *Journal of virology*. 1994;68(1):463-8.
170. Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(2):648-52.
171. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk H-D, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*. 1992;360(6402):358-61.
172. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, et al. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;53(1):55-67.
173. Freed E, Myers D, Risser R. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *Journal of virology*. 1989;63(11):4670-5.
174. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*. 1986;45(5):637-48.
175. Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, Buckler CE, et al. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(14):5038-42.
176. Sagar M, Wu X, Lee S, Overbaugh J. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *Journal of virology*. 2006;80(19):9586-98.
177. Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, et al. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. 1987;50(6):975-85.
178. Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. 1987;237(4820):1351-5.
179. Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W, Sodroski J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *Journal of virology*. 1990;64(12):5701-7.
180. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998;393(6686):648-59.
181. Korkut A, Hendrickson WA. Structural plasticity and conformational transitions of HIV envelope glycoprotein gp120. *PloS one*. 2012;7(12):e52170.
182. Herschhorn A, Gu C, Moraca F, Ma X, Farrell M, Smith III AB, et al. The β 20– β 21 of gp120 is a regulatory switch for HIV-1 Env conformational transitions. *Nature communications*. 2017;8(1):1049.

183. Finzi A, Xiang S-H, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, et al. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Molecular cell*. 2010;37(5):656-67.
184. Shioda T, Oka S, Ida S, Nokihara K, Toriyoshi H, Mori S, et al. A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. *Journal of Virology*. 1994;68(12):7689-96.
185. Piai A, Fu Q, Cai Y, Ghantous F, Xiao T, Shaik MM, et al. Structural basis of transmembrane coupling of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature communications*. 2020;11(1):2317.
186. Murphy RE, Samal AB, Vlach J, Saad JS. Solution structure and membrane interaction of the cytoplasmic tail of HIV-1 gp41 protein. *Structure*. 2017;25(11):1708-18. e5.
187. Shang L, Yue L, Hunter E. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *Journal of virology*. 2008;82(11):5417-28.
188. Gabuzda DH, Lever A, Terwilliger E, Sodroski J. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of virology*. 1992;66(6):3306-15.
189. LEE S-J, Hu W, FISHER AG, LOONEY DJ, KAO VF, MITSUYA H, et al. Role of the carboxy-terminal portion of the HIV-1 transmembrane protein in viral transmission and cytopathogenicity. *AIDS research and human retroviruses*. 1989;5(4):441-9.
190. Yu X, Yuan X, McLane M, Lee T, Essex M. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *Journal of virology*. 1993;67(1):213-21.
191. Freed EO, Martin MA. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *Journal of virology*. 1996;70(1):341-51.
192. Affranchino JL, González SA. Mutations at the C-terminus of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein affect gp120-gp41 stability on virions. *Virology*. 2006;347(1):217-25.
193. Kalia V, Sarkar S, Gupta P, Montelaro RC. Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *Journal of virology*. 2003;77(6):3634-46.
194. Lee S-F, Ko C-Y, Wang C-T, Chen SS-L. Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(18):15363-75.
195. Murakami T, Freed EO. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and α -helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *Journal of virology*. 2000;74(8):3548-54.
196. Ohno H, Aguilar RC, Fournier M-C, Hennecke S, Cosson P, Bonifacino JS. Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology*. 1997;238(2):305-15.
197. Herschhorn A, Ma X, Gu C, Ventura JD, Castillo-Menendez L, Melillo B, et al. Release of gp120 restraints leads to an entry-competent intermediate state of the HIV-1 envelope glycoproteins. *MBio*. 2016;7(5):e01598-16.

198. Munro JB, Gorman J, Ma X, Zhou Z, Arthos J, Burton DR, et al. Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science*. 2014;346(6210):759-63.
199. Ma X, Lu M, Gorman J, Terry DS, Hong X, Zhou Z, et al. HIV-1 Env trimer opens through an asymmetric intermediate in which individual protomers adopt distinct conformations. *Elife*. 2018;7:e34271.
200. Kwon YD, Finzi A, Wu X, Dogo-Isonagie C, Lee LK, Moore LR, et al. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(15):5663-8.
201. Prévost J, Tolbert WD, Medjahed H, Sherburn RT, Madani N, Zoubchenok D, et al. The HIV-1 Env gp120 Inner Domain Shapes the Phe43 Cavity and the CD4 Binding Site. *mBio*. 2020;11(3).
202. Xiang S-H, Kwong PD, Gupta R, Rizzuto CD, Casper DJ, Wyatt R, et al. Mutagenic Stabilization and/or Disruption of a CD4-Bound State Reveals Distinct Conformations of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*. 2002;76(19):9888-99.
203. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280(5371):1884-8.
204. Chen B. Molecular mechanism of HIV-1 entry. *Trends in microbiology*. 2019;27(10):878-91.
205. Shaik MM, Peng H, Lu J, Rits-Volloch S, Xu C, Liao M, et al. Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature*. 2019;565(7739):318-23.
206. Alsaifi N, Bakouche N, Kazemi M, Richard J, Ding S, Bhattacharyya S, et al. An Asymmetric Opening of HIV-1 Envelope Mediates Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Cell Host Microbe*. 2019;25(4):578-87.e5.
207. Huettner I, Krumm SA, Serna S, Brzezicka K, Monaco S, Walpole S, et al. Cross-reactivity of glycan-reactive HIV-1 broadly neutralizing antibodies with parasite glycans. *Cell Rep*. 2022;38(13):110611.
208. Gray ES, Madiga MC, Hermanus T, Moore PL, Wibmer CK, Tumba NL, et al. The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *Journal of virology*. 2011;85(10):4828-40.
209. Hraber P, Seaman MS, Bailer RT, Mascola JR, Montefiori DC, Korber BT. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. *AIDS (London, England)*. 2014;28(2):163.
210. Simek MD, Rida W, Priddy FH, Pung P, Carrow E, Laufer DS, et al. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *Journal of virology*. 2009;83(14):7337-48.
211. Rusert P, Kouyos RD, Kadelka C, Ebner H, Schanz M, Huber M, et al. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nature medicine*. 2016;22(11):1260-7.
212. Sather DN, Armann J, Ching LK, Mavrantoni A, Sellhorn G, Caldwell Z, et al. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*. 2009;83(2):757-69.

213. Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994;266(5187):1024-7.
214. Wu X, Yang Z-Y, Li Y, Hogerkorp C-M, Schief WR, Seaman MS, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010;329(5993):856-61.
215. Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science*. 2011;333(6049):1633-7.
216. Huang J, Kang B, Ishida E, Zhou T, Griesman T, Sheng Z, et al. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evolved near-pan neutralization breadth. *Immunity*. 2016;45(5):1108-21.
217. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien J-P, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*. 2011;477(7365):466-70.
218. Mouquet H, Scharf L, Euler Z, Liu Y, Eden C, Scheid JF, et al. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(47):E3268-E77.
219. Freund NT, Wang H, Scharf L, Nogueira L, Horwitz JA, Bar-On Y, et al. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. *Science translational medicine*. 2017;9(373):eaal2144.
220. Stanfield RL, De Castro C, Marzaioli AM, Wilson IA, Pantophlet R. Crystal structure of the HIV neutralizing antibody 2G12 in complex with a bacterial oligosaccharide analog of mammalian oligomannose. *Glycobiology*. 2015;25(4):412-9.
221. Richard J, Prévost J, Baxter AE, von Bredow B, Ding S, Medjahed H, et al. Uninfected bystander cells impact the measurement of HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *MBio*. 2018;9(2):e00358-18.
222. Doria-Rose NA, Schramm CA, Gorman J, Moore PL, Bhiman JN, DeKosky BJ, et al. Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. *Nature*. 2014;509(7498):55-62.
223. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui P-Y, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*. 2009;326(5950):285-9.
224. Huang J, Kang BH, Pancera M, Lee JH, Tong T, Feng Y, et al. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. *Nature*. 2014;515(7525):138-42.
225. Falkowska E, Le KM, Ramos A, Doores KJ, Lee JH, Blattner C, et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity*. 2014;40(5):657-68.
226. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *Journal of virology*. 2001;75(22):10892-905.
227. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*. 2012;491(7424):406-12.

228. Pinto D, Fenwick C, Caillat C, Silacci C, Guseva S, Dehez F, et al. Structural basis for broad HIV-1 neutralization by the MPER-specific human broadly neutralizing antibody LN01. *Cell host & microbe*. 2019;26(5):623-37. e8.
229. Zhou T, Zheng A, Baxa U, Chuang G-Y, Georgiev IS, Kong R, et al. A neutralizing antibody recognizing primarily N-linked glycan targets the silent face of the HIV envelope. *Immunity*. 2018;48(3):500-13. e6.
230. Schoofs T, Barnes CO, Suh-Toma N, Golijanin J, Schommers P, Gruell H, et al. Broad and potent neutralizing antibodies recognize the silent face of the HIV envelope. *Immunity*. 2019;50(6):1513-29. e9.
231. Chan K-W, Luo CC, Lu H, Wu X, Kong X-P. A site of vulnerability at V3 crown defined by HIV-1 bNAb M4008_N1. *Nature Communications*. 2021;12(1):6464.
232. Yang Z, Wang H, Liu AZ, Gristick HB, Bjorkman PJ. Asymmetric opening of HIV-1 Env bound to CD4 and a coreceptor-mimicking antibody. *Nature structural & molecular biology*. 2019;26(12):1167-75.
233. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature*. 2008;455(7209):109-13.
234. Ozorowski G, Pallesen J, de Val N, Lyumkis D, Cottrell CA, Torres JL, et al. Open and closed structures reveal allostery and pliability in the HIV-1 envelope spike. *Nature*. 2017;547(7663):360-3.
235. Wang H, Barnes CO, Yang Z, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. Partially open HIV-1 envelope structures exhibit conformational changes relevant for coreceptor binding and fusion. *Cell Host & Microbe*. 2018;24(4):579-92. e4.
236. Haim H, Salas I, McGee K, Eichelberger N, Winter E, Pacheco B, et al. Modeling virus-and antibody-specific factors to predict human immunodeficiency virus neutralization efficiency. *Cell host & microbe*. 2013;14(5):547-58.
237. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature immunology*. 2004;5(3):233-6.
238. Veillette M, Coutu M, Richard J, Batraverse L-A, Dagher O, Bernard N, et al. The HIV-1 gp120 CD4-bound conformation is preferentially targeted by antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies in sera from HIV-1-infected individuals. *Journal of virology*. 2015;89(1):545-51.
239. Kwon YD, LaLonde JM, Yang Y, Elban MA, Sugawara A, Courter JR, et al. Crystal structures of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in complex with NBD analogues that target the CD4-binding site. *PloS one*. 2014;9(1):e85940.
240. Moore JP, Trkola A, Korber B, Boots LJ, Kessler JA, 2nd, McCutchan FE, et al. A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *J Virol*. 1995;69(1):122-30.
241. Tolbert WD, Sherburn RT, Van V, Pazgier M. Structural Basis for Epitopes in the gp120 Cluster A Region that Invokes Potent Effector Cell Activity. *Viruses*. 2019;11(1).
242. Gohain N, Tolbert WD, Acharya P, Yu L, Liu T, Zhao P, et al. Cocystal structures of antibody N60-i3 and antibody JR4 in complex with gp120 define more cluster A epitopes involved in effective antibody-dependent effector function against HIV-1. *Journal of virology*. 2015;89(17):8840-54.

243. Tolbert WD, Gohain N, Veillette M, Chapleau J-P, Orlandi C, Visciano ML, et al. Paring down HIV Env: design and crystal structure of a stabilized inner domain of HIV-1 gp120 displaying a major ADCC target of the A32 region. *Structure*. 2016;24(5):697-709.
244. Gohain N, Tolbert WD, Orlandi C, Richard J, Ding S, Chen X, et al. Molecular basis for epitope recognition by non-neutralizing anti-gp41 antibody F240. *Scientific reports*. 2016;6(1):36685.
245. Cook JD, Khondker A, Lee JE. Conformational plasticity of the HIV-1 gp41 immunodominant region is recognized by multiple non-neutralizing antibodies. *Communications Biology*. 2022;5(1):291.
246. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine*. 2010;28(38):6367-73.
247. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(1):34-47.
248. Forthal DN, Finzi A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infection. *Aids*. 2018;32(17):2439-51.
249. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(4):311-31.
250. Helmy KY, Katschke Jr KJ, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, et al. CRlg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 2006;124(5):915-27.
251. Mellors J, Tipton T, Longuet S, Carroll M. Viral Evasion of the Complement System and Its Importance for Vaccines and Therapeutics. *Front Immunol*. 2020;11:1450.
252. Yu Q, Yu R, Qin X. The good and evil of complement activation in HIV-1 infection. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(5):334-40.
253. Woodham AW, Skeate JG, Sanna AM, Taylor JR, Da Silva DM, Cannon PM, et al. Human immunodeficiency virus immune cell receptors, coreceptors, and cofactors: implications for prevention and treatment. *AIDS patient care and STDs*. 2016;30(7):291-306.
254. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *Journal of virus eradication*. 2015;1(2):59-66.
255. Cohn LB, Chomont N, Deeks SG. The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell Host Microbe*. 2020;27(4):519-30.
256. Hargrave A, Mustafa AS, Hanif A, Tunio JH, Hanif SNM. Current Status of HIV-1 Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(9).
257. Prévost J, Zoubchenok D, Richard J, Veillette M, Pacheco B, Coutu M, et al. Influence of the envelope gp120 Phe 43 cavity on HIV-1 sensitivity to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity responses. *Journal of virology*. 2017;91(7).
258. FDA-Approved HIV Medicines. HIVinfoNIHgov.<https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/fda-approved-hiv-medicines>.
259. Bertoletti N, Chan AH, Schinazi RF, Yin YW, Anderson KS. Structural insights into the recognition of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by HIV-1 reverse transcriptase: First crystal structures with reverse transcriptase and the active triphosphate forms of lamivudine and emtricitabine. *Protein Science*. 2019;28(9):1664-75.

260. Bertoletti N, Chan AH, Schinazi RF, Anderson KS. Post-Catalytic Complexes with Emtricitabine or Stavudine and HIV-1 Reverse Transcriptase Reveal New Mechanistic Insights for Nucleotide Incorporation and Drug Resistance. *Molecules*. 2020;25(20):4868.
261. Kohlstaedt L, Wang J, Friedman J, Rice P, Steitz T. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. 1992;256(5065):1783-90.
262. Ren J, Milton J, Weaver KL, Short SA, Stuart DI, Stammers DK. Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Structure*. 2000;8(10):1089-94.
263. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, ToTH MV, Marshall GR, Clawson L, et al. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science*. 1989;246(4934):1149-52.
264. Tie Y, Boross PI, Wang Y-F, Gaddis L, Hussain AK, Leshchenko S, et al. High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multi-drug-resistant clinical strains. *Journal of molecular biology*. 2004;338(2):341-52.
265. Flexner C. HIV-protease inhibitors. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(18):1281-93.
266. Xiao T, Cai Y, Chen B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. *Viruses*. 2021;13(5).
267. Scarsi KK, Havens JP, Podany AT, Avedissian SN, Fletcher CV. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Comparative Review of Efficacy and Safety. *Drugs*. 2020;80(16):1649-76.
268. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(4):a007161.
269. Lobritz MA, Ratcliff AN, Arts EJ. HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses*. 2010;2(5):1069-105.
270. Cooper DA, Heera J, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, et al. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(6):803-13.
271. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(14):1429-41.
272. Wild C, Greenwell T, Shugars D, Rimsky-Clarke L, Matthews T. The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS research and human retroviruses*. 1995;11(3):323-5.
273. Madani N, Princiotta AM, Mach L, Ding S, Prevost J, Richard J, et al. A CD4-mimetic compound enhances vaccine efficacy against stringent immunodeficiency virus challenge. *Nature Communications*. 2018;9(1):2363.
274. Princiotta AM, Vrbanac VD, Melillo B, Park J, Tager AM, Smith III AB, et al. A small-molecule CD4-Mimetic compound protects bone marrow–liver–thymus humanized mice from HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(3):471-5.
275. Rajashekar JK, Richard J, Bloor J, Prévost J, Anand SP, Beaudoin-Bussièrès G, et al. Modulating HIV-1 envelope glycoprotein conformation to decrease the HIV-1 reservoir. *Cell host & microbe*. 2021;29(6):904-16. e6.
276. Dereuddre-Bosquet N, Morellato-Castillo L, Brouwers J, Augustijns P, Bouchemal K, Ponchel G, et al. MiniCD4 microbicide prevents HIV infection of human mucosal explants and

vaginal transmission of SHIV162P3 in cynomolgus macaques. *PLoS pathogens*. 2012;8(12):e1003071.

277. Ariën KK, Baleux F, Desjardins D, Porrot F, Coïc Y-M, Michiels J, et al. CD4-mimetic sulfopeptide conjugates display sub-nanomolar anti-HIV-1 activity and protect macaques against a SHIV162P3 vaginal challenge. *Scientific Reports*. 2016;6(1):34829.

278. Madani N, Princiotta AM, Schön A, LaLonde J, Feng Y, Freire E, et al. CD4-mimetic small molecules sensitize human immunodeficiency virus to vaccine-elicited antibodies. *Journal of virology*. 2014;88(12):6542-55.

279. Richard J, Veillette M, Brassard N, Iyer SS, Roger M, Martin L, et al. CD4 mimetics sensitize HIV-1-infected cells to ADCC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(20):E2687-E94.

280. Vézina D, Gong SY, Tolbert WD, Ding S, Nguyen D, Richard J, et al. Stabilizing the HIV-1 envelope glycoprotein State 2A conformation. *J Virol*. 2021;95(5).

281. Cahn P, Fink V, Patterson P. Fostemsavir: a new CD4 attachment inhibitor. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2018;13(4):341-5.

282. Meanwell NA, Krystal MR, Nowicka-Sans B, Langley DR, Conlon DA, Eastgate MD, et al. Inhibitors of HIV-1 attachment: the discovery and development of temsavir and its prodrug fostemsavir. *ACS Publications*; 2018.

283. Muccini C, Canetti D, Castagna A, Spagnuolo V. Efficacy and safety profile of fostemsavir for the treatment of people with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1): current evidence and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 2022:297-304.

284. FDA. FDA Approves New HIV Treatment for Patients With Limited Treatment Options. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-hiv-treatment-patients-limited-treatment-options>. 2020.

285. Pancera M, Lai Y-T, Bylund T, Druz A, Narpala S, O'Dell S, et al. Crystal structures of trimeric HIV envelope with entry inhibitors BMS-378806 and BMS-626529. *Nature chemical biology*. 2017;13(10):1115.

286. Herschhorn A, Gu C, Espy N, Richard J, Finzi A, Sodroski JG. A broad HIV-1 inhibitor blocks envelope glycoprotein transitions critical for entry. *Nature chemical biology*. 2014;10(10):845-52.

287. Zou S, Zhang S, Gaffney A, Ding H, Lu M, Grover JR, et al. Long-acting BMS-378806 analogues stabilize the state-1 conformation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of Virology*. 2020;94(10):e00148-20.

288. Si Z, Madani N, Cox JM, Chruma JJ, Klein JC, Schön A, et al. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(14):5036-41.

289. Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current opinion in Immunology*. 1999;11(4):466-74.

290. Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, et al. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*. 2002;420(6916):678-82.

291. Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B, Barin F. Evolutionary Dynamics of the Glycan Shield of the Human Immunodeficiency Virus Envelope during Natural Infection and Implications for Exposure of the 2G12 Epitope. *Journal of virology*. 2004;78(22):12625-37.

292. Fenouillet E, Gluckman JC, Jones IM. Functions of HIV envelope glycans. *Trends in biochemical sciences*. 1994;19(2):65-70.
293. Grundner C, Pancera M, Kang J-M, Koch M, Sodroski J, Wyatt R. Factors limiting the immunogenicity of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins. *Virology*. 2004;330(1):233-48.
294. LaBranche CC, McGuire AT, Gray MD, Behrens S, Kwong PDK, Chen X, et al. HIV-1 envelope glycan modifications that permit neutralization by germline-reverted VRC01-class broadly neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*. 2018;14(11):e1007431.
295. Doores KJ. The HIV glycan shield as a target for broadly neutralizing antibodies. *Febs j*. 2015;282(24):4679-91.
296. Zhang S, Wang K, Wang WL, Nguyen HT, Chen S, Lu M, et al. Asymmetric structures and conformational plasticity of the uncleaved full-length human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein trimer. *J Virol*. 2021:Jvi0052921.
297. Boutin M, Vézina D, Ding S, Prévost J, Laumaea A, Marchitto L, et al. Temsavir Treatment of HIV-1-Infected Cells Decreases Envelope Glycoprotein Recognition by Broadly Neutralizing Antibodies. *Mbio*. 2022:e00577-22.
298. Rathore U, Saha P, Kesavardhana S, Kumar AA, Datta R, Devanarayanan S, et al. Glycosylation of the core of the HIV-1 envelope subunit protein gp120 is not required for native trimer formation or viral infectivity. *J Biol Chem*. 2017;292(24):10197-219.
299. Pancera M, Wyatt R. Selective recognition of oligomeric HIV-1 primary isolate envelope glycoproteins by potently neutralizing ligands requires efficient precursor cleavage. *Virology*. 2005;332(1):145-56.
300. Das S, Kumar R, Ahmed S, Parray HA, Samal S. Efficiently cleaved HIV-1 envelopes: can they be important for vaccine immunogen development? *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2020;8:2515135520957763.
301. Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, Kepler TB. B-cell–lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nature biotechnology*. 2012;30(5):423-33.
302. Alam SM, Cronin K, Parks R, Anasti K, Ding H, Go EP, et al. Antigenicity and immunogenicity of HIV-1 envelope trimers complexed to a small-molecule viral entry inhibitor. *Journal of Virology*. 2020;94(21):e00958-20.
303. Ahr B, Robert-Hebmann V, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology*. 2004;1:1-12.
304. Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, Fauci AS, Orenstein JM. gp120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymph nodes of HIV-1-infected individuals: an immunoelectron microscopic study. *Aids*. 1997;11(1):27-32.
305. Richard J, Prévost J, Bourassa C, Brassard N, Boutin M, Benlarbi M, et al. Temsavir blocks the immunomodulatory activities of HIV-1 soluble gp120. *Cell Chemical Biology*. 2023.
306. Chirmule N, Pahwa S. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiological reviews*. 1996;60(2):386-406.
307. Levast B, Barblu L, Coutu M, Prevost J, Brassard N, Peres A, et al. HIV-1 gp120 envelope glycoprotein determinants for cytokine burst in human monocytes. *PLoS one*. 2017;12(3):e0174550.
308. Rychert J, Strick D, Bazner S, Robinson J, Rosenberg E. Detection of HIV gp120 in plasma during early HIV infection is associated with increased proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *AIDS research and human retroviruses*. 2010;26(10):1139-45.

309. Santosuosso M, Righi E, Lindstrom V, Leblanc PR, Poznansky MC. HIV-1 envelope protein gp120 is present at high concentrations in secondary lymphoid organs of individuals with chronic HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(7):1050-3.
310. Oh S-K, Cruikshank WW, Raina J, Blanchard GC, Adler WH, Walker J, et al. Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 1992;5(3):251-6.
311. Kozal M, Aberg J, Pialoux G, Cahn P, Thompson M, Molina J-M, et al. Fostemsavir in adults with multidrug-resistant HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(13):1232-43.
312. de Coul ELO, Prins M, Cornelissen M, van der Schoot A, Boufassa F, Brettler RP, et al. Using phylogenetic analysis to trace HIV-1 migration among western European injecting drug users seroconverting from 1984 to 1997. *AIDS*. 2001;15(2):257-66.
313. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(2):143-55.
314. Zhou N, Ray N, Healy M, Langley D, Hwang C, Lataillade M, et al. Geno-and phenotypic correlates of virologic response to the attachment inhibitor BMS-626529 in an 8-day monotherapy study of its prodrug BMS-663068. *Journal of the International AIDS Society*. 2012;15:1-.
315. Schader SM, Colby-Germinario SP, Quashie PK, Oliveira M, Ibanescu R-I, Moisi D, et al. HIV gp120 H375 is unique to HIV-1 subtype CRF01_AE and confers strong resistance to the entry inhibitor BMS-599793, a candidate microbicide drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(8):4257-67.
316. Prévost J, Chen Y, Zhou F, Tolbert WD, Gasser R, Medjahed H, et al. Structure-function Analyses Reveal Key Molecular Determinants of HIV-1 CRF01_AE Resistance to the Entry Inhibitor Temsavir. *bioRxiv*. 2023.
317. Schön A, Madani N, Klein JC, Hubicki A, Ng D, Yang X, et al. Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry*. 2006;45(36):10973-80.
318. Melillo B, Liang S, Park J, Schön A, Courter JR, LaLonde JM, et al. Small-molecule CD4-mimics: structure-based optimization of HIV-1 entry inhibition. *ACS medicinal chemistry letters*. 2016;7(3):330-4.
319. Richard J, Pacheco B, Gohain N, Veillette M, Ding S, Alshafi N, et al. Co-receptor binding site antibodies enable CD4-mimetics to expose conserved anti-cluster A ADCC epitopes on HIV-1 envelope glycoproteins. *EBioMedicine*. 2016;12:208-18.

CHAPITRE VI – ANNEXE

Liste des articles additionnels auxquels la candidate a contribué au cours de ses études de maîtrise

VIH-1

11 - Richard J, Prévost J, Bourassa C, Brassard N, Boutin M, Benlarbi M, Goyette G, Medjahed H, Gendron-Lepage G, Gaudette F, Chen HC, Tolbert WD, Smith AB 3rd, Pazgier M, Dubé M, Clark A, Mothes W, Kaufmann DE, Finzi A. Temsavir blocks the immunomodulatory activities of HIV-1 soluble gp120. *Cell Chem Biol.* 2023 Mar 17:S2451-9456(23)00062-4. doi: 10.1016/j.chembiol.2023.03.003. Epub ahead of print. PMID: 36958337.

SRAS-CoV-2

Dû à la pandémie actuelle, en plus de mon projet VIH-1, j'ai contribué à de nombreuses études sur le SRAS-CoV-2.

10 - Sannier G, Nicolas A, Dubé M, Marchitto L, Nayrac M, Tastet O, Chatterjee D, Tauzin A, Lima-Barbosa R, Laporte M, Cloutier R, Flores AS, **Boutin M**, Gong SY, Benlarbi M, Ding S, Bourassa C, Gendron-Lepage G, Medjahed H, Goyette G, Brassard N, Ortega-Delgado GG, Niessl J, Gokool L, Morrisseau C, Arlotto P, Rios N, Tremblay C, Martel-Laferrrière V, Prat A, Bélair J, Beaubien-Souigny W, Goupil R, Nadeau-Fredette AC, Lamarche C, Finzi A, Suri RS, Kaufmann DE. A third SARS-CoV-2 mRNA vaccine dose in people receiving hemodialysis overcomes B cell defects but elicits a skewed CD4+ T cell profile. *Cell Rep Med.* 2023 Feb 7:100955. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.100955. PMCID: PMC9902290.

9 - Tauzin A, Gong SY, Chatterjee D, Ding S, Painter MM, Goel RR, Beaudoin-Bussièrès G, Marchitto L, **Boutin M**, Laumaea A, Okeny J, Gendron-Lepage G, Bourassa C, Medjahed H, Goyette G, Williams JC, Bo Y, Gokool L, Morrisseau C, Arlotto P, Bazin R, Fafard J, Tremblay C, Kaufmann DE, De Serres G, Richard J, Côté M, Duerr R, Martel-Laferrrière V, Greenplate AR,

Wherry EJ, Finzi A. A boost with SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine elicits strong humoral responses independently of the interval between the first two doses. *Cell Rep.* 2022 Oct 25;41(4):111554. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111554. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36244343; PMCID: PMC9533674.

8 - Chatterjee D, Tauzin A, Marchitto L, Gong SY, **Boutin M**, Bourassa C, Beaudoin- Bussi eres G, Bo Y, Ding S, Laumaea A, Vézina D, Perreault J, Gokool L, Morrissette C, Arlotto P, Fournier  , Guilbault A, Delisle B, Levade I, Goyette G, Gendron-Lepage G, Medjahed H, De Serres G, Tremblay C, Martel-Laferr iere V, Kaufmann DE, Bazin R, Prévost J, Moreira S, Richard J, Côté M, Finzi A. SARS-CoV-2 Omicron Spike recognition by plasma from individuals receiving BNT162b2 mRNA vaccination with a 16-week interval between doses. *Cell Rep.* 2022 Mar 1;38(9):110429. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110429. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35216664; PMCID: PMC8823958.

7 - Tanguay M*, **Boutin M***, Laumaea A*, Salaciak M, Mendoza A, Cassis C, Ajjamada L, Assouline S, Patenaude F, Clark MW, Finzi A, Johnson NA. B-cell cytopenia and time to last B-cell-depleting therapy predict response to SARS-COV-2 vaccines in patients with lymphoproliferative disorders. *Vaccine.* 2022 Feb 23;40(9):1203-1207. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.01.040. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35105492; PMCID: PMC8784616.
*Contribution  gale.

6 - Tauzin A, Gong SY, Beaudoin-Bussi eres G, Vézina D, Gasser R, Nault L, Marchitto L, Benlarbi M, Chatterjee D, Nayrac M, Laumaea A, Prévost J, **Boutin M**, Sannier G, Nicolas A, Bourassa C, Gendron-Lepage G, Medjahed H, Goyette G, Bo Y, Perreault J, Gokool L, Morrissette C, Arlotto P, Bazin R, Dubé M, De Serres G, Brousseau N, Richard J, Rovito R, Côté M, Tremblay C, Marchetti GC, Duerr R, Martel-Laferr iere V, Kaufmann DE, Finzi A. Strong humoral immune responses against SARS-CoV-2 Spike after BNT162b2 mRNA vaccination with a 16-week interval between doses. *Cell Host Microbe.* 2022 Jan 12;30(1):97-109.e5. doi: 10.1016/j.chom.2021.12.004. Epub 2021 Dec 3. PMID: 34953513; PMCID: PMC8639412.

5 - Bégin P, Callum J, Cook R, Jamula E, Liu Y, Finzi A; **CONCOR-1 Study Group**, Arnold DM. Reply to: Concerns about estimating relative risk of death associated with convalescent plasma for COVID-19. *Nat Med.* 2022 Jan;28(1):53-58. doi: 10.1038/s41591-021-01639-5. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35013612.

4 - Brunet-Ratnasingham E, Anand SP, Gantner P, Dyachenko A, Moquin-Beaudry G, Brassard N, Beaudoin-Bussièrès G, Pagliuzza A, Gasser R, Benlarbi M, Point F, Prévost J, Laumaea A, Niessl J, Nayrac M, Sannier G, Orban C, Messier-Peet M, Butler-Laporte G, Morrison DR, Zhou S, Nakanishi T, **Boutin M**, Descôteaux-Dinelle J, Gendron-Lepage G, Goyette G, Bourassa C, Medjahed H, Laurent L, Rébillard RM, Richard J, Dubé M, Fromentin R, Arbour N, Prat A, Larochelle C, Durand M, Richards JB, Chassé M, Tétreault M, Chomont N, Finzi A, Kaufmann DE. Integrated immunovirological profiling validates plasma SARS-CoV-2 RNA as an early predictor of COVID-19 mortality. *Sci Adv.* 2021 Nov 26;7(48):eabj5629. doi: 10.1126/sciadv.abj5629. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34826237; PMCID: PMC8626074.

3 - Bégin P, Callum J, Jamula E, Cook R, Heddle NM, Tinmouth A, Zeller MP, Beaudoin-Bussièrès G, Amorim L, Bazin R, Loftsgard KC, Carl R, Chassé M, Cushing MM, Daneman N, Devine DV, Dumaresq J, Fergusson DA, Gabe C, Glesby MJ, Li N, Liu Y, McGeer A, Robitaille N, Sachais BS, Scales DC, Schwartz L, Shehata N, Turgeon AF, Wood H, Zarychanski R, Finzi A; **CONCOR-1 Study Group**, Arnold DM. Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: an open-label, randomized controlled trial. *Nat Med.* 2021 Nov;27(11):2012-2024. doi: 10.1038/s41591-021-01488-2. Epub 2021 Sep 9. Erratum in: *Nat Med.* 2022 Jan;28(1):212. PMID: 34504336; PMCID: PMC8604729.

2 - **Writing Committee for the REMAP-CAP Investigators**; Estcourt LJ, Turgeon AF, McQuilten ZK, McVerry BJ, Al-Beidh F, Annane D, Arabi YM, Arnold DM, Beane A, Bégin P, van Bentum-Puijk W, Berry LR, Bhimani Z, Birchall JE, Bonten MJM, Bradbury CA, Brunkhorst FM, Buxton M, Callum JL, Chassé M, Cheng AC, Cove ME, Daly J, Derde L, Detry MA, De Jong M, Evans A, Fergusson DA, Fish M, Fitzgerald M, Foley C, Goossens H, Gordon AC, Gosbell IB, Green C, Haniffa R, Harvala H, Higgins AM, Hills TE, Hoad VC, Horvat C, Huang DT, Hudson CL, Ichihara N, Laing E, Lamikanra AA, Lamontagne F, Lawler PR, Linstrum K, Litton E, Lorenzi

E, MacLennan S, Marshall J, McAuley DF, McDyer JF, McGlothlin A, McGuinness S, Mifflin G, Montgomery S, Mouncey PR, Murthy S, Nichol A, Parke R, Parker JC, Priddee N, Purcell DFJ, Reyes LF, Richardson P, Robitaille N, Rowan KM, Rynne J, Saito H, Santos M, Saunders CT, Serpa Neto A, Seymour CW, Silversides JA, Tinmouth AA, Triulzi DJ, Turner AM, van de Veerdonk F, Walsh TS, Wood EM, Berry S, Lewis RJ, Menon DK, McArthur C, Zarychanski R, Angus DC, Webb SA, Roberts DJ, Shankar-Hari M. Effect of Convalescent Plasma on Organ Support-Free Days in Critically Ill Patients With COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021 Nov 2;326(17):1690-1702. doi: 10.1001/jama.2021.18178. PMID: 34606578; PMCID: PMC8491132.

1 - Rébillard RM, Charabati M, Grasmuck C, Filali-Mouhim A, Tastet O, Brassard N, Daigneault A, Bourbonnière L, Anand SP, Balthazard R, Beaudoin-Bussièrès G, Gasser R, Benlarbi M, Moratalla AC, Solorio YC, **Boutin M**, Farzam-Kia N, Descôteaux-Dinelle J, Fournier AP, Gowing E, Laumaea A, Jamann H, Lahav B, Goyette G, Lemaître F, Mamane VH, Prévost J, Richard J, Thai K, Cailhier JF, Chomont N, Finzi A, Chassé M, Durand M, Arbour N, Kaufmann DE, Prat A, Laroche C. Identification of SARS-CoV-2-specific immune alterations in acutely ill patients. *J Clin Invest*. 2021 Apr 15;131(8):e145853. doi: 10.1172/JCI145853. PMID: 33635833; PMCID: PMC8262478.