

**Université de Montréal**

**Étude du rôle des micro-ARN  
cellulaires au cours de  
l'infection par le VIH-1**

Par  
**Nicolas BELLINI**

**Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal**

Thèse présentée en vue de l'obtention du  
grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en  
Microbiologie et Immunologie

© Nicolas Bellini, Décembre 2023

Cette thèse intitulée :

**Étude du rôle des micro-ARN  
cellulaires au cours de l'infection  
par le VIH-1**

Présentée par  
**Nicolas Bellini**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

---

**Dr Guy LEMAY** - Président-rapporteur  
**Dr Éric A. COHEN** - Directeur de recherche  
**Dr Martin SAUVAGEAU** - Membre du jury  
**Dre Caroline GILBERT** - Examineur externe  
**Dr Roger LIPPÉ** - Représentant du doyen

---

## Résumé

---

Avec plus de 39 millions de personnes infectées à travers le monde, le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1) est un problème majeur de santé publique. Bien que la thérapie antirétrovirale contrôle la réplication virale, améliore la santé et prolongent la vie des personnes vivant avec le VIH-1, elle ne permet pas d'éradiquer complètement le virus. En effet, celui-ci établit des phases de latence en intégrant son génome dans l'ADN cellulaire des cellules cibles, entraînant la formation de ce que l'on appelle le réservoir latent du virus. Ce réservoir se situe principalement dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, bien qu'on le retrouve également dans les cellules myéloïdes, et il constitue le principal obstacle à l'éradication du virus. Il est donc impératif de mieux comprendre les facteurs de l'hôte qui régissent non seulement la susceptibilité de ces cellules à l'infection et qui contribuent également à la persistance du VIH-1. Nous postulons que les micro-ARN (miARN), des petits ARN produits par la cellule et qui régulent l'expression génique, jouent un rôle au cours de l'infection par le VIH-1.

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur le rôle des miARN dans l'entrée virale. À l'aide d'un séquençage de nouvelle génération des miARN dans les macrophages, nous avons déterminé que le miARN-103, ainsi que son paralogue le miARN-107, ciblent l'ARNm du corécepteur CCR5 utilisé par le VIH-1. Nous montrons que l'induction de l'expression des miARN-103/107 est régulée par le facteur de transcription p53 et rend les macrophages réfractaires à l'entrée du VIH-1. Nous observons que le niveau d'expression des miARN-103/107 est enrichi dans les macrophages résidant dans les tissus intestinaux de donneurs sains et les macrophages alvéolaires des personnes sous thérapie antirétrovirale, ce qui contribue vraisemblablement à leur résistance à l'infection par le VIH-1.

Étant donné que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> constituent le principal réservoir du VIH-1, nous avons ensuite étendu l'étude du miARN-103 dans ces cellules. Récemment, il a été montré que la latence virale serait la conséquence de l'infection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans une fenêtre très étroite suite à leur activation. Ces cellules qui

transitionnent vers un phénotype mémoire posséderaient des propriétés uniques, comme une augmentation temporaire de l'expression du corécepteur viral CCR5, ainsi qu'une capacité réduite de transcrire l'ADN proviral intégré. Nos résultats montrent que le miARN-103, qui cible également le CCR5 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, participe à la modulation du CCR5 selon l'état d'activation de la cellule et contribue indirectement à l'établissement de la latence virale dans ces cellules. De plus, nos résultats montrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus d'individus qui contrôlent l'infection par le VIH-1 expriment des niveaux réduits d'ARNm de CCR5 (lorsque comparés à ceux d'individus non-contrôleurs). Cet état étant associé à une tendance à la hausse du miARN-103, suggère que le miARN-103 pourrait participer au contrôle de l'expression de CCR5 *in vivo*.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un séquençage de nouvelle génération de l'ARN des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés. À la suite de cette analyse, nous avons déterminé que le miARN-26a participe à la régulation de CD59, une protéine cellulaire incorporée dans les virions jouant un rôle clé dans l'activation du complément en inhibant la formation du complexe d'attaque membranaire. Au cours de l'infection, ce miARN est diminué dans les cellules productivement infectées. Cette diminution est associée à une augmentation de CD59 dans les cellules infectées et à la surface des virions produits par ces cellules, favorisant leur échappement à la lyse médiée par le complément. Nous montrons que l'introduction d'un analogue du miARN-26a dans les cellules rend les virions produits par ces dites cellules plus sensibles à la lyse médiée par le complément.

En conclusion, les observations et analyses réalisées dans le cadre de cette thèse nous aident à mieux comprendre le rôle des miARN dans l'infection et la persistance du VIH-1. Ces résultats aident à notre compréhension des facteurs de l'hôte qui régissent la susceptibilité de ces cellules à l'infection ainsi que la persistance virale, et pourraient aider au développement de stratégies thérapeutiques.

**Mots-clés** : VIH-1, persistance, latence, miARN, CCR5, CD59, analyse transcriptomique

## Abstract

---

With more than 39 million people infected in the world, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a major public health problem. Although antiretroviral therapy controls viral replication, improves the health, and prolongs the lives of people living with HIV-1, it does not completely eradicate the virus. Indeed, the virus has established latency phases by integrating its genome into the cellular DNA of target cells, leading to the formation of what is called the latent reservoir of the virus. This reservoir is located mainly in CD4<sup>+</sup> T cells, although it is also found in myeloid cells, and it has become the main obstacle to eradication of the virus. It is therefore imperative to better understand the host factors that not only govern the susceptibility of these cells to infection but also contribute to HIV-1 persistence. We postulate that microRNAs (miRNAs), which are small RNAs produced by the cell involved in regulation of gene expression, have a role during HIV-1 infection.

First, we focused on the role of miRNAs in viral entry. Using next generation miRNA sequencing in macrophages, we determined that miRNA-103, as well as its paralogue miRNA-107, target the mRNA of CCR5, the HIV-1 coreceptor. We show that the induction of miRNA-103/107 expression is regulated by the transcription factor p53 and makes macrophages more resistant to HIV-1 entry. We observe that the expression level of miRNAs-103/107 is enriched in resident macrophages in intestinal tissues of healthy donors and alveolar macrophages of people on antiretroviral therapy, which likely contributes to their resistance to infection by HIV-1.

Given that CD4<sup>+</sup> T cells constitute the main reservoir of HIV-1, we then extended the study of miRNA-103 in these cells. Recently, it has been shown that viral latency is the consequence of the infection of CD4<sup>+</sup> T cells within a very narrow window following their activation. These transitioning to memory T cells are thought to possess unique properties, such as a temporary increase in the expression of the viral coreceptor CCR5, as well as a reduced capacity to transcribe integrated proviral DNA. Our results show that miRNA-103, which also targets CCR5 in CD4<sup>+</sup> T cells, participates in the modulation of CCR5 depending on the activation state of the cell

and indirectly contributes to the establishment of viral latency in these cells. Furthermore, our results show that CD4<sup>+</sup> T cells from individuals who control HIV-1 infection express reduced levels of CCR5 mRNA (when compared to those from non-controller individuals), this being associated to a upward trend in miRNA-103 expression, suggesting that miRNA-103 may participate in the control of CCR5 expression *in vivo*.

Secondly, we carried out next generation RNA sequencing of HIV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells. Their resulting analyses determined that miRNA-26a participates in the regulation of CD59, a cellular protein that is incorporated into virions and has a key role in complement activation by inhibiting the formation of the membrane attack complex. During infection, this miRNA is decreased in productively infected cells. This decrease is associated with an increase in CD59 in infected cells, as well as on the surface of virions produced by these cells, favoring their escape from complement-mediated lysis. We show that introduction of miRNA-26a mimics in cells makes the virions produced by these cells more sensitive to complement-mediated lysis.

In conclusion, the observations and analyses developed in this thesis will help us better understand the role of miRNAs in HIV-1 infection and persistence. These results help in the understanding of host factors that govern the susceptibility of these cells to infection as well as viral persistence and could help in the development of therapeutic strategies.

**Keywords:** HIV-1, latency, persistence, miRNA, CCR5, CD59, transcriptomic analysis

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>10</b>
<b>Sigles et abréviations.....</b>	<b>12</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>16</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Généralités sur le VIH-1 .....</b>	<b>19</b>
1.1. Problématique .....	19
1.2. Classification du VIH-1 .....	19
1.3. Structure du VIH-1 .....	20
1.4. Génome du VIH-1 .....	22
1.5. Structures des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 .....	24
1.6. L'entrée virale.....	26
1.7. Tropisme cellulaire .....	29
1.8. Cycle de réplication du VIH-1 .....	31
1.9. La thérapie antirétrovirale.....	34
1.10. Pathogénèse du VIH-1 .....	36
<b>2. Réponse immunitaire à l'infection .....</b>	<b>39</b>
2.1. Réponse intrinsèque .....	39
2.2. Réponse innée .....	41
2.3. Réponse cellulaire.....	44
2.4. Réponse humorale .....	45
<b>3. Mécanismes d'évasion à la réponse immunitaire .....</b>	<b>48</b>
3.1. Les protéines accessoires.....	48
3.2. La diversité génétique .....	49
3.3. Incorporation de protéines de l'hôte dans l'enveloppe virale .....	50
3.4. L'établissement de la latence.....	53
<b>4. Latence virale et rôle des miARN dans l'infection par le VIH-1 (revue de littérature).....</b>	<b>55</b>
4.1. Introduction .....	56
4.2. Les réservoirs et la latence virale .....	57
4.3. Les miARN et leur rôle dans l'infection par le VIH-1 .....	62
4.4. Rôle des miARN dans l'établissement de la latence (cellules T CD4 <sup>+</sup> ) .....	65
4.5. Rôle des miARN dans l'établissement de la latence (macrophages/monocytes).....	66
4.6. L'entrée, une étape du cycle viral modulée par les miARN .....	67
4.7. Les miARN pour maintenir ou contrer la latence .....	70
4.8. Conclusion .....	72
<b>Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de la thèse .....</b>	<b>74</b>
<b>Hypothèses et objectifs de la thèse .....</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 3 : Manuscrit #1 .....</b>	<b>76</b>
<b>Découverte d'une nouvelle cible du miARN-103.....</b>	<b>77</b>
<b>Article N°1 .....</b>	<b>79</b>
Introduction .....	81

Results .....	83
Discussion .....	94
Materials and methods.....	98
References .....	104
<b>Chapitre 4 : Manuscrit #2 .....</b>	<b>117</b>
<b>Rôle du miARN-103 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>118</b>
<b>Article N°2 .....</b>	<b>120</b>
Introduction .....	121
Results .....	124
Discussion .....	136
STAR★Methods .....	140
References .....	147
<b>Chapitre 5 : Manuscrit #3 .....</b>	<b>158</b>
<b>Rôle du miARN-26a dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>159</b>
<b>Article N°3 .....</b>	<b>161</b>
Introduction .....	163
Results .....	165
Discussion .....	179
Methods .....	182
References .....	190
<b>Chapitre 6 : Discussion &amp; Conclusion .....</b>	<b>208</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>209</b>
1. Importance et régulation du corécepteur CCR5 .....	209
2. Avantages et limites de notre analyse par séquençage de l'ARN.....	211
3. Autres ARN régulateurs .....	213
4. Régulation du miARN-26a.....	214
5. Les miARN comme biomarqueurs de l'infection.....	216
<b>Conclusion générale et contributions de la thèse .....</b>	<b>218</b>
<b>Références.....</b>	<b>220</b>



## Liste des tableaux

### **Chapitre 1 : Introduction**

<i>Tableau 1 - Les différentes protéines encodées par les gènes du VIH-1 .....</i>	<i>23</i>
<i>Tableau 2 - Récapitulatif des anticorps largement neutralisants existants ainsi que la région de leurs épitopes dans les glycoprotéines virales .....</i>	<i>47</i>

### **Chapitre 3 : Manuscrit #1**

<i>Table S1 - List of 30 highest expressed miRNAs in MDMs .....</i>	<i>112</i>
<i>Table S2 - Oligonucleotides used in this study.....</i>	<i>113</i>

### **Chapitre 4 : Manuscrit #2**

<i>Table 1 - Clinical data of HIV-1 infected individuals included in the study.....</i>	<i>134</i>
<i>Table S1 - Oligonucleotides, related to STAR methods. ....</i>	<i>157</i>

### **Chapitre 5 : Manuscrit #3**

<i>Table S1 - Sequences of miRNAs mimics .....</i>	<i>200</i>
<i>Table S2 - Oligonucleotides used for qPCR in this study.....</i>	<i>200</i>
<i>Table S3 - Oligonucleotides used to generate pMIR-REPORT-CD59-Luc .....</i>	<i>201</i>

# Liste des figures

## Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 - Structure du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) -----	21
Figure 2 - Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1 -----	23
Figure 3 - Représentation schématique de la structure de la gp120 du VIH-1 -----	24
Figure 4 - Représentation schématique de la structure de la gp41 du VIH-1 -----	26
Figure 5 - Représentation schématique d'un récepteur des chimiokines -----	28
Figure 6 - Représentation schématique de l'attachement au CD4 et au corécepteur-----	29
Figure 7 - Représentation schématique du processus de fusion virale du VIH-1 -----	29
Figure 8 - Représentation graphique des différents tropismes du VIH-1 -----	31
Figure 9 - Cycle de réplication du VIH-1 -----	34
Figure 10 - Marqueurs de la progression de l'infection du VIH-1 -----	38
Figure 11 - Mode d'action des facteurs de restriction BST-2, SAMHD1, APOBEC3G et IFITMs -----	41
Figure 12 - Mode d'action du complément -----	43
Figure 13 - Mode d'action des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> au cours d'une infection par le VIH-1 -----	45
Figure 14 - Les différents mécanismes de diversité du VIH-1 -----	50
Figure 15 - Formation du MAC et mode d'action de CD59 -----	52
Figure 16 - Le réservoir latent du VIH-1 est présent dans de nombreux tissus et types cellulaires ---	59
Figure 17 - Établissement d'une infection latente dans les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> -----	60
Figure 18 - Biogenèse des miARN -----	63
Figure 19 - Les miARN cellulaires peuvent moduler l'infektivité et la réplication du VIH-1 -----	69
Figure 20 - Stratégies potentielles basées sur l'utilisation des miARN pour contrôler ou éradiquer les réservoirs du VIH-1 -----	72

## Chapitre 3 : Manuscrit #1

Figure 1 - miRNA-103 and miRNA-107 are enhanced and CCR5 is downregulated in bystander MDMs -----	84
Figure 2 - Effect of transfected miRNA-103 or miRNA-107 mimics, or antagomirs, on CCR5 expression in MDMs -----	85
Figure 3 - Effect of transfected miRNA-103 mimics or antagomirs on HIV-1 infection in MDMs-----	87
Figure 4 - Macrophage activation by IL-1 $\beta$ reduces CCR5 expression and enhances miRNA-103 ---	89
Figure 5 - IL-1 $\beta$ and/or TNF- $\alpha$ secreted into HIV-1-infected MDM supernatants inhibits CCR5/CD4-dependent HIV-1 infection of macrophages -----	90
Figure 6 - IL-1 $\beta$ -triggered p53 activity modulates CCR5 mRNA and miRNA-103 levels-----	91
Figure 7 - IL-1 $\beta$ triggers p53-mediated inhibition of CCR5-dependent HIV-1 entry in macrophages through miRNA-103 -----	92
Figure 8 - HIV-resistant tissue-resident macrophages express high levels of miRNAs-103/107 -----	93
Figure 9 - Model summarizing how miRNA-103 and miRNA-107 target CCR5 mRNA, leading to less CCR5-mediated HIV-1 entry in macrophages -----	98
Figure S1 - miRNA-103 antagomirs counteract IL-1 $\beta$ -driven CCR5 reduction, related to Figure 4 --	115
Figure S2 - IL-1 $\beta$ secreted into HIV-1-infected MDM supernatants enhances miRNA-103 in MDMs, related to Figure 5 -----	116

## Chapitre 4 : Manuscrit #2

Figure 1 - MiRNA-103 downregulates CCR5 mRNA levels in CCR5-expressing CD4 <sup>+</sup> T cells -----	125
Figure 2 - MiRNA-103 modulates CCR5 expression in primary activated-to-memory transitioning CD4 <sup>+</sup> T cells -----	126
Figure 3 - Stabilization of p53 leads to a downregulation of CCR5 in activated CD4 <sup>+</sup> T cells through miRNA-103 upregulation -----	128

Figure 4 - Activated-to-memory transitioning CD4 <sup>+</sup> T cells are more susceptible to latent infection	130
Figure 5 - Nutlin-3 treatment decreases the susceptibility of transitioning CD4 <sup>+</sup> T cells to HIV-1 infection by downregulating CCR5 expression through miRNA-103 upregulation	133
Figure 6 - Analyses of miRNA-103 and CCR5 mRNA expression levels in CD4 <sup>+</sup> T cells isolated from HIV-1-infected and healthy individuals	135

Figure S1 - CD4 <sup>+</sup> T cell phenotype characterization at different activation time-points, related to Figure 2	154
Figure S2 - Nutlin-3 treatment of CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes does not affect the expression of CD4, CXCR4 or p53 mRNA, related to Figure 3	155
Figure S3 - Characterization of CD4 <sup>+</sup> T cell subpopulations following infection with doubly fluorescent HI.fate HIV-1 virus, related to Figure 4	156

## **Chapitre 5 : Manuscrit #3**

Figure 1 - RNA-seq mRNA and miRNA profiles in productively infected and bystander CD4 <sup>+</sup> T-cells compared to uninfected cells	167
Figure 2 - CD59 is predicted to be regulated in productively infected cells by three miRNAs	168
Figure 3 - The downregulation of miRNA-21, miRNA-26a and miRNA-29a are linked to an upregulation of CD59 expression levels in productively infected cells	169
Figure 4 - CD59 is a target of miRNA-26a	171
Figure 5 - Reduction of CD59 expression in HIV-1 infected cells and decreased packaging of CD59 in released virions enhance their susceptibility to ADCML	174
Figure 6 - Enhanced expression of miRNA-26a during HIV-1 infection renders released virions more susceptible to ADCML	175
Figure 7 - Downregulation of miRNA-26 is contingent on viral DNA integration and expression but does not involve accessory gene expression	178

Figure S1 - Characterization of the cell populations used for the RNA-seq, related to Figure 1	202
Figure S2 - List of genes of which mRNA expression levels are modulated in the GFP-negative population compared to Mock, related to Figure 1	203
Figure S3 - List of genes of which mRNA expression levels are modulated in the GFP-positive population compared to Mock, related to Figure 1	204
Figure S4 - Modulation of miRNA-26a and CD59 expression levels in HIV-1 infected CEM-CCR5 cells and characterization of CEM-CD59_KO cells, related to Figure 5	205
Figure S5 - ADCML assay with antibodies purified from the sera of viremic individuals, related to Figure 6	206
Figure S6 - Characterization of CD4 <sup>+</sup> T cell subpopulations following infection with doubly fluorescent HIV Nef-2A-CRIMZs virus, related to Figure 7	207

## **Chapitre 6 : Discussion & Conclusion**

Figure 1 - Le profil d'expression du miARN-107 est similaire au miARN-103	210
Figure 2 - EZH2 est augmenté dans les cellules productivement infectées par rapport aux cellules non infectées	215
Figure 3 - EZH2 n'est pas responsable de la diminution du miARN-26 à la suite de l'infection par le VIH-1	215

## Sigles et abréviations

---

### A

---

ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ( <i>Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity</i> )
ADCML	Lyse médiée par le complément dépendante des anticorps ( <i>Antibody-dependent complement-mediated lysis</i> )
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALVM	Macrophage alvéolaire pulmonaire ( <i>lung alveolar macrophages</i> )
APOBEC3	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger

### B

---

bNAb	Anticorps largement neutralisant ( <i>Broadly neutralizing antibody</i> )
BST-2	Antigène-2 de la moelle épinière stromale ( <i>Bone marrow stromal cell antigen 2</i> )

### C

---

CA	Capside
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CCR5	Récepteur de chimiokine C-C de type 5 ( <i>C-C chemokine receptor type 5</i> )
CCR6	Récepteur de chimiokine C-C de type 6 ( <i>C-C chemokine receptor type 6</i> )
CCR7	Récepteur de chimiokine C-C de type 7 ( <i>C-C chemokine receptor type 7</i> )
CD	Cluster de différenciation
CLR	Récepteur de lectines de type C ( <i>C-type lectin receptors</i> )
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CRF	Forme recombinante circulante ( <i>Circulating Recombinant Forms</i> )
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CXCR4	Récepteur de chimiokine C-X-C de type 4 ( <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> )

### D

---

DC-Sign	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome Critical Region gene 8</i>
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate ( <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> )

### E

---

EC	Contrôleur élite ( <i>Elite controller</i> )
ECL	<i>Extracellular loop</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Glycoprotéines d'enveloppe virale
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>

**F**

---

Fc	Fragment cristallisable
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

**G**

---

GALT	Tissu lymphoïde associé à l'intestin ( <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> )
gp41	Glycoprotéine d'enveloppe de 41 kDa
gp120	Glycoprotéine d'enveloppe de 120 kDa
gp160	Glycoprotéine d'enveloppe de 160 kDa
GPI	Glycophosphatidylinositol

**H**

---

HIHS	Sérum humain inactivé par la chaleur ( <i>heat-inactivated human serum</i> )
HLA	Antigène des leucocytes humains ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
HR1	<i>Heptad repeat 1</i>
HR2	<i>Heptad repeat 2</i>

**I**

---

ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire ( <i>Intercellular adhesion molecule</i> )
ICL	<i>Intracellular loop</i>
IFITM	<i>Interferon-induced transmembrane protein</i>
IFN	Interferon
INT	Intégrase

**J**

---

JAK	Janus kinase ( <i>Just Another Kinase</i> )
-----	---

**K**

---

KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>
-----	--

**L**

---

Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
lncARN	Long ARN non-codant ( <i>long non-coding RNA</i> )
LPS	Lipopolysaccharides
LRA	Agent d'inversion de la latence ( <i>Latency Reversing Agent</i> )
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>

**M**

---

M-Tropique	Tropisme macrophagique
MA	Matrice
MAC	Complexe d'attaque membranaire ( <i>Membrane attack complex</i> )
MDDC	Cellules dendritiques dérivées de monocytes ( <i>Monocyte-Derived Dendritic Cells</i> )
MDM	Macrophages dérivés de monocytes ( <i>Monocyte-Derived Macrophages</i> )
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
miARN/miR	Micro-ARN
MIP	Protéine inflammatoire des macrophages ( <i>macrophage inflammatory protein</i> )

MPER *Membrane-proximal external region*

## N

---

NC *Nucléocapside*  
Nef *Negative factor*  
NF- $\kappa$ B *Nuclear factor-kappa B*  
NFAT *Nuclear Factor of Activated T-cells*  
NHS *Sérum humain normal (Normal human serum)*  
NK *Natural Killer*  
NLR *Récepteurs de type NOD (NOD-like receptor)*  
NTB-A *NK-T-B antigen*

## P

---

P-TEFb *Positive transcription elongation factor b*  
p21 *Inhibiteur de kinase dépendant de la cycline 1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1)*  
p53 *Protéine tumorale 53 (tumor protein 53)*  
PAMP *Motif moléculaire associé aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern)*  
PBMC *Cellules mononuclées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells)*  
PCR *Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)*  
pDC *Cellule dendritique plasmacytoïde*  
PR *Protéase*  
Pré-miARN *Précurseur de miARN*  
Pri-miARN *miARN primaire*  
PRR *Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern recognition receptor)*  
Pur- $\alpha$  *Purine-Rich single stranded DNA-binding protein alpha*

## R

---

R5 (tropisme) *Tropisme CCR5*  
RANTES *Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*  
Rev *Regulator of virions*  
RISC *Complexe de silençage induit par l'ARN (RNA-Induced Silencing Complex)*  
RLR *Récepteur de type RIG-I (RIG-I-like receptor)*  
RT *Reverse transcriptase*

## S

---

SAMHD1 *Sterile Alpha Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1*  
SERINC *Serine incorporator*  
siARN *Petit ARN interférent (small interfering RNA)*  
SIDA *Syndrôme d'immunodéficience acquise*  
SNC *Système nerveux central*  
STAT *Signal transducer and activator of transcription*

## T

---

T CD4<sup>+</sup> *Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> / Lymphocytes T auxiliaires*

T CD8 <sup>+</sup>	Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> / Lymphocytes T cytotoxiques
T-Tropique	Tropisme lymphocytaires T CD4 <sup>+</sup>
T/F	<i>Transmitted/Founder</i>
TAR	Thérapie antirétrovirale
Tat	Transactivateur transcriptionnel ( <i>Trans-Activator of Transcription</i> )
TCR	Récepteur des lymphocytes T ( <i>T cell receptor</i> )
TLR	Récepteur de type Toll ( <i>Toll-like receptor</i> )
TM	Transmembranaire
TNF	Facteur de necrose tumorale ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
TRBP	<i>TAR-RNA Binding Protein</i>
TRIM5 $\alpha$	<i>Tripartite Motif containing protein 5</i>
TRIM32	<i>Tripartite Motif containing protein 32</i>

## U

---

URF	Forme recombinante unique ( <i>Unique recombinant form</i> )
UTR	Région transcrite non traduite ( <i>Untranslated Transcribed Region</i> )

## V

---

Vif	Facteur viral d'infectivité ( <i>Virus infectivity factor</i> )
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2
Vpr	Protéine virale R ( <i>Viral protein R</i> )
Vpu	Protéine virale U ( <i>Viral protein U</i> )
VSV-G	Glycoprotéine G de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire

## X

---

X4 (tropisme)	Tropisme CXCR4
---------------	----------------

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Éric Cohen pour m'avoir permis de rejoindre son laboratoire et d'y réaliser mes travaux de recherche. Merci pour votre soutien financier au cours de ces cinq années.

Merci à tous les membres qui ont siégé sur mes comités de suivi ainsi que mon comité pré-doctoral pour leurs conseils qui m'ont permis d'avancer sur mes projets : Dr. Nicolas Chomont, Dr. Martin Sauvageau, Dr. Fabien Touzot. Merci également à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de réviser ma thèse : Dr. Guy Lemay, Dr. Martin Sauvageau, Dre. Caroline Gilbert et Dr. Roger Lippé. Un (troisième !) merci à Dr. Martin Sauvageau d'avoir été mon conseiller académique à l'IRCM tout au long mon doctorat, et particulièrement de m'avoir épaulé au cours de ma dernière année.

Je remercie également l'intégralité des membres (passés ou actuels) de mon laboratoire : Robert, Tram, Mélanie, Alexandre, Marianna, Fred, Lijun, Jérémy, Oussama, Shu Hui, Samantha, Olga, Vandana, Jaspreet, Isa, Joy, Maria, Sharmin et Chengyu.

Robert, merci d'avoir tenu le rôle de mentor pendant toute ma thèse. Merci pour ta bonne humeur, ton écoute, ton soutien et tes nombreux conseils. Merci également pour ta patience, notamment lorsqu'il s'agissait de relire mes papiers. Nos discussions à la cafétéria (scientifiques ou non) vont me manquer.

Tram, merci beaucoup pour ton soutien, ton écoute, et pour tes nombreux conseils tout au long de ma thèse. Malgré ton planning surchargé, tu as toujours trouvé du temps pour moi, que ce soit pour discuter de mes résultats de cytométrie en flux, pour des conseils scientifiques sur mes expériences, ou pour me remonter le moral quand j'en avais besoin, donc simplement merci !

Chengyu, c'était un plaisir d'être ton encadrant l'espace de quelques mois. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. Bonne chance pour ton doctorat, et j'espère avoir l'occasion de venir te voir à Vancouver prochainement !



À tous les autres membres du laboratoire, merci pour les nombreuses discussions, votre aide et votre soutien technique tout au long de mon doctorat. C'était un plaisir d'avoir eu l'opportunité de travailler avec vous et j'espère que nous aurons la possibilité de nous revoir, que ce soit à Montréal ou ailleurs.

Je souhaite également remercier Éric Massicotte et Julie Lord (plateforme de cytométrie en flux) pour les nombreuses heures que nous avons passées ensemble à faire du tri cellulaire, que cela soit à l'intérieur ou à l'extérieur du laboratoire de niveau 3. Merci beaucoup pour votre assistance tout au long de mon doctorat. Julie, promis, je ne t'embêterai plus pour des rendez-vous dans le niveau 3 désormais ! Je souhaite également remercier les affaires académiques de l'IRCM pour leur soutien tout au long de mon doctorat, je ne suis pas sûr que je serai arrivé au bout de mon parcours sans votre aide. Les étudiants de l'IRCM ont vraiment beaucoup de chance d'avoir une équipe si dédiée.

Pour finir, je souhaite évidemment remercier infiniment ma famille, pour son accompagnement et son soutien en tout temps malgré la distance qui nous sépare. Merci de m'avoir motivé, et remotivé, jusqu'à prendre l'avion pour venir me voir, quand j'en avais besoin. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui !

# **Chapitre 1 : Introduction**

# 1. Généralités sur le VIH-1

---

## 1.1. Problématique

Plusieurs années après la découverte du virus par F. Barré-Sinoussi (1), récompensée par le prix Nobel de Médecine en 2008, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), agent responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), reste un problème majeur de santé publique à travers le monde. Selon le dernier rapport de l'ONUSIDA en 2022 (<https://www.unaids.org/fr>), environ 39 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde, dont 1,3 millions de nouvelles infections. De plus, 630 000 nouveaux décès liés à l'infection ont été recensés (40,4 millions de décès depuis la découverte du virus). L'apparition des multithérapies antirétrovirales dès 1996 a contribué à limiter la transmission virale mais également le développement de l'infection et l'apparition de la phase SIDA grâce à la diminution de la réplication virale jusqu'à un niveau indétectable dans le sérum ou le plasma. Cependant les traitements actuellement disponibles ne permettent pas d'éradiquer complètement le virus dont le génome demeure intégré dans l'ADN cellulaire des cellules cibles et est capable de se répliquer à nouveau dès l'arrêt du traitement (2,3). De plus, des phénomènes de résistance à la thérapie sont fréquemment observés.

Malheureusement, parmi les 39 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde, seulement 29,8 millions ont accès à la thérapie antirétrovirale d'après l'ONUSIDA. Ainsi, bien que le nombre de décès diminue année après année depuis l'avènement de la trithérapie, il continue de souligner le problème d'accès au soin et au traitement d'une infection dont 95% des nouvelles victimes habitent dans un pays à faible revenu, et l'importance de poursuivre les efforts de préventions et l'accessibilité des soins et aux traitements.

## 1.2. Classification du VIH-1

Le VIH appartient à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus*. On distingue deux espèces : le VIH-1, responsable de la pandémie, et le VIH-2, qui présente 50% d'homologie avec le VIH-1, moins virulent

et qui sévit principalement en Afrique de l'Ouest. Le VIH-1 est aujourd'hui classé en quatre groupes : le groupe M (pour *Major group*) découvert en 1983 (1) ; le groupe O (pour *Outlier group*) identifié en 1990 (4) ; le groupe N (pour *New group* ou non-M, non-O) identifié en 1998 (5) et enfin le groupe P (pour *Pending the identification of further human cases*) identifié en 2009 (6). Le groupe M est le plus répandu dans le monde, il se retrouve à travers tout le globe et est responsable de la pandémie actuelle (95% des cas de SIDA). Le groupe O est plus endémique, et est circonscrit à l'Afrique centrale et Afrique de l'Ouest. Les groupes N et P sont rares, et les souches issues de ces groupes ont été principalement observées au Cameroun.

Le groupe M comporte 9 sous-types (ou *clades*) : A, B, C, D, F, G, H, J et K, génétiquement distincts et ayant différentes prévalences selon les régions géographiques (7). Le sous-type B est principalement retrouvé en Europe et aux États-Unis tandis que le sous-type C, qui est le plus important à l'échelle du globe, est retrouvé en Afrique du Sud ou en Asie. Les autres sous-types sont essentiellement concentrés en Afrique.

Le séquençage complet du génome du VIH-1 a permis l'identification de nombreuses formes recombinantes uniques (URF pour *Unique Recombinant Forms*) ou circulantes (CRF pour *Circulating Recombinant Forms*) correspondant à des recombinaisons inter-sous-types de souche appartenant à au moins deux sous-types différents (8). Lorsque la forme recombinante est retrouvée chez plus de trois individus, on dit qu'elle est circulante, sinon, elle est considérée comme unique.

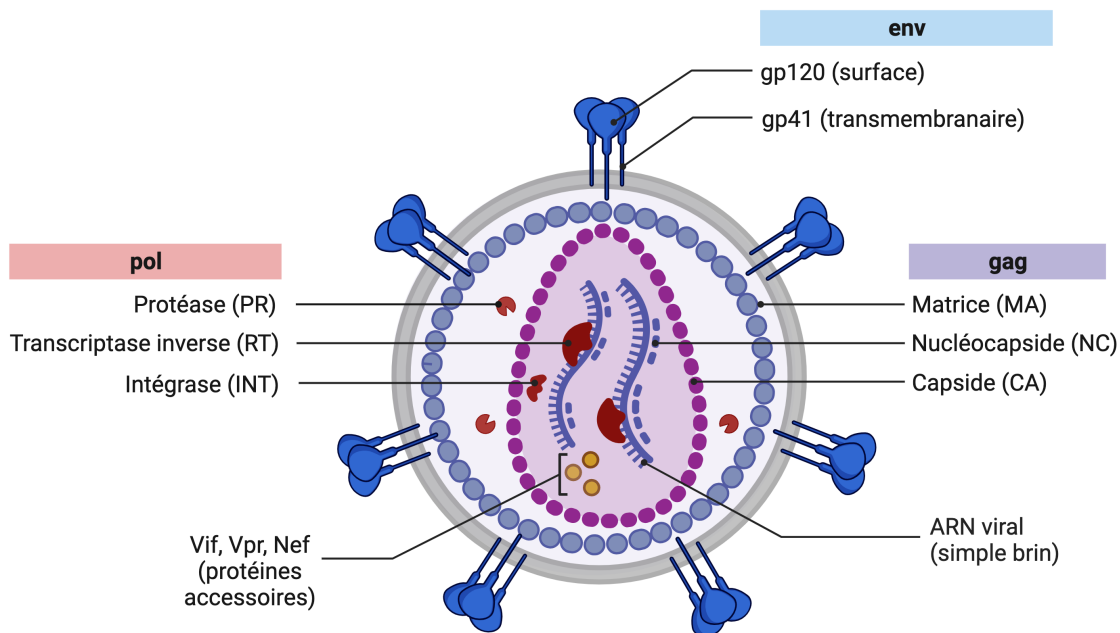
### **1.3. Structure du VIH-1**

Le VIH-1 est un virus enveloppé à ARN, de 80 à 120nm de diamètre (9). Il est constitué d'une enveloppe virale formée d'une bicouche phospholipidique empruntée à la cellule hôte dans laquelle sont insérés des trimères de glycoprotéines d'enveloppe Env (**Figure 1**).

Chaque glycoprotéine Env est constituée de deux sous-unités : gp120 et gp41 liées de façon non covalente. La sous-unité gp41 traverse la bicouche lipidique (protéine

transmembranaire) tandis que la sous-unité gp120 est une glycoprotéine de surface impliquée dans la liaison au récepteur CD4 (cluster de différenciation 4) et aux corécepteurs des cellules cibles (10).

À l'intérieur de la membrane, on retrouve une matrice protéique composée de la protéine de matrice p17 (MA) qui entoure la capsid virale (CA) et renferme la protéase virale p11 (PR). Cette capsid est composée majoritairement de la protéine p24 et renferme deux molécules d'ARN monocaténaire associées aux nucléoprotéines p7 et p9, formant la nucléocapsid (NC) (11). Elle renferme également les différentes enzymes nécessaires à la réplication et la maturation : la transcriptase inverse p66 /51 (RT), l'intégrase p32 (INT). Enfin, les protéines accessoires Vif, Vpr et Nef sont également incorporés dans la particule virale à des degrés différents (12–14) : Vpr y est la protéine la plus abondante tandis que le mécanisme d'incorporation pour Vif et Nef, ainsi que leur localisation dans la particule virale, n'est pas totalement élucidé.



**Figure 1 - Structure du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1).**

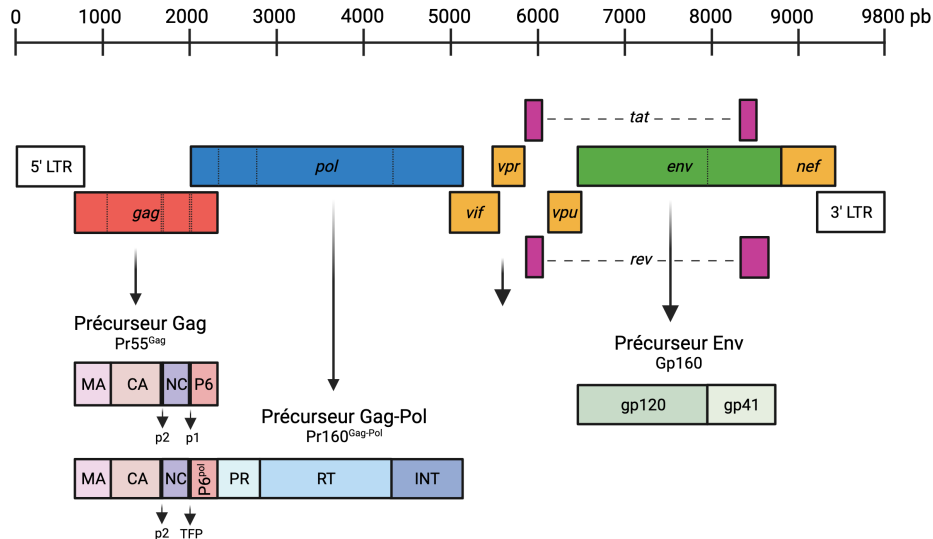
Le VIH-1 est constitué d'une enveloppe virale empruntée à la cellule hôte, dans laquelle on retrouve les trimères de glycoprotéines d'enveloppe Env eux-mêmes constitués de deux sous-unités : gp120 et gp41. Sous cette membrane lipidique, on retrouve une couche intermédiaire constituée surtout de la protéine de matrice en plus de quelques molécules de protéase virale. La capsid renferme le génome du virus (sous forme de deux molécules d'ARN monocaténaire), des enzymes nécessaires au cycle viral (transcriptase inverse et intégrase). L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

#### 1.4. Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 9,8kb (**Figure 2**). Sous sa forme intégrée à la cellule cible, il comporte à ces extrémités des séquences répétées inversées (*Long Terminal Repeat ou LTR*). La région LTR située à l'extrémité 5' contient le promoteur ainsi que l'ensemble des signaux permettant la régulation positive ou négative de la transcription de l'ADN proviral. La région LTR située à l'extrémité 3' contient les signaux de terminaison de la transcription et de la polyadénylation (9).

Le génome contient les gènes *gag*, *pol* et *env* qui code pour trois poly-protéines Gag, Gag-Pol et Env, des précurseurs qui seront par la suite clivés en protéines individuelles. Il contient également des séquences additionnelles, présentant des cadres de lecture chevauchants, qui codent pour les protéines régulatrices (Tat et Rev) ainsi que les protéines accessoires (Vif, Nef, Vpr et Vpu). Ces protéines participent, entre autres, dans la régulation de la réplication virale et dans l'échappement à la réponse immunitaire (15) (**Tableau 1**).

Le gène *gag* code pour un précurseur de 55 kDa (Pr55<sup>Gag</sup>) qui, suite à un clivage par la protéase virale (PR), formera les protéines composant la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC) ainsi que la protéine p6 (16). La transcriptase inverse (RT), l'intégrase (INT) et la protéase (PR) dérivent d'un précurseur Gag-Pol Pr160<sup>Gag-pol</sup> généré par un changement de cadre de lecture lors de la traduction par les ribosomes. La transcriptase inverse permet la rétro-transcription du génome d'ARN en ADN double brin. L'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Les glycoprotéines d'enveloppe dérivent d'un précurseur gp160 codé par le gène *env*, qui subit un clivage par une endoprotéase cellulaire, la furine, pour donner deux fragments : la glycoprotéine de surface (gp120) et la glycoprotéine transmembranaire (gp41). Ces deux sous-unités interagissent de manière non covalente pour former un complexe trimérique et participent à la liaison aux récepteurs de la cellule hôte (10).



**Figure 2 - Organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1.**

Le génome est constitué d'environ 9800 paires de base. Il comporte à ces extrémités des séquences répétées inversées (LTR ou *Long Terminal Repeat*). Entre les LTR se trouvent les trois gènes principaux communs aux rétrovirus appelés *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines structurales, les enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe, ainsi que les gènes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu* codant les protéines régulatrices et les protéines accessoires. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

**Tableau 1 - Les différentes protéines encodées par les gènes du VIH-1.**

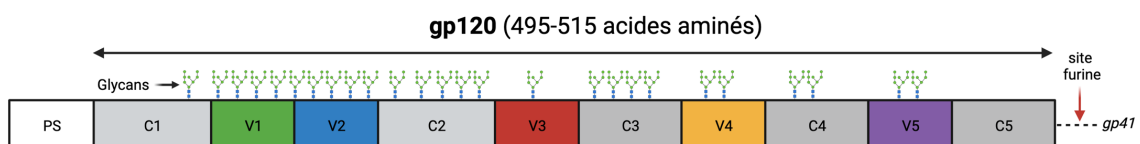
<b>Protéines de structure</b>	p17 (MA)	Protéine de la matrice
	p24 (CA)	Protéine de la capsid
	p7 (NC)	Protéine de la nucléocapside
	p6	Permet l'encapsulation de Vpr
	gp120	Permet la liaison avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5/CXCR4
	gp41	Permet la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire
<b>Enzymes virales</b>	Transcriptase inverse (RT)	Permet la conversion de l'ARN viral en ADN double brin
	Intégrase (INT)	Permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte
	Protéase (PR)	Permet la maturation des protéines Gag et Gag-Pol
<b>Protéines régulatrices</b>	Tat	Transactivateur transcriptionnel
	Rev	Facilite l'export des ARNm non épissés ou partiellement épissés vers le cytoplasme
<b>Protéines accessoires</b>	Nef ( <i>Negative factor</i> )	Diminution de l'expression du CD4 et des molécules CMH de classe 1 à la surface des cellules infectées
	Vpr ( <i>Viral protein R</i> )	Favorise le transport du complexe de pré-intégration dans le noyau Bloque les cellules infectées en phase G2 du cycle cellulaire (+ forte transcription du virus)
	Vpu ( <i>Viral protein U</i> )	Diminue l'expression du CD4 dans les cellules infectées Contrecarre le facteur de restriction BST-2
	Vif ( <i>Viral infectivity factor</i> )	Neutralise le facteur de restriction APOBEC3G

## 1.5. Structures des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1

### Structure de la gp120

La sous-unité de surface gp120 (environ 500 acides aminés) est constituée de 9 ponts disulfures ainsi que de 5 régions avec une forte variabilité (domaines V1-V5) qui sont séparées par des régions constantes (C1-C5) (**Figure 3**) (17). Elle possède également un nombre variable de sites de N-glycosylation (entre 20-35) qui contribuent à la moitié de sa masse moléculaire (18). Les glycanes protègent partiellement la protéine de la reconnaissance par le système immunitaire et sont également indispensables à la structure finale de la gp120 (19,20). La sous-unité gp120 peut être également modifiée par des O-glycosylations, mais ces modifications sont moins bien caractérisées (21).

Les régions V1 et V2 sont les plus variables ce qui favorise l'échappement à la réponse immunitaire humorale, néanmoins ces régions ne sont pas essentielles pour la réplication virale (10,22). La région V3 (également appelée boucle V3) est constituée de 25 à 30 acides aminés, est relativement bien conservée, et joue un rôle majeur dans l'entrée virale en interagissant avec les corécepteurs du VIH-1 (23). Ainsi, en fonction des mutations présentes dans la boucle V3, le virus pourra interagir avec les corécepteurs CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) et/ou CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) sur lequel nous reviendrons dans la section suivante (24). La région V4 (ou boucle V4) participe à la maturation de la glycoprotéine (25). La région V5 (ou boucle V5), quant à elle, possède une variabilité plus faible. Les régions constantes C1 et C5 interagissent avec la gp41, tandis que les régions C2 à C4 interagissent avec le CD4 (26).



**Figure 3 - Représentation schématique de la structure de la gp120 du VIH-1.**

La gp120 est constituée d'environ 495-515 acides aminés, dont la séquence démarre à la suite du site de clivage des peptidases qui libèrent le peptide signal (PS) issu du



précurseur gp160. La gp120 est constituée de 5 régions variables (V1-V5) qui sont séparées par des régions constantes (C1-C5). Les régions variables V1 à V5 sont encadrées. Les sites de N-glycosylation sont indiqués (glycanes). L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et adaptée de Caffrey, 2011 (27).

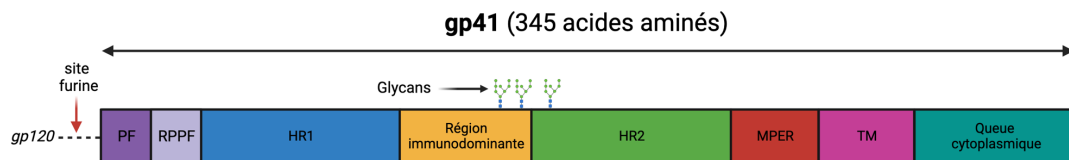
### *Structure de la gp41*

La sous-unité transmembranaire gp41 est beaucoup plus conservée que la gp120 et est constituée d'environ 345 acides aminés. Elle est divisée en trois domaines : un domaine extracellulaire (également appelé ectodomaine), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (28) **(Figure 4)**.

Le domaine extracellulaire joue un rôle majeur dans la fusion des membranes cellulaires et virales. Il est divisé en plusieurs régions. La région N-terminale forme le peptide de fusion permettant à la glycoprotéine se trouvant sur la particule virale de s'ancrer dans la membrane plasmique de la cellule cible lors de la fusion membranaire (29,30). Les domaines HR1 (*Heptad Repeat 1*) et HR2 (*Heptad Repeat 2*) sont constitués de motifs répétés de 7 acides aminés et ont une structure en hélice alpha. L'enroulement des domaines HR1 et HR2 entre eux permet le rapprochement des membranes cellulaire et virale (31). Les deux domaines sont reliés entre eux par une région immunodominante contenant une boucle hydrophile. Le domaine extracellulaire se termine par la région MPER (*membrane-proximal external region*), fortement conservée et qui joue un rôle critique à l'étape de fusion même si son fonctionnement n'est pas encore totalement connu (32).

Le domaine transmembranaire est une région hydrophobe, constituée d'une vingtaine d'acides aminés, traversant la membrane virale. Cette région participe à l'ancrage des glycoprotéines virales au niveau des bicouches lipidiques (33).

La queue cytoplasmique est longue de plus de 150 acides aminés. Elle est constituée de trois motifs hydrophobes en hélice  $\alpha$  impliqués dans l'expression de Env à la surface des cellules infectées et de son incorporation dans les virions (10).



**Figure 4 - Représentation schématique de la structure de la gp41 du VIH-1.**

À la suite du site de clivage par la furine, on retrouve le peptide fusion. La gp41 est constituée d'un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. Les régions structurales et fonctionnelles du domaine extracellulaire sont indiquées par différentes couleurs. PF : peptide fusion, RPPF : région proximale du peptide fusion, HR1 : *Heptad Repeat 1*, HR2 : *Heptad Repeat 2*, MPER : *membrane-proximal external region*, TM : transmembranaire. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et adaptée de Caffrey, 2011 (27).

## 1.6. L'entrée virale

### *Fixation au récepteur CD4*

Le récepteur CD4 est une glycoprotéine de 55 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est structuré en trois parties : une partie extracellulaire constituée elle-même de quatre domaines (D1 à D4), d'une partie transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (34). Il est exprimé à la surface de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Il est un ligand des récepteurs CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) et participe ainsi à la formation du complexe CMH-peptide-TCR (*T Cell Receptor*) entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (35). La formation de ce complexe permet le recrutement de la tyrosine kinase Lck, qui entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (36,37).

Le CD4 est le récepteur majeur du VIH-1. Le contact entre le CD4 et la gp120 a lieu dans une zone conservée qui est dépourvue de glycosylation. L'interaction fait intervenir 26 acides aminés de la gp120 et 22 acides aminés du CD4 (38). Parmi ceux-ci, deux acides aminés du domaine D1 sont particulièrement importants : une phénylalanine en position 43 (Phe43) et une arginine en position 59 (Arg59), qui interagissent tous les deux avec les domaines C3-C4 de la gp120 (39). La phénylalanine en position 43 est impliquée dans environ 23% des contacts possibles entre la gp120 et le CD4.

La liaison de la gp120 avec le récepteur CD4 entraîne le passage d'une conformation fermée du trimère à une conformation ouverte. Ce réarrangement, qui permet l'exposition de la boucle V3, joue un rôle critique pour l'étape suivante, la fixation au corécepteur.

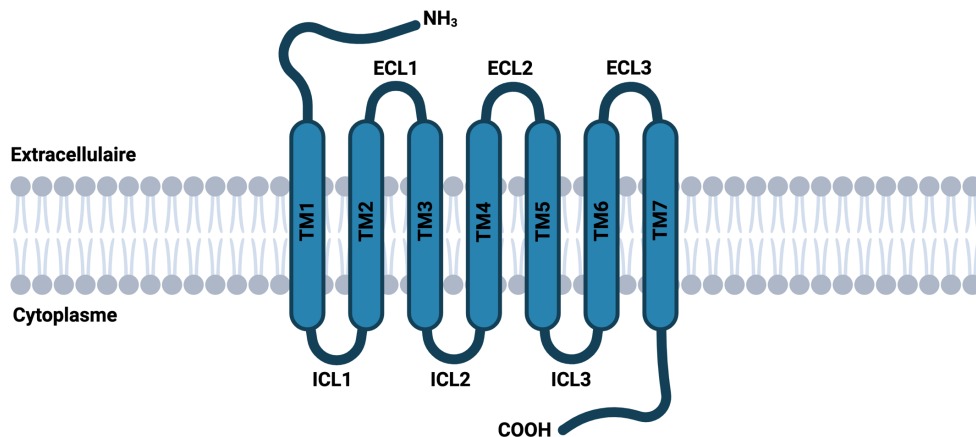
#### *Fixation aux corécepteurs CCR5/CXCR4*

La liaison avec le récepteur CD4 n'est pas suffisante pour permettre l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible : une seconde interaction avec un corécepteur est nécessaire. Il existe deux corécepteurs majeurs impliqués dans l'entrée du VIH-1 : le récepteur CCR5 (40,41) ainsi que le récepteur CXCR4 (42). CCR5 et CXCR4 sont des récepteurs aux chimiokines qui appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils participent à la transmission du signal du milieu extracellulaire vers l'intérieur des cellules (43). D'une longueur totale de 340 à 370 acides aminés, les récepteurs sont constitués d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'une queue C-terminale intracellulaire, reliés entre eux par 7 hélices alpha transmembranaires hydrophobes (TM1-TM7) qui sont elles-mêmes connectées par trois boucles intracellulaires (ICL1-3, pour *intracellular loop*) et trois boucles extracellulaires (ECL1-3, pour *extracellular loop*) (44) (**Figure 5**).

Les chimiokines sont des molécules de faible poids moléculaire impliquées de nombreuses fonctions homéostatiques et inflammatoires (45). Elles sont séparées en 4 groupes en fonction du nombre et de la position des deux premières cystéines à leur extrémité N-terminale. Parmi ces groupes, on y retrouve notamment la famille CC (les ligands du CCR5), dont les deux premiers résidus cystéine sont adjacents, ainsi que la famille CXC (les ligands du CXCR4) dans laquelle les deux cystéines sont séparées par un acide aminé non conservé (d'où leur nom CXC) (46).

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 interagissent avec les récepteurs aux chimiokines par l'intermédiaire de la boucle V3 de la gp120. L'extrémité de la boucle V3 de la gp120 interagit avec ECL2 tandis que la base de la boucle V3, qui relie le cœur de la gp120 à l'extrémité de la V3, interagit avec le domaine N-terminal de CCR5

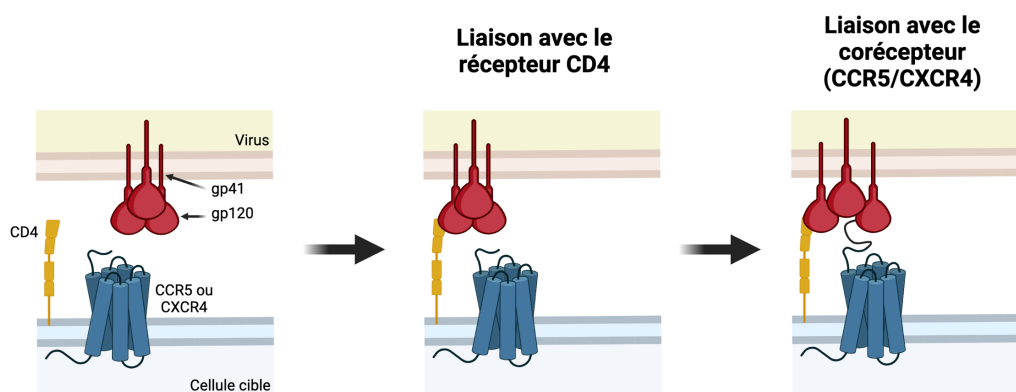
(47). Le choix de corécepteur utilisé par le VIH-1 (CCR5 ou CXCR4) est déterminé par la séquence de la boucle V3 de la gp120 : ainsi, la présence d'acides aminés chargés positivement en position 11, 24, 25 dans V3 entraîne l'utilisation du corécepteur CXCR4, tandis qu'à l'inverse, la présence d'acides aminés moins chargés positivement permet l'interaction avec les résidus non chargés du CCR5 (47).



**Figure 5 - Représentation schématique d'un récepteur des chimiokines.**

Les récepteurs CCR5 ou CXCR4 sont constitués d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire. Les deux domaines sont reliés entre eux par 7 domaines transmembranaires (TM1-TM7) connectés par trois boucles intracellulaires (ICL1-3) et trois boucles extracellulaires (ECL1-3). TM : transmembranaire, ICL : *intracellular loop*, ECL : *extracellular loop*. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et adaptée de Neumann *et al.*, 2014 (48).

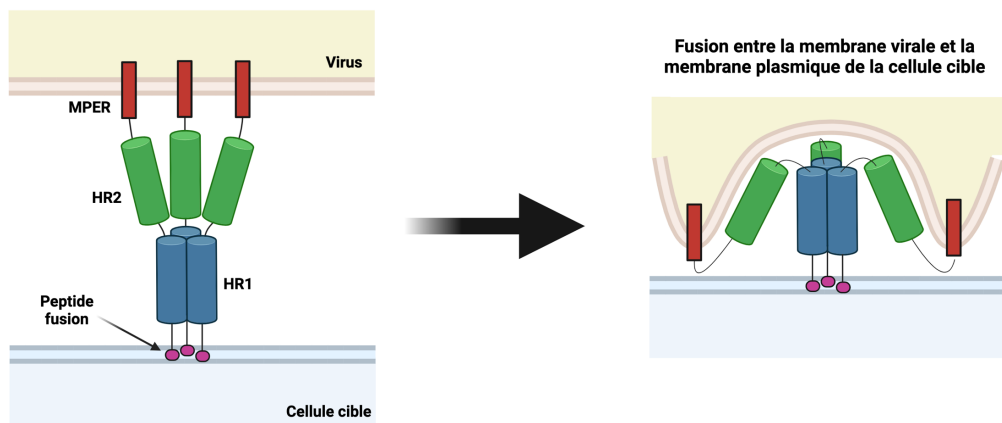
La liaison entre la gp120 et le récepteur CD4 provoque un changement structural de la gp120 dans une conformation ouverte, notamment grâce au déplacement de la région V1/V2 (49,50). Ce changement de conformation permet l'exposition de la boucle V3 et entraîne l'exposition du site de liaison au corécepteur CCR5 ou CXCR4 (51) (Figure 6).



**Figure 6 - Représentation schématique de l'attachement au CD4 et au corécepteur.**  
 La liaison au CD4 entraîne un changement de conformation de la gp120, qui passe dans une conformation ouverte, et qui permet l'exposition de la boucle V3. Ce réarrangement permet la liaison entre la gp120 et le corécepteur (CCR5 ou CXCR4) utilisé par le VIH-1. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

### La fusion virale

Après l'interaction avec le corécepteur, le trimère de gp41 est exposé hors de la gp120, ce qui permet l'insertion du peptide de fusion, composés de résidus hydrophobes, dans la membrane de la cellule cible (52). À la suite de cet ancrage, les régions HR1 et HR2 de chaque sous-unité de gp41 s'unissent pour former un complexe à 6 hélices (6HB) (31,53). Ce complexe permet le rapprochement des membranes virales et cellulaires et la formation d'un pore de fusion (Figure 7).



**Figure 7 - Représentation schématique du processus de fusion virale du VIH-1.**  
 La liaison au corécepteur entraîne un nouveau changement conformationnel qui entraîne l'exposition de la gp41 et l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible. Les domaines HR2 complémentaires aux domaines HR1 de la gp41 se rapprochent et forment une structure à 6 hélices qui permet le rapprochement des membranes cellulaire et virale et la formation d'un pore de fusion. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

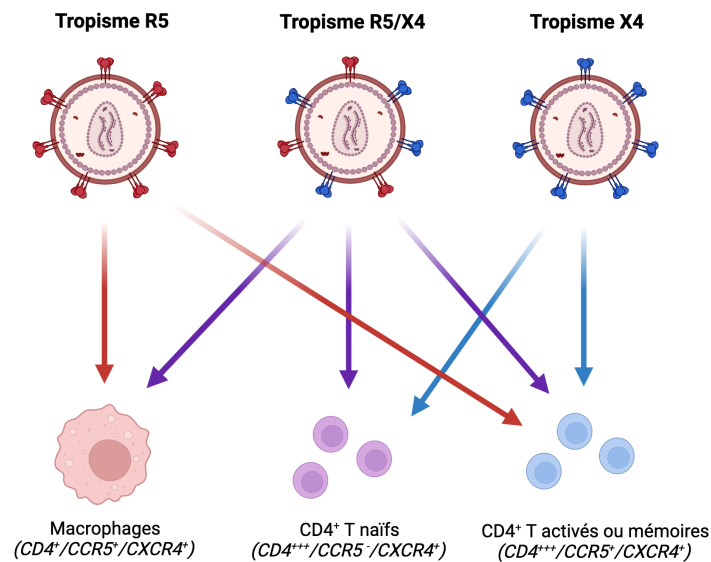
### 1.7. Tropisme cellulaire

Le tropisme du virus peut tout d'abord être défini selon sa cible cellulaire privilégiée (54) (Figure 8). Ainsi, un virus capable d'infecter uniquement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est défini comme T-tropique et a généralement besoin d'une grande quantité de CD4 à la surface de la cellule cible pour pouvoir l'infecter. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (également appelés lymphocytes auxiliaires) sont des cellules immunitaires qui, à la

suite de leur rencontre avec un antigène, vont s'activer, proliférer et produire des cytokines qui vont à leur tour activer les autres cellules immunitaires (55,56). En d'autres termes, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contrôlent et régulent la réponse immunitaire. Le VIH-1 peut infecter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (57). En revanche, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (avant la reconnaissance par un antigène) sont peu susceptibles à l'infection par le VIH-1 (58,59), tandis que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires (spécifiques à l'antigène qu'ils ont rencontré) peuvent être infectés, mais dépendant de leur stade de différenciation, ont un environnement cellulaire peu propice à la transcription des gènes du VIH-1 (60–62), comme nous l'aborderons plus tard. À l'inverse, le virus capable d'infecter les macrophages est un virus M-tropique, caractérisé par la capacité d'infecter sa cellule cible y compris si le niveau de CD4 à sa surface est faible (63). Les macrophages sont des cellules impliquées dans la détection et la phagocytose. Nous aurons l'occasion d'y revenir plus tard, mais les macrophages sont une population très hétérogène, qui se reflète notamment dans leur morphologie (64,65). Ces cellules peuvent également présenter l'antigène aux lymphocytes T et amorcer la réaction inflammatoire en libérant de nombreuses cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) qui peuvent activer d'autres cellules immunitaires (66).

Le tropisme peut également se référer à l'utilisation préférentielle d'un des deux corécepteurs (CCR5 ou CXCR4) (**Figure 8**). Les souches dit de « tropisme R5 » utilisent le CCR5 pour entrer dans la cellule cible. Les virus responsables de la transmission virale, appelé virus T/F (*Transmitted/Founder*) ont un tropisme R5 (67,68). Le corécepteur CCR5 est présent à surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à des niveaux d'expression variable selon le stade de différenciation de la cellule. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs expriment très peu le CCR5, mais ce dernier est exprimé sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés ou mémoires. Plus précisément, le CCR5 est plus fortement exprimé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés qui transitent vers un phénotype mémoire (69), ce sujet sera développé plus en détail par la suite. Le corécepteur CCR5 est également exprimé à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et les cellules microgliales.

Les souches dites de « tropisme X4 » qui utilisent préférentiellement le corécepteur CXCR4 retrouvé sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, peuvent émerger plus tard dans l'infection et sont souvent associés à une progression beaucoup plus rapide de la maladie (70). Ceci est aussi le cas des souches dites de tropisme R5/X4 (utilisant les deux corécepteurs).



**Figure 8 - Représentation graphique des différents tropismes du VIH-1.**

Les virus à tropisme R5 sont responsables de la transmission virale et persistent durant l'infection par le VIH-1. Ils infectent principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (T-tropique) ainsi que les macrophages (M-tropique) selon que ces virus ont la capacité d'infecter des cellules exprimant de haut niveau de CD4 (cellules T) ou de bas niveau de CD4 (macrophages). Ces virus peuvent évoluer vers un tropisme double R5/X4 ou un tropisme X4. Le tropisme X4 peut apparaître au cours des phases tardives de l'infection. Contrairement aux virus à tropisme R5, les virus à tropismes X4 peuvent infecter les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves qui expriment CXCR4. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et adaptée de *Esté & Telenti, 2007 (54)*.

## 1.8. Cycle de réplication du VIH-1

### *Phase précoce du cycle de réplication virale*

Le cycle de réplication virale se déroule en plusieurs étapes (**Figure 9**). Dans un premier temps, le virus se fixe à la surface de la cellule cible grâce à l'interaction de la glycoprotéine virale gp120 avec le récepteur cellulaire CD4. L'attachement du virion à la cellule cible peut également être non spécifique, par exemple *via* une interaction avec l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du tissu lymphoïde associé au tube digestif ou encore la lectine DC-SIGN des cellules dendritiques, qui favorise la

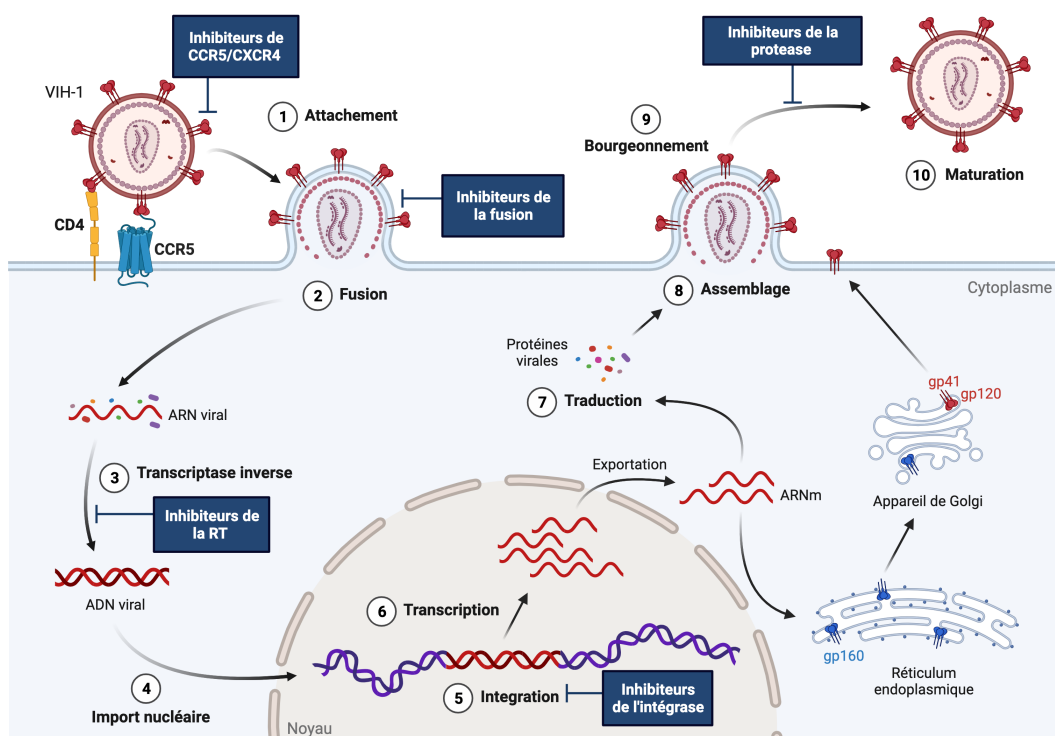
migration du virus vers les ganglions lymphatiques et l'interaction avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présents (71–73). Comme décrit précédemment, la fixation avec le CD4 entraîne un changement conformationnel de la gp120, permettant l'exposition des sites de fixation aux CCR5 et/ou CXCR4. L'interaction de la gp120 avec l'un des corécepteurs induit à son tour un changement de conformation de la glycoprotéine transmembranaire gp41 permettant l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule hôte, puis la fusion des membranes cellulaire et virale. Après l'entrée virale dans la cellule cible, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme où a lieu la décapsidation et la libération des deux molécules d'ARN, de la transcriptase inverse et de l'intégrase (74). Les molécules d'ARN viral simple brin sont alors rétro-transcrites en ADN double brin grâce à l'action de la transcriptase inverse (75). Les protéines virales de la capsid, de la matrice, de la nucléocapsid, l'intégrase et Vpr ainsi que d'autres facteurs cellulaires restent associés à l'ADN viral bicaténaire, formant le complexe de pré-intégration (PIC) qui est adressé au noyau par l'intermédiaire des pores nucléaires (76). L'ADN viral est intégré dans l'ADN cellulaire grâce à l'action de l'intégrase, préférentiellement dans les régions actives de la chromatine, donnant naissance à un provirus. Le virus peut rester intégré pendant plusieurs années dans l'ADN hôte sous cette forme, l'activation de la transcription des gènes viraux étant souvent liée à l'état d'activation de la cellule hôte.

#### *La phase tardive du cycle de réplication virale*

Une fois l'ADN proviral transcrit, les différents ARN messagers viraux sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines en utilisant les machineries transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule hôte (ribosomes, ARNt...). Dans un premier temps, seuls les ARN messagers viraux multi-épissés codant pour les protéines régulatrices Tat et Rev, ainsi que pour la protéine accessoire Nef, sont exportés dans le cytoplasme, puis traduits en protéines (77). La transactivation au niveau de régions du LTR viral par la protéine Tat et de son cofacteur cellulaire P-TEFb (*transcription elongation factor b*) permet d'augmenter l'efficacité de la transcription virale, conduisant à la production des ARN non-épissés (c'est-à-dire l'ARN viral génomique et les ARN messagers codant pour Gag et Gag-Pol) et mono-épissés (ARN messenger codant pour les glycoprotéines virales/Vpu, Vpr et Vif) (78).



La protéine Rev participe au transport de ces ARN non-épissés/mono-épissés dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la traduction des gènes *gag* et *gag-pol* conduit à la synthèse des deux précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol. À la suite de l'interaction des protéines Gag dans des régions riches en cholestérol de la membrane plasmique, les protéines néosynthétisées s'assemblent avec l'ARN viral pour éventuellement faire partie du processus de bourgeonnement viral. Le clivage de ces précurseurs polyprotéiques Gag, Gag-Pol par la protéase virale lors de la maturation de la particule virale donne alors naissance aux protéines de la matrice, de la capsid, aux enzymes virales transcriptase inverse, intégrase et protéase, respectivement (79). D'autre part, le précurseur des glycoprotéines virales, gp160, est quant à lui traduit au niveau du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où il est glycosylé et clivé par l'endoprotéase cellulaire furine, pour donner les trimères d'hétérodimères gp120/gp41, associés de façon non covalente et qui seront enchâssés dans la membrane plasmique de la cellule infectée. Les glycoprotéines sont éventuellement incorporées lors du bourgeonnement viral à la membrane plasmique, et les virus sont relargués dans le milieu extracellulaire (80). La maturation des virions se poursuit après relargage pour donner naissance à des particules virales infectieuses.



### **Figure 9 - Cycle de réplication du VIH-1.**

Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible, le génome viral et les enzymes sont libérés dans le cytoplasme. Les molécules d'ARN viral simple brin sont alors rétro-transcrites en ADN double brin grâce à l'action de la transcriptase inverse. L'ADN bicaténaire néosynthétisé est alors adressé au noyau, puis intégré dans l'ADN cellulaire grâce à l'action de l'intégrase, donnant naissance à un provirus. Une fois l'ADN proviral transcrit, les différents ARN messagers viraux sont exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines en utilisant les machineries transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule hôte. L'association de ces protéines virales et de l'ARN viral permet de former de nouvelles particules virales immatures qui bourgeonnent à la membrane plasmique puis sont relarguées dans le milieu extracellulaire. La maturation se poursuit après relargage pour donner naissance à des particules virales infectieuses. Chaque étape du cycle de répliatif du VIH-1 peut-être la cible de molécules antivirales qui sont représentées dans un rectangle bleu. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

## **1.9. La thérapie antirétrovirale**

### *Généralités*

Bien que le VIH-1 a été découvert en 1981, il a fallu attendre 1987 pour que le premier agent antirétroviral (AZT, Zidovudine) soit approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) (81). Aujourd'hui, il existe plus de 30 molécules antirétrovirales disponibles qui peuvent être divisées en 6 classes distinctes selon leur capacité à inhiber les différentes étapes du cycle de réplication du virus (**Figure 9**) : (1) les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, (2) les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, (3) les inhibiteurs d'intégrase, (4) les inhibiteurs de protéase, (5) les inhibiteurs de fusion, et (6) les antagonistes du corécepteur CCR5 (82). Plus tard dans cette section, nous allons nous concentrer sur ces deux dernières catégories d'inhibiteurs.

L'utilisation d'un seul agent antiviral (la monothérapie) n'est pas efficace et est fréquemment associée à l'apparition de formes résistantes du virus (83). Ceci est dû à la haute capacité de la rétrotranscriptase virale à introduire des mutations dans l'ADN proviral, sur laquelle nous reviendrons plus tard. Ainsi, depuis 1997, la trithérapie antirétrovirale (également appelé HAART pour *Highly Active AntiRetroviral Therapy*) qui combine 3 agents antirétroviraux, est devenue la norme de soins utilisée contre l'infection par le VIH-1 (84). Bien que l'avènement de la trithérapie rétrovirale ait considérablement amélioré la qualité et la durée de vie des personnes vivants avec le VIH-1, elle est malgré tout associée à de nombreux inconvénients, notamment les

effets secondaires variés (85), mais également son coût élevé. De plus, ce traitement ne permet pas l'éradication du virus, car le VIH-1 établit des phases de latence en s'intégrant dans le génome de sa cellule hôte, comme nous allons le voir dans une des prochaines sections. Ainsi, l'arrêt de la prise des médicaments se traduit par un rebond de production virale après quelques semaines.

#### *Inhibiteurs d'attachement ou post-attachement à CD4*

Le développement d'inhibiteurs d'entrée du VIH-1 a été réalisé assez rapidement. Les premières tentatives se sont focalisées sur le développement de molécules de CD4 recombinantes solubles (sCD4). Il s'agit de molécules délétées des domaines intracellulaire et cytoplasmique du CD4 mais qui maintiennent leur capacité à lier la gp120 (86). Ces molécules ont été très efficaces *in vitro* mais elles n'ont pas donné de résultats convaincants en clinique (87). D'autres molécules, de nature non peptidique, ont également été développées pour inhiber l'interaction CD4/gp120. Les inhibiteurs Temsavir (BMS-626529) et sa prodrogue Fostemsavir sont des molécules qui se lient au niveau du domaine externe de la gp120 et empêchent l'interaction Env/CD4 (88). De plus, ils stabilisent également la glycoprotéine dans une conformation « fermée » qui est préférentiellement ciblée par plusieurs anticorps largement neutralisants (bNAbs). D'autres stratégies, ciblant le CD4 à la place de la gp120, ont également été développées. L'anticorps Ibalizumab est un anticorps monoclonal humanisé IgG4 dirigé contre le second domaine extracellulaire du CD4 (89). Bien que certains virus aient développé une résistance à cette drogue, l'Ibalizumab est approuvé par la FDA depuis 2018 et est utilisé en association avec d'autres médicaments antirétroviraux.

#### *Inhibiteurs d'attachement à CCR5*

Le rôle majeur du CCR5 dans la pathogénèse du VIH-1 a été mis en évidence par la présence d'une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32) chez certains patients (90). Cette délétion induit un codon stop prématuré amenant éventuellement à une protéine tronquée et la rétention de la protéine mutée dans le réticulum endoplasmique. La protéine n'est ainsi pas exprimée à la surface

cellulaire (91). Les personnes homozygotes pour la délétion (1% de la population caucasienne) possèdent une forte résistance naturelle au VIH-1 tandis que les personnes hétérozygotes pour cette délétion (10-15% de la population caucasienne) progressent beaucoup moins rapidement vers le stade SIDA (92). Cette découverte a évidemment amené de nombreuses équipes à développer des approches pour contrer l'interaction de la gp120 avec le CCR5.

Plusieurs inhibiteurs allostériques, des molécules non peptidiques de faible poids moléculaire, ont été développés (TAK779, Aplaviroc, Vicriviroc, Maraviroc) parmi ces approches. Parmi toutes les molécules, le Maraviroc est le seul antagoniste de CCR5 actuellement utilisé pour le traitement du VIH-1 (44). Il est utilisé en thérapie chez des patients infectés par des souches uniquement à tropisme R5. Le Maraviroc est un inhibiteur qui interagit dans une cavité au sein des 7 domaines transmembranaires de CCR5, le stabilisant dans une conformation inactive. Sous cette forme, l'affinité du CCR5 pour la gp120 est fortement diminuée. Toutefois, des souches R5 résistantes au Maraviroc sont apparues à la suite du traitement (93). Cette résistance peut être liée à la capacité du virus à se lier à des conformations du CCR5 auxquelles le Maraviroc ne peut se fixer.

#### *Inhibiteurs d'attachement à CXCR4*

Plusieurs inhibiteurs dirigés contre CXCR4 ont également été découverts, tels que AMD3100, AMD070 ou AMD3465 (94–96). Cependant, ces inhibiteurs entraînent une forte toxicité et peuvent présenter une activité antivirale faible *in vitro*, si bien qu'aucun inhibiteur de CXCR4 n'a encore été approuvé par la FDA pour inhiber l'infection par le VIH-1 (97).

### **1.10. Pathogénèse du VIH-1**

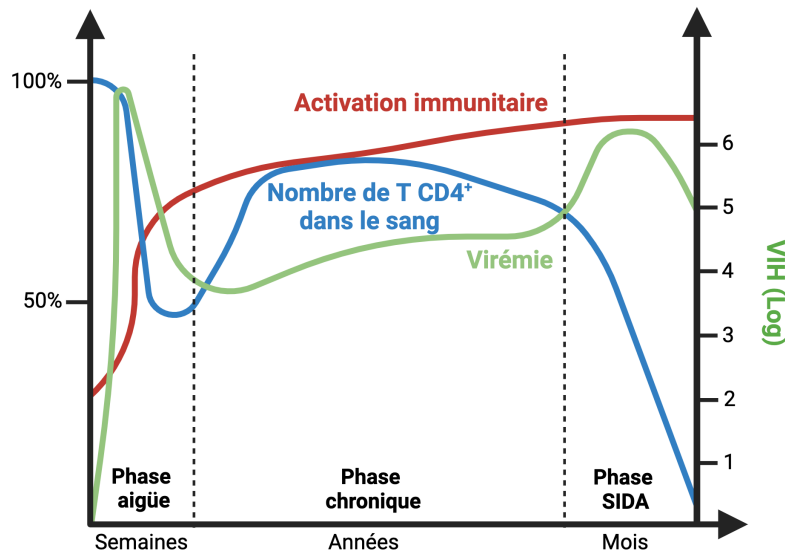
Il existe trois modes de transmission du VIH : par voie sexuelle (la plus fréquente, elle représente 80% des nouvelles infections dans le monde), par voie sanguine et enfin par transmission mère-enfant (materno-foetale, périnatale ou par allaitement) dont l'incidence a fortement diminué ces dernières années (98). À la suite de la

contamination, l'infection par le VIH évolue selon trois phases distinctes (**Figure 10**). Le suivi des marqueurs virologiques et immunitaires permet de définir le stade de l'infection.

La primo-infection survient directement après la transmission du virus et s'étale sur une période de 2 à quelques semaines (99,100). Cette phase peut être asymptomatique ou engendrer des signes cliniques de type syndrome grippal ou mononucléosique. Après une courte période (7 à 10 jours) durant laquelle le virus reste indétectable dans le plasma (on parle de phase d'éclipse), un pic de virémie dû à une réplication très intense du virus est détecté, entraînant une diminution rapide mais transitoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (101). Le virus se dissémine alors dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale). En réponse à la dissémination virale, se met progressivement en place une réponse immunitaire (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et anticorps neutralisants) entraînant une diminution de la charge virale. Au cours de cette phase, le risque de transmission du virus est particulièrement élevé, du fait de l'importante virémie.

À environ 2 à 3 mois post-infection, la phase asymptomatique ou phase chronique se met en place avec une stabilisation de la charge virale plasmatique à un niveau plus ou moins élevé. Il s'agit d'une période longue (entre 5 à 10 ans) au cours de laquelle la réplication continue du virus contribue à diminuer de façon constante le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang (102).

L'accélération de la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> annonce la phase SIDA ou phase symptomatique (103). A ce stade, l'épuisement du système immunitaire ne permet plus la régénération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une augmentation de la virémie survient. L'effondrement des défenses immunitaires (le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> descend sous le seuil de 200 cellules/mm<sup>3</sup>) favorise l'apparition de maladies opportunistes pouvant entraîner, en absence de traitement, le décès du patient.



**Figure 10 - Marqueurs de la progression de l'infection du VIH-1.**

La progression de l'infection est caractérisée par trois phases. Dans la phase aiguë (ou primo-infection), la charge virale augmente rapidement puis chute grâce au développement de la réponse immune spécifique, notamment T cytotoxique. Dans la phase de latence clinique (ou phase asymptomatique), la charge virale, le niveau d'anticorps et le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> restent relativement constants, contrairement au nombre de cellules CD4<sup>+</sup> qui diminue progressivement. Lorsque la phase SIDA est atteinte, le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> est très faible, les niveaux d'anticorps et de cellules CD8<sup>+</sup> chutent tandis que la charge virale augmente. L'effondrement des défenses immunitaires favorise l'apparition de maladies opportunistes pouvant éventuellement entraîner le décès du patient. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et a été adaptée de *Grossman et al., 2006* (102).

Certains individus, appelés contrôleurs *élites* (*ECs, elite controllers*), sont naturellement capable de combattre l'infection par le VIH-1. Ces individus possèdent une charge virale indétectable (ARN VIH < 50 copies/mL) en absence de thérapies antirétrovirales. Ces individus ne progressent pas vers le stade SIDA et maintiennent leur seuil de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à un niveau plus ou moins constant (104). Certains ECs peuvent contrôler l'infection sans aucun traitement pendant de très nombreuses années.

## 2. Réponse immunitaire à l'infection

---

### 2.1. Réponse intrinsèque

À la suite de l'infection par le VIH-1, les cellules de l'hôte vont rapidement se mettre à exprimer (ou expriment déjà) des molécules, appelées facteurs de restriction, qui inhibent la réplication du virus à diverses étapes du cycle répliatif (105). Ils fournissent une ligne de défense initiale contre l'infection, précédant souvent les réponses antivirales innées. Il existe de nombreux facteurs de restriction différents, ainsi, dans cette section, nous allons nous concentrer sur certains facteurs parmi les plus caractérisés (**Figure 11**).

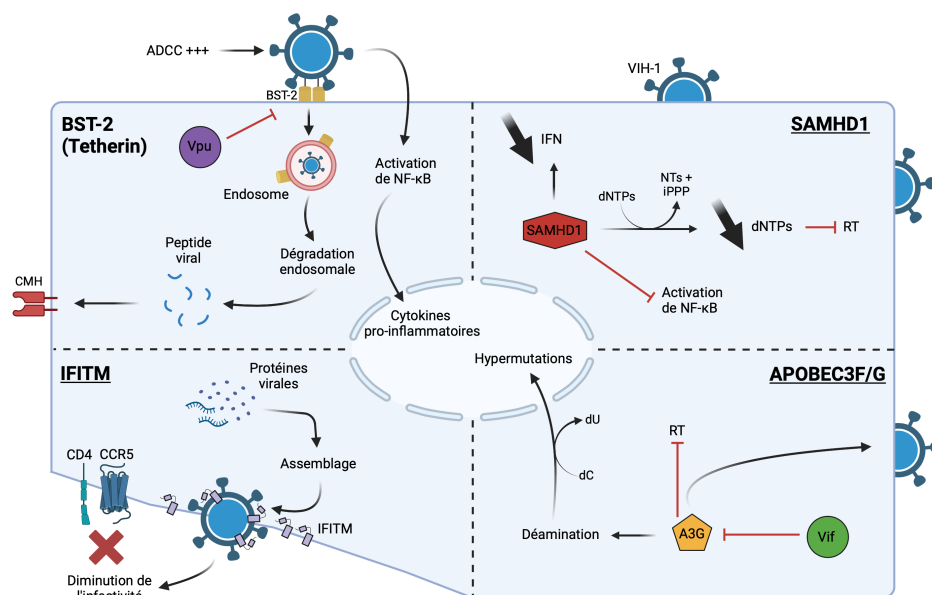
Les protéines APOBEC3F/G (*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3*) catalysent la désamination des désoxynucléotides cytosine (C) en uracile (U). Elles s'associent aux protéines virales et à l'ARN entraînant leur encapsidation dans les virions naissants (106). Dans les cellules nouvellement infectées, APOBEC3F/G induit des hypermutations au niveau de l'ADN proviral, ce qui affecte son intégrité génétique (107,108). Les protéines APOBEC3F/G inhibent également la synthèse de l'ADNc viral en empêchant la translocation de la transcriptase inverse le long de l'ARN viral (109).

La protéine SAMHD1 (*Sterile Alpha Motif and Histidine Aspartate domain-containing protein 1*) est une protéine qui favorise la diminution des niveaux de désoxynucléotide triphosphate (dNTPs) dans les cellules ce qui inhibe la rétrotranscription de l'ARN viral en ADNc. Elle joue un rôle important dans la résistance relative des cellules myéloïdes à l'infection par le VIH-1 (110), toutefois, son rôle dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est plus nuancé. En effet, à la suite de l'activation de ces cellules, SAMHD1 est phosphorylée et perd son activité antivirale. La phosphorylation de SAMHD1 peut être augmentée par les cytokines régulant la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, telles que l'IL-2, l'IL-7 ou encore l'IL-15 (111,112). Ainsi, la quantité de dNTPs disponible dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés est largement suffisante pour assurer la rétrotranscription. La protéine SAMHD1, sous une forme non phosphorylée,

participe en revanche à l'inhibition de la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos (113). Il a également été montré que SAMHD1 supprime les réponses immunitaires innées aux infections virales en inhibant l'activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et l'induction de l'interféron de type I (IFN-I) (114).

La protéine BST-2 (*Bone marrow stromal cell antigen 2*) est une protéine membranaire induite par l'IFN-I qui inhibe la libération des particules virales du VIH-1 à partir des cellules infectées (115,116). Les virions sont retenus à la surface des cellules, puis sont internalisés et dégradés dans les lysosomes cellulaires. La protéine BST-2 exerce une activité antirétrovirale contre une variété de virus enveloppés (117–119).

Les protéines IFITM 1 à 3 (*Interferon-induced transmembrane protein*) sont des protéines transmembranaires qui se colocalisent (en particulier IFITM3) avec les protéines structurales des virions en développement, ce qui entraîne leur incorporation dans les particules virales naissantes lors du processus de bourgeonnement (120). Cette incorporation entraîne une diminution de l'infectiosité des particules virales naissantes selon un mécanisme qui n'est pas encore totalement défini. Une étude a montré que les interactions entre IFITM3 et Env inhibaient le clivage protéolytique du précurseur des glycoprotéines virales gp160, entraînant une diminution de la quantité de gp120/gp41 (121), mais ce résultat doit être nuancé car d'autres études n'ont pas observé de changement dans le niveau d'incorporation des glycoprotéines virales dû aux IFITMs (122).





**Figure 11 - Mode d'action des facteurs de restriction BST-2, SAMHD1, APOBEC3F/G et IFITMs.**

(1) La protéine BST-2 (Tetherin) inhibe la libération des particules virales à partir des cellules infectées et entraîne leur internalisation et dégradation. Son action est contrée par la protéine Vpu. (2) SAMHD1 hydrolyse les désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) en désoxynucléosides (dNs) et en triphosphate inorganique (iPPP). Ce mécanisme favorise la diminution des niveaux en dNTPs dans les cellules ce qui inhibe la synthèse de l'ADNc viral. Son action entraîne également une diminution de la synthèse d'interféron (IFN) et inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B. (3) Les protéines IFITMs sont incorporées dans les particules virales naissantes lors du processus de bourgeonnement ce qui entraîne une diminution de leur infectiosité. (4) APOBEC3F/G catalyse la désamination des désoxynucléotides cytosine (dC) en uracile (dU). Ce phénomène induit des hypermutations au niveau de l'ADN proviral. APOBEC3F/G inhibe également la synthèse de l'ADNc viral. Son action est contrée par la protéine Vif. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et a été adaptée de Colomer-Lluch et al., 2018 (123).

## **2.2. Réponse innée**

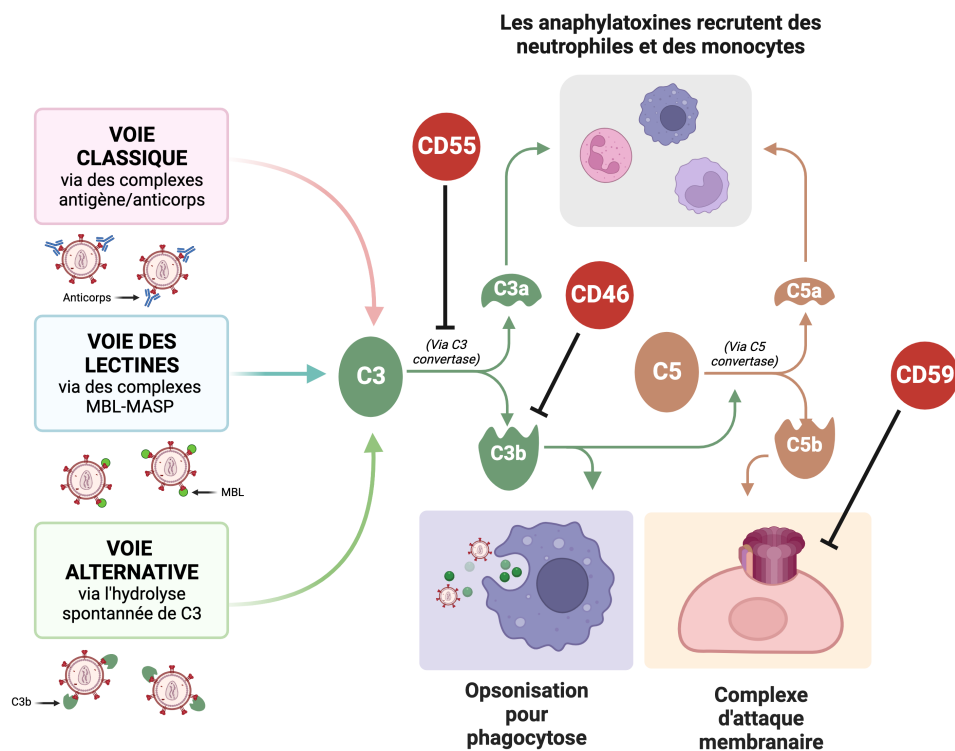
L'identification de pathogènes par les cellules de l'immunité innée se fait par des récepteurs (appelés PRRs pour *Pattern Recognition Receptor*), qui ont la capacité à reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes (appelés PAMPs pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Parmi les PRRs, on retrouve les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de type NOD (NLR), les récepteurs de lectines de type C (CLR), les récepteurs de type RIG-I (RLR), ou encore les capteurs d'ADN cytosolique (124,125). La famille des récepteurs de type Toll (TLR) joue un rôle important dans la reconnaissance des structures moléculaires du VIH-1 par diverses cellules du système immunitaire suite à l'infection (126). Le premier lien entre le VIH-1 et les PRRs a été établi en 2004, dans une étude montrant que l'ARN simple brin riche en guanine-uridine du VIH-1 peut-être reconnu par TLR7/8 et stimuler les cellules dendritiques et les macrophages à sécréter de l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (127). La production de ces cytokines va jouer un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire et l'arrêt de la réplication virale, cependant il est plausible que l'intensité et l'ampleur de cette cascade puissent également contribuer en partie à l'immunopathologie associée à la maladie précoce du VIH-1.

Au cours de l'infection par le VIH-1, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui expriment une vaste gamme de PRRs, jouent un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire (128,129). En effet, ces cellules sont les principales cellules

productrices d'IFN-I dans la réponse immunitaire (130). En réponse à l'infection par le VIH-1, l'IFN-I est rapidement sécrété et va se lier à son récepteur à la surface de la cellule cible. L'engagement avec le récepteur aboutit à une cascade de signalisation (de type JAK-STAT) qui permettra l'induction de différents facteurs de restriction (APOBEC3G, IFITMs, BST-2, SAMHD1, TRIM5 $\alpha$ ...) (131). Cependant, bien que plusieurs études aient montré l'importance de l'IFN-I dans le contrôle de la charge virale et la limite de la transmission (132), une réponse soutenue à l'IFN-I peut devenir néfaste, car elle contribue à augmenter la réponse inflammatoire et la diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (133).

Le système du complément est également un effecteur principal de l'immunité innée. Il se compose d'environ 30 protéines solubles et peut être activé par trois voies distinctes : la voie classique, la voie des lectines, et la voie alternative (134) (**Figure 12**). La voie classique est celle sur laquelle nous allons nous focaliser dans cette section. Les composants de cette voie sont désignés par un C et un numéro. Cette voie peut être activée par l'intermédiaire d'un complexe anticorps/antigène se fixant sur le complexe C1. Cette interaction va activer certaines sous-unités du complexe, menant au clivage des composants C2 et C4 en deux fragments chacun : les fragments C4a et C2b, qui seront libérés dans l'environnement et les fragments C4b et C2a. Ces derniers vont s'associer pour former la C3 convertase classique (C4bC2a), une enzyme qui clive le composant C3 en C3a et C3b (135,136). Toutes les voies du complément finissent par mener à la formation d'une C3 convertase (**Figure 12**). Par la suite, le fragment C3a est libéré dans l'environnement tandis que le fragment C3b s'associe avec C4b et C2a pour former la C5 convertase (C4bC2aC3b), une enzyme qui clive le composant C5 en C5a et C5b (135,136). Cette étape marque la fin de la cascade du complément spécifique à la voie classique. La seconde partie de la cascade du complément, qui sera abordée plus en détail dans le chapitre suivant, permet la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC), le produit final des trois voies d'activation du complément. Le MAC forme un pore lytique dans la membrane de la cellule infectée ou du virion, détruisant l'intégrité de la membrane et entraînant la lyse de la cellule ou de l'agent pathogène étranger.

Le rôle du complément dans la pathogénèse du VIH-1 a de multiples facettes. L'activation de la voie classique par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 se produit lors de leur liaison aux particules virales entraînant la lyse des virions (137). Cette lyse peut se développer rapidement au cours de l'infection et est notamment efficace au cours de la phase aiguë (138). De plus, les glycoprotéines de surface du VIH-1, gp41 et gp120, améliorent encore plus l'activation du complément médiée par les anticorps, car ces glycoprotéines peuvent lier directement des composantes du complément (139,140). Cependant, il a également été montré que le complément peut améliorer la réplication virale. En effet, le dépôt de produits d'activation du complément (tels que le fragment C3 ou C5a) sur les virions du VIH-1 facilite l'interaction avec les monocytes/macrophages ou les cellules dendritiques qui expriment des récepteurs du complément à leur surface (141,142). De plus, le VIH-1 en circulation échappe souvent à la lyse médiée par le complément en partie dû à des régulateurs de l'activation de complément de l'hôte qui sont détourné par le virus à son avantage, comme nous allons l'aborder plus loin.



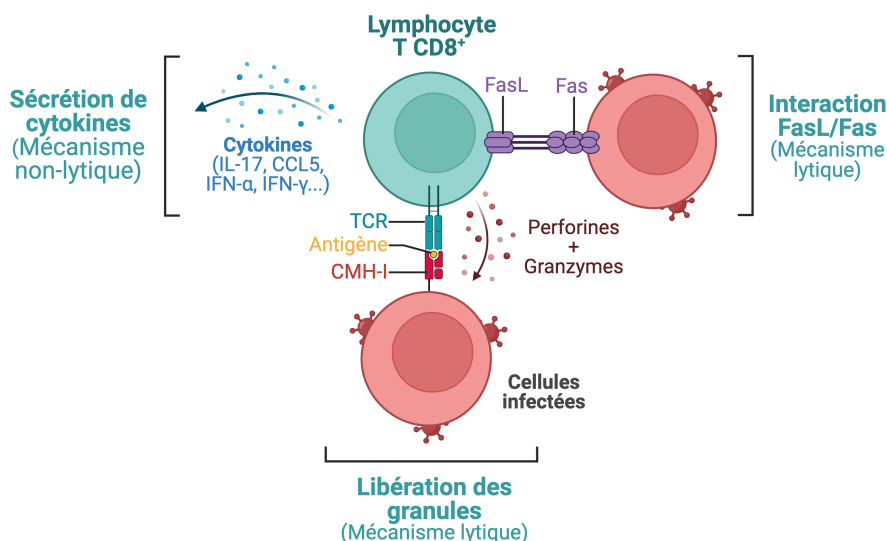
**Figure 12 - Mode d'action du complément.**

Le système de complément peut être activé par trois voies distinctes : la voie classique, la voie des lectines, et la voie alternative. (1) La voie classique est activée par la molécule C1 qui interagit avec un complexe antigène/anticorps ou directement avec l'agent pathogène. (2) La voie des lectines est indépendante des anticorps. Elle est activée

lorsque la lectine liant le mannose (MBL, *mannose-binding lectin*) se lie aux molécules de mannose sur les parois cellulaires bactériennes, fongiques ou des virus. (3) La voie alternative est activée lorsque les composantes des surfaces des cellules microbiennes clivent de petites quantités de C3. Les 3 voies d'activation convergent en une voie finale commune, qui passe par une cascade d'activation impliquant notamment la convertase C3 clivant C3 en C3a et C3b ainsi que la convertase C5 clivant C5 en C5a et C5b. Cette cascade d'activation entraîne l'opsonisation de l'agent pathogène, le recrutement des cellules immunitaires innées ainsi que la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) ce qui aboutit à la lyse de l'agent pathogène. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

### 2.3. Réponse cellulaire

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (ou lymphocytes T cytotoxiques) jouent un rôle au cours de l'infection par le VIH-1. Au cours de la phase aiguë ils vont rapidement progresser en nombre, permettant de contrôler la réplication virale, du moins pendant un certain temps (143). La lyse des cellules infectées par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est principalement médiée par la perforine, une protéine qui entraîne la formation de pores dans la membrane de la cellule infectée, et les granzymes, des protéases à sérine, capables de pénétrer par les pores afin d'induire l'apoptose (144) (**Figure 13**). Cependant une minorité de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> utilisent une voie alternative où le ligand Fas exprimé sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés par l'antigène déclenche l'apoptose dans les cellules cibles qui expriment le récepteur Fas (145). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 produisent également des chimiokines qui peuvent inhiber la réplication du VIH-1, comme MIP-1alpha (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1beta (MIP-1 $\beta$ ) et RANTES, par concurrence ou régulation à la baisse du CCR5 (146).



**Figure 13 - Mode d'action des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au cours d'une infection par le VIH-1.**

(1) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> initient l'apoptose par la sécrétion de perforines et de granzymes, deux types de protéines cytotoxiques. Les perforines sont des protéines cytolytiques qui forment des pores dans la membrane cellulaire des cellules ciblées. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> utilisent ces pores pour diriger la libération de granzymes, une classe de protéases sérine qui entraîne l'apoptose. (2) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent également induire l'apoptose par le biais d'interactions ligand Fas-Fas. Chaque fois que le ligand Fas (FasL) se lie au récepteur Fas sur les cellules ciblées, une série de molécules de signalisation initie l'apoptose. (3) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent libérer des chimiokines affectant la réplication virale. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et a été adaptée de *Perdomo-Celis et al., 2019* (147).

Les cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*) peuvent être considérées comme une composante à l'interface des immunités innée et adaptative. Contrairement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les cellules NK sont des lymphocytes granulaires qui n'expriment pas de récepteur spécifique à l'antigène. Leur cytotoxicité est activée dès lors que la cible n'exprime pas de molécules complémentaires aux récepteurs KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*) (148). Les récepteurs KIR interagissent avec les molécules CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I), et peuvent faire la distinction entre les variantes alléliques du CMH-I, ce qui leur permet de détecter les cellules infectées par un virus qui a développé des stratégies pour réguler le CMH-I à la baisse afin d'échapper aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Au cours d'une infection par le VIH-1, les cellules NK interviennent de différentes façons. Notamment, les cellules NK peuvent être activées par des stimuli dépendants des anticorps et entraîner la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) sur les cellules infectées (149). Les cellules NK peuvent également provoquer la lyse des cellules infectées à l'aide de granules cytolytiques composées de perforine et granzyme, comme mentionné plus haut (150). Il a également été montré que les cellules NK produisent de grandes quantités de  $\beta$ -chimokines (CCL3, CCL4 et CCL5) qui sont des ligands naturels pour le CCR5, inhibant ainsi l'entrée virale (151).

#### **2.4. Réponse humorale**

À la suite de l'infection par le VIH-1, une réponse humorale est rapidement mise en place (152). Dans un premier temps, il y a une réponse spécifique non neutralisante: les anticorps dirigés contre la gp41 apparaissent en premier (13 jours en moyenne,

suite à l'infection), suivi d'anticorps dirigés contre la gp120 (27 jours en moyenne, suite à l'infection) (153). Bien que ces anticorps apparaissent très tôt, ils ne possèdent aucun pouvoir de neutralisation (154). Cependant, ces anticorps peuvent contribuer à l'activité antivirale via le récepteur au fragment constant Fc des anticorps et entraîner l'activation du complément ou encore l'ADCC que nous avons mentionné précédemment (155).

Dans un second temps, environ 3 mois après la séroconversion, une réponse autologue neutralisante se met en place chez la majorité des individus infectés par le VIH-1 (156). Ces anticorps ont un spectre d'activité neutralisante relativement étroit : ils sont généralement dirigés contre le variant autologue responsable de l'infection et ne neutralisent peu ou pas les souches hétérologues (157). Ces anticorps ciblent des régions hautement variables des glycoprotéines de l'enveloppe (principalement au niveau des boucles V1/V2 et de la boucle V3), ce qui explique leur spécificité étroite (158–160). Ils ne protègent pas contre la progression vers le stade SIDA mais exercent une pression de sélection aboutissant à l'échappement rapide du virus (161,162), que nous aborderons dans la section qui suit.

Enfin, environ 10 à 25% des individus infectés développent des anticorps largement neutralisants (bNAbs, *broadly neutralizing antibodies*), également appelés anticorps à large spectre, après plusieurs années d'infection. Ces anticorps ciblent des épitopes très conservés et sont capables de neutraliser une grande variété de souches du VIH-1 (163) (**Tableau 2**). L'apparition tardive de ces anticorps suggère qu'une stimulation prolongée par les antigènes viraux est nécessaire pour leur développement (153). En outre, plusieurs études ont montré que la détection des anticorps largement neutralisants était souvent associée à une virémie élevée, ce qui suggère qu'une forte réplication du virus est nécessaire pour favoriser leur apparition (164,165). De plus, il a également été montré que les co-infections ou surinfections favorisent la production de ces anticorps, notamment lorsque les souches impactées sont de sous-types différents (166,167). Les anticorps largement neutralisants peuvent être classés en deux catégories : les anticorps de première génération (avant 2009) et les anticorps de nouvelle génération (**Tableau 2**). En effet, les données collectées ont permis

d'identifier qu'une petite fraction des individus infectés développant des anticorps largement neutralisants (environ 1%), appelés neutralisateurs élités, développent des anticorps capables de neutraliser la très grande majorité des virus circulants et avec des titres encore plus élevés (168,169). La découverte de ces sujets neutralisateurs élités, associée au développement des nouvelles technologies, a ainsi permis l'isolation d'une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux neutralisants, beaucoup plus puissants et avec un spectre d'activité plus large (170–172). Dans notre étude, nous avons utilisé l'anticorps PGT121, un puissant anticorps de deuxième génération, qui cible la région V3 de la gp120 (173).

**Tableau 2 - Récapitulatif des anticorps largement neutralisants existants ainsi que la région de leurs épitopes dans les glycoprotéines virales.**

	Boucle V1/V2	Boucle V3	Site de liaison au CD4	Interface gp120/gp41	MPER
1 <sup>ère</sup> génération d'anticorps largement neutralisants		447-52D 2G12	b12		2F5 4E10 Z13E1
Nouvelle génération d'anticorps largement neutralisants	PG9 PG16 PGT141-145 CH01-04 PGDM1400 CAP256- VRC26.25 VRC38 PCT64	PGT121 PGT126 PGT128 PGT135 10-1074 PCDN-33A PGDM12 PGDM21 VRC29.03 BF520.1 VRC41 BG18 DH270	VRC01 3BNC117 PGV04 8ANC131 CH103 CH235 N6 IOMA N49	PGT151-158 8ANC195 35022 N123- VRC34.01 ACS202	10E6 DH511

### **3. Mécanismes d'évasion à la réponse immunitaire**

---

#### **3.1. Les protéines accessoires**

Le VIH-1 s'est adapté à la réponse immunitaire décrite précédemment et possède plusieurs protéines accessoires qui lui permettent de contrer cette réponse.

La protéine virale Vif (23 kDa) est exprimée tard dans le cycle de réplication virale. Elle joue un rôle important dans l'infection puisque son absence altère la réplication virale dans des modèles d'infection *in vivo* (174). Vif a pour fonction de contrer le facteur de restriction APOBEC3G et agit à la fois en altérant la traduction de l'ARNm d'APOBEC3G, mais également en accélérant sa dégradation post-traductionnelle par le protéasome, diminuant son incorporation dans la particule virale (175). La protéine Vif a également d'autres fonctions plus secondaires comme l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (176) ou encore l'inhibition de l'interféron (177).

La protéine virale Vpu (16 kDa) est produite à partir d'un ARNm bicistronique codant également pour Env. Elle a pour fonction principale de contrer le facteur de restriction BST-2. Au cours de l'infection, BST-2 est intercepté par Vpu dans le système vésiculaire, ce qui entraîne sa séquestration dans les endosomes puis sa dégradation (178). Vpu peut également interagir directement avec BST-2 à la surface cellulaire pour empêcher son incorporation dans les virions bourgeonnants. Elle participe également à l'augmentation de l'infectivité des virions par la dégradation du récepteur CD4 (179). La protéine Vpu possède également d'autres fonctions secondaires. Par exemple, elle est capable de contrer les réponses antivirales sollicitées par NF- $\kappa$ B (180), de contribuer à l'évasion de la réponse immunitaire adaptative en diminuant les ligands de récepteurs activateurs des cellules NK (NTB-A) et des cellules T CD8<sup>+</sup> (HLA-C) (181,182), ou encore de bloquer la transmigration lymphocytaire vers les tissus, notamment en ciblant le récepteur CCR7 (183).

La protéine Nef (27 kDa) est produite précocement dans le cycle de réplication virale. Conjointement avec Vpu, la protéine virale Nef diminue le niveau de CD4 à la surface



des cellules infectées (l'effet médié par Nef est plus drastique que l'effet médié par Vpu) (179). La diminution rapide et constante de l'expression de CD4 à la surface cellulaire permet de limiter la surinfection des cellules et contribue ainsi à l'évasion immunitaire du virus, notamment en protégeant les cellules infectées de l'ADCC (dû aux changements conformationnels affectant la fixation des anticorps) (184). Elle permet également une régulation négative des facteurs de restriction SERINC3 et SERINC5 afin d'améliorer l'infectivité virale (185). La protéine Nef induit également la diminution de l'expression du CMH-I (types HLA-A et HLA-B) à la surface des cellules infectées, ce qui permet de protéger ces cellules de la réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (186). De plus, Nef perturbe également la présentation antigénique médiée par le CMH-II par une double stratégie qui comprend une réduction des niveaux de surface cellulaire des molécules CMH-II matures chargées de peptides et une régulation à la hausse des molécules CMH-II immatures (187).

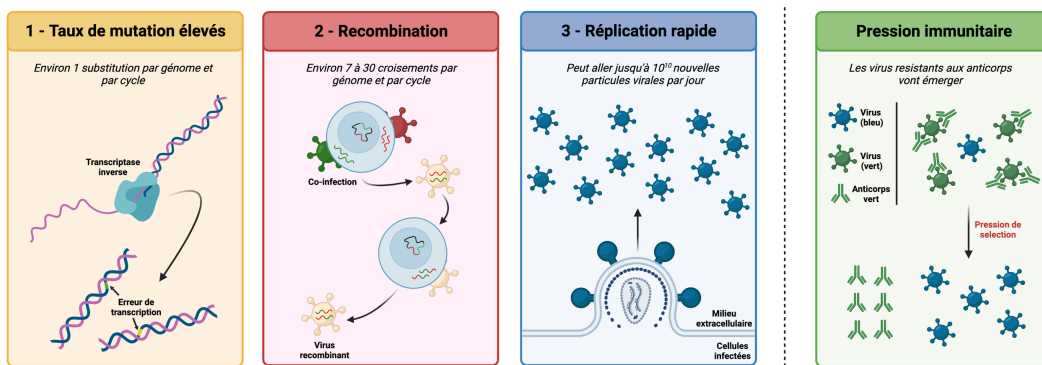
Le rôle de la protéine Vpr (14 kDa) est beaucoup moins défini. Cependant, sa présence améliore la réplication du VIH-1 dans les macrophages primaires et les cellules dendritiques par des mécanismes qui ne sont pas totalement élucidés, mais qui inclut une réduction de l'induction de l'IFN et une augmentation du niveau d'expression d'Env (188,189). De plus, la protéine Vpr est également responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (190).

### **3.2. La diversité génétique**

Comme décrit précédemment, la diversité génétique du VIH-1 est illustrée par les nombreux sous-types ou formes recombinantes qui circulent à l'échelle mondiale. Cependant, on retrouve aussi cette diversité génétique au sein d'un individu infecté étant donné la présence du grand nombre de variants du virus : en effet, pour désigner la population virale au sein d'un individu infecté, on utilise le terme de quasi-espèce virale. Cette diversité génétique s'explique par des phénomènes liés à l'hôte, mais également par des propriétés intrinsèques au VIH-1 (**Figure 14**).

Les phénomènes liés à l'hôte se traduisent essentiellement par la très forte sélection exercée par le système immunitaire tel que mentionné brièvement plus haut. En effet, la région codante *env* est particulièrement variable, et comme nous l'avons vu, les glycoprotéines d'enveloppe sont la cible des anticorps neutralisants générés par le système immunitaire en réponse à l'infection. Ainsi, sous la pression de sélection par les anticorps neutralisants, les virus qui possèdent des mutations leur conférant une résistance aux anticorps vont émerger (156).

À cela, s'ajoute des propriétés intrinsèques au virus. La transcriptase inverse du VIH-1 étant dépourvue d'activité correctrice 3'-5' exonucléase, son taux d'erreur est très important entraînant un taux de mutation élevé (191). De plus, des recombinaisons peuvent se produire à la suite de la co-infection d'une même cellule par deux virus génétiquement distincts (192). Enfin, le taux de réplication du VIH-1 est très élevé : la production de nouvelles particules virales peut aller jusqu'à  $10^9$  virus par jour et par individu (193). Ces paramètres combinés génèrent une grande variabilité génétique.



**Figure 14 - Les différents mécanismes de diversité du VIH-1.**

La diversité génétique du VIH-1 est le résultat de plusieurs facteurs : un taux de mutation élevé introduit par la transcriptase inverse, des recombinaisons lors d'une co-infection d'une même cellule par deux virus génétiquement distincts, et un taux de réplication du virus très élevé. A ceci, s'ajoute la pression de sélection exercée par la réponse immunitaire, qui favorise l'émergence de variants résistants aux anticorps. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

### **3.3. Incorporation de protéines de l'hôte dans l'enveloppe virale**

#### *Généralités*

Au cours du processus de bourgeonnement, le VIH-1 détourne de nombreuses protéines de l'hôte présentes à la surface de la cellule afin de les incorporer dans son

enveloppe ; ceci est souvent fait dans l'optique de contrer la réponse immunitaire. Ici, nous allons passer en revue certaines de ces protéines les plus importantes.

L'incorporation des molécules du CMH-I et du CMH-II dans l'enveloppe virale est bien établie. Le niveau des molécules de CMH retrouvé sur les virions peut varier en fonction du type de cellule infectée, de la souche virale, et de la variabilité des donneurs mais étonnamment la quantité de molécules de CMH est plus élevée que celle des glycoprotéines virales. La présence des molécules du CMH accentuent l'infectivité du virus, notamment en améliorant la liaison avec CD4 (194).

Le VIH-1 incorpore également les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM, *Intercellular Adhesion Molecule*) dans son enveloppe virale, notamment ICAM-1 (195). ICAM-1 est le ligand apparenté de LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*). L'interaction ICAM-1 et LFA-1 est importante dans l'activation des lymphocytes T, leur migration et, dans le contexte d'une infection par le VIH-1, lors de la formation de syncytia. Ce phénomène cytopathique se caractérise par de multiples fusions cellulaires qui conduit à la formation d'une cellule multinucléée géante qui libère de très nombreux virions suite à sa lyse (196). L'incorporation des ICAMs dans l'enveloppe virale favorise les interactions avec LFA-1, et donc l'infection.

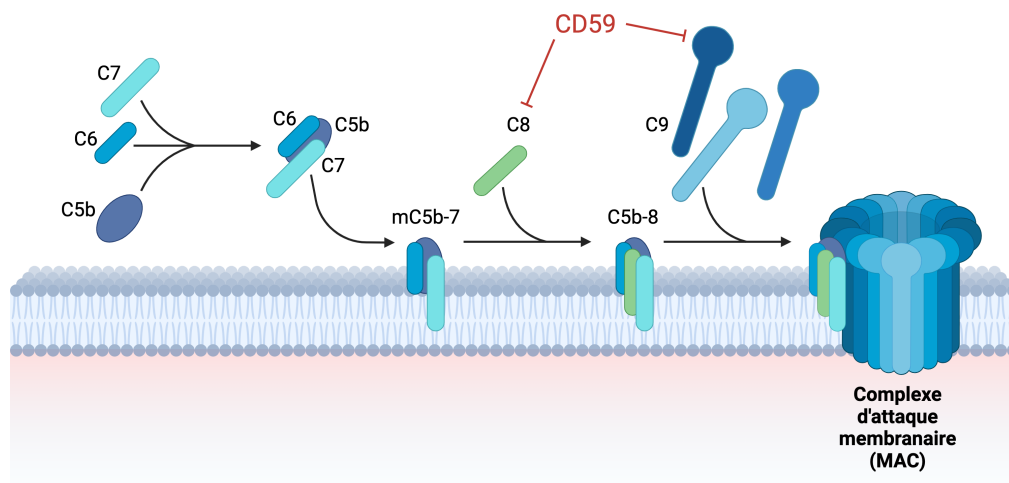
Le VIH-1 incorpore également dans son enveloppe de nombreuses protéines activatrices ou régulatrices du système du complément : CD46, CD55 et CD59 (**Figure 12**) (197,198). Ces protéines permettent aux virions d'être protégés de la lyse médiée par le complément. En effet, CD46 agit comme un inactivateur de C3b et C4b (199), tandis que CD55 prévient la formation des C3 et C5 convertases (200). Mais dans le contexte de notre étude, nous allons particulièrement nous intéresser à la protéine CD59, également appelé *MAC-Inhibitory Protein* ou *protectin*, qui comme son nom l'indique, contrôle la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC).

### *La protéine CD59*

CD59 (cluster de différenciation 59) est une protéine ancrée au GPI (glycophosphatidylinositol) d'approximativement 20 kDa, qui est présente à la surface

d'une grande variété de cellules (leucocytes, érythrocytes, cellules épithéliales et endothéliales...). Elle contient huit sites potentiels d'O-glycosylation et un site de N-glycosylation dont le rôle est controversé (201). En effet, des études suggèrent que l'élimination ou la modification des N-glycanes élimine ses propriétés inhibitrices du complément (202,203), tandis que d'autres études ont montré l'inverse (204). CD59 est le principal inhibiteur du MAC chez l'humain et peut également influencer la capacité de la prolifération des lymphocytes T et leur capacité à produire des cytokines (205).

Le MAC est un assemblage multimoléculaire composé de plusieurs protéines du complément (C5 à C9) (206). Au cours de la cascade d'activation du complément, la protéine C5b (illustrée dans la précédente **Figure 12**) va former un complexe avec les protéines C6 et C7. À la suite de la formation du complexe C5b-C7, un site de liaison est exposé sur C7, ce qui permet au MAC en cours de formation de lier les membranes cellulaires. Par la suite, C8 ainsi que plusieurs protéines C9 sont incorporées dans le complexe ce qui permet la formation d'un pore fonctionnel à travers la bicouche permettant l'assemblage complet du MAC et la lyse cellulaire. La protéine CD59 empêche la lyse en se liant aux protéines C8 ou C9, interférant ainsi avec l'assemblage final du MAC (**Figure 15**).



**Figure 15 - Formation du MAC et mode d'action de CD59.**

Le complexe d'attaque membranaire (MAC) est constitué de plusieurs protéines du complément (C5 à C9). Au stade d'assemblage C5b-7, un site de liaison est exposé sur C7 ce qui permet au MAC en croissance de lier les membranes cellulaires. La liaison de C8 permet la création du complexe C5b-C8 au niveau de la membrane cellulaire. Par la suite, plusieurs protéines C9 sont incorporées au complexe, ce qui va entraîner la formation d'un pore fonctionnel à travers la membrane cellulaire. Le complexe C5b-C9

constitue la forme finale et fonctionnelle du MAC. La protéine CD59 interfère avec l'assemblage final du MAC en interagissant avec C8 (au niveau de sa sous-unité  $\alpha$ ) et les protéines C9 (au niveau du fragment C9b) ce qui perturbe leur incorporation au complexe C5b-7. L'illustration a été réalisée à l'aide de BioRender.com et a été adaptée de *Doorduyn et al., 2020 (207)*.

Dans le contexte d'une infection par le VIH-1, il a été clairement montré que le virus incorpore et détourne la protéine CD59 pour se protéger de la lyse médiée par le complément dépendante des anticorps (ADCML) (198). De même, la présence de CD59 protège également les cellules infectées de l'ADCML en présence de sérum de patients infectés par le VIH-1 (208). De plus, il a également été montré que le blocage de la fonction biologique de CD59 restaure la sensibilité des virions et des cellules infectées à l'ADCML, que ce soit par des anticorps non-neutralisants ou neutralisants (209,210), confirmant le rôle important du détournement de CD59 dans les mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire mis en place par le virus.

### **3.4. L'établissement de la latence**

Comme nous l'avons annoncé précédemment, la thérapie antirétrovirale ne permet pas d'éliminer complètement le virus. En effet, au cours de son cycle de réplication virale, le VIH-1 établit des phases de latence, ce qui correspond à un état d'infection réversible où les cellules infectées contiennent de l'ADN proviral intégré mais ne produisent pas de particules virales. Ainsi, ces cellules ne peuvent pas être détectées par le système immunitaire et survivent à la thérapie antirétrovirale. Tout arrêt du traitement entraîne donc un rebond de la charge virale plasmatique quelques semaines suivant l'interruption.

La latence s'établit très tôt au cours de l'infection par le VIH-1. En effet, l'initiation de la thérapie antirétrovirale dans les 10 jours qui suivent l'infection n'est pas suffisante pour empêcher l'établissement des réservoirs (211,212). La latence peut s'établir selon deux modalités différentes. La première, dite latence pré-intégrative, survient avant l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Elle est surtout présente dans les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, mais son impact dans la persistance à long terme du virus est mineur (213). La deuxième, dite latence post-intégrative, est plus importante et survient lorsque l'expression des gènes viraux est réprimée après

l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Une fois la latence établie, des mécanismes assurant le maintien de celle-ci vont entrer en jeu. Ces mécanismes reposent essentiellement sur l'organisation de la chromatine. Ainsi, l'hétérochromatine, qui est une forme compacte et condensée, empêche les facteurs transcriptionnels d'accéder à l'ADN du promoteur pour initier la transcription des gènes, contrairement à l'euchromatine, qui est une forme plus relâchée (214). Le passage d'une forme à l'autre est assuré par des modifications épigénétiques. Par exemple, la forme compacte est associée à plusieurs modifications (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation, ou sumoylation) des histones (histones H3 et H4) (215). La latence peut également être maintenue à l'aide de mécanismes non-épigénétiques : par exemple, la séquestration dans le cytoplasme de facteurs de transcription inductibles tel que le facteur P-TEFb (216).

Le réservoir latent est le principal obstacle à l'éradication du VIH-1. Plusieurs facteurs biologiques influencent la persistance de ces cellules, tel que leur localisation anatomique, leur susceptibilité à l'infection et leur état d'activation, ainsi que leur durée de vie. Ces points font l'objet d'une première partie dans une revue de littérature présentée dans le chapitre suivant.

Les microARN (miARN) jouent également un rôle dans la persistance du VIH-1. Ces ARN non codants, d'une vingtaine de nucléotides, contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel via un mécanisme très similaire à l'interférence par l'ARN. Dans la deuxième partie du prochain chapitre, nous reviendrons plus en détail sur la biogénèse et le fonctionnement des miARN. De plus, nous proposerons une synthèse de la littérature concernant le rôle des miARN dans l'infection par le VIH-1. Dans ce contexte, nous discuterons de plusieurs miARN et de leur implication dans les différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1, allant de l'entrée virale à la traduction des gènes du virus. Nous aborderons également plusieurs exemples de miARN qui favorisent le maintien de la latence dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou les monocytes/macrophages. Enfin, nous aborderons dans une dernière section quelles seraient les stratégies thérapeutiques basées sur les miARN qui pourraient être mises en place afin de contrer l'établissement d'une infection latente.

## **4. Latence virale et rôle des miARN dans l'infection par le VIH-1 (revue de littérature)**

---

**Contexte :** Cette section correspond à une revue de littérature intitulée « Des petits ARN qui voient grand : les microARN et la persistance du VIH-1 » par Nicolas Bellini, Robert Lodge et Éric A. Cohen.

**Statut de la revue :** Cette revue a été publiée dans la revue Virologie, Volume 26, numéro 1 (Janvier-Février 2022).

**Contribution détaillée de chacun des auteurs :** Ma contribution personnelle à cette revue est de 70%. J'ai participé tout d'abord à la structure de la revue. J'ai rédigé les premières versions des sections suivantes de la revue : « introduction », « les réservoirs et la latence virale », « les miARN : un rôle dans l'établissement de la latence virale dans - les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> », « - dans les macrophages/monocytes », « les miARN pour maintenir ou contrer la latence » ainsi que « conclusion ». Enfin, j'ai réalisé l'intégralité des figures illustrant la revue.

Robert Lodge a participé à la structure de la revue et à l'écriture des sections suivantes : « les miARN et leur rôle dans l'infection par le VIH-1 » ainsi que « l'entrée, une étape du cycle viral modulée par les miARN ». Il a contribué à la révision des textes et des figures.

Éric A. Cohen a participé à la structure de la revue ainsi qu'à la complétion, correction et relecture de l'ensemble de la revue.

**Résumé :** La thérapie antirétrovirale (TAR) inhibe la réplication du VIH-1 mais n'est pas curative. Pendant la TAR, le génome intégré du VIH-1 persiste principalement dans les lymphocytes T mémoires CD4<sup>+</sup> ainsi que dans d'autres cellules immunitaires, notamment les cellules myéloïdes comme les macrophages. La majorité de ces cellules ne produisent pas de particules virales infectieuses et constituent le réservoir latent. D'importants progrès ont été réalisés dans l'identification des facteurs qui contribuent à l'établissement et au maintien du réservoir latent qui demeure le principal obstacle à l'éradication du VIH-1. Dans cette revue, nous mettrons en relief le rôle des microARN dans le développement des réservoirs viraux vu que ceux-ci sont d'importants modulateurs de l'expression génique, ciblant des facteurs de transcription ainsi que d'autres effecteurs nécessaires à l'infection productive du VIH-1. Certains microARN ciblent même directement les transcrits viraux. Nous soulignerons les grandes questions en suspens sur la participation active des microARN de l'hôte aux mécanismes de persistance virale et notamment ceux régissant la latence virale. Finalement, compte tenu des stratégies actuelles qui ne permettent toujours pas de réduire efficacement les réservoirs viraux, les perspectives quant à l'utilisation des microARN comme approche pour contrer la persistance des réservoirs latents seront discutées.

#### **4.1. Introduction**

Le développement de la thérapie antirétrovirale (TAR) combinée pour la suppression de la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) représente une avancée remarquable de la médecine moderne. Bien que ces traitements améliorent la santé et prolongent la vie des personnes vivant avec le VIH-1, la TAR n'est pas curative. L'incapacité des traitements actuels d'éradiquer l'infection découle des propriétés du virus à persister dans plusieurs types de cellules et tissus (217). À l'arrêt des traitements, la virémie rebondit rapidement, entraînant une morbidité et une mortalité accélérées soulignant la nécessité d'un traitement continu durant la vie de la personne infectée. Un des modes de persistance est celui établi dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires qui hébergent des formes intégrées latentes du



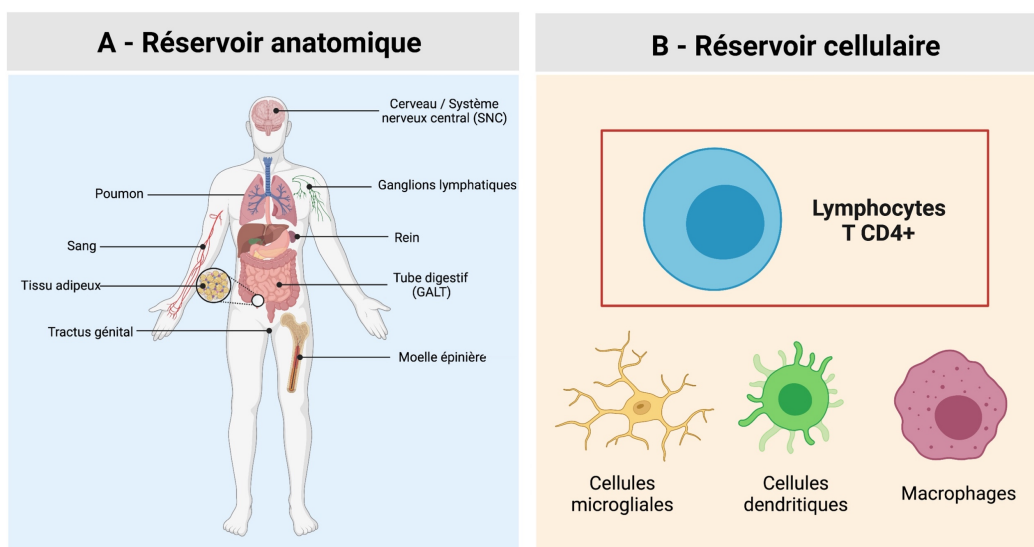
génomique virale qui sont compétentes pour la réplication virale. Sous cette forme, le virus n'est pas affecté par les médicaments antirétroviraux ou les réponses immunitaires, formant ainsi un réservoir latent (218). Toutefois, si la cellule hôte est activée par un stimulus d'activation, la latence peut être inversée et la cellule peut commencer à produire de nouvelles particules virales infectieuses se traduisant par un rebond de la virémie en cas d'interruption du traitement (218,219). Bien que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires représentent le réservoir latent du VIH-1 le mieux caractérisé, de plus en plus de données suggèrent que d'autres cellules à longue durée de vie comme certains types de macrophages tissulaires favorisent la persistance virale et contribuent au rebond de virémie lors d'une interruption de traitement (220). Il est donc impératif de mieux comprendre les mécanismes permettant l'établissement de ces réservoirs et notamment les facteurs de l'hôte qui régissent la susceptibilité de ces cellules à l'infection et la latence virale. L'identification et la caractérisation du rôle de ces facteurs cellulaires dans la persistance virale sont des prérequis nécessaires afin d'informer et guider le développement d'approches thérapeutiques destinées à éliminer ou du moins contrôler les réservoirs viraux qui persistent en présence de TAR.

Dans cette revue, nous ferons une synthèse des progrès récents dans l'étude des mécanismes permettant l'établissement et la persistance des réservoirs viraux dans les lymphocytes T mémoires et les macrophages en mettant en relief le rôle des microARN (miARN) codés par ces cellules dans ces processus. Nous noterons également les propriétés de régulation de l'expression génique des miARN qui demeurent peu définies et soulignerons les questions qui sont toujours en suspens. Finalement, nous mettrons en avant comment l'étude et l'utilisation de ces miARN pourraient mener à de nouvelles approches innovantes pour contrer l'établissement et la persistance de ces réservoirs viraux.

#### **4.2. Les réservoirs et la latence virale**

Le VIH-1 est un rétrovirus appartenant au genre des lentivirus. Les rétrovirus ont la particularité de convertir leur information génétique sous forme de deux molécules

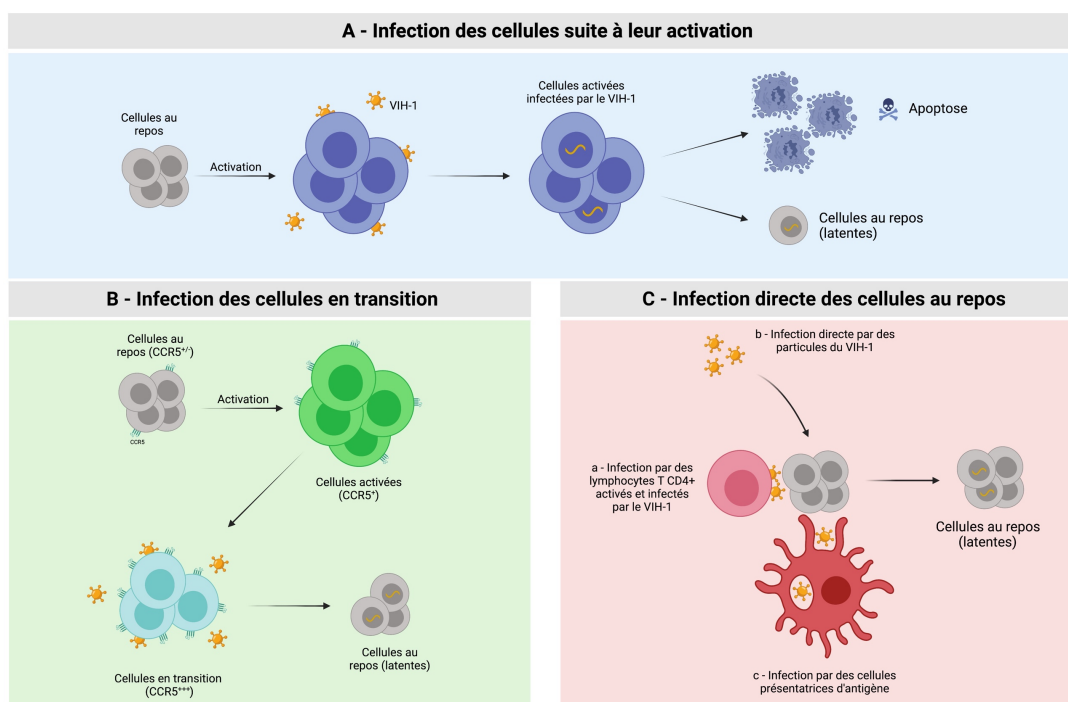
d'ARN simple brin en un ADN proviral double brin à travers un processus de transcription inverse (221). Par ailleurs, leur cycle d'infection productif passe par l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte par l'action de l'intégrase virale (222). La latence virale est la capacité d'un virus pathogène de persister à l'état dormant dans une cellule hôte, c'est-à-dire sans production de nouveaux virions. La latence du VIH-1 peut-être sous deux formes. La première, dite latence pré-intégrative, survient avant l'intégration de l'ADN dans le génome de la cellule hôte ; cependant sa contribution à la persistance virale est très minoritaire. Au contraire, la latence post-intégrative représente le mécanisme majoritaire qui contribue à la persistance du VIH-1. La suppression de la transcription du VIH-1 contribue fortement à l'établissement et au maintien de la latence post-intégrative. Parmi les facteurs qui modulent cette transcription, citons d'abord l'organisation de la chromatine dont un état compact par l'introduction de modifications épigénétiques, inhibe la transcription des gènes (223). En effet, l'initiation de la transcription des gènes viraux nécessite un accès au promoteur viral par des régulateurs transcriptionnels cellulaires clés, tels que NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-B*) ou NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (224). Le VIH-1 code également le transactivateur Tat (*Trans-Activator of Transcription*), qui interagit avec plusieurs facteurs d'élongation transcriptionnelle cellulaires, incluant pTEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*), afin de stimuler la transcription des gènes viraux (225). L'établissement d'une infection latente par le VIH-1 dans une population cellulaire contribue à la formation du réservoir viral (**Figure 16**).



**Figure 16 - Le réservoir latent du VIH-1 est présent dans de nombreux tissus et types cellulaires.**

(A) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> trouvés entre autres dans le sang périphérique sont la principale source du réservoir du VIH-1. Les tissus lymphoïdes, comme le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), ainsi que le système nerveux central (SNC), dû à la présence de cellules myéloïdes à durée de vie très longue (microglies et macrophages), agissent aussi comme réservoirs viraux. De plus, des tissus tels que les reins, les poumons, le tissu adipeux, le tractus génital, peuvent également contenir des cellules hébergeant un provirus latent. (B) Les tissus qui agissent comme réservoirs contiennent des cellules qui peuvent héberger des virus latents : majoritairement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (sang et tissus lymphoïdes), mais aussi les macrophages (poumons, cerveau, tractus génital). Ces nombreuses cellules aux propriétés uniques contribuent à la persistance du VIH-1 en présence de TAR.

L'un des réservoirs principaux du VIH-1 se trouve dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, principalement les cellules mémoires centrales et mémoires transitionnelles (219). De plus, les lymphocytes mémoires T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> (*C-C motif Chemokine Receptor 6*) contiennent de fortes quantités de virus intégrés par rapport aux lymphocytes mémoires T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> (226). Ces cellules, ayant la capacité de migrer vers les ganglions et l'intestin, pourraient contribuer à l'infection et à la persistance du VIH-1 dans ces sites privilégiés. Bien que l'on ne sache toujours pas précisément comment le virus établit une latence dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'une des hypothèses actuelles postule que l'infection latente découlerait de l'infection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (214). L'infection entraînerait dans la majorité des cas une mort cellulaire rapide suite aux effets cytopathiques du virus, mais une minorité d'entre elles pourraient survivre et revenir vers un état mémoire au repos. Le résultat serait une forme silencieuse du génome viral dans une cellule à longue durée de vie (**Figure 17A**). Plus récemment, Shan *et al.* ont avancé une autre hypothèse suggérant que la latence découlerait de l'infection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans un délai très bref suite à leur activation (69). Ces cellules seraient caractérisées par une expression accrue du corécepteur CCR5 (*C-C motif Chemokine Receptor 5*) facilitant l'entrée du virus, et dans un même temps, un environnement peu propice à l'expression des gènes du VIH-1, favorisant une infection latente (**Figure 17B**). Une dernière hypothèse serait l'infection directe des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos, malgré leur incapacité à produire des particules infectieuses due à la présence de nombreux facteurs de restriction qui bloquent des étapes précises du cycle de réplication virale (213) (**Figure 17C**).



**Figure 17 - Établissement d'une infection latente dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

(A) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos sont peu sensibles à l'infection par le VIH-1 dû à de nombreux facteurs de restriction. Cependant, à la suite d'une activation, les cellules deviennent particulièrement susceptibles à l'infection. À la suite de cette infection, la majorité des cellules T CD4<sup>+</sup> vont être détruites, dû en partie aux effets cytopathiques du virus. Cependant, certaines cellules survivent et reviennent à un état de repos. Le résultat est une forme silencieuse du génome viral dans une cellule à longue durée de vie. (B) L'expression du corécepteur CCR5 varie entre les différents états des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à la suite de leur activation. Ainsi, il existe une population de cellules dans un état de « transition » (ni activée, ni mémoire) qui expriment fortement le CCR5, mais qui présentent un environnement peu favorable à l'expression des gènes du VIH-1 : ceci favorise une infection latente. (C) L'infection directe des cellules au repos peut se faire de différentes façons : (a) par contact cellule-cellule avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés et infectés par le VIH-1, (b) par une infection directe du virus « libre », (c) par contact cellule-cellule avec des cellules présentatrices d'antigène qui ont internalisé le virus.

Bien que le réservoir viral dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> soit le plus étudié, la comparaison des séquences entre virus latents dans les lymphocytes et les virus nouvellement produits suite à l'interruption de la TAR suggère très fortement l'existence d'un réservoir viral dans d'autres types cellulaires (227). Compte tenu de leur durée de vie pouvant s'échelonner de mois à des années, de leur capacité unique à résister aux effets cytopathiques du VIH-1 et à la destruction induite par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK (*Natural Killer*) (228), les macrophages seraient également un réservoir viral pendant le traitement antirétroviral (229) (Figure 16B). Cependant, les macrophages dérivés de monocytes ainsi que les autres macrophages spécialisés de différents tissus du corps (intestin, cerveau, foie, urètre,

ganglions lymphatiques) varient dans leur permissivité au virus, à la fois selon leur origine, leurs particularités environnementales et leur état d'activation (230–232). Par exemple, lors de la différenciation des monocytes en macrophages, ces cellules deviennent plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 et contribueraient ainsi à la propagation du virus (233) ; cependant leur existence est relativement courte. En revanche, certaines populations de macrophages tissulaires spécialisés se renouvellent et ont une longue durée de vie (232). Quoique certains macrophages tissulaires sont résistants au VIH-1 (par exemple, les macrophages du tissu lymphoïde intestinal (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*)) (234), les macrophages alvéolaires du poumon sont permissifs à l'infection (235). De plus, l'ARN du VIH-1 est présent dans les macrophages du vagin (230) et récemment, une étude a mis en évidence la présence de provirus intégrés dans les macrophages urétraux, indiquant un réservoir potentiel dans ces tissus (236). Le système nerveux central (SNC) est également un réservoir tissulaire important. Le VIH-1 atteint le SNC dès la primo-infection grâce au passage de cellules infectées à travers la barrière hémato-encéphalique. Dans le SNC, le VIH-1 persiste dans les macrophages résidents comme les cellules microgliales et les macrophages périvasculaires (237) (**Figure 16B**).

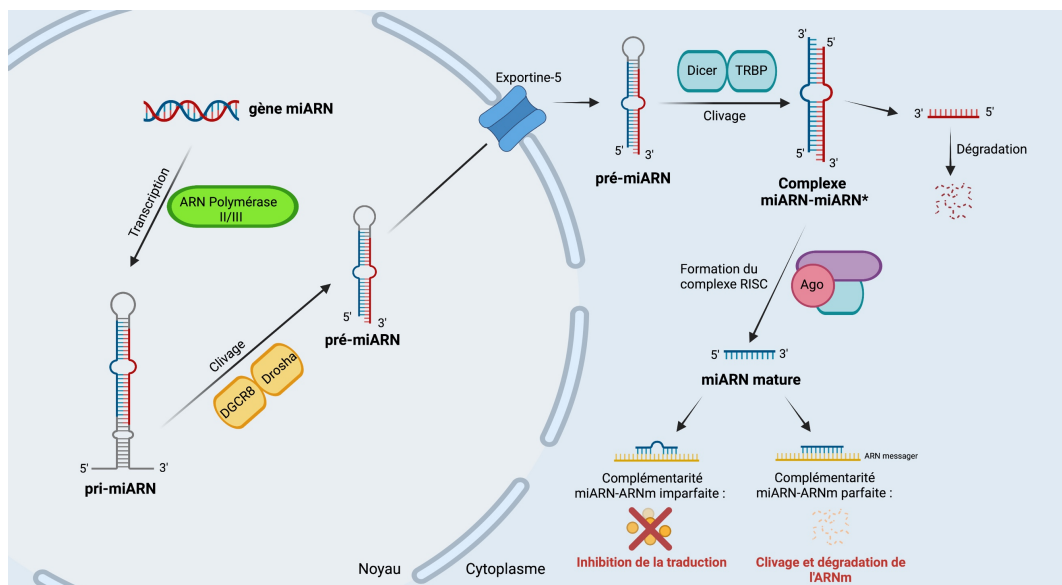
Il est difficile de mesurer précisément le réservoir du VIH-1 car il n'existe pas de marqueur cellulaire qui distingue les cellules infectées latentes des cellules non infectées, d'autant plus que le nombre de cellules infectées latentes est très faible : la fréquence des cellules latentes compétentes pour la réplication est estimée à environ 0,1-10 unités infectieuses par millions de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos chez la plupart des personnes sous TAR (238,239). L'une des stratégies les plus étudiées ces dernières années pour réduire le réservoir est connue sous le nom « réactivation et élimination (*shock and kill*) » et propose dans un premier temps de réactiver le réservoir viral à l'aide de molécules inversant la latence dans le but d'exprimer des antigènes viraux. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC) perturbe l'activité désacétylase à proximité du LTR (*Long Terminal Repeat*) du VIH-1, favorisant l'expression des gènes viraux (240). Les agonistes de la protéine kinase C (PKC), quant à eux, stimulent la voie NF- $\kappa$ B ainsi que l'expression des gènes

du VIH-1 (241). Dans un deuxième temps, cette stratégie propose de stimuler le système immunitaire pour induire la clairance des cellules réactivées, le tout en présence de TAR pour limiter l'infection subséquente de cellules susceptibles au VIH-1 (242). Cependant, malgré des résultats prometteurs *in vitro*, cette stratégie n'a pour le moment pas pu réduire efficacement le réservoir chez les individus infectés dans le cadre d'essais cliniques (243). Une réactivation virale inefficace ainsi qu'une résistance des cellules latentes aux effets cytotoxiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expliquent entre autres ces résultats *in vivo* (244). Ceci confirme la nécessité de développer de nouvelles approches alternatives, dont fait partie la stratégie « bloquer et verrouiller (*block and lock*) ». En effet, contrairement à la stratégie décrite précédemment, celle-ci consisterait à induire une latence profonde de façon permanente en ciblant différents facteurs transcriptionnels (245). Dans cette stratégie, l'utilisation des miARN peut être envisagée afin de maintenir le VIH-1 dans une latence profonde.

#### **4.3. Les miARN et leur rôle dans l'infection par le VIH-1**

Les miARN sont de petits ARN régulateurs d'environ 20-22 nucléotides dont l'appariement à un ARN messager (ARNm) cible conduit à une répression de la traduction ou à sa dégradation (246) (**Figure 18**). Jusqu'à 60 % des gènes humains seraient régulés par les miARN (247), qui ciblent à la fois plusieurs fonctions cellulaires et familles de gènes. C'est le cas, par exemple, de la condensation de la chromatine, des mécanismes épigénétiques (248) et de la réponse immunitaire (249), tous pertinents dans l'établissement et le maintien de la latence virale. En effet, ces petits ARN régulateurs sont impliqués dans l'hématopoïèse des lignées lymphoïdes et myéloïdes, dans leur différenciation ainsi que dans leur activation (250,251). D'autre part, la modulation de la réponse immunitaire innée implique de nombreux miARN : par exemple, les miARN-146 et miARN-155 sont parmi les premiers miARN identifiés à la suite d'une stimulation par les récepteurs de type Toll (*Toll-Like Receptors*, TLRs) ou des cytokines pro-inflammatoires (252). Cependant l'expression de plusieurs miARN est contrôlée par de puissantes voies activatrices immunitaires, telle que la

voie NF- $\kappa$ B et les conséquences de cette activation ont un lien direct avec la réponse antivirale cellulaire (253).



**Figure 18 - Biogenèse des miARN.**

Les miARN sont transcrits par une ARN polymérase de type II/III sous la forme de longs précurseurs tige-boucle appelés miARN primaires (pri-miARN). La première étape de maturation se déroule au sein du noyau où le pri-miARN est pris en charge par l'endoribonucléase de type III Drosha et son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*). Un clivage permet de libérer le précurseur de miARN (pré-miARN), d'environ 60 à 70 nucléotides, caractérisé par la présence d'une structure en tige-boucle et d'une extrémité protubérante en 3'. Par la suite, les pré-miARN sont transportés de manière active depuis le noyau vers le cytosol par l'Exportine 5. Le pré-miARN est alors clivé par un complexe enzymatique comprenant un membre de la famille de la ribonucléase III Dicer et TRBP (*TAR-RNA Binding Protein*). Dicer reconnaît et clive l'ARN double-brin proche de la structure boucle du pré-miARN, ce qui libère un miARN mature, aux extrémités 3' cohésives, appelé « duplex miARN/miARN\* », avec un brin guide et un brin passager. Le complexe multiprotéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), composé principalement d'une des quatre protéines Argonaute présente chez l'humain, va sélectionner un brin du duplex (le brin guide), et dégrader le brin opposé (le brin passager). Finalement, le miARN sélectionné va servir de guide pour cibler un ARNm. Deux voies de suppression sont alors possibles, soit un clivage de l'ARNm cible si la complémentarité avec le miARN est parfaite, soit une répression de la traduction, associée éventuellement à une dégradation de l'ARNm, dans le cas où la complémentarité entre miARN et ARNm est imparfaite.

Le rôle régulateur des miARN dans les processus cellulaires a un impact sur la réplication des virus, ceux-ci étant reconnus pour détourner les machineries cellulaires à leur profit. Par exemple, le miARN-122 se lie à la région 5' du génome du virus de l'hépatite C (VHC), favorisant sa réplication virale (254). Des essais pré-cliniques montrent que l'inhibition de ce miARN entraîne une forte diminution de la réplication du VHC (255). Il n'est donc pas surprenant que la réplication du VIH soit également affectée par les miARN, d'autant plus que les cellules ont élaboré des

réponses antivirales, parmi lesquelles les miARN jouent un rôle effecteur important (**Figure 19**). Ainsi, certains miARN semblent avantager la réplication du VIH-1, notamment en ciblant des facteurs qui restreignent la réplication virale. Par exemple, le miARN-148, en ciblant les ARNm du HLA-C (*Human Leukocyte Antigen-C*), diminuerait l'expression de cette molécule et un polymorphisme du HLA-C empêchant cette interaction est associé à un contrôle de la virémie chez l'hôte infecté (256). Les miARN-181 (257) et miARN-124a (258) ciblent SAMHD1 (*SAM and HD Domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1*) et p21, respectivement, qui sont des régulateurs des niveaux de déoxynucléosides triphosphates cellulaires et ainsi des inhibiteurs de la transcription inverse (**Figure 19**). Le miARN-34a cible l'expression de TASK (*TWIK-related Acid Sensitive K<sup>+</sup> channel*), un constituant de canaux potassiques qui inhibe la protéine virale Vpu (*Viral protein U*) (258). Enfin, dans certains cas, le VIH-1 induit des miARN qui compromettent la réponse immunitaire : la protéine virale Vpu induit l'expression des miARN-34c, -93, -381 et -500a qui réduisent les peroxisomes cellulaires, des plateformes de signalisation de la réponse immunitaire innée (259). Ces effets favorisent une meilleure réplication virale. D'autres miARN induits par le VIH-1 sont associés à sa pathogénèse, par exemple lors de maladies neurocognitives, mais leurs mécanismes d'action ne sont pas bien définis (260).

Jusqu'à maintenant, la grande majorité des miARN identifiés comme étant impliqués dans la réplication du VIH-1 le sont du fait de leur effet antiviral. D'abord, plusieurs de ces miARN sont liés à la modulation de la réponse immunitaire innée. Parmi ceux-ci, notons les miARN-29, -125b, -149 et -223 (250). Il est remarquable que le miARN-29 cible directement l'ARN du VIH-1, possiblement au niveau des régions codantes (par exemple, pour *nef* (*negative regulatory factor*) (261)), quoique tous ciblent l'ARN viral au niveau du LTR (262) (**Figure 19**). Une autre catégorie de miARN antiviraux est les modulateurs de facteurs cellulaires nécessaires à l'achèvement du cycle viral (les HDFs, *HIV-Dependency Factors*). On y retrouve le miARN-155, qui, comme nous allons l'aborder dans la section suivante, se trouve à être un modulateur important de la latence virale dans les lymphocytes et les macrophages.



#### 4.4. Rôle des miARN dans l'établissement de la latence (cellules T CD4<sup>+</sup>)

Au-delà de leurs rôles au cours de l'infection par le VIH1, les miARN interviennent aussi dans l'établissement de la latence virale (263). Comme décrit précédemment, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos ne produisent pas de particules virales infectieuses ; cependant l'ADN proviral peut être retrouvé dans ces cellules, suggérant la présence d'un réservoir latent. Les mécanismes menant à cette latence ne sont pas totalement compris mais les miARN cellulaires, en inhibant la réplication du virus, sont impliqués dans ce phénomène. Parmi eux, le miARN-155 joue un rôle central dans l'établissement de la latence du VIH-1. Notamment, ce miARN cible le facteur TRIM32 (*Tripartite Motif containing 32*), une ubiquitine ligase E3 qui active NF-κB favorisant ainsi la transcription du VIH-1 dans le modèle lymphocytaire de latence post-intégration *J-lat* (264) (**Figure 19**). Lorsque les niveaux de TRIM32 sont réduits, une réactivation plus faible du virus latent a été observée et inversement, lorsque TRIM32 est surexprimé, une activation virale accrue est détectée.

En plus du miARN-155, d'autres miARN ont également un rôle dans la latence du VIH-1, en modulant des facteurs cellulaires dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos et activés. En effet, la cycline T1, qui a un rôle important dans la transactivation induite par Tat, est augmentée lors de l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette augmentation est due à une diminution du miARN-27b dans les cellules activées (265). Les miARN peuvent également inhiber fortement la production du VIH-1 en réprimant l'expression des gènes du virus. Par exemple, un groupe de miARN comprenant les miARN-28, -125b, -150, -223 et -382 sont considérablement enrichis dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos (par rapport aux cellules activées) (266). Ces miARN ciblent l'extrémité 3' de l'ARN du VIH-1 (3'UTR, la région non traduite commune à tous les ARNm du VIH-1) empêchant ainsi la traduction des gènes du VIH-1 et la production de nouvelles particules infectieuses. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces miARN augmente la production virale dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos, illustrant le rôle de ces miARN dans le maintien de la latence dans ces cellules (266).

Finalement, quelques miARN ont un effet positif sur la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ainsi, Chiang *et al.* ont rapporté que le miARN-132 réactive le VIH-1 latent et augmente la réplication du virus dans les lymphocytes (267). Il est possible que cette hausse de la réplication virale soit due à la réduction du régulateur transcriptionnel MeCP2 (*Methyl-CpG-binding protein 2*), mais le lien définitif reste à établir (268). Enfin, les miARN-34a, -182 et -217 inhibent l'expression de la Sirtuine 1 (SIRT1), une déacétylase, qui aboutit à une activité accrue de NF-κB favorisant la réplication du VIH-1 (269–271) (**Figure 19**).

#### **4.5. Rôle des miARN dans l'établissement de la latence (macrophages/monocytes)**

Le réservoir viral latent dans les macrophages/monocytes est moins caractérisé que celui des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (229), bien qu'il existe plusieurs indications que les miARN jouent un rôle dans son établissement. Par exemple, dans les macrophages activés, le miARN-155 cible les ARNm de plusieurs protéines cellulaires impliquées dans la biogenèse et le transport nucléaire du complexe de pré-intégration : ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease domain 10*), TNPO3 (*Transportin 3*), Nup153 (*Nucleoporin 153*) et LEDGF/p75 (*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*). Ces protéines sont nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (272) (**Figure 19**).

Bien que les monocytes puissent être infectés par le VIH1, ils sont réfractaires à sa réplication (229). En effet, cette restriction peut être surmontée au cours de la différenciation en macrophages (MDMs, *Monocyte-Derived Macrophages*) (273) ou en cellules dendritiques (MDDCs, *Monocyte-Derived Dendritic Cells*) (274). Dans ce sens, Shen *et al.* ont montré que l'expression de Pur-α (*Purine-Rich single stranded DNA-binding protein alpha*) une protéine de liaison à l'ADN et à l'ARN, connue pour favoriser la transactivation induite par Tat, est altérée dans les monocytes. L'étude en question montre que son 3'UTR est la cible d'un groupe de miARN (incluant les miARN-15a/b, -16, -20a, -93 et -106b) qui sont augmentés dans les monocytes par rapport aux MDDCs. Les monocytes traités avec des inhibiteurs (antagomirs) de ces

miARN sont plus susceptibles à l'infection, tandis que les MDDCs traités avec les analogues de ces miARN sont plus résistantes à l'infection par le VIH-1 (275). De plus, Wang *et al.* ont montré que les monocytes expriment des niveaux élevés des miARN-28, -125b, -150, -223 et -382, qui correspondent aux miARN qui inhibent la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos décrits précédemment. La diminution de ces miARN dans les monocytes a amélioré l'infection par le VIH-1, suggérant que ces miARN participent à la non-permissivité des monocytes à l'infection productive par le VIH-1 (262).

S'il est donc désormais fort probable que les miARN ont un rôle dans l'établissement de la latence du VIH-1 (par exemple par l'intermédiaire de la suppression de facteurs de transcription) et dans le maintien de la latence du VIH-1 (par exemple en ciblant directement les ARN viraux), très peu d'études comparatives du profil global d'expression des miARN entre cellules infectées et cellules latentes ont jusqu'ici été réalisées quel que soit le type cellulaire. Dans ce sens, Yang *et al.* ont montré une régulation différente de plusieurs miARN impliqués dans la signalisation cellulaire, l'apoptose et la réorganisation du cytosquelette (210). Cependant, cette étude porte sur une lignée cellulaire de type lymphocytaire modélisant la latence du VIH-1, en raison de la difficulté d'obtenir un modèle de latence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires. Des études plus approfondies basées sur des cellules primaires T CD4<sup>+</sup> issues d'un réservoir de patient sous TAR, par exemple, ou des MDMs sont donc nécessaires. L'utilisation de vecteurs lentiviraux bi-cistroniques développés récemment afin de permettre la séparation de cellules infectées productivement de cellules infectées de manière latente serait dans ce sens utile pour répondre à cette question dans un contexte plus physiologique (276).

#### **4.6. L'entrée, une étape du cycle viral modulée par les miARN**

Bien que la latence du VIH-1 soit une caractéristique intimement liée à l'établissement du réservoir viral, il demeure que cibler d'autres étapes du cycle d'infection peut avoir des conséquences directes sur la constitution du réservoir, son importance et ses attributs. Par exemple, intervenir au niveau des premières étapes du cycle viral, c'est-

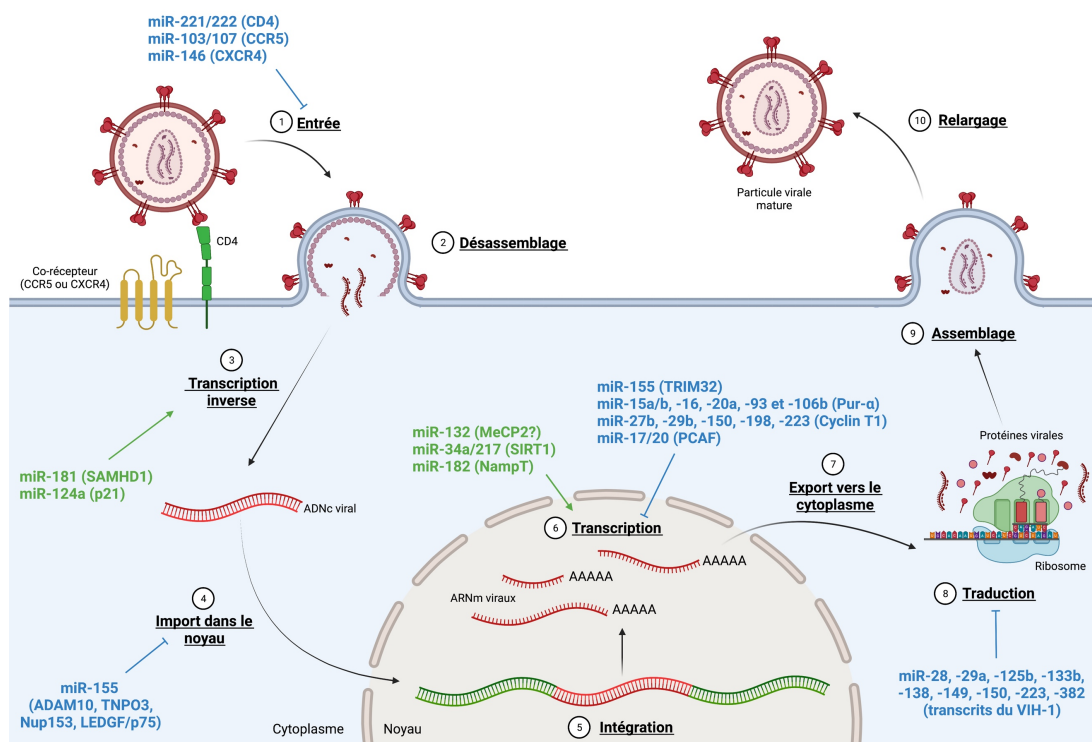
à-dire au point de la reconnaissance par le virus de ses récepteurs CD4 et CCR5 ou CXCR4 (*C-X-C motif Chemokine Receptor 4*) à la surface cellulaire limiterait l'implantation de nouveaux réservoirs dans des tissus connexes susceptibles, à la suite d'une réactivation virale. Cette stratégie est validée par la reconstitution d'un système immunitaire chez un individu infecté composé de cellules n'exprimant pas CCR5 et ainsi résistantes à l'infection suite à une transplantation de cellules souches provenant d'un donneur homozygote pour une forme mutante de CCR5, CCR5 $\Delta$ 32 (277). Comprendre comment l'expression du récepteur principal viral (CD4) et de ses corécepteurs (CCR5/CXCR4) est modulée par les miARN a le potentiel d'ouvrir de précieuses pistes à ce sujet.

L'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules diminue suite à la différenciation des monocytes du sang en macrophages (278). En effet, la liaison de CD4 avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) est une étape qui déclenche cette différenciation (279). Il est remarquable que bien que les monocytes expriment fortement le CD4, ils sont peu infectables par le VIH-1 (280) ; ceci est dû à la présence de facteurs de restriction cellulaires (262,281), dont les miARN tels que décrits précédemment (262,278). De plus, l'activation des macrophages par des cytokines réduit l'expression de CD4 (282,283) et donc leur susceptibilité au VIH-1 (63).

En triant les macrophages productivement infectés par le VIH-1 des autres cellules avoisinantes, nous avons ainsi pu déterminer que l'infection par le VIH-1 conduit à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui modifient substantiellement le répertoire de miARN exprimés par les macrophages (284). Plus particulièrement, parmi ces cytokines, le facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF- $\alpha$ ) augmente l'expression des miARN-221/222, des miARN régulés par NF- $\kappa$ B, qui modulent à la baisse le récepteur CD4 dans les cellules avoisinantes. Dans ces mêmes cellules, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) accroît l'expression des miARN-103/107, deux miARN régulés par p53 (*TP53*, *Tumor Protein 53*), diminuant ainsi le niveau de corécepteur CCR5 (285) (**Figure 19**). Parallèlement, l'expression de CD4 est régulée par le miARN-222 (286) et celle de CXCR4 par le miARN-146 (287) dans les

lymphocytes. En affectant l'entrée virale, ces miARN ne sont-ils pas indirectement des facteurs limitants pour l'établissement de réservoirs viraux ?

Les états d'activation et de différenciation ont aussi un impact sur l'expression de CCR5 dans les lymphocytes. En effet, Shan *et al.* ont observé une augmentation de CCR5 lors de la période de transition d'état activé/effecteur vers celui de lymphocyte mémoire, permettant au VIH-1 d'infecter et de compléter son cycle jusqu'à l'intégration (69). Cependant, ces cellules étant peu actives au niveau transcriptionnel, ces étapes aboutiraient à une latence et à l'établissement d'un réservoir viral. Étant donné que les miARN-103/107 ciblent le CCR5, il serait intéressant de déterminer si ces miARN sont modulés dans ce contexte. La voie de signalisation p53 est reconfigurée lors de l'établissement de la latence virale dans les lymphocytes (288), or cette voie est impliquée dans l'expression des miARN-103/107 dans les macrophages (285). Le rôle d'autres modulateurs de CCR5, tel que le long ARN non-codant (lncARN) CCR5AS (*CCR5 Anti-Sense RNA*), qui protège l'ARNm de CCR5 de la dégradation induite par la protéine Raly, reste aussi à être déterminé (289).



**Figure 19 - Les miARN cellulaires peuvent moduler l'inféctivité et la réplication du VIH-1.**

L'infection par le VIH-1 peut être directement affectée par des miARN cellulaires qui peuvent cibler le virus à différentes étapes de son cycle de réplication. La majorité des

miARN identifiés à ce jour ont un effet antiviral et inhibent la réplication du VIH-1 (indiqués en bleu). Quelques miARN identifiés récemment peuvent favoriser l'infection par le VIH-1 (indiqués en vert). Les cibles des miARN sont entre parenthèses.

#### **4.7. Les miARN pour maintenir ou contrer la latence**

Jusqu'à présent, aucun médicament ne s'est avéré efficace *in vivo* pour réduire le réservoir latent. Basé sur leurs propriétés, les miARN pourraient être utilisés en tant que nouveaux composés capables de contrôler l'établissement et le maintien de la latence à l'aide de différentes approches (**Figure 20**).

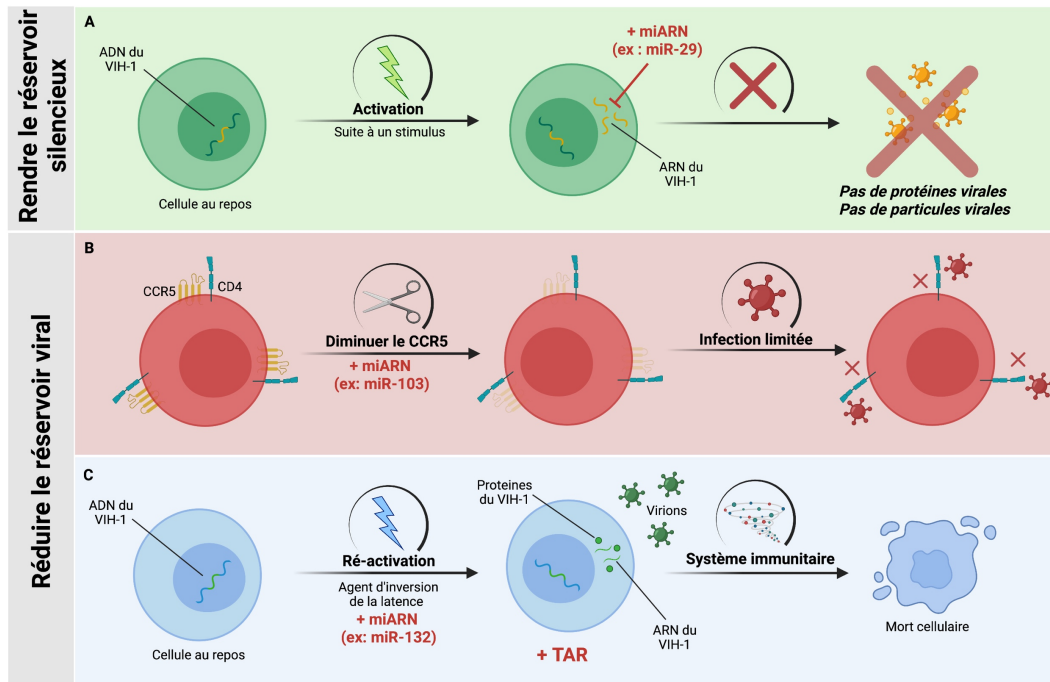
Comme discuté précédemment, il est tout d'abord possible d'induire les miARN par des facteurs cellulaires, notamment les cytokines. Ainsi, entraîner une augmentation des miARN ciblant des facteurs de dépendance du VIH-1 (miARN-16, -132, -34c) ou des miARN ciblant l'ARN viral (miARN-29a, -92a), contribuerait à maintenir le réservoir dans une latence profonde (**Figure 20A**). Cependant, l'efficacité et la pertinence physiologiques des effets induits par les miARN sur la réplication du VIH-1 restent un domaine encore en cours d'étude et sujet à certaines controverses. En effet, on peut se demander quel est le nombre de copies de miARN cellulaires nécessaire pour exercer un effet sur la réplication du VIH-1. Il est également important de mentionner que le réservoir latent se trouve dans différents types cellulaires et les effets des miARN peuvent être différents dans différents types de cellules. Il est probable qu'une surexpression de miARN induirait une certaine toxicité étant donné l'éventail de cibles modulées par un seul miARN (290) ; par ailleurs un excès de miARN pourrait être détecté par des senseurs à ARN capables de déclencher des réponses pro-inflammatoires (291). Bien que certains résultats soient potentiellement prometteurs, des études plus approfondies concernant l'induction des miARN à l'aide de différents facteurs sont donc nécessaires.

L'utilisation de miARN « artificiels » permettrait en partie de contourner ce problème. Les miARN artificiels sont des molécules alternatives conçues pour imiter les tiges-boucles des miARN primaires (pri-miARN) endogènes dans lesquelles le duplex de miARN-miARN\* est remplacé par des séquences conçues pour réprimer le gène souhaité (292). Le pri-miARN conserve ainsi toutes les caractéristiques d'un miARN

endogène. Le miARN artificiel peut être introduit dans une cellule cible choisie par l'entremise d'un vecteur viral (293). Leur utilisation est très efficace par rapport aux méthodes de suppression génique et permet notamment une meilleure spécificité. Cette stratégie pourrait par exemple être utilisée pour réduire le niveau d'expression du corécepteur CCR5 dans les cellules cibles et ainsi limiter leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (**Figure 20B**).

Récemment, López-Huertas *et al.* ont identifié de nouveaux miARN impliqués dans la persistance du VIH-1 à l'aide d'un séquençage de dernière génération (NGS, *Next-Generation Sequencing*) (294). Ils les ont par la suite utilisés dans une approche pour inverser la latence virale en utilisant comme modèle les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aux repos traités avec le ligand de chimiokine 19 (CCL19, *Chemokine C-C motif Ligand 19*) ou l'interleukine-7 (IL-7). Cependant, la modulation de ces miARN n'a pas été efficace pour réactiver le VIH-1. Il est donc possible que l'efficacité des miARN pour réactiver le VIH-1 varie selon le modèle de latence utilisé.

Finalement, les miARN pourraient être exploités en combinaison avec d'autres agents d'inversion de la latence (LRAs, *Latency Reversing Agents*) quoiqu'aucune étude sur ce sujet n'ait pour le moment été réalisée (**Figure 20C**). Les LRAs se sont avérés efficaces pour induire la transcription du VIH-1 *in vitro*, mais leur efficacité pour diminuer la taille du réservoir latent chez les patients sous traitement est très limitée (295). Ceci soutient l'hypothèse qu'il n'existe probablement pas de molécule unique qui permettra de réduire les réservoirs, mais plutôt une combinaison de plusieurs classes de molécules différentes, incluant possiblement les miARN.



**Figure 20 - Stratégies potentielles basées sur l'utilisation des miARN pour contrôler ou éradiquer les réservoirs du VIH-1.**

(A) Les miARN peuvent être utilisés afin de cibler des facteurs de transcription ou les transcrits du VIH-1, aboutissant à un réservoir viral complètement dormant. (B) Les miARN peuvent être utilisés afin de diminuer le niveau d'expression du corécepteur CCR5 à la surface des cellules cibles. La diminution du CCR5 inhibe très fortement l'infection par le VIH-1, ce qui limite l'implantation de réservoir et à terme conduit à une réduction du réservoir. (C) Les miARN peuvent être également utilisés en combinaison avec un agent d'inversion de la latence afin d'améliorer l'efficacité de la réactivation des cellules latentes. La réactivation entraîne la synthèse de protéines du VIH-1 ainsi que la production de particules virales infectieuses. Ces étapes se font en présence de thérapie antirétrovirale (TAR) pour inhiber la dissémination virale. Les cellules réactivées seront, dans un second temps, éliminées par le système immunitaire (lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et NK), entraînant ainsi une réduction du réservoir.

#### 4.8. Conclusion

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont confirmé le rôle des miARN dans la pathogenèse de nombreuses maladies, incluant les maladies infectieuses. Le nombre de miARN associés à la latence du VIH-1 augmente de plus en plus, et la manipulation de ces miARN représente une approche potentielle pour, par exemple, réactiver le VIH-1 ou limiter la susceptibilité des cellules à l'infection. Cependant, les études actuellement disponibles montrent que les effets de ces miARN varient selon le modèle cellulaire utilisé. Des études plus approfondies sont donc nécessaires, notamment sur les différents modèles de latence basés sur des



lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou macrophages primaires. Il est fort probable que les miARN seuls ne suffiront pas à réactiver complètement le VIH-1, mais que leur association avec d'autres molécules soit bénéfique. Si la réactivation directe du VIH-1 pour réduire la taille du réservoir viral demeure un concept expérimental dont les bénéfices restent à prouver, les miARN pourraient en revanche servir pour contrer d'autres étapes du cycle de réplication du VIH-1, notamment l'entrée virale. Ceci permettrait de compromettre directement l'infection par le VIH-1 et indirectement l'établissement de réservoirs latents. Grâce aux nombreux progrès technologiques des dernières années, les miARN pourraient donc ouvrir la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques efficaces pour contrôler ou éradiquer les réservoirs latents du VIH-1, améliorant ainsi l'espérance et la qualité de vie de millions d'individus vivant avec le VIH-1 dans le monde aujourd'hui.

*Remerciements : Nous tenons à remercier les Instituts de recherche en santé du Canada (Fonds FDN-154324, HAL-157986 [Canadian HIV-Ageing Multidisciplinary Programmatic Strategy in NeuroHIV Research CHAMPS] et HB2-164064 [Consortium de recherche sur la guérison du VIH] à É.A.C.) et le Fonds de la recherche Québec-Santé (FRQ-S), Réseau SIDA/Maladies infectieuses pour leur soutien financier. É.A.C. est récipiendaire de la chaire d'excellence Université de Montréal-IRCM en recherche sur le VIH.*

## **Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs de la thèse**

## Hypothèses et objectifs de la thèse

---

Cette thèse est composée de trois parties, sous forme d'articles scientifiques, qui visent à mieux comprendre le rôle des miARN au cours de l'infection par le VIH-1. La grande majorité de nos expériences ont été réalisées *ex vivo* dans des cellules primaires (macrophages et lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) prélevées du sang de participants volontaires.

**1<sup>ère</sup> partie** : La première partie est consacrée à la découverte d'une nouvelle cible et fonction d'un miARN, le miARN-103, dans le cadre de l'infection par le VIH-1 : cette nouvelle cible étant le corécepteur CCR5, le miARN-103 affecte donc l'entrée virale. Cette partie a été réalisée dans les macrophages dérivés de monocytes humains (MDMs) et s'est accompagnée de la mise en place au laboratoire d'une méthode de PCR quantitative en temps-réel (RT-qPCR) ultra-sensible afin de détecter et quantifier les miARN.

**2<sup>ème</sup> partie** : La deuxième partie est consacrée à l'étude du rôle du miARN-103 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au cours d'une infection par le VIH-1. Notre hypothèse était que le miARN-103, en régulant CCR5, participe à l'établissement de la latence dans une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ayant pour caractéristique une augmentation transitoire du CCR5, ainsi qu'une capacité réduite de transcrire l'ADN proviral intégré. Dans cette partie, nous avons également étudié le rôle du miARN-103 dans les cellules issues d'individus vivants avec le VIH-1 (virémique ou EC).

**3<sup>ème</sup> partie** : La dernière partie est consacrée à l'identification de nouveaux miARN jouant un rôle dans l'infection par le VIH-1. Pour cela, nous avons réalisé une étude de l'expression globale des ARN dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés ou non par le VIH-1, à l'aide d'une première analyse ARN-seq consacrée aux miARN et d'une seconde analyse ARN-seq consacrée aux ARN messagers (ARNm). Le croisement de ces données par bio-informatique nous a permis d'identifier plusieurs miARN régulés au cours de l'infection. Notamment, nous avons identifié le miARN-26a, qui participe à la régulation de CD59 et joue un rôle dans l'activation du complément.

## **Chapitre 3 : Manuscrit #1**

## Découverte d'une nouvelle cible du miARN-103

---

**Contexte** : Les macrophages sont des cellules immunitaires très hétérogènes dont la sensibilité à l'infection par le VIH-1 est très variable en fonction de leur origine, localisation tissulaire, ou encore de leur profil de polarisation. Les macrophages infectés par le VIH-1 sont plus résistants aux effets cytopathiques médiés par le virus et ne sont pas significativement épuisés *in vivo* par opposition aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces cellules participent donc à la propagation virale ainsi qu'à l'établissement et à la persistance de réservoirs viraux. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les miARN cellulaires jouent un rôle important dans la modulation de la sensibilité des MDMs au VIH-1. Nous avons donc examiné le profil d'expression de plus de 400 miARN dans les MDMs productivement infectées, non infectées productivement, et non infectées. Parmi ces miARN, nous avons identifié les miARN-103 et miARN-107 comme deux régulateurs négatifs potentiels de CCR5.

**Objectif** : Basé sur l'**hypothèse** qu'il existe encore des miARN non identifiés impliqués dans l'infection par le VIH-1, les objectifs de cette étude étaient :

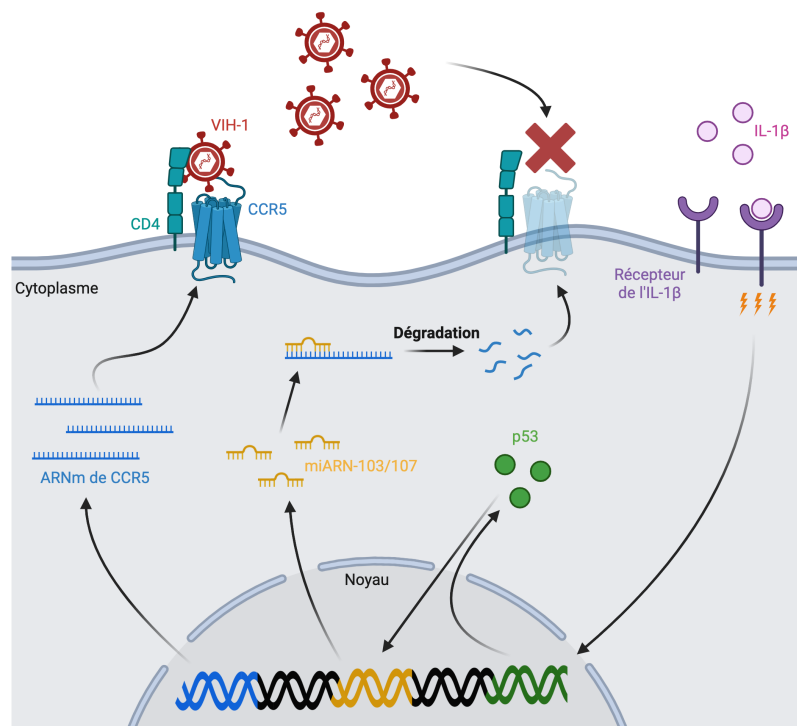
- Approfondir l'analyse bio-informatique du profil d'expression des miARN mentionné plus haut ; identification de la modulation des miARN-103/107 dans les cellules non infectées productivement par le VIH-1.
- Valider que les miARN-103/107 régulent négativement le CCR5 dans les macrophages et étudier leurs effets sur l'entrée virale.
- Déterminer comment les miARN-103/107 sont régulés dans les macrophages.
- Analyser le niveau d'expression des miARN-103/107 dans les macrophages résidant dans les tissus intestinaux de donneurs sains et les macrophages alvéolaires des personnes sous thérapie antirétrovirale. Ceci peut permettre de déterminer si ces miARN participent à la résistance relative de ces cellules à l'infection par le VIH-1.

**Statut de l'article** : Cet article a été publié dans la revue *mBio* en septembre 2020.

**Contribution détaillée de chacun des auteurs :** Ma contribution personnelle à cet article est de 20%. J'ai contribué au développement d'une approche de PCR ultrasensible pour quantifier les niveaux de miARN dans les macrophages utilisés dans de plusieurs figures (Fig 1C, Fig 4B, Fig 8A, Fig 8C et Fig S2). J'ai assisté à l'expérience de miR-Report afin de confirmer que CCR5 est une cible des miARN-103/107 (Fig 1B). De plus, j'ai conçu plusieurs réactifs destinés à quantifier le niveau absolu des miARN-103/107 dans les macrophages. Enfin, j'ai également participé à la lecture et aux commentaires concernant le manuscrit.

Robert Lodge a participé à la conception des expériences, a réalisé la majorité des expériences et a écrit les premières versions du manuscrit. Mélanie Laporte a réalisé certaines expériences. Syim Salahuddin, Jean-Pierre Routy, Petronela Ancuta, Cecilia T. Costiniuk et Mohammad-Ali Jenabian ont fourni leur expertise ainsi qu'un accès aux échantillons de macrophages résidant dans les tissus intestinaux et les macrophages alvéolaires des personnes sous thérapie antirétrovirale. Éric A. Cohen a participé à la conception des expériences, à l'écriture du papier et a obtenu les fonds.

### Résumé graphique :



# Interleukin-1 $\beta$ Triggers p53-Mediated Downmodulation of CCR5 and HIV-1 Entry in Macrophages through MicroRNAs 103 and 107

Robert Lodge<sup>a</sup>, Nicolas Bellini<sup>a</sup>, Mélanie Laporte<sup>a</sup>, Syim Salahuddin<sup>b,c</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>c,d,e</sup>, Petronela Ancuta<sup>f,g</sup>, Cecilia T. Costiniuk<sup>c,h,i</sup>, Mohammad-Ali Jenabian<sup>b,g,i</sup>, Éric A. Cohen<sup>a,g\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>b</sup>Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>c</sup>Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>d</sup>Division of Hematology, Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>e</sup>Chronic Viral Illness Service, Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>f</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>g</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>h</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

<sup>i</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

\*Corresponding author.

Correspondence:

Éric A. Cohen  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec,  
Canada, H2W 1R7  
Tel: 514-987-5804  
Email: eric.cohen@ircm.qc.ca

## Article N°1

---

**Abstract:** Macrophages are a target of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and may serve as a viral reservoir during antiretroviral therapy (ART). Their susceptibility to HIV-1 infection is subject to variations from permissiveness to resistance depending on their origin, tissue localization, and polarization profile. This is in part due to the expression of regulatory microRNAs. Here, we identify two microRNA paralogs, microRNA 103 (miRNA-103) and miRNA-107, as regulators of CCR5 expression that are upregulated in noninfected bystander cells of HIV-1-infected-monocyte-derived macrophage (MDM) cultures. Transfection of microRNA 103 mimics in MDMs reduced CCR5 expression levels and inhibited CCR5-dependent HIV-1 entry, whereas the corresponding antagomirs enhanced virus spread in HIV-infected MDMs. Treatment of MDMs with interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) enhanced microRNA 103 expression, a condition that we found contributed to the reduction of CCR5 mRNA in IL-1 $\beta$ -exposed MDMs. Interestingly, we show that the induction of miRNAs-103/107 expression is part of a tumor suppressor p53 response triggered by secreted IL-1 $\beta$  that renders macrophages refractory to HIV-1 entry. In a more physiological context, the levels of microRNAs 103 and 107 were found enriched in tissue-resident colon macrophages of healthy donors and alveolar macrophages of individuals under antiretroviral therapy, conceivably contributing to their relative resistance to HIV-1 infection. Overall, these findings highlight the role of p53 in enforcing proinflammatory antiviral responses in macrophages, at least in part, through miRNAs-103/107-mediated downmodulation of CCR5 expression and HIV-1 entry.

**Importance:** Macrophages are heterogeneous immune cells that display varying susceptibilities to HIV-1 infection, in part due to the expression of small noncoding microRNAs involved in the posttranscriptional regulation of gene expression and silencing. Here, we identify microRNAs 103 and 107 as important p53-regulated effectors of the antiviral response triggered by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in macrophages. These microRNAs, which are enriched in colon macrophages of healthy donors and alveolar macrophages of HIV-infected individuals under



antiretroviral therapy, act as inhibitors of HIV-1 entry through their capacity to downregulate the CCR5 coreceptor. These results highlight the important role played by miRNAs-103/107 in modulating CCR5 expression and HIV-1 entry in macrophages. They further underscore a distinct function of the tumor suppressor p53 in enforcing proinflammatory antiviral responses in macrophages, thus providing insight into a cellular pathway that could be targeted to limit the establishment of viral reservoirs in these cells.

## **Introduction**

In addition to CD4, the primary receptor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), chemokine receptors are essential coreceptors for virus entry. Among these chemokine receptors, CCR5 serves as a major coreceptor for HIV-1 (1, 2). Variation in its expression impacts disease outcomes after HIV-1 infection (3), and its reduction at the cell surface, such as that resulting from a 32-bp deletion in the *CCR5* gene, entails resistance to HIV-1 infection (4). As a matter of fact, the degree of CCR5 surface expression influences various facets of HIV pathogenesis, such as transmission and virus burden, but also the efficiency of CCR5 blockers and entry inhibitors in treatments as well as virus neutralization by HIV-1-specific antibodies (Abs) (3).

Macrophages are increasingly recognized as an important cellular target of HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) infection at different stages of disease (5-10). Although they express several chemokine receptors, CCR5 is the main coreceptor used by HIV-1 to infect these myeloid cells (11). Given their life span ranging from months to years and their unique ability to resist HIV-1 cytopathic effects and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated killing, macrophages have been proposed to be an important sanctuary for HIV-1 and a potential viral reservoir during antiretroviral therapy (ART) (12-14). While HIV-1 infection has been demonstrated in lymphoid as well as nonlymphoid tissues, tissue-resident macrophages display different susceptibilities to productive HIV-1 infection (14). For instance, whereas productive infection has been observed in vaginal (15), penile urethral (16, 17), and, to a weaker degree, lung alveolar (18-21) macrophages, intestinal macrophages reveal significant resistance to HIV-1 infection (22, 23), thus

indicating that the origin and activation status of tissue-resident macrophages as well as local environmental signals influence their susceptibility to HIV-1 infection. Indeed, the nonpermissiveness of intestinal macrophages is in part due to reduced expression levels of CD4 and CCR5 (22). Reduced cell surface CD4 and CCR5 expression levels are also observed in HIV-1-resistant monocyte-derived macrophages (MDMs) that are activated by cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) or interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (24-27). Nevertheless, other cytokine-induced antiviral factors such as SAMHD1, APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , TRIM22, and BST2/tetherin also contribute to restrict HIV-1 infection in activated macrophages to various degrees (28). A comprehensive understanding of host factors and signals modulating the susceptibility of macrophages to HIV-1 infection is likely to provide important insight into cellular pathways that could be targeted to limit the establishment and persistence of viral reservoirs in macrophages.

MicroRNAs have been shown to play a key role in modulating the susceptibility of HIV target cells to HIV-1 infection (29). The 3' untranslated region (UTR) of HIV-1 transcripts is targeted by microRNA 28 (miRNA-28), miRNA-125b, miRNA-150, miRNA-223, and miRNA-382, which are reduced during monocyte-to-macrophage differentiation (30). Among these microRNAs, miRNA-28, miRNA-150, miRNA-223, and miRNA-382 are induced in IFN- $\alpha$ -activated, HIV-resistant MDMs (28). miRNA-155 targets the HIV dependency factors ADAM10, TNPO3, NUP153, and LEDGF/p75 in Toll-like receptor 3 (TLR3) ligand-treated MDMs (31). Importantly, microRNAs and other regulatory RNAs modulate viral entry. Kulkarni et al. (32) recently showed that the antisense long noncoding RNA (lncRNA) CCR5AS inhibits CCR5 mRNA degradation mediated by the RNA-binding protein RALY in CD4<sup>+</sup>T cells. We previously reported that TNF- $\alpha$ -induced miRNA-221 and miRNA-222 target CD4 mRNAs in MDMs (24). Thus, variations in CCR5AS and miRNAs-221/222 lead to differences in CCR5 and CD4 expression, respectively, directly impacting viral entry.

Following comprehensive analyses of transcriptome sequencing (RNAseq) microRNA expression profiles in HIV-1-infected MDMs, HIV-1-exposed but noninfected bystander MDMs, and virus-unexposed control MDMs (24), we identified two closely

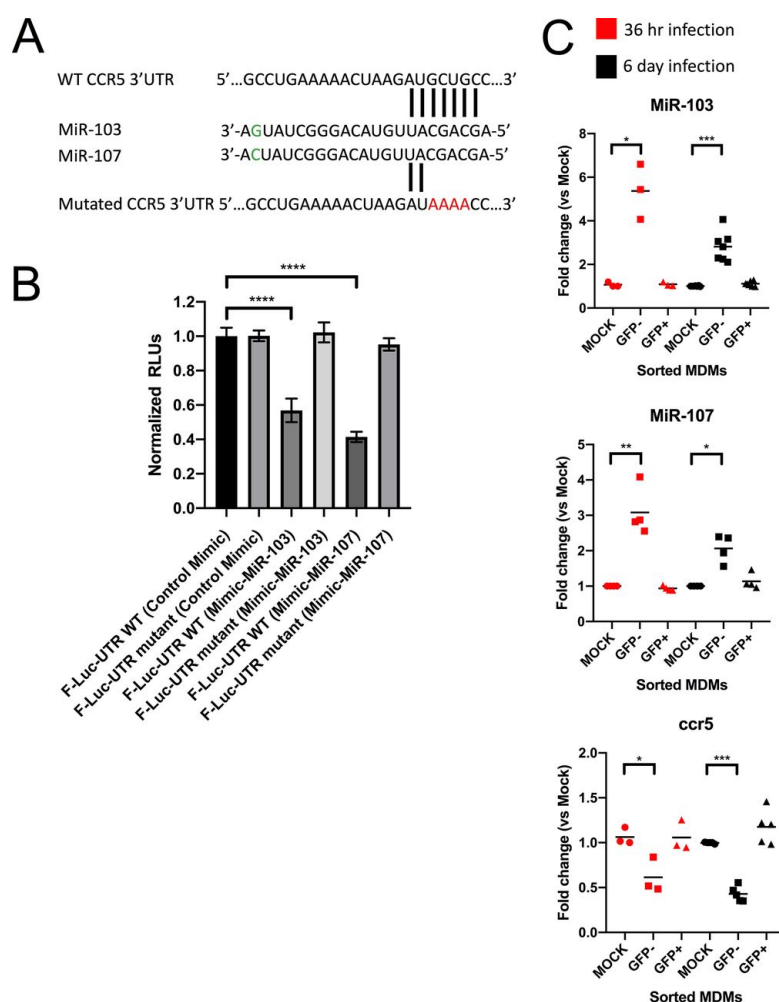
related p53-regulated microRNAs, miRNA-103 and miRNA-107, as negative regulators of CCR5, which are enhanced in bystander cells. Functional analyses of miRNA-103 reveal that it is induced by interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and modulates MDM permissiveness to HIV-1 by inhibiting viral entry via CCR5 downregulation. Importantly, we found that miRNA-103 and miRNA-107 are upregulated in colon macrophages as well as in macrophages recovered by bronchoalveolar lavage (BAL) from HIV-infected individuals under ART, thus highlighting the role of these microRNAs in regulating HIV-1 entry in these tissue-resident macrophages.

## **Results**

### *CCR5 mRNA is a target of miRNA-103 and miRNA-107 in MDMs.*

In order to identify new microRNAs that modulate the susceptibility of macrophages to HIV infection, we screened a microRNA expression database that we previously generated by RNAseq deep sequencing of uninfected MDMs as well as productively infected (green fluorescent protein-positive [GFP<sup>+</sup>]) and bystander (GFP-negative [GFP<sup>-</sup>]) MDMs infected with a GFP reporter virus (24). As performed previously, we limited our screen to the 30 most highly expressed microRNAs that were upregulated in bystander macrophages after 6 days of HIV-1 infection (see **Table S1** in the supplemental material) but slightly expanded our search to include those with less striking increases. Using this approach, we found that microRNA 103 ( $\log_2=0.31$ ;  $P=0.065$ ; ranked 23rd) was enhanced in GFP-negative MDMs. miRNA-103 was selected given that a closely related microRNA, miRNA-107, was also slightly upregulated in bystanders ( $\log_2=0.19$ ), although it was not among the 30 most highly expressed microRNAs (ranked 87th out of 414). Indeed, we confirmed that miRNA-107 was expressed (~400 molecules/cell) about 5-fold less than miRNA-103 (~2,000 molecules/cell) in uninfected MDMs by serial dilution quantitative PCR (qPCR). Interestingly, an ensuing search for the most relevant targets of miRNA-103 and miRNA-107 using the Targetscan database ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) revealed that the HIV-1 entry coreceptor CCR5 contains a potential miRNAs-103/107 target site in its 3' UTR (**Figure 1A**). To test CCR5 as a potential target for miRNAs-103/107, we first validated whether the 3' UTR of CCR5 could be a target of both miRNA-103 and

miRNA-107 in a reporter assay in which mRNA of the 3' UTR of CCR5 fused to that of firefly luciferase (F-Luc) is expressed in either control-, miRNA-103 mimic-, or miRNA-107 mimic-transfected HEK293T cells. The presence of the miRNA-103 or miRNA-107 mimic significantly reduced Luc expression, and this was not observed in cells expressing a CCR5 3' UTR mutated in the seed sequence (**Figure 1B**). The enhanced expression of both miRNA-103 and miRNA-107 in bystander MDMs was validated by sensitive two-tailed reverse transcription-qPCR (qRT-PCR) (33) in GFP-sorted MDMs obtained from 3 to 7 donors at either 36h or 6days of HIV-1 infection (**Figure 1C**). Accordingly, we determined that CCR5 mRNAs levels were significantly reduced in GFP-negative bystander MDMs compared to uninfected cells (**Figure 1C**).

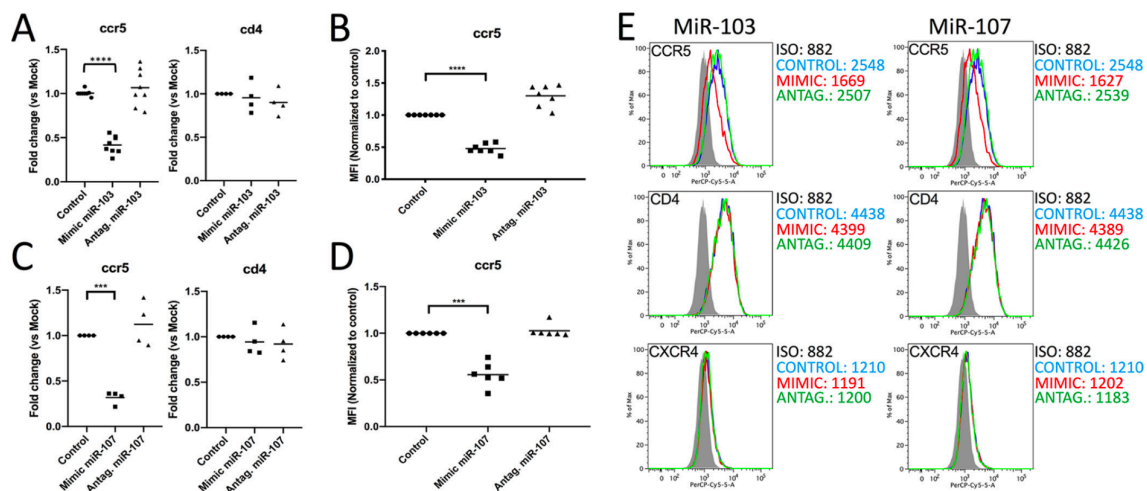


**Figure 1 - miRNA-103 and miRNA-107 are enhanced and CCR5 is downregulated in bystander MDMs.**

(A) Nucleotide sequences of miRNA-103 and miRNA-107 showing the matching seed sequence nucleotides recognized in the CCR5 mRNA 3' UTR. The nucleotides changed in the mutated version used in the target validation assay are in red. The single G/C substitution in miRNA-103 compared to miRNA-107 is shown in green. The CCR5

nucleotide sequence is from GenBank accession number NM\_000579. (B) Target validation assay in wild-type (WT) or mutant firefly luciferase (F-Luc)-CCR5-3'-UTR-transfected HEK293T cells treated with either control, miRNA-103, or miRNA-107 mimics. Results are plotted as mean F-Luc activities (relative light units [RLUs]) standardized to the control *Renilla* Luc activity  $\pm$  standard deviations (SD). Statistical significance was determined using Student's *t* test ( $n = 4$  technical replicates). (C) miRNA-103, miRNA-107, and CCR5 expression levels were determined in sorted macrophages derived from 3 to 7 blood donors by real-time qPCR. Bars shown are the mean fold changes compared to mock cells ( $n=3$  to 7 blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

Finally, the expression of CCR5 was also monitored directly in MDMs transfected with mimics or antagomirs for miRNA-103 (7 to 8 donors) or miRNA-107 (4 to 6 donors), respectively, and compared to that of the controls (**Figure 2**). A >2-fold reduction in CCR5 mRNA and an ~2-fold reduction in CCR5 cell surface expression were observed in either miRNA-103 or miRNA-107 mimic-transfected cells. Interestingly, no significant difference in CCR5 mRNA or cell surface expression was detected in either miRNA-103 or miRNA-107 antagomir-transfected MDMs and control cells, suggesting that at steady state, these microRNAs do not limit CCR5 expression (**Figure 2**).



**Figure 2 - Effect of transfected miRNA-103 or miRNA-107 mimics, or antagomirs, on CCR5 expression in MDMs.**

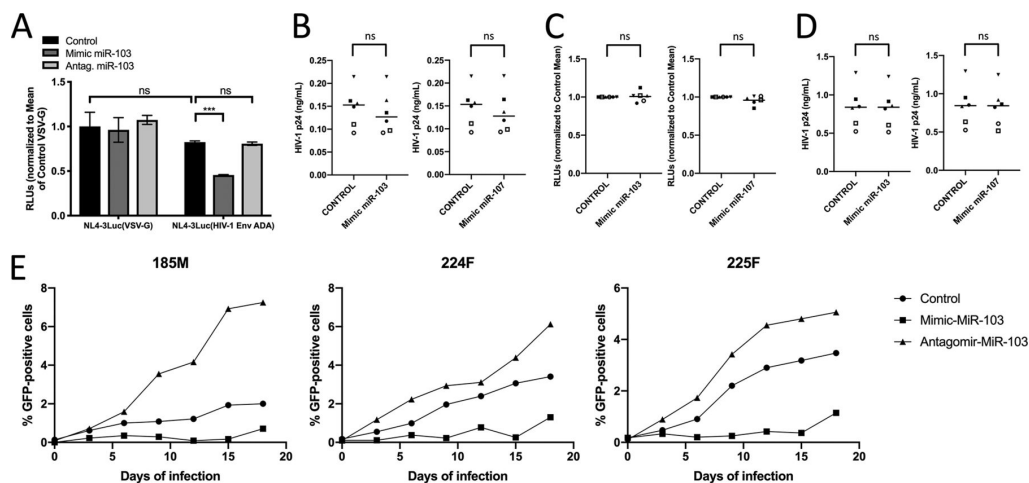
MDMs from 4 to 8 blood donors were transfected with either the indicated controls, mimics, or antagomirs and processed accordingly. (A) CCR5 and CD4 mRNA levels were quantified by real-time qPCR in control, miRNA-103 mimic-transfected, or miRNA-103 antagomir-transfected MDMs and compared to those in control-transfected cells. Bars are the mean fold changes compared to the control ( $n=4$  to 8 blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (B) Surface CCR5 was measured by flow cytometry in control, miRNA-103 mimic-transfected, or miRNA-103 antagomir-transfected MDMs, and the geometric mean fluorescence intensity (MFI) was calculated relative to control-transfected cells. Bars are the mean relative MFIs ( $n=7$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (C) CCR5 and CD4 mRNA levels were quantified by real-time

qPCR in control, miRNA-107 mimic-transfected, or miRNA-107 antagomir-transfected MDMs and compared to those in control-transfected cells. Bars are the mean fold changes compared to the control ( $n=4$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (D) Surface CCR5 was measured by flow cytometry in control-, miRNA-107 mimic-, or miRNA-107 antagomir-transfected MDMs, and the MFI was calculated relative to control-transfected cells. Bars are the mean relative MFIs ( $n=6$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (E) Representative flow cytometry data for MDMs from one blood donor shown in panels B and D. Additional surface expression levels (MFIs) for CD4 and CXCR4 are also shown. ISO, isotype control.

### *MiRNA-103 mimics restrict HIV replication in macrophages by targeting CCR5-mediated viral entry*

Since variation in CCR5 levels impacts the susceptibility of macrophages to HIV-1 (34), we tested if miRNA-103-mediated CCR5 decline affects HIV-1 infection. We focused mostly on miRNA-103 given its high levels in macrophages compared to miRNA-107. We compared Luc activities in MDMs infected with single-round Luc reporter viruses coated with either HIV-1 ADA Env (CCR5-tropic) or vesicular stomatitis virus G (VSV-G) (CD4/CCR5-independent) glycoproteins (**Figure 3A**). The transfection of miRNA-103 mimics significantly inhibited Luc activity in MDMs infected with HIV-1(ADA Env) but not in those infected with HIV-1(VSV-G) (**Figure 3A**). We observed no significant difference in Luc signals of MDMs infected with VSV-G-coated virus between control and mimic-transfected cells, suggesting that miRNA-103 mimics primarily affect CCR5-dependent viral entry. Consistent with the lack of an effect of miRNA-103 on CCR5 at steady state, transfection of miRNA-103 antagomirs did not impact CCR5-dependent viral entry. In order to investigate if either miRNA-103 or miRNA-107 influenced steps other than entry in MDMs, mimic-treated macrophages were infected with either CXCR4-tropic (**Figures 3B** and **3C**) or Env-negative (**Figure 3D**) HIV-1 that was VSV-G pseudotyped, thus limiting the analysis to a single round of infection. Similar levels of virus, as measured by an HIV-1 p24 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were detected in control and mimic-treated cell supernatants (Supnts) (**Figures 3B** and **3D**), and no change in the infectivity of the resulting CXCR4-tropic viruses was detected in TZM-bl reporter cells (**Figure 3C**). These results, combined with those obtained with VSV-G-pseudotyped HIV particles, indicate that miRNA-103 and miRNA-107 do not target any other steps in HIV-1 replication besides CCR5-mediated entry in MDMs. To further assess the

influence of miRNA-103 on HIV-1 replication kinetics in MDMs, we monitored viral spread in macrophages infected with a GFP-expressing virus (3 donors) (**Figure 3E**). In all cases, transfection of miRNA-103 mimics prior to the initial HIV-1 input reduced the frequency of GFP-expressing MDMs over 3 weeks (**Figure 3E**). Interestingly, transfection of miRNA-103 antagonists in this experimental setting enhanced the spread of HIV-1 infection in MDMs from all 3 donors, culminating in an additional (1.3- to 3-fold) increase in GFP-expressing MDMs after 3 weeks (**Figure 3E**).



**Figure 3 - Effect of transfected miRNA-103 mimics or antagonists on HIV-1 infection in MDMs.**

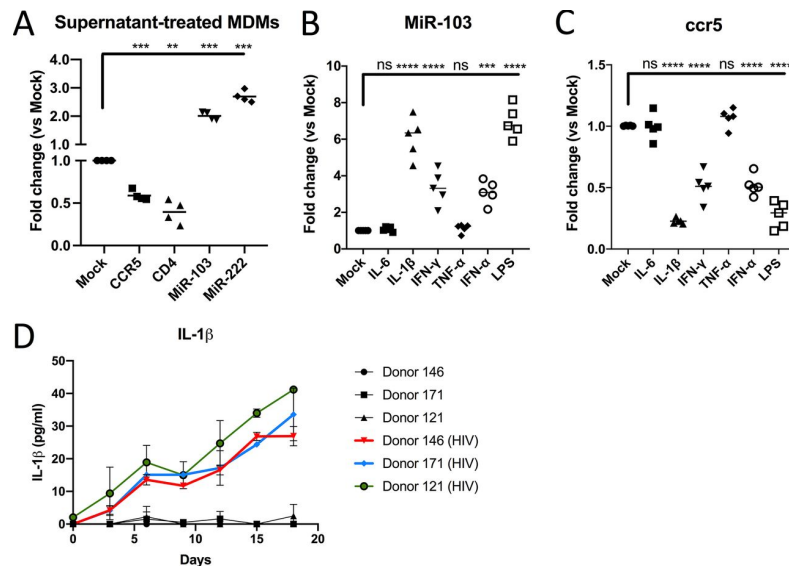
(A) MDMs isolated from 4 blood donors were treated with the indicated mimics or antagonists, or controls, and infected with HIV-1 Env (ADA)- or VSV-G-pseudotyped luciferase-encoding HIV-1, and F-Luc activity was determined in the lysates 48h following infection. RLUs were normalized to the value for F-Luc obtained in the VSV-G-pseudotyped virus-infected cells. Mean relative F-Luc activities  $\pm$  SD are shown ( $n=4$  blood donors; Student's  $t$  test). ns, not significant. (B) MDMs from 6 blood donors (represented by different symbols) were transfected with either controls or the indicated mimics and infected with VSV-G-pseudotyped CXCR4-tropic NL4-3. The level of HIV-1 released into the supernatant was determined after 4 days of infection by an ELISA for HIV-1 p24 ( $n=6$  blood donors; Student's  $t$  test). (C) The infectivity of the released viruses in panel B was measured by determining F-Luc activity in infected TZM-bl reporter cells ( $n=6$  blood donors; Student's  $t$  test). (D) Same as for panel B except that a VSV-G-pseudotyped NL4-3 $\Delta$ Env virus was used. (E) MDMs from 3 donors were transfected with either the control, the miRNA-103 antagonist, or the miRNA-103 mimic and infected with GFP-expressing HIV-1. The percentage of GFP-positive cells was determined at the indicated time points.

### *HIV-1-infected MDMs produce miRNA-103-enhancing cytokines.*

The activity of the miRNA-103 antagonists on HIV-1 infection kinetics led us to hypothesize that spreading HIV-1 infection might induce the secretion of soluble factors in MDM cultures. These factors would induce an upregulation of miRNA-103

expression levels functionally blockable by antagomirs. Indeed, such levels are not obtained in uninfected MDMs (**Figure 2**) or in single-round infections (**Figure 3A**), reminiscent of our previous observations on the targeting of the CD4 receptor by miRNA-221 and miRNA-222 (24). We thus examined the effect of virus-cleared supernatants of 3-day HIV-infected macrophage cultures on the expression of miRNA-103 and CCR5 in naive MDMs (4 donors) (**Figure 4A**). Macrophages treated with these conditioned supernatants expressed significantly reduced levels of CCR5 mRNA and, accordingly, 2-fold-increased miRNA-103 expression (**Figure 4A**). As expected, supernatant-treated MDMs also showed reduced levels of CD4 mRNA and enhanced miRNA-222 (24). In order to identify possible secreted factors required for increased miRNA-103 expression, a panel of cytokines and macrophage activators was tested for miRNA-103 (5 donors) and CCR5 mRNA (5 donors) levels (**Figures 4B** and **4C**). Although most tested factors enhanced miRNA-103, the strongest increase observed was that by lipopolysaccharide (LPS) or IL-1 $\beta$  treatment, which also resulted in the greatest reduction of CCR5 mRNA in MDMs (**Figures 4B** and **4C**). Transfection of miRNA-103 antagomirs significantly (3 donors) increased CCR5 (but not control CD4) mRNA in either LPS-, IL-1 $\beta$ -, or supernatant-treated, but not in IFN- $\gamma$ - or IFN- $\alpha$ -treated, MDMs. This suggests that the decrease in CCR5 mRNA triggered by IL-1 $\beta$  or LPS, an inducer of IL-1 $\beta$  (35, 36), is at least in part due to miRNA-103, although antagomirs have a transfection efficiency close to 60% (24). We also determined by ELISAs that IL-1 $\beta$  is secreted in HIV-1-infected macrophage cultures (**Figure 4D**), a finding consistent with miRNA-103 and miRNA-107 accumulation in bystander MDMs.



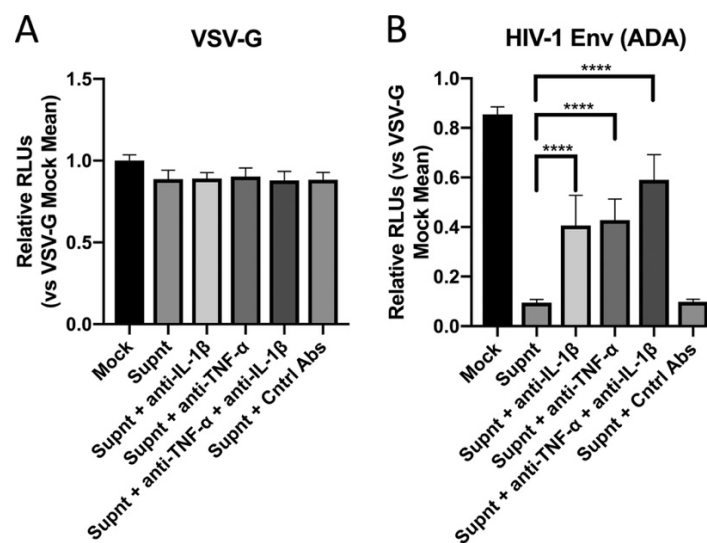


**Figure 4 - Macrophage activation by IL-1 $\beta$  reduces CCR5 expression and enhances miRNA-103.**

(A) Virus-cleared supernatants from infected macrophages were added to new MDM cultures ( $n = 4$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test) for 48h, and the levels of CCR5 mRNA, CD4 mRNA, miRNA-103, and miRNA-222 were determined by real-time qPCR. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells. (B) MDMs derived from different blood donors ( $n = 5$ ; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test) were treated with the indicated MDM activators for 48h, and miRNA-103 expression was measured by real-time qPCR. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells. (C) CCR5 mRNA levels were measured by real-time qPCR in the same samples as the ones described above for panel B. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells. (D) MDMs from 3 blood donors were infected with HIV-1, and the levels of IL-1 $\beta$  released into the supernatants were compared to that of uninfected cells at the indicated time points by an ELISA. Shown are picograms per milliliter  $\pm$  SD of IL-1 $\beta$ . See also **Figure S1**.

Finally, to directly establish the role of IL-1 $\beta$  in modulating CCR5 expression via miRNA-103 in the context of HIV-1 infection, we pretreated MDMs with the supernatant alone or in the presence of either neutralizing anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$ , or a combination of both antibodies (Abs). Neutralizing TNF- $\alpha$  was used given that TNF- $\alpha$  decreases CD4 and CD4-mediated HIV-1 entry via miRNAs-221/222 (24). These cells were then infected with the single-cycle luciferase reporter viruses (**Figure 3A**). As expected, the CCR5 HIV-1 Env-tropic luciferase viruses poorly infected supernatant-treated macrophages; however, this inhibition was partly alleviated by the presence of neutralizing anti-IL-1 $\beta$  or anti-TNF- $\alpha$  Ab (**Figure 5**). Treatment of the supernatant with both Abs further restored the susceptibility of MDMs to CCR5 HIV-1 Env-tropic virus infection, thus underlining the antiviral impact of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . No effect was observed using CD4/CCR5-independent VSV-G-coated viruses, strongly suggesting that the supernatant containing IL-1 $\beta$  was inhibiting viral entry in part by decreasing

the mRNA levels of CCR5 (**Figure 5A**). We further confirmed this by measuring the levels of miRNA-103 in MDMs treated with the supernatant with or without the neutralizing Abs; indeed, a decrease in miRNA-103 was detected specifically in anti-IL-1 $\beta$  Ab-treated cells (**Figure S2**). These results support a role of IL-1 $\beta$  in the induction of miRNA-103 and the downregulation of CCR5 during HIV-1 infection of MDMs, yet other factors secreted into the supernatant, such as IFN- $\alpha$  (37) (**Figure 4** and **Figure S1**), RANTES, macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), and MIP-1 $\beta$  (38), are also likely to contribute to the reduced levels of CCR5 (at both the mRNA and surface protein levels) in supernatant-exposed cells.



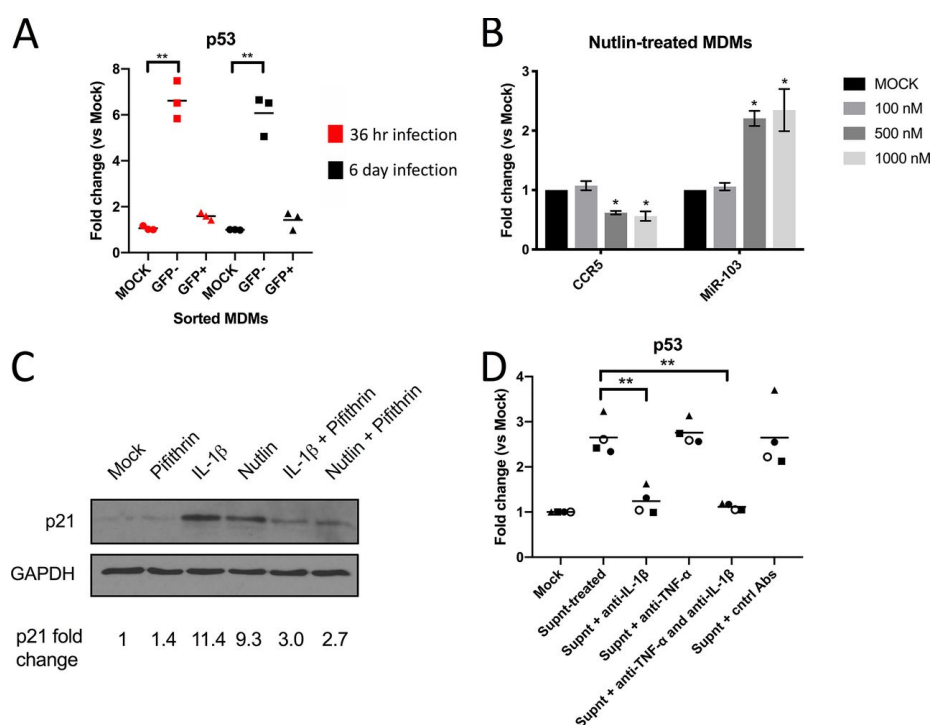
**Figure 5 - IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$  secreted into HIV-1-infected MDM supernatants inhibits CCR5/CD4-dependent HIV-1 infection of macrophages.**

The virus-cleared supernatant from infected macrophages was added to new MDM cultures from 3 blood donors, prior to infection with the indicated F-Luc-encoding viruses (pseudotyped with VSV-G [A] or HIV-1 Env ADA [B]), and F-Luc activity in the cell lysates was measured. In some cases, the conditioned supernatant was treated with either control goat anti-human IgGs (Cntrl Abs), neutralizing anti-TNF- $\alpha$ , neutralizing anti-IL-1 $\beta$ , or both neutralizing antibodies. Mean F-Luc activities  $\pm$  SD are shown ( $n = 3$  blood donors; Student's  $t$  test). See also **Figure S2**.

### *IL-1 $\beta$ restricts HIV-1 entry in MDMs by p53-induced miRNA-103.*

IL-1 $\beta$  has been reported to activate p53-dependent pathways (39), and both miRNA-103 and miRNA-107 have been shown to be upmodulated by p53 (40-42). Since miRNA-103 and miRNA-107 are upregulated in bystander MDMs (**Figure 1**), we confirmed that p53 mRNA is also enhanced in these cells (**Figure 6A**) following either 36h or 6days of HIV-1 infection. Furthermore, Nutlin-3, an MDM2 antagonist and p53

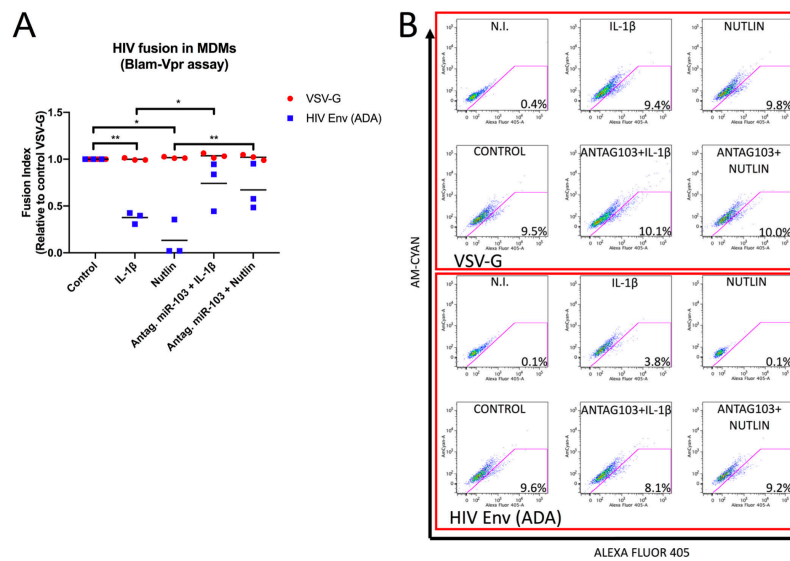
pathway activator (43), increased miRNA-103 levels in treated MDMs, leading to a decrease in CCR5 mRNA (**Figure 6B**), thus validating the regulation of miRNA-103 by p53. We confirmed the enhanced activity of p53 in either IL-1 $\beta$ - or Nutlin-treated MDMs by showing an increase of p21, a well-established p53-regulated protein, in these cells, which was inhibited by the p53 inhibitor Pifithrin (**Figure 6C**). Importantly, supernatant treatment enhanced p53 mRNA in MDMs, and this increase was completely abolished by neutralizing anti-IL-1 $\beta$  Abs (**Figure 6D**).



**Figure 6 - IL-1 $\beta$ -triggered p53 activity modulates CCR5 mRNA and miRNA-103 levels.**

(A) Expression of p53 mRNA was determined in sorted macrophages derived from 3 blood donors by real-time qPCR. Bars shown are the mean fold changes compared to mock cells ( $n=3$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (B) Different concentrations of the MDM2 antagonist Nutlin-3 were added to MDMs (3 different blood donors), and its effect on CCR5 mRNA and miRNA-103 levels was determined by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes  $\pm$  SD compared to mock cells ( $n=3$  blood donors; Student's  $t$  test). (C) Control, IL-1 $\beta$ -treated, or Nutlin-treated MDMs were then exposed to Pifithrin (or the vehicle) for 24h and lysed, and the p53-driven enhanced expression of p21 was determined by Western blotting. Data shown are derived from MDMs of one blood donor ( $n=2$  blood donors). (D) The conditioned supernatant from infected macrophages was added to new MDM cultures from 4 blood donors. In some cases, the conditioned supernatant was treated with either control goat anti-human IgGs (Cntrl Abs), neutralizing anti-TNF- $\alpha$ , neutralizing anti-IL-1 $\beta$ , or both neutralizing antibodies. The level of p53 mRNA was then measured by real-time qPCR. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells ( $n = 4$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

To specifically test the effect of the IL-1 $\beta$ -mediated induction of miRNA-103 on HIV-1 entry in MDMs, we used the Blam-Vpr fusion assay (44). Compared to VSV-G-pseudotyped control viruses, the fusion step of HIV-1 CCR5-tropic Env-coated viral particles was strongly inhibited by either IL-1 $\beta$  or Nutlin-3. Importantly, these inhibitory effects were substantially abolished by treatment with miRNA-103 antagonists (Figure 7), indicating that inhibition of viral entry by IL-1 $\beta$  in macrophages involves p53-regulated miRNA-103 and, most likely, miRNA-107.



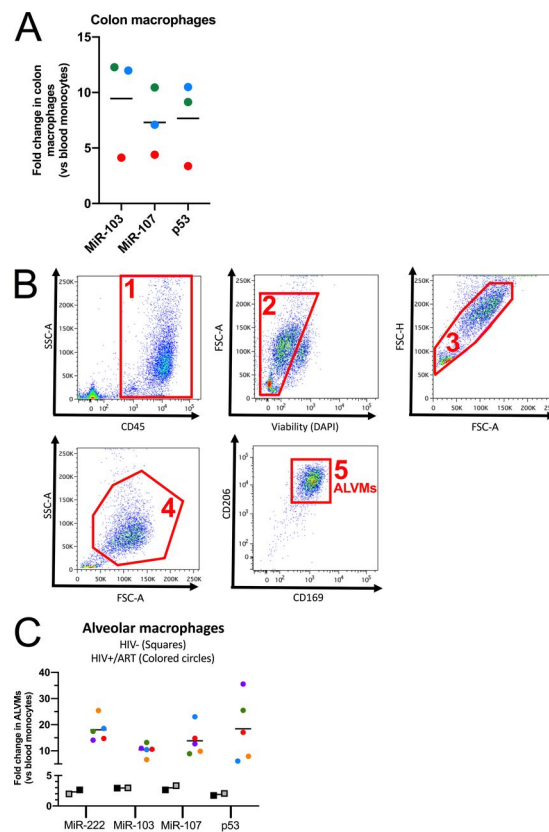
**Figure 7 - IL-1 $\beta$  triggers p53-mediated inhibition of CCR5-dependent HIV-1 entry in macrophages through miRNA-103.**

MDMs derived from different blood donors ( $n = 3$ ) were treated with the indicated reagents for 48h and then left untreated or additionally treated with miRNA-103 antagonists. (A) Macrophages were then infected with either the VSV-G- or HIV-Env (ADA)-pseudotyped Blam-Vpr-containing viruses. Bars represent mean viral fusion efficiencies compared to VSV-G-pseudotyped virus fusion in control-treated cells (“fusion index”). Statistics were calculated by Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests. (B) Data from a representative experiment (numbers represent percentages of Alexa Fluor 405-positive cells). N.I., noninfected control.

### *HIV-resistant tissue-resident macrophages express high levels of miRNAs-103/107.*

To ascertain a more physiological sense of miRNAs-103/107 in tissue-resident macrophages, we examined the levels of miRNA-103, miRNA-107, and p53 mRNA in colon macrophages obtained from healthy donors (24) as well as in lung alveolar macrophages (ALVMs) recovered from either HIV-negative or HIV-infected individuals under long-term antiretroviral therapy (>9years) (45, 46) and compared their expression levels to those in blood monocytes obtained from the same individuals.

First, as we previously described for the CD4-targeting miRNA-221 (24), miRNAs-103/107 and p53 mRNA were greatly upregulated in colon macrophages (3 donors) (Figure 8A), thus potentially contributing to the resistance of these cells to HIV-1 infection (22, 23). In alveolar macrophages, which were isolated as described in the legend of Figure 8B, the levels of miRNAs-103/107, p53 mRNA, as well as miRNA-222 were slightly increased, compared to those in blood monocytes, in HIV-1-negative participants ( $n = 2$  donors) (Figure 8C) but were highly upregulated in aviremic HIV-infected individuals ( $n = 5$  donors) (Figure 8C), suggesting that in the latter context, local environmental inflammatory signals may drive ALVMs to an antiviral state that likely limits HIV-1 entry and infection via the upregulation of microRNAs, including miRNAs-103/107 and miRNAs-221/222.



**Figure 8 - HIV-resistant tissue-resident macrophages express high levels of miRNAs-103/107.**

(A) Myeloid cells were sorted from matched sigmoid intestine biopsy specimens and blood of 3 HIV-negative study participants. The expression levels of miRNA-103, miRNA-107, and p53 mRNA in blood and colon myeloid cells were determined by real-time qPCR and normalized to the levels in blood myeloid cells ( $n = 3$  donors, represented by different colors). (B) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) strategy (steps 1 to 5) to obtain lung alveolar macrophages (ALVMs). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. SSC-A, side scatter (area); FSC-A, forward scatter (area); FSC-H, forward scatter (height). (C) ALVMs and blood monocytes were obtained from 5 HIV-positive (under ART) or 2 HIV-negative

individuals, and the levels of p53 mRNA, miRNA-222, miRNA-103, and miRNA-107 were determined by real-time qPCR. RNA levels of ALVMs were normalized to that of the blood monocytes ( $n = 2$  or 5 donors, represented by different colors). In all cases, bars represent the mean fold changes compared to the levels in blood myeloid cells.  $P$  values for fold changes are all  $<0.01$  (\*\*) compared to blood myeloid cells, from Wilcoxon matched-pairs signed-rank tests. Each dot represents a participant.

## **Discussion**

Levels of chemokine receptor CCR5 expression have a central role in determining the risk of HIV-1 acquisition and disease progression (3). Deciphering the multiple facets of regulation that condition CCR5 expression in HIV-1 target cells is therefore needed to better understand the influence of CCR5 on the outcome of HIV-1 infection and for advancing the development of CCR5-targeted therapies. In this study, we took advantage of a previous profiling of microRNAs differentially expressed in HIV-1-infected and virus-exposed noninfected MDMs that had identified miRNA-221 and miRNA-222 as modulators of CD4 expression (24), to search for microRNAs regulating CCR5 expression in macrophages. Indeed, the levels of CCR5 mRNA in virus-exposed, noninfected bystander MDMs were downregulated, leading us to focus on upregulated microRNAs in these cells that would potentially target the 3' UTR of CCR5 and limit HIV-1 entry.

Among the microRNAs that were upregulated in bystander MDMs, two closely related microRNAs, miRNA-103 and miRNA-107, were identified as modulators of CCR5 expression. These two paralogs reside on different human chromosomes and are encoded within introns in the genes that encode pantothenate kinase (PANK) enzymes that are essential for the biosynthesis of coenzyme A (47). The expression of miRNAs-103/107 has been shown to regulate systemic glucose metabolism and insulin sensitivity (48) and has been associated with many types of cancers, including colorectal cancers (49, 50). Our data reveal that miRNAs-103/107 upregulation in MDMs significantly reduces CCR5 mRNA and surface protein expression levels and as a result downregulates HIV-1 entry. Despite being able to target the expression of multiple host proteins involved in cell growth, motility, and adhesion (CDK6, P130, LATS2, DAPK, KLF4, and Axin) (42, 49, 50), survival (LRP) (41), and carbohydrate and fatty acid metabolism (caveolin-1) (47, 48, 51), the expression of miRNAs-103/107

mimics had no detectable effects on VSV-G-pseudotyped HIV-1 infection or on late stages of the virus replication cycle that govern the production of infectious virus particles. These findings demonstrate that in the context of macrophages, these microRNAs impact specifically HIV-1 entry by interfering with Env-mediated viral fusion via CCR5. Interestingly, although miRNAs-103/107 antagomirs had no effect on CCR5 expression in uninfected MDMs, these antagomirs alleviated CCR5 downregulation under conditions in which the expression of miRNAs-103/107 was induced by cytokine treatment, notably IL-1 $\beta$ . This observation is reminiscent of the disrupting effect of miRNAs-221/222 antagomirs on TNF- $\alpha$ -mediated CD4 downregulation via miRNAs-221/222 upregulation (24). Taking this into account, the presence of miRNAs-103/107 antagomirs in the context of HIV-infected MDMs was shown to significantly enhance the spread of HIV-1 infection, validating that miRNAs-103/107 expression levels are increased in noninfected bystander cells, thus making them refractory to HIV-1 infection.

Infection of MDMs with HIV-1 *in vitro* results in the upregulation and constitutive secretion of IL-1 $\beta$  in culture supernatants (52). Our data demonstrate that the release of IL-1 $\beta$  by infected macrophages induces an upregulation of miRNA-103 in MDMs treated with a conditioned supernatant, a state that leads to a reduction of CCR5 mRNA levels. Although the exposure of MDMs to other cytokines reported to inhibit HIV-1 replication in macrophages, such as IFN- $\gamma$  (27) and IFN- $\alpha$  (53, 54), downregulated CCR5 mRNA, this reduction was not affected by miRNA-103 antagomirs, thus excluding a direct role of miRNA-103 in IFN- $\gamma$ - or IFN- $\alpha$ -mediated downmodulation of CCR5 expression levels. However, the addition of the miRNA-103 antagomirs did not result in a complete recovery of CCR5 levels in conditioned supernatant- or IL-1 $\beta$ -treated MDMs, suggesting that other factors/cytokines participate in CCR5 modulation through an independent process. IL-1 $\beta$  binding to IL-1 $\beta$  receptor 1 was reported to stimulate HIV-1 transcription through a mechanism independent of the activation of NF- $\kappa$ B (55). However, it was also shown that IL-1 $\beta$  can inhibit HIV-1 entry by downregulating the CD4 receptor at the transcriptional level (24, 36). Taken together, our results further extend these findings and provide direct evidence that IL-1 $\beta$  can also inhibit HIV entry by disrupting HIV-1 Env-mediated fusion

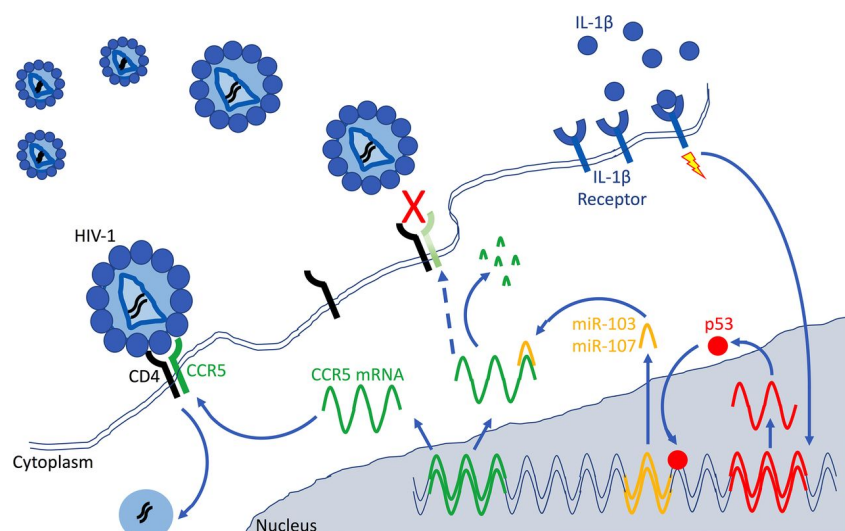
by triggering miRNAs-103/107-directed downmodulation of CCR5 mRNAs. That being said, it is important to note that innate immune activation of macrophages occurs beyond IL-1 $\beta$  and affects a broad array of transcriptional factors that can affect viral restriction at different stages of the virus replication cycle. Indeed, a recent paper by Covino et al. (56) shows how the activation of an NF- $\kappa$ B/miRNA-155 regulatory network upon the neutralization of CCL2 contributes to the restriction of HIV-1 replication in macrophages at postentry steps, notably through APOBEC3A.

Previous reports have shown that miRNAs-103/107 expression is regulated by p53 (40-42). Furthermore, besides its tumor suppressor function, p53 has been found to modulate the macrophage response to environmental challenges and regulate proinflammatory gene responses in these cells (57-59). Thus, our finding that the regulation of CCR5 expression by IL-1 $\beta$  is at least in part triggered by p53-modulated microRNAs reinforces the notion that p53 plays a key role in integrating environmental signals and, more specifically, an inflammatory signal triggered by IL-1 $\beta$  and highlights how the resulting p53-modulated response impacts the permissiveness of macrophages to HIV-1 infection. Indeed, we show that p53 mRNA is enhanced in sorted bystander MDMs and that treatment of macrophages with the p53 stabilizer Nutlin-3 leads to inhibition of HIV-1 fusion through enhanced expression of miRNAs-103/107 and reduction of CCR5 expression. Given the multifunctional nature of p53, it is conceivable that other steps of the HIV-1 replicative cycle, downstream of viral entry, may also be affected upon p53 stabilization and activation. Indeed, we recently showed that downmodulation of MDM2, the E3 ubiquitin ligase responsible for p53 degradation, impairs early HIV-1 postentry steps in macrophages (60), suggesting that p53 activation is restrictive for HIV-1 infection in MDMs. In that regard, the p53-dependent increase of p21 in macrophages was shown to enhance the antiviral form of SAMHD1, a restriction factor that disrupts the production of HIV-1 cDNA (61). Overall, our current results and previous findings on miRNAs-221/222 (62) underscore a sophisticated antiviral response triggered by the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in MDMs that impedes HIV-1 entry via p53- and NF- $\kappa$ B-regulated microRNAs targeting CCR5 and CD4 expression.



The great variation in the HIV-1 susceptibility of macrophages is due to their different activation levels, origins, and tissue localizations (63). Indeed, several antiviral restriction factors are enhanced in activated MDMs and target various steps of the viral replicative cycle. Macrophages directly isolated from different tissues also show remarkable differences in their susceptibility to HIV-1 infection, with intestinal macrophages displaying nonpermissiveness to HIV-1 infection because of a downregulation of CD4 and CCR5 (15, 22). Interestingly, our results reveal that besides expressing important levels of CD4-targeting miRNAs-221/222, these cells express significant quantities of miRNA-103 and miRNA-107 that could also contribute to their resistance to HIV infection. Furthermore, our data show that lung alveolar macrophages express high levels of miRNAs-103/107, miRNA-222, and p53 mRNA in the context of HIV-1-infected individuals undergoing ART. These levels are strikingly higher than those found in HIV-1-negative participants, suggesting that these tissue-resident macrophages in ART-treated individuals might be in an activated state refractory to HIV-1 infection. Whether downregulation of CD4 and CCR5 expression by miRNAs-221/222 and miRNAs-103/107, respectively, represents one of the barriers for seeding the HIV-1 reservoir in these cells, perhaps explaining the varying occurrence and the low frequency of alveolar macrophages harboring proviral DNA in virally suppressed HIV-1-infected individuals (19, 46), awaits further studies.

In conclusion, we have identified miRNA-103 and miRNA-107 as important p53-regulated effectors of the antiviral response triggered by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , as summarized in **Figure 9**. These microRNAs act as inhibitors of HIV-1 entry through their capacity to downregulate the CCR5 coreceptor. These findings raise the possibility that p53-activating drugs, many of which are currently in clinical trials, may have unforeseen effects on macrophage susceptibility to HIV-1 infection, thus influencing the establishment of an HIV-1 reservoir in these cells.



**Figure 9 - Model summarizing how miRNA-103 and miRNA-107 target CCR5 mRNA, leading to less CCR5-mediated HIV-1 entry in macrophages.**

The exposure of macrophages to the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  (blue dots) triggers the expression of p53 (red dots). The resulting p53 response activates a set of p53-regulated genes, including miRNA-103 and miRNA-107 (yellow), which target CCR5 mRNAs (green) and downregulate their levels, presumably by inducing their degradation. The ensuing reduction of CCR5 expression at the cell surface (broken blue arrow and light green CCR5) limits HIV-1 entry and influences the permissiveness of macrophages to HIV-1 infection. This model highlights miRNA-103 and miRNA-107 as important p53-regulated effectors of the antiviral response triggered by the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in macrophages.

## **Materials and methods**

### ***Study subjects***

Peripheral blood samples were obtained from HIV- and hepatitis C virus (HCV)-seronegative adults (of either gender) or HIV-seropositive adults under suppressive ART in the case of human lung alveolar macrophages. Research protocols for the use of HIV-seronegative human blood cells were approved by the Research Ethics Review Board of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM). The study using sigmoid intestine biopsy specimens and blood from adult participants received approval from the Institutional Review Boards of the McGill University Health Centre and the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM) (64). The study using human lung alveolar macrophages and blood from participants received approval from the Institutional Review Boards of the McGill University Health Centre, the CR-CHUM, and the Université du Québec à Montréal

(UQAM). All participants had given written informed consent, and all studies were performed in compliance with the Declaration of Helsinki.

### ***Plasmid constructs, CCR5 3'-UTR validation assay, and microRNA mimics and antagomirs***

The NL4-3 (65), NL4-3ΔEnv (66), NL4-3Env<sup>-</sup>Luc<sup>+</sup>Vpr<sup>+</sup> (67), Blam-Vpr (44), SVCMV-VSV-G (62), SVIII-ADA-Env (68), NL4-3-ADA-IRES-GFP, and NL4-3Env<sup>-</sup>Vpr<sup>-</sup> (24) constructs were previously described. For the miR-REPORT system, the plasmid pGL4.70Actin1.2(8) (69), encoding *Renilla* luciferase under the control of the actin promoter, was used instead of pMIR-REPORT-β-gal. In order to generate pMIR-REPORT-CCR5-Luc, blunt-end *Pfu* PCR was performed on cDNA of pooled primary peripheral blood lymphocytes (PBLs) using primers 5'CCR5UTR and 3'CCR5UTR (see **Table S2** in the supplemental material), and the fragment equivalent to the full CCR5 3' UTR was inserted into the *SacI* and blunted *HindIII* sites of pMIR-REPORT-Luc. Site-directed mutagenesis of the 3' UTR of CCR5 was performed by 2-step overlap PCR using primers CCR5mutFwd and CCR5mutRev (**Table S2**) and cloned into pMIR-REPORT using the same strategy in order to generate pMIR-REPORT-CCR5mutLuc (in which the miRNAs-103/107 target sequence ATGCTGC is mutated to ATAAAAC). The 3'-UTR CCR5 target validation assay was performed as previously described (24) using pMIR-REPORT-CCR5-Luc or pMIR-REPORT-CCR5mut-Luc and the Dual-Glo luciferase assay system (Promega) on a GloMax luminometer (Promega). For absolute qRT-PCR analyses of miRNA-103 and miRNA-107, primers miR-103C-FWD and miR-103C-REV or primers miR-107C-FWD and miR-107C-REV were annealed and directly inserted into the *EcoRI* and *BamHI* sites of pEGFP-N1 to create pMIR-103 and pMIR-107, respectively. The miRNA-103-3p (catalog number YM00470828), miRNA-107 (catalog number YM00470827), and miRNA-222 (catalog number 472196-001) miRCURY locked nucleic acid (LNA) mimics or the miRNA-103-3p (catalog number YI04107448) and miRNA-107 (catalog number YI04109094) antagomirs were purchased from Qiagen (Exiqon). Nontargeting control RNAs were obtained from Dharmacon/GE Healthcare (siGENOME nontargeting 2, catalog number D-001210-02-20) or Ambion/Thermo Fisher Scientific (catalog number AM16104).

### ***Antibodies, flow cytometry, and chemicals used***

Antibodies used for flow cytometry assays were anti-human J418F1 or HEK/1/85a CCR5, 3.9 CD11c, 12G5 CXCR4, and OKT4 CD4 (all peridinin chlorophyll protein [PerCP]-Cy5.5); 3.9 CD11c-phycoerythrin (PE)-Cy7, M5E2 CD14-Pacific Blue, and 3G8 CD16-allophycocyanin (APC)-Cy7 were used with the corresponding isotype controls (BioLegend). The Live/Dead fixable dead-cell stain kits were obtained from Life Technologies/Invitrogen. The following specific antibodies used to isolate colon myeloid cells were all from BioLegend: 9C4 CD326-Brilliant Violet 650 (BV650), RPAT8 CD8-PerCP-Cy5.5, HIB19 CD19-PerCP-Cy5.5, G10F5 CD66b-PerCP-Cy5.5, UCHT1 CD3-Alexa Fluor 700 or -Pacific Blue, and L243 HLA-DR-BV785. The specific antibodies used to isolate human alveolar macrophages were HI30 CD45-PE-Cy7, 19.2 CD206-PE, and 7-239 CD169-Brilliant Blue 515 (BB515) (all from BD Biosciences); OKT3 CD3-PE and HCD14 CD14-BV421 (both from BioLegend) were also used to isolate blood myeloid cells. Preparation of cells for flow cytometry and protein expression analyses was performed as previously described (24). The MDM2 inhibitor Nutlin-3 (Sigma) and the p53 inhibitor Pifithrin- $\alpha$  (EMD-Millipore) were used at 500nM and 10 $\mu$ M, respectively, unless mentioned otherwise, for 48h.

### ***MDM isolation, activation, and transfection and HIV-1 production and infection***

MDMs were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and characterized as previously described (24). MDM activation was induced by 48h of treatment with the following reagents: LPS (100ng/ml; Sigma), TNF- $\alpha$  (10ng/ml; BioLegend), IL-6 (10ng/ml; BioLegend), IFN- $\alpha$  (100 U/ml; PBL Interferon Source), IFN- $\gamma$  (20ng/ml; Peprotech), and IL-1 $\beta$  (10ng/ml; BioLegend). Transfection of MDMs with either Exiqon microRNA LNA mimics or inhibitors (antagomirs) was performed using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) as previously described (24). Following a 72-h incubation, cells were harvested for qRT-PCR or flow cytometry analyses. In some cases, a second transfection was performed. Viruses were produced and titers were determined as previously described (24), using the TZM-bl reporter cell line (70). Unless otherwise indicated, macrophages were infected with HIV-1 at a multiplicity of infection (MOI) of 1.

### ***SDS-PAGE and Western immunoblot analyses***

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of macrophage lysates and immunoblotting were performed as previously described (71) using rabbit anti-human 12D1 p21 (1/500; NEB/Cell Signaling) or mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (BioLegend) diluted 1/200.

### ***Analysis of HIV-1 infection or fusion in MDMs, preparation of conditioned supernatants, and IL-1 $\beta$ measurement***

MDMs were transfected with either control RNA, mimics, or antagonists and cultured for 72 h in 12-well plates. Cells were then infected with NL4-3-ADA-IRES-GFP virus at an MOI of 1, washed, and incubated for 2 weeks. Macrophages and their supernatants were harvested at the indicated time points, and viral spread was assessed by analyzing the percentage of cells expressing GFP by flow cytometry. For infected MDM conditioned supernatants, the supernatant was harvested at 48h postinfection, ultracentrifuged on 20% sucrose cushions to clear it of virus particles, and then added (diluted 1/20) to new MDM cultures. Briefly, the conditioned supernatant was either left untreated, treated for 20min at 37°C with neutralizing goat anti-human TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  monoclonal Abs (mAbs) (1 $\mu$ g/ml; R&D Systems, Cedarlane) or control anti-human IgGs (1 $\mu$ g/ml; Molecular Probes, Invitrogen), and added to macrophages 48 h prior to RNA extraction, the addition of antagonists, or infection with VSV-G- or HIV-1 ADA-pseudotyped luciferase-encoding viruses. In the latter case, macrophages were lysed following 48 h of infection, and luciferase activity was determined. Virus production was assessed in some experiments by HIV-1 p24 ELISAs, and the infectivity of released virus was evaluated in TZM-bl reporter cells as described previously (24). Viral fusion was measured using the Blam-Vpr assay (44) as described previously (24). IL-1 $\beta$  in the supernatants from either control uninfected or infected MDMs was measured using an IL-1 $\beta$  ELISA Legend Max kit (BioLegend).

### ***RNA extraction, reverse transcription, and real-time qPCR analyses***

Total cellular RNAs were extracted using RNeasy RNA extraction columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C. For the isolation of

infected (GFP<sup>+</sup>) and bystander (GFP<sup>-</sup>) macrophage populations, MDMs infected with NL4-3-ADA-IRES-GFP viruses (MOI of 1) were sorted using an Influx cell sorter (BD Biosciences), and GFP<sup>+</sup> and GFP<sup>-</sup> cells were directly recovered in RLT lysis buffer as previously described (24). In the case of microRNAs, cDNAs were obtained by using two-tailed qRT-PCR (33); briefly, 100 to 300ng of total RNAs was reversed transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) with poly(dT) and specific loop primers for the appropriate microRNAs. For qRT-PCR, cDNA and appropriate primers (**Table S2**) were added to SYBR green select master mix (Applied Biosystems) in 96-well plates and run on a ViiA96 thermocycler (Thermo Fisher Scientific). GAPDH was used as a loading control, and  $\Delta\Delta C_T$  variations were calculated. For microRNA absolute quantitation, primers were designed according to methods described previously by Balcells et al. (72), and standardized dilutions of pMIR103 or pMIR107 were used as a reference to compute microRNA copy numbers. Particular attention was noted on melt curve analyses to obtain optimal conditions.

#### ***Comparative expression of miRNAs-103/107 and p53 mRNA in myeloid cells isolated from PBMCs or the colon***

Myeloid cells from either peripheral blood or sigmoid colon biopsy specimens were isolated from 3 adult HIV-negative donors, as previously described (23, 24). Cells stained with a cocktail of Abs were suspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 5% fetal bovine serum (FBS) and 25mmol/liter HEPES buffer, and the myeloid cell-enriched fraction with a CD326<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD66b<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> HLA-DR<sup>high</sup> phenotype was sorted on a BD-FACS Aria III instrument (BD Biosciences). The viability dye Live/Dead fixable aqua dead-cell stain kit (Invitrogen) was used to exclude dead cells. Sorted cells were lysed in RLT lysis buffer (Promega), and RNA was extracted for real-time qPCR.

#### ***Comparative expression of miRNAs-103/107, miRNA-222, and p53 mRNA in blood monocytes or ALVMs***

Individuals were recruited at the McGill University Health Centre and the CR-CHUM (Montreal, Canada). Bronchoalveolar lavage (BAL) specimens were collected from 2 HIV-negative individuals and 5 HIV-positive individuals under suppressive ART

(undetectable plasma viral load and CD4 count higher than 350cells/mm<sup>3</sup>) for at least 3years and without any respiratory symptoms or active infections and processed as previously described (45). Matched peripheral blood was also collected from the participants, and CD14<sup>+</sup> blood monocytes were isolated using an Influx cell sorter and recovered directly in RLT lysis buffer (Qiagen). BAL fluid cells were first washed and resuspended in a solution containing PBS–5% FBS–25mM HEPES (pH 7.4), FcR blocked, and stained with a cocktail of Abs, and cells with the CD45<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> CD169<sup>+</sup> phenotype were sorted. Live/Dead viability dye (Invitrogen) was used to exclude dead cells. Sorted cells were lysed in RLT lysis buffer, and RNA was extracted for mRNA or microRNA qRT-PCR.

### **Statistics**

Statistical analyses were performed using the nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test or Student's *t* test. Statistical significance is indicated in the figures (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

### **Acknowledgments**

We thank Martine Gauthier (IRCM Clinic) for coordinating access to blood donors as well as the participants. We also thank Eric Massicotte for his assistance in flow cytometry. The following reagents were obtained from the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: TZM-bl cells, from John C. Kappes, Xiaoyun Wu, and Tranzyme, Inc. We thank Tom Hobman (University of Alberta) for the miRNA-REPORT system, Warner Greene (Gladstone Institute, UCSF) for the Blam-Vpr plasmid, and members of the Canadian HIV-Ageing Multidisciplinary Programmatic Strategy (CHAMPS) in NeuroHIV Research Team for helpful discussions.

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants HAL-157986 and FDN-154324 to É.A.C., PJT-166049 to J.-P.R., PG-153082 to C.T.C. and M.-A.J., as well as HB2-164064 (Canadian HIV Cure Enterprise-CanCURE) to É.A.C., P.A., J.-P.R., C.T.C., and M.-A.J. This work was also supported in part by the

Fonds de la Recherche Québec-Santé (FRQ-S), Réseau SIDA/Maladies Infectieuses. É.A.C. is the recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV Research. M.-A.J. holds the CIHR Canada Research Chair tier 2 in immunovirology. C.T.C. holds an FRQ-S Junior 1 clinician-researcher salary award. J.-P.R. is the holder of the Louis Lowenstein Chair in Hematology and Oncology, McGill University, and the William Turner award holder from the McGill University Health Centre.

## **References**

1. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955–1958.
2. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. 1996. HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667–673.
3. BreLOT A, Chakrabarti LA. 2018. CCR5 revisited: how mechanisms of HIV entry govern AIDS pathogenesis. *J Mol Biol* 430:2557–2589.
4. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367–377.
5. Joseph SB, Arrildt KT, Sturdevant CB, Swanstrom R. 2015. HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol* 21:276–289.
6. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233:1089–1093.



7. DiNapoli SR, Ortiz AM, Wu F, Matsuda K, Twigg HL, III, Hirsch VM, Knox K, Brenchley JM. 2017. Tissue-resident macrophages can contain replication-competent virus in antiretroviral-naive, SIV-infected Asian macaques. *JCI Insight* 2:e91214.
8. Avalos CR, Price SL, Forsyth ER, Pin JN, Shirk EN, Bullock BT, Queen SE, Li M, Gellerup D, O'Connor SL, Zink MC, Mankowski JL, Gama L, Clements JE. 2016. Quantitation of productively infected monocytes and macrophages of simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 90:5643–5656.
9. Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Foster J, Zakharova O, Wietgreffe S, Caro-Vegas C, Madden V, Sharpe G, Haase AT, Eron JJ, Garcia JV. 2016. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J Clin Invest* 126:1353–1366.
10. Micci L, Alvarez X, Iriete RI, Ortiz AM, Ryan ES, McGary CS, Deleage C, McAtee BB, He T, Apetrei C, Easley K, Pahwa S, Collman RG, Derdeyn CA, Davenport MP, Estes JD, Silvestri G, Lackner AA, Paiardini M. 2014. CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells. *PLoS Pathog* 10:e1004467.
11. Sattentau QJ, Stevenson M. 2016. Macrophages and HIV-1: an unhealthy constellation. *Cell Host Microbe* 19:304–310.
12. Boliar S, Gludish DW, Jambo KC, Kamng'ona R, Mvaya L, Mwandumba HC, Russell DG. 2019. Inhibition of the lncRNA SAF drives activation of apoptotic effector caspases in HIV-1-infected human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:7431–7438.
13. Clayton KL, Collins DR, Lengieza J, Ghebremichael M, Dotiwala F, Lieberman J, Walker BD. 2018. Resistance of HIV-infected macrophages to CD8(+) T lymphocyte-mediated killing drives activation of the immune system. *Nat Immunol* 19:475–486.
14. Kruize Z, Kootstra NA. 2019. The role of macrophages in HIV-1 persistence and pathogenesis. *Front Microbiol* 10:2828.
15. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Clapham PR, Smythies LE, Smith PD. 2009. Macrophages in

vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 83:3258–3267.

16. Ganor Y, Zhou Z, Bodo J, Tudor D, Leibowitch J, Mathez D, Schmitt A, Vacher-Lavenu MC, Revol M, Bomsel M. 2013. The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages. *Mucosal Immunol* 6:776–786.
17. Ganor Y, Real F, Sennepin A, Dutertre CA, Prevedel L, Xu L, Tudor D, Charmeteau B, Couedel-Courteille A, Marion S, Zenak AR, Jourdain JP, Zhou Z, Schmitt A, Capron C, Eugenin EA, Cheynier R, Revol M, Cristofari S, Hosmalin A, Bomsel M. 2019. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol* 4:633–644.
18. Jambo KC, Banda DH, Kankwatira AM, Sukumar N, Allain TJ, Heyderman RS, Russell DG, Mwandumba HC. 2014. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol* 7:1116–1126.
19. Cribbs SK, Lennox J, Caliendo AM, Brown LA, Guidot DM. 2015. Healthy HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy harbor HIV-1 in their alveolar macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31:64–70.
20. Worgall S, Connor R, Kaner RJ, Fenamore E, Sheridan K, Singh R, Crystal RG. 1999. Expression and use of human immunodeficiency virus type 1 coreceptors by human alveolar macrophages. *J Virol* 73:5865–5874.
21. Cenker JJ, Stultz RD, McDonald D. 2017. Brain microglial cells are highly susceptible to HIV-1 infection and spread. *AIDS Res Hum Retroviruses* 33:1155–1165.
22. Shen R, Meng G, Ochsenbauer C, Clapham PR, Grams J, Novak L, Kappes JC, Smythies LE, Smith PD. 2011. Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF-kappaB activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages. *PLoS Pathog* 7:e1002060.
23. Cattin A, Wiche Salinas TR, Gosselin A, Planas D, Shacklett B, Cohen EA, Ghali MP, Routy JP, Ancuta P. 2019. HIV-1 is rarely detected in blood and colon myeloid cells during viral-suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 33:1293–1306.

24. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, Wiche Salinas TR, Bego MG, Power C, Routy JP, Ancuta P, Tremblay MJ, Cohen EA. 2017. Host microRNAs-221 and -222 inhibit HIV-1 entry in macrophages by targeting the CD4 viral receptor. *Cell Rep* 21:141–153.
25. Bailer RT, Lee B, Montaner LJ. 2000. IL-13 and TNF-alpha inhibit dual-tropic HIV-1 in primary macrophages by reduction of surface expression of CD4, chemokine receptors CCR5, CXCR4 and post-entry viral gene expression. *Eur J Immunol* 30:1340–1349.
26. Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ. 1999. Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood* 93:1137–1144.
27. Zaitseva M, Lee S, Lapham C, Taffs R, King L, Romantseva T, Manischewitz J, Golding H. 2000. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility of macrophages to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 96:3109–3117.
28. Cobos Jimenez V, Booiman T, de Taeye SW, van Dort KA, Rits MA, Hamann J, Kootstra NA. 2012. Differential expression of HIV-1 interfering factors in monocyte-derived macrophages stimulated with polarizing cytokines or interferons. *Sci Rep* 2:763.
29. Girardi E, Lopez P, Pfeffer S. 2018. On the importance of host microRNAs during viral infection. *Front Genet* 9:439.
30. Wang X, Ye L, Hou W, Zhou Y, Wang YJ, Metzger DS, Ho WZ. 2009. Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood* 113:671–674.
31. Swaminathan G, Rossi F, Sierra LJ, Gupta A, Navas-Martin S, Martin-Garcia J. 2012. A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog* 8:e1002937.
32. Kulkarni S, Lied A, Kulkarni V, Rucevic M, Martin MP, Walker-Sperling V, Anderson SK, Ewy R, Singh S, Nguyen H, McLaren PJ, Viard M, Naranbhai V, Zou C, Lin Z, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M, Thio CL, Margolick J, Kirk GD, Goedert JJ, Hoots WK, Deeks SG, Haas DW, Michael N, Walker B, Le Gall S, Chowdhury FZ, Yu XG,

- Carrington M. 2019. CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nat Immunol* 20:824 – 834.
33. Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. 2017. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 45:e144.
34. Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. 1998. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol* 72:7642–7647.
35. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JWM, Dinarello CA. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324 –2335.
36. Herbein G, Doyle AG, Montaner LJ, Gordon S. 1995. Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor (TNF) and IL-1 beta. *Clin Exp Immunol* 102:430 – 437.
37. Szebeni J, Dieffenbach C, Wahl SM, Venkateshan CN, Yeh A, Popovic M, Gartner S, Wahl LM, Peterfy M, Friedman RM, Weinstein JN. 1991. Induction of alpha interferon by human immunodeficiency virus type 1 in human monocyte-macrophage cultures. *J Virol* 65:6362–6364.
38. Choe W, Volsky DJ, Potash MJ. 2001. Induction of rapid and extensive beta-chemokine synthesis in macrophages by human immunodeficiency virus type 1 and gp120, independently of their coreceptor phenotype. *J Virol* 75:10738 –10745.
39. Guadagno J, Swan P, Shaikh R, Cregan SP. 2015. Microglia-derived IL-1beta triggers p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in neural precursor cells. *Cell Death Dis* 6:e1779.
40. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. 2007. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26:745–752.

41. Leslie PL, Franklin DA, Liu Y, Zhang Y. 2018. p53 regulates the expression of LRP1 and apoptosis through a stress intensity-dependent microRNA feedback loop. *Cell Rep* 24:1484 –1495.
42. Bohlig L, Friedrich M, Engeland K. 2011. p53 activates the PANK1/miRNA- 107 gene leading to downregulation of CDK6 and p130 cell cycle proteins. *Nucleic Acids Res* 39:440 – 453.
43. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303:844 – 848.
44. Cavrois M, De Noronha C, Greene WC. 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 20:1151–1154.
45. Salahuddin S, Thomson E, Meziane O, Farnos O, Pagliuzza A, Chomont N, Olivenstein R, Costiniuk C, Jenabian M-A. 2019. Processing of bronchoalveolar lavage fluid and matched blood for alveolar macrophage and CD4<sup>+</sup> T-cell immunophenotyping and HIV reservoir assessment. *J Vis Exp* 2019:e59427.
46. Costiniuk CT, Salahuddin S, Farnos O, Olivenstein R, Pagliuzza A, Orlova M, Schurr E, De Castro C, Bourbeau J, Routy JP, Ancuta P, Chomont N, Jenabian MA. 2018. HIV persistence in mucosal CD4<sup>+</sup> T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 32:2279 –2289.
47. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. 2007. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 91:209 –217.
48. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. 2011. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 474:649 – 653.
49. Chen H-Y, Lin Y-M, Chung H-C, Lang Y-D, Lin C-J, Huang J, Wang W-C, Lin F-M, Chen Z, Huang H-D, Shyy JY-J, Liang J-T, Chen R-H. 2012. miR-103/ 107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res* 72:3631–3641.

50. Chen H-Y, Lang Y-D, Lin H-N, Liu Y-R, Liao C-C, Nana AW, Yen Y, Chen R-H. 2019. miR-103/107 prolong Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and colorectal cancer stemness by targeting Axin2. *Sci Rep* 9:9687.
51. Rech M, Kuhn AR, Lumens J, Carai P, van Leeuwen R, Verhesen W, Verjans R, Lecomte J, Liu Y, Luiken JJFP, Mohren R, Cillero-Pastor B, Heymans S, Knoops K, van Bilsen M, Schroen B. 2019. AntagomiR-103 and -107 treatment affects cardiac function and metabolism. *Mol Ther Nucleic Acids* 14:424 – 437.
52. Esser R, Glienke W, Andreesen R, Unger RE, Kreutz M, Rubsamen- Waigmann H, von Briesen H. 1998. Individual cell analysis of the cytokine repertoire in human immunodeficiency virus-1-infected monocytes/macrophages by a combination of immunocytochemistry and in situ hybridization. *Blood* 91:4752– 4760.
53. Cremer I, Vieillard V, De Maeyer E. 2000. Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J Immunol* 164:1582–1587.
54. Poli G, Biswas P, Fauci AS. 1994. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* 24:221–233.
55. Poli G, Kinter AL, Fauci AS. 1994. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:108–112.
56. Covino DA, Kaczor-Urbanowicz KE, Lu J, Chiantore MV, Fiorucci G, Vescio MF, Catapano L, Purificato C, Galluzzo CM, Amici R, Andreotti M, Gauzzi MC, Pellegrini M, Fantuzzi L. 5 August 2020. Transcriptome profiling of human monocyte-derived macrophages upon CCL2 neutralization reveals an association between activation of innate immune pathways and restriction of HIV-1 gene expression. *Front Immunol*.
57. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, Shatz M, Kirk EL, Troester MA, Garantziotis S, Fessler MB, Resnick MA. 2014. p53 and NF-kappaB co-regulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res* 74:2182–2192.
58. Lowe JM, Menendez D, Fessler MB. 2014. A new inflammatory role for p53 in human macrophages. *Cell Cycle* 13:2983–2984.

59. Li L, Ng DS, Mah WC, Almeida FF, Rahmat SA, Rao VK, Leow SC, Laudisi F, Peh MT, Goh AM, Lim JS, Wright GD, Mortellaro A, Taneja R, Ginhoux F, Lee CG, Moore PK, Lane DP. 2015. A unique role for p53 in the regulation of M2 macrophage polarization. *Cell Death Differ* 22:1081–1093.
60. Breton Y, Desrosiers V, Ouellet M, Deshiere A, Torresilla C, Cohen EA, Tremblay MJ. 2019. Expression of MDM2 in macrophages promotes the early postentry steps of HIV-1 infection through inhibition of p53. *J Virol* 93:e01871-18.
61. Allouch A, David A, Amie SM, Lahouassa H, Chartier L, Margottin-Goguet F, Barre-Sinoussi F, Kim B, Saez-Cirion A, Pancino G. 2013. p21-mediated RNR2 repression restricts HIV-1 replication in macrophages by inhibiting dNTP biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3997–E4006.
62. Lodge R, Lalonde JP, Lemay G, Cohen EA. 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* 16:695–705.
63. Herskovitz J, Gendelman HE. 2019. HIV and the macrophage: from cell reservoirs to drug delivery to viral eradication. *J Neuroimmune Pharma- col* 14:52– 67.
64. Mehraj V, Ghali P, Ramendra R, Costiniuk C, Lebouche B, Ponte R, Reinhard R, Sousa J, Chomont N, Cohen EA, Ancuta P, Routy J-P. 2017. The evaluation of risk-benefit ratio for gut tissue sampling in HIV cure research. *J Virus Erad* 3:212–217.
65. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome- associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284–291.
66. Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile JP, Cohen EA. 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115:1354–1363.
67. Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mono- nuclear phagocytes. *Virology* 206:935–944.

68. Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. 1995. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 69:4413– 4422.
69. Bego MG, Mercier J, Cohen EA. 2012. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *J Virol* 86:3513–3527.
70. Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophage-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 2855–2864.
71. Lodge R, Gilmore JC, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Cohen EA. 2017. Regulation of CD4 receptor and HIV-1 entry by microRNAs-221 and -222 during differentiation of THP-1 cells. *Viruses* 10:13.
72. Balcells I, Cirera S, Busk PK. 2011. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 11:70.

**Table S1 - List of 30 highest expressed miRNAs in MDMs**



Table S1: List of 30 highest expressed microRNAs in MDMs (based on data from ref. 24)

<u>MicroRNA</u>	<u>Base mean average</u>	<u>Fold change GFP-neg./MOCK</u>
hsa-miR-22-3p	1102115	0.93
hsa-miR-21-5p	845068	0.69
hsa-let-7f-5p	582709	1.12
hsa-miR-191-5p	505295	1.17
hsa-miR-146a-5p	389172	1.23
hsa-let-7a-5p	369882	1.30
hsa-miR-26a-5p	317539	0.99
hsa-miR-181a-5p	292114	1.13
hsa-miR-378a-3p	229967	1.07
hsa-let-7g-5p	149606	1.13
hsa-miR-146b-5p	139136	1.11
hsa-miR-222-3p	113630	1.82
hsa-miR-16-5p	113246	0.85
hsa-miR-30e-5p	96842	0.86
hsa-miR-142-5p	84684	0.62
hsa-miR-221-3p	75292	1.52
hsa-miR-26b-5p	71962	0.98
hsa-miR-423-3p	63087	1.69
hsa-miR-98-5p	61522	1.07
hsa-miR-186-5p	58768	1.08
hsa-miR-30d-5p	56068	0.98
hsa-miR-92a-3p	51372	1.07
hsa-miR-103a-3p	50807	1.24
hsa-miR-28-3p	43526	1.32
hsa-let-7d-5p	43158	1.32
hsa-let-7i-5p	40527	1.06
hsa-miR-342-3p	40451	1.43
hsa-miR-155-5p	39152	1.90
hsa-miR-29a-3p	34874	0.73
hsa-miR-30c-5p	32893	1.04

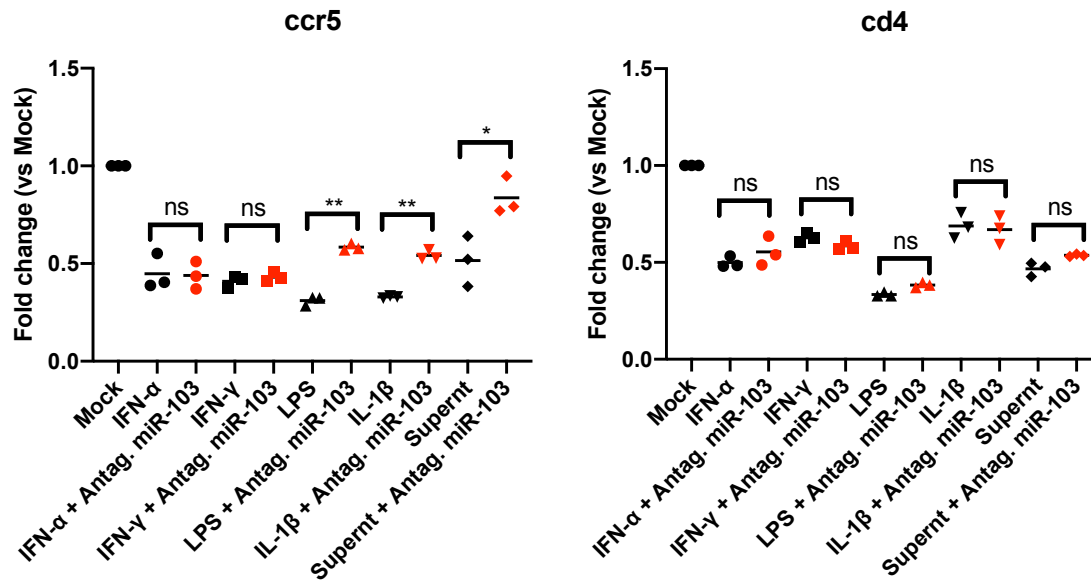
MiR-103 is shown in red. MiR-107 was ranked 87 out of the 414 microRNAs studied. MiR-221 and 222, that target the mRNA of the CD4 receptor, are highlighted in green.

Table S2 - Oligonucleotides used in this study

**Table S2 - Oligonucleotides used in this study.**

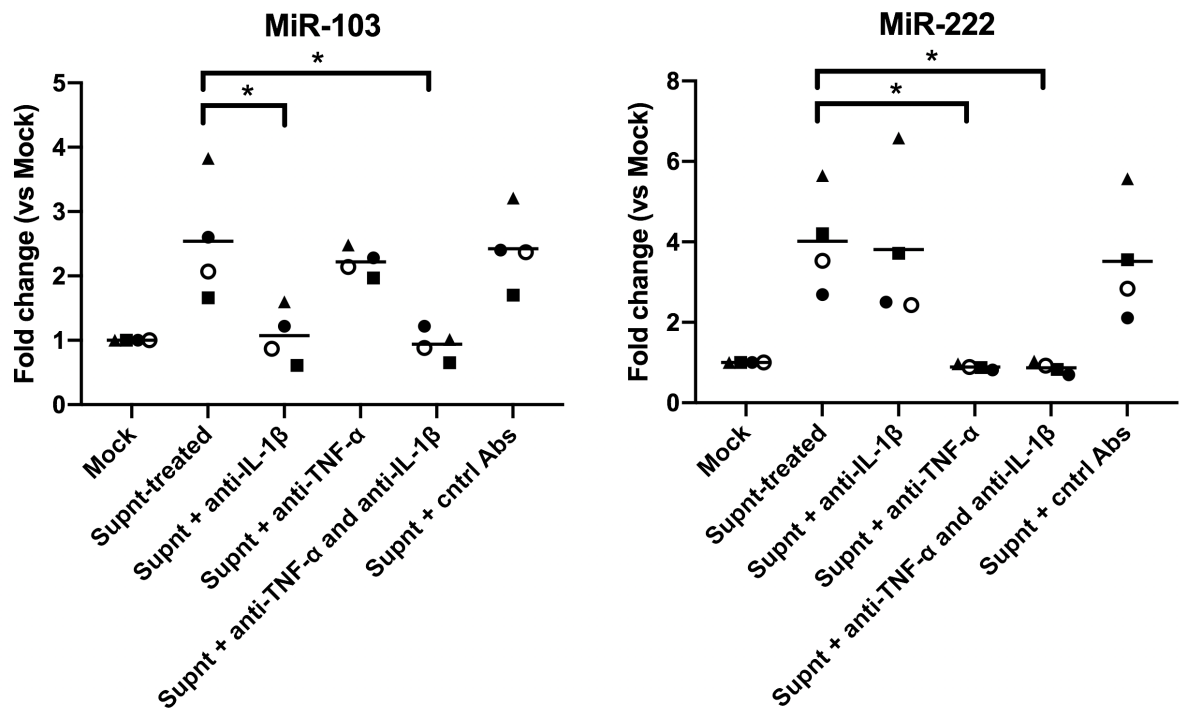
<u>NAME</u>	<u>OLIGONUCLEOTIDE</u>	<u>PURPOSE</u>
5'CCR5-UTR	TACAAGAGCTCTTGTGACACGGACTCAAGTGG	LucCCR5-3'UTR
3'CCR5-UTR	TACAAAACGCGTTTATTTTAGAAGGTGTTTTTATTAGATG	LucCCR5-3'UTR
CCR5mutFwd	CTGAAAAACTAAGCTTACAGCTGCCAGTG	Seed mutations
CCR5mutRev	CACTGGGCAGCTGTAAGCTTAGTTTTTCAG	Seed mutations
miR-222-3p-L	CAGATGTATCAAGCTCTCCAGGTACAGTTGGTACCTGACTCCACGCACCCAG	qPCR
miR-222-3p-5'	CAGATGTATCAAGCTCTCCAGGTACAGT	qPCR
miR-222-3p-3'	GGAGCTACATCTGGCTACTGGGT	RT loop
miR-103-3p-5'	ACAATGTCAAGCTCTCCAGGTACAGT	qPCR
miR-103-3p-3'	GGAGCAGCATTGTACAGGGCT	qPCR
miR-103-3p-L	TACAATGTCAAGCTCTCCAGGTACAGTTGGTACCTGACTCCACGCTCATAG	RT loop
miR-107-5'	ACAATGGCTAGCTATGCAGGTACAG	qPCR
miR-107-3'	GGAGCAGCATTGTACAGGGCT	qPCR
miR-107-L	TACAATGGCTAGCTATGCAGGTACAGTTGGTACCTGACTCTTGTGATAG	RT loop
gapdh-5'	GCCATCAATGACCCCTTCAT	qPCR
gapdh-3'	TTGACGGTGCCATGGAATTT	qPCR
cd4-F	GTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCT	qPCR
cd4-R	TCTTCCCTGAGTGGCTGCT	qPCR
ccr5-F	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	qPCR
ccr5-R	CCTGTGCCTTCTTCTCATTTCG	qPCR
p53-F	GCCCAACAACACCAGCTCCT	qPCR
p53-R	CCTGGGCATCCTTGAGTTCC	qPCR
p21-F (A)	TCCTCATCCCGTGTTCTCCT	qPCR
p21-R (A)	ACAAGTGGGGAGGAGGAAGT	qPCR
miR-103C FWD	AATTCAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAAAAAAG	pMIR103
miR-103C REV	GATCCTTTTTTCATAGCCCTGTACAATGCTGCTG	pMIR103
miR-107C FWD	AATTCAGCAGCATTGTACAGGGCTATCAAAAAAAG	pMIR107
miR-107C REV	GATCCTTTTTTGATAGCCCTGTACAATGCTGCTG	pMIR107
miR-103/107-5'	CGCAGAGCAGCATTGTACAG	qPCR (absolute)
miR-103-3p-3'	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCATAG	qPCR (absolute)
miR-107-3'	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGATAG	qPCR (absolute)
miR-103 mimic	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	
miR-107 mimic	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA	
miR-103 antag.	GCCCTGTACAATGCTGCT	
miR-107 antag.	GATAGCCCTGTACAATG	

**Figure S1**



**Figure S1 - MiRNA-103 antagomirs counteract IL-1 $\beta$ -driven CCR5 reduction, related to Figure 4.**

MDMs from 3 blood donors were treated with conditioned medium (Fig. 4A) or the indicated MDM activators (Fig. 4B and 4C) and then transfected with either control or miRNA-103 antagomirs. CCR5 or CD4 mRNA expression levels were measured by real-time qPCR. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells ( $n = 3$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).



**Figure S2 - IL-1 $\beta$  secreted into HIV-1-infected MDM supernatants enhances miRNA-103 in MDMs, related to Figure 5.**

The conditioned supernatant from infected macrophages was added to new MDM cultures from 4 blood donors. In some cases, the conditioned supernatant was treated with either control goat anti-human IgGs (cntrl Abs), neutralizing anti-TNF- $\alpha$ , neutralizing anti-IL-1 $\beta$ , or both neutralizing antibodies. miRNA-103 and miRNA-222 expression levels were then measured by real-time qPCR. Bars represent the mean fold changes compared to mock (untreated) cells ( $n = 4$  blood donors; Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

## **Chapitre 4 : Manuscrit #2**

## **Rôle du miARN-103 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

---

**Contexte** : Comment la latence s'établit dans les cellules infectées, en particulier dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, est une question qui n'est pas encore totalement expliquée. Récemment, une étude montre que la latence virale s'établirait lors de l'infection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans une fenêtre très étroite suite à leur activation. Ces cellules posséderaient des propriétés uniques, comme une augmentation temporaire de l'expression du corécepteur viral CCR5, ainsi qu'un environnement cellulaire peu favorable à la transcription des gènes du VIH-1. Partant de ce constat, nous avons émis **l'hypothèse** que le miARN-103, dont nous avons découvert qu'il cible l'ARNm du CCR5, pourrait contribuer à moduler le niveau d'expression de CCR5 au cours de la transition des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> d'un phénotype activé vers un phénotype mémoire. Cette contribution du miARN-103 dans l'expression de CCR5 impacterait l'entrée du VIH-1, et par conséquent, l'établissement d'une infection latente dans ces cellules.

**Objectif** : Notre objectif était tout d'abord de confirmer que le CCR5 est une cible du miARN-103 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi que d'approfondir la régulation de ce miARN. Par la suite, nous avons voulu déterminer quel serait l'impact d'une augmentation du miARN-103 sur l'entrée du VIH-1 dans ces cellules, et plus particulièrement, l'impact sur la fréquence de cellules latentes. Enfin, notre dernier objectif était d'approfondir la relation entre le CCR5 et le miARN-103 *in vivo*, chez l'humain. Pour cela, nous avons cherché à savoir si le contrôle de l'infection (en absence de traitement) par les contrôleurs élites (ECs) se traduisait par une augmentation du miARN-103 chez ces individus.

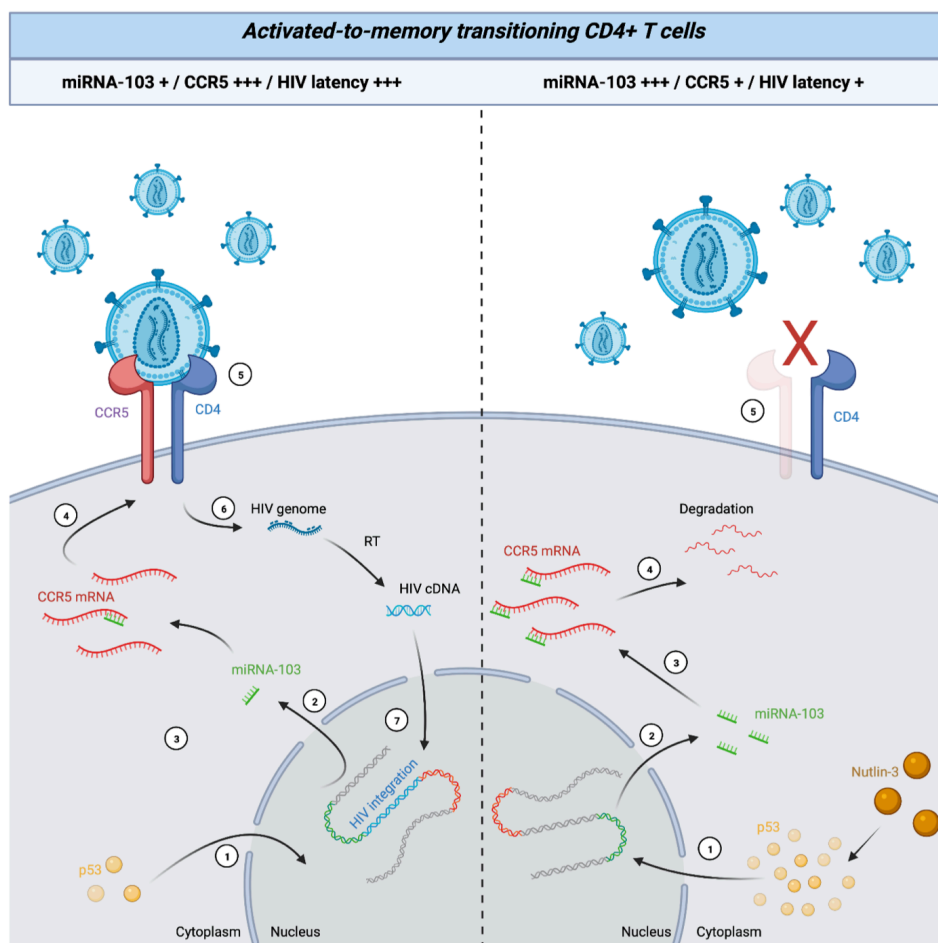
**Statut de l'article** : Cet article a été publié dans la revue *iScience* en septembre 2022.

**Contribution détaillée de chacun des auteurs** : Ma contribution personnelle à cet article est de 80%. J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, et

j'ai effectué toutes les analyses de données, participé à la majorité de l'écriture de l'article, et j'ai réalisé l'ensemble des figures.

Robert Lodge et Tram Pham ont assisté à l'analyse des données ainsi qu'à l'écriture de l'article. Jaspreet Jain et Thomas Murooka ont participé à la caractérisation du système de vecteur VIH-1 à double fluorescence, qui a été fourni par Alon Herschhorn. Cécile Tremblay et Nicole Bernard ont supervisé le recrutement des participants contrôlant l'infection du VIH-1 en absence de traitement. Jean-Pierre Routy a supervisé le recrutement des participants vivants avec le VIH-1 et notamment fournis les échantillons provenant de sujet virémique. Éric A. Cohen a supervisé chaque étape de cette étude, a participé à l'écriture du manuscrit et a obtenu le financement.

### Résumé graphique :



### **MiRNA-103 downmodulates CCR5 expression reducing HIV-1 entry and impacting latency establishment in CD4<sup>+</sup> T cells**

Nicolas Bellini<sup>1,7</sup>, Robert Lodge<sup>1</sup>, Tram N. Q. Pham<sup>1,7</sup>, Jaspreet Jain<sup>1</sup>, Thomas T. Murooka<sup>2</sup>, Alon Herschhorn<sup>3</sup>, Nicole F. Bernard<sup>4,5</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>4</sup>, Cécile L. Tremblay<sup>6,7</sup>, and Éric A. Cohen<sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Human Retrovirology, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup>Department of Immunology, Rady Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

<sup>3</sup>Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

<sup>4</sup>Division of Hematology and Chronic Viral Illness Service, McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

<sup>5</sup>Research Institute of the McGill University Health Centre Montreal, Montreal, QC, Canada

<sup>6</sup>Research Centre of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

<sup>7</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

\*Corresponding author.

Correspondence:

Éric A. Cohen  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec,  
Canada, H2W 1R7  
Tel: 514-987-5804  
Email: [eric.cohen@ircm.qc.ca](mailto:eric.cohen@ircm.qc.ca)



## Article N°2

---

### **Summary**

Activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells display elevated expression of the HIV-1 co-receptor CCR5 and are more prone to HIV-1 latent infection. Here, we show that p53-regulated miRNA-103 downmodulates CCR5 levels in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. We reveal that miRNA-103 mimics, as well as Nutlin-3, an inhibitor of Mdm2-mediated p53 degradation, decrease CCR5-dependent HIV-1 infection. Using a dual-reporter virus, we subsequently validate that in transitioning CD4<sup>+</sup> T cells, Nutlin-3 treatment decreases the frequency of both productively and latently infected cells via upregulation of miRNA-103. Importantly, we provide evidence that CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-1 elite controllers express less CCR5 than those from antiretroviral therapy-naïve progressors, an effect linked to a significant increase in miRNA-103 levels. By contributing to the control of CCR5 expression in CD4<sup>+</sup> T cells, miRNA-103 is likely to play a key role in countering the establishment of latent HIV-1 reservoirs *in vivo*.

### **Introduction**

The development of combined antiretroviral therapy (ART) for the suppression of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) replication represents a remarkable achievement of modern medicine. However, although these treatments improve the health and prolong the life of those infected, they do not eradicate the virus and therefore must be taken for life. HIV-1 can establish latent infection by integrating replication-competent proviral DNA into the genome of specific host target cells, ultimately leading to the formation of a latent reservoir (Chun et al., 1997a; Wong et al., 1997). These HIV-1 latent reservoirs, which escape elimination by the host immune system or antiviral drugs, represent the primary obstacle to an HIV-1 cure as they drive the resurgence of the infection once ART is interrupted.

One of the best characterized latent HIV-1 reservoirs is found in resting memory CD4<sup>+</sup> T cells (Chomont et al., 2009; Chun et al., 1997a, 1997b; Finzi et al.,

1997; Wong et al., 1997), and appears to be seeded at very early stages of infection as was demonstrated in non-human primate models (Whitney et al., 2014, 2018). The mechanisms responsible for the establishment of HIV-1 latency in memory CD4<sup>+</sup> T cells are not fully elucidated. Latently infected cells are rare *in vivo* and appear to arise when activated CD4<sup>+</sup> T cells become infected and survive long enough to revert back to a long-lived resting memory stage, which is nonpermissive for viral gene expression (Sengupta and Siliciano, 2018). An alternative model proposes that HIV-1 latency is directly established in resting CD4<sup>+</sup> T cells, following interaction with dendritic cells and/or the action of specific chemokines (Chavez et al., 2015; Evans et al., 2013; Saleh et al., 2007). More recently, it was shown that latent infection could also arise from the infection of CD4<sup>+</sup> T subsets that are transitioning from an activated to a memory stage (Shan et al., 2017). These transitioning CD4<sup>+</sup> T cells were found to have a unique combination of characteristics: first, they display a transient upregulation of the virus co-receptor C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression, allowing for HIV-1 entry and infection, and second, they exhibit a cellular environment poorly conducive for active HIV-1 provirus transcription. Indeed, *ex vivo* studies of HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells transitioning from an activated to a memory stage revealed the establishment of largely latent infection in these cells (Shan et al., 2017). In this context, a comprehensive understanding of host factors and signals that modulate CD4<sup>+</sup> T cell susceptibility to latent HIV-1 infection is likely to provide important information about cellular pathways that could be countered to limit the establishment of latent infection in these cells.

MicroRNAs (miRNAs) are small single-stranded non-coding RNA molecules (containing about 22 nucleotides) found in plants, mammals, and even viruses, that are involved in RNA silencing and post-transcriptional regulation of gene expression (Hammond, 2015). They can be delivered to neighboring cells via exosomes, which are found to contain large quantities of miRNAs (Nahand et al., 2020). MiRNAs function by base pairing with complementary sequences within target mRNAs, primarily in the 3' untranslated region (UTR). As a consequence, targeted mRNAs are silenced by one or more mechanisms, including mRNA cleavage and blocking the translation of the mRNA by ribosomes (O'Brien et al., 2018). Increasing evidence

indicate that miRNAs play a key role in regulating the susceptibility of target cells to HIV-1 infection and persistence (Balasubramaniam et al., 2018). Indeed, several miRNAs that target the 3' UTR of HIV-1 transcripts have been identified, such as miRNA-29a and miRNA-223 (Ahluwalia et al., 2008; Huang et al., 2007). MiRNAs appear also to promote HIV-1 infection by targeting factors that restrict viral replication. For instance, miRNA-181 modulates the expression of SAMHD1, a cellular regulator of deoxynucleoside triphosphate levels and a strong inhibitor of reverse transcription (Riess et al., 2017). Importantly, miRNAs are also found to promote the establishment and maintenance of provirus latency by targeting directly or indirectly host transcription factors that are essential for HIV-1 gene expression (Chiang et al., 2012; Shen et al., 2012; Triboulet et al., 2007). Hence, TRIM32, an E3 ubiquitin ligase that activates NF- $\kappa$ B to promote HIV-1 transcription, is targeted by miRNA-155, therefore limiting long terminal repeat (LTR)-driven gene expression (Ruelas et al., 2015). MiRNAs can also modulate HIV-1 entry into host target cells. Indeed, miRNAs-221/222 inhibit HIV-1 infection by downregulating the HIV-1 receptor CD4 in lymphocytes (Orecchini et al., 2014) as well as in macrophages (Lodge et al., 2017). More recently, we provided evidence that interleukin (IL)-1 $\beta$  induces a downmodulation of CCR5 expression and HIV-1 entry in macrophages through a p53-mediated process involving miRNA-103 (Lodge et al., 2020). Lastly, differences in miRNA expression profiles in HIV-1, hepatitis B virus (HBV), or hepatitis C virus (HCV)-infected individuals, as well as co-infected individuals or HIV-1-infected elite controllers suggest that miRNAs could be used as biomarkers for the risk of disease progression (Moghoofei et al., 2018; Yousefpouran et al., 2020).

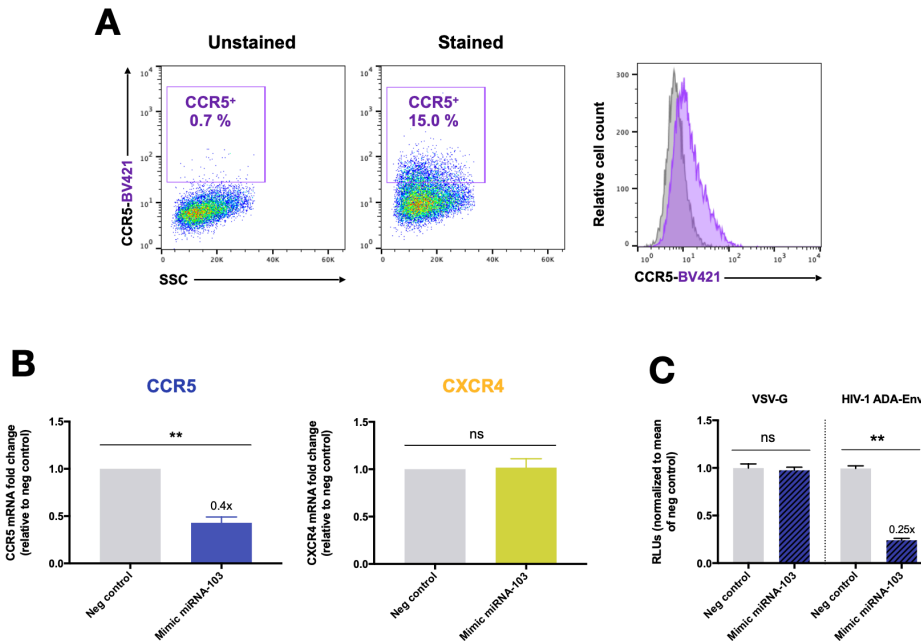
Here, we investigated the role of the p53-regulated miRNA-103 in the regulation of CCR5 expression following the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and examined its impact on the susceptibility of activated-to-memory transitioning cells to HIV-1 latent infection. Our findings reveal that miRNA-103 contributes to the downregulation of CCR5 expression in CD4<sup>+</sup> T cells progressing to a resting memory phenotype. We also show that the extent of CCR5 control by miRNA-103 is determined by the levels of p53 in CD4<sup>+</sup>T cells progressing to a resting memory stage. Indeed, we provide evidence that the pharmacological stabilization of p53 limits both productive and

latent infections of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by reducing CCR5 expression levels via miRNA-103. Importantly, we show that CD4<sup>+</sup> T cells from elite controllers (ECs) display significantly reduced expression of CCR5 compared to ART-naïve progressors, a condition that is associated with a statistically meaningful increase in miRNA-103 expression. Overall, these results highlight the role of p53-regulated miRNA-103 in the regulation of CCR5 expression in CD4<sup>+</sup> T cells and underscore how the modulation of miRNA-103 could conceivably affect the establishment of HIV-1 latency in these cells.

## **Results**

### *P53-modulated miRNA-103 regulates CCR5 mRNA levels in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes progressing to a resting memory phenotype*

Having recently reported that miRNA-103 downregulates CCR5 mRNA levels in macrophages (Lodge et al., 2020), we first sought to directly determine if miRNA-103 mimics could regulate CCR5 mRNA levels in CD4<sup>+</sup> T cells. To this end, we used the CD4<sup>+</sup> C10/MJ T cell line that expresses low, yet detectable levels of endogenous CCR5 protein at the cell surface (Majka et al., 2000) (**Figure 1A**). Transfection of miRNA-103 mimics significantly decreased the degree of CCR5 mRNA expression when compared to control (approximately 60%,  $p = 0.0022$ ), but did not impact CXCR4 mRNA levels (**Figure 1B**). Consistently, infection of C10/MJ cells with firefly Luciferase (F-Luc)-expressing single-round HIV-1-reporter viruses, either pseudotyped with HIV-1 ADA-Env (CCR5-dependent entry) or vesicular stomatitis virus G (VSV-G) glycoprotein (CCR5-independent entry) revealed that HIV-1 ADA-Env-coated virus infection was significantly reduced (approximately 75%,  $p = 0.0022$ ) by miRNA-103 mimic treatment as compared to control (**Figure 1C**). In contrast, no difference in viral infection efficiency was detected with VSV-G-coated viruses, thus excluding potential effects of miRNA-103 on post-entry steps up to provirus expression. These results indicate that miRNA-103 can downregulate CCR5 expression in CD4<sup>+</sup> T cells and inhibit CCR5-dependent HIV-1 entry.



**Figure 1 - MiRNA-103 downregulates CCR5 mRNA levels in CCR5-expressing CD4<sup>+</sup> T cells.**

(A) CCR5 surface expression was measured in C10/MJ cells by flow cytometry.

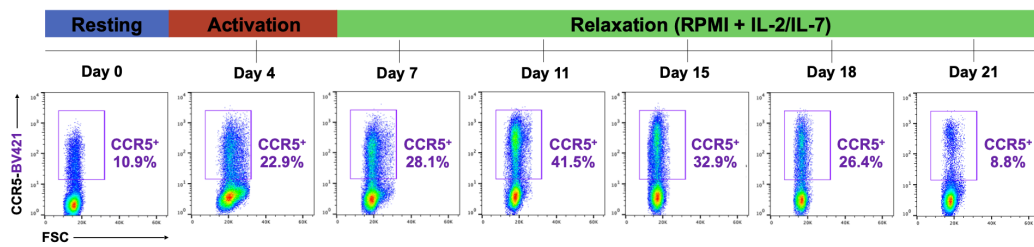
(B) CCR5 and CXCR4 mRNA levels were evaluated in miRNA-103 mimic or control-transfected C10/MJ cells. Shown is the mean fold change ( $n = 3$ ) compared to control transfected C10/MJ cells (in gray). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney test, values: \*\* $p < 0.01$ .*

(C) F-Luc activity was evaluated, as a measure of viral entry, in lysates of either HIV-1 ADA-Env or VSV-G-pseudotyped NL4-3-Luc<sup>+</sup>Vpr<sup>+</sup>-infected C10/MJ cells previously transfected with either controls or miRNA-103 mimics. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney test, values: \*\* $p < 0.01$ .*

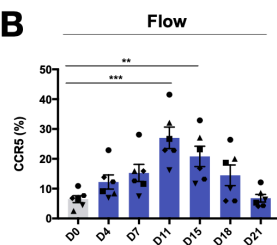
To examine the role of miRNA-103 in regulating CCR5 expression during the transition of CD4<sup>+</sup> T cells from an activated to a memory phenotype, we first validated if CCR5 expression was modulated during this transition in our culture conditions. Thus, the levels of CCR5 at the surface of either primary resting CD4<sup>+</sup>T cells (D0, or “day 0”) or CD4<sup>+</sup> T cells activated for 4 days with anti-CD3/anti-CD28 antibodies (day 4) or at different time-points following the removal of antibodies (“relaxation”, day 7-day 21) were measured by flow cytometry (**Figures S1A** and **2A**) As previously shown ([Shan et al., 2017](#)), our results reveal that resting CD4<sup>+</sup> T cells weakly express CCR5 (with <10% cells being CCR5-positive). However, co-receptor expression increases transiently in activated-to-memory transitioning lymphocytes with a peak of >30% of cells expressing CCR5 after 7 days of “relaxation” post-activation (day 11) (**Figures 2A** and **2B**). These observations were further confirmed at the mRNA level as we detected a parallel transient increase of CCR5 mRNA in activated-to-memory

transitioning CD4<sup>+</sup> T cells. Following a peak at day 11, a progressive decrease of CCR5 mRNA levels was observed as cells were progressing to a resting phenotype (**Figure 2C**). This modulation of CCR5 was specific as the levels of cell-surface CXCR4 remained unchanged during this transition despite the progressive decrease of the CD25 activation marker (**Figures S1B** and **S1C**).

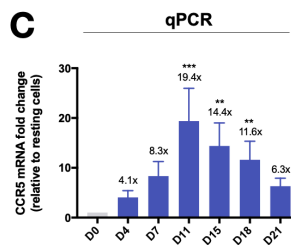
**A**



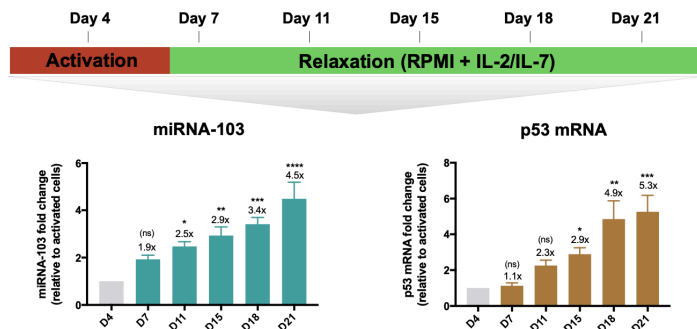
**B**



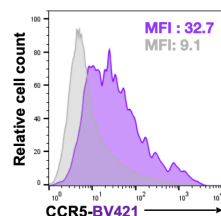
**C**



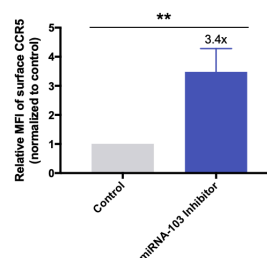
**D**



**E**



**F**



**Figure 2 - MiRNA-103 modulates CCR5 expression in primary activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells.**

(A and B) Cell-surface CCR5 expression was measured by flow cytometry and compared in resting, activated, and relaxed CD4<sup>+</sup> T cells obtained from healthy blood donors. In (B), data represent results obtained from cells of six different blood donors (2 ♀/4 ♂). Error bars represent +/- SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

(C) CCR5 mRNA levels in resting, activated and relaxed CD4<sup>+</sup> T cells (n = 6, 2 ♀/4 ♂) were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to resting cells (in gray). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.*

(D) MiRNA-103 and p53 mRNA levels in activated and relaxed CD4<sup>+</sup> T cells (n = 6, 2 ♀/4 ♂) were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to activated cells (in gray). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.*

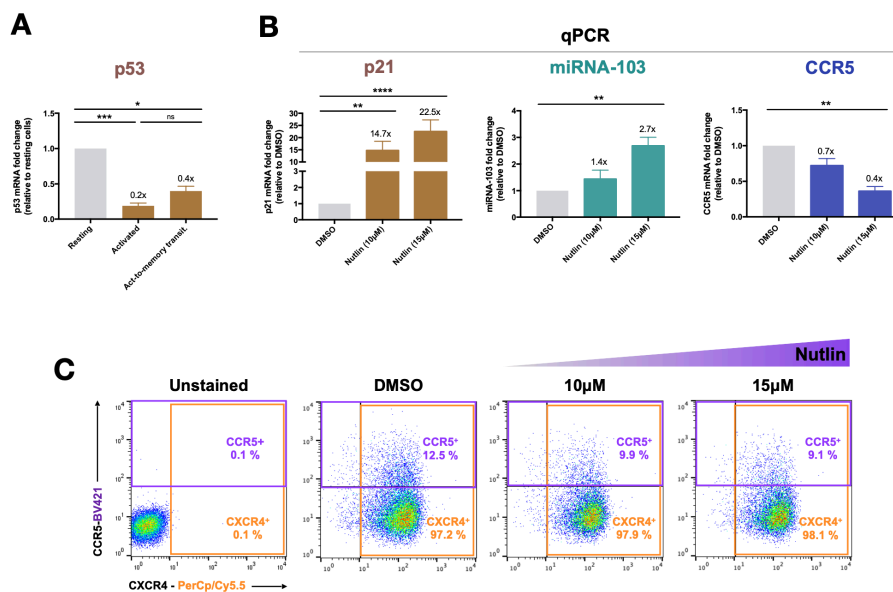
(E and F) Transitioning primary CD4<sup>+</sup> T cells (D11, “day 11”) were transfected with FAM-labeled miRNA-103 inhibitor (purple) or control inhibitor (gray). In (E), mean fluorescence intensity (MFI) of cell surface CCR5 was measured and compared to the control inhibitor-transfected cells 48h after the transfection. Shown are data from a representative donor. In (F), compiled data from the cells of five different blood donors (3 ♀/2 ♂) showing CCR5 expression relative to that of control inhibitor-transfected cells. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney’s test, values: \*\*p < 0.01.* See also **Figure S1**.

Recently, we and others reported that miRNA-103 is regulated by the tumor suppressor p53 in Interleukin (IL)-1 $\beta$  treated macrophages as well as in a human colorectal carcinoma cell model (Leslie et al., 2018; Lodge et al., 2020). Therefore, we tested if miRNA-103 and p53 mRNA levels varied in parallel with the changes in CCR5 expression from day 4 (activated) to day 21. Interestingly, we found that the level of miRNA-103 expression varies slightly between day 4 and day 11 (2.5-fold, p = 0.0412 at day 11) but shows a strong increase starting at day 15 (2.9-fold, p = 0.0072 to 4.5-fold, p < 0.00001 between day 15 and day 21) (**Figure 2D, left panel**). These observations correlate with p53 mRNA levels, which also start to significantly increase at day 15 (2.9-fold, p = 0.0386) (**Figure 2D, right panel**). These results suggest that miRNA-103 expression levels following activation (day 4) are not sufficient to counter the increase in CCR5 observed, and further indicate that miRNA-103 is implicated in the downregulation of CCR5 that is observed between day 11 and day 21 (**Figures 2A-2C**). As a decrease in CCR5 expression in transitioning primary CD4<sup>+</sup> T cells was detectable between day 11 and day 15 (**Figures 2A-2C**), we assessed the role of miRNA-103 in this down-modulation by transfecting primary CD4<sup>+</sup> T cells with an inhibitor (antagomir) of miRNA-103 at the peak of CCR5 expression (day 11). As shown in **Figures 2E** and **2F**, transfection of the miRNA-103 inhibitor abolished the decrease of CCR5 expression with transfected cells displaying a significantly higher level of CCR5 at the surface (approximately 3.4-fold, p = 0.0079) relative to control cells. Overall, these results provide evidence that endogenous

miRNA-103 downregulates the expression of CCR5 in primary CD4<sup>+</sup> T cells progressing to a resting memory phenotype.

### *Stabilization of p53 leads to less CCR5 in primary CD4<sup>+</sup> T cells through miRNA-103 upregulation*

We then investigated the role and the modulation of p53 in CD4<sup>+</sup> T cells by comparing the level of p53 mRNA in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to that in cells at different stages post-activation. We show that p53 mRNA was strongly expressed in resting CD4<sup>+</sup> lymphocytes as compared to activated or activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells (at day 11), which, indeed, displayed reduced p53 mRNA levels by approximately 80% ( $p = 0.0004$ ) and 60% ( $p = 0.0479$ ) (**Figure 3A**).



**Figure 3 - Stabilization of p53 leads to a downregulation of CCR5 in activated CD4<sup>+</sup> T cells through miRNA-103 upregulation.**

(A) p53 mRNA levels in resting (day 0), activated (day 4) and activated-to-memory (day 11) CD4<sup>+</sup> T cells were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes in p53 mRNA expression compared to resting cells ( $n = 6$ , 2 ♀/4 ♂). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .*

(B) Different concentrations of the Mdm2 antagonist Nutlin-3 were added to activated primary CD4<sup>+</sup> T cells ( $n = 5$  donors, 2 ♀/3 ♂) and the effect of Nutlin-3 on p21 mRNA, miRNA-103, and CCR5 mRNA was determined by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes in expression compared to vehicle (DMSO)-treated cells. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .*

(C) Different concentrations of Nutlin-3 were added to primary CD4<sup>+</sup> T cells and the effect of Nutlin-3 on the surface expression of CCR5 and CXCR4 was determined by flow cytometry. Shown are data from a representative donor. See also **Figure S2**.

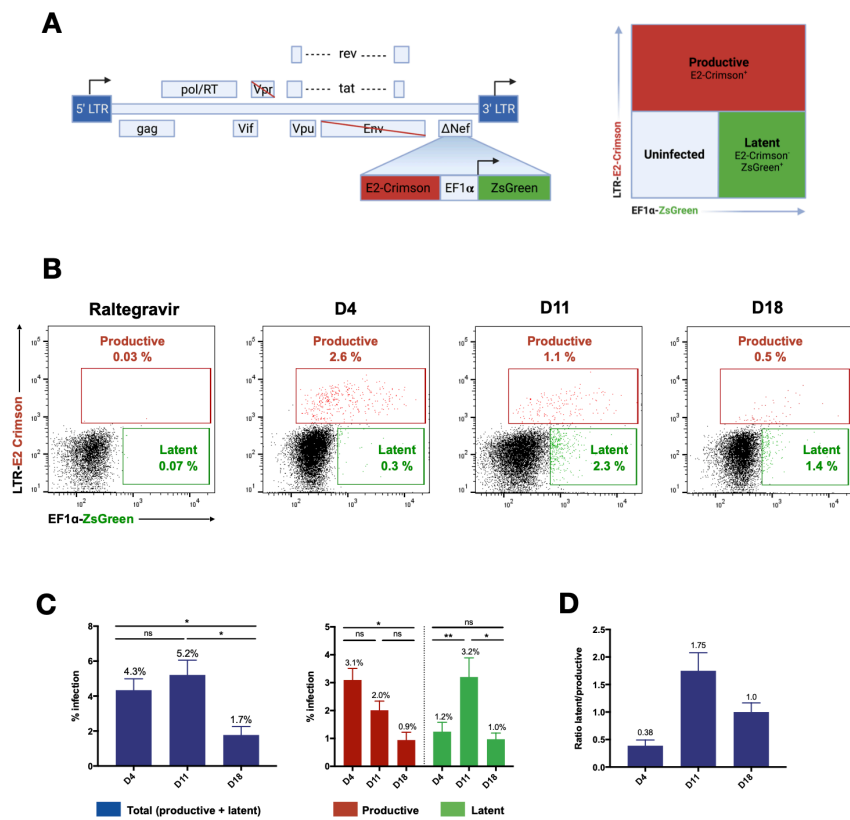


To investigate whether the low levels of p53 in activated and activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup>T cells impact miRNA-103 expression in these cellular stages, we treated activated primary CD4<sup>+</sup> T cells for 24h with different concentrations of Nutlin-3, a Mdm2 inhibitor that stabilizes the p53 protein (Vassilev et al., 2004). Treatment with Nutlin-3 did not significantly affect cell viability, except at higher concentrations (20μM, 66.7% viability, p = 0.0011) (**Figure S2A**). Interestingly, cell treatment with 15μM of Nutlin-3 significantly increased miRNA-103 (2.7-fold, p = 0.0070), a condition that was linked to a decrease in CCR5 mRNA level by 60% (p = 0.0028) in these cells (**Figure 3B**). The effectiveness of the Nutlin-3 treatment on p53 stabilization was validated by the detection of a significant increase in expression of the p53-target gene, p21 (**Figure 3B**). As expected, p53 mRNA levels were not affected by Nutlin-3, which inhibits Mdm2-triggered p53 protein degradation but not p53 transcription (**Figure S2B**). Consistent with the upregulation of miRNA-103 expression upon Nutlin-3 treatment, we also observed a reduction in the frequency of cell-surface CCR5 positive-cells within 24h, using flow cytometry (12.5% CCR5<sup>+</sup> with vehicle as compared to 9.9 and 9.1% CCR5<sup>+</sup> with 10 and 15μM Nutlin-3, respectively) (**Figure 3C**). Importantly, we did not observe any significant effect of Nutlin-3 treatment on CXCR4 surface expression (**Figure 3C**). Together, these results indicate that miRNA-103 is also regulated by p53 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and that Nutlin-3-mediated stabilization of p53 leads to a reduction in the frequency of cells expressing CCR5. They also support the notion that p53 expression (or lack thereof) in activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes transitioning to a resting memory phenotype likely impacts the control exerted by miRNA-103 on CCR5 expression.

#### *Activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells are more susceptible to human immunodeficiency virus type-1 latent infection*

Although CD4<sup>+</sup> T cells that are transitioning from an activated stage to a resting memory phenotype express CCR5 and are susceptible to HIV-1 infection, their overall cellular environment is reported to not be conducive to HIV-1 gene expression, thus favoring the establishment of latent infection (Shan et al., 2017). To further validate these observations, we used the dual-fluorescent HIV-1 reporter vector, HI.fate, that

encodes for the E2-Crimson gene under the control of the HIV-1 LTR, and the ZsGreen gene, under the control of an EF1- $\alpha$  promoter (**Figure 4A**). This virus reporter system can distinguish infected cells where HIV-1 expression is active (both E2-Crimson and ZsGreen-positive) from those that remain silent (only ZsGreen-positive), thus allowing for the analysis of latently or productively HIV-1 infected cells at a single cell level (Ratnapriya et al., 2021). Indeed, we show that upon the activation of HI.fate infected cells with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, the frequency of latently infected CD4<sup>+</sup> T cells was reduced and a concomitant increase in the frequency of productively infected cells was detected (**Figures S3A** and **S3B**). Additionally, productively infected cells, which are predicted to express Vpu, were found to display downregulation of its cellular targets, CD4 and BST2, a condition not observed in uninfected or latently infected cells (**Figure S3C**).



**Figure 4 - Activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells are more susceptible to latent infection.**

(A) Genomic organization of the HI.fate dual reporter virus and schematic depiction of HI.fate-infected cell populations detected by flow cytometry. Productively infected cells are E2-Crimson<sup>+</sup>, while latently infected cells are ZsGreen<sup>+</sup> and E2-Crimson<sup>-</sup>. Adapted from (Dahabieh et al., 2013).

(B-D) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with HI.fate-JRFL-Env viruses at different time points post-activation and E2-Crimson and ZsGreen expression analyzed by flow

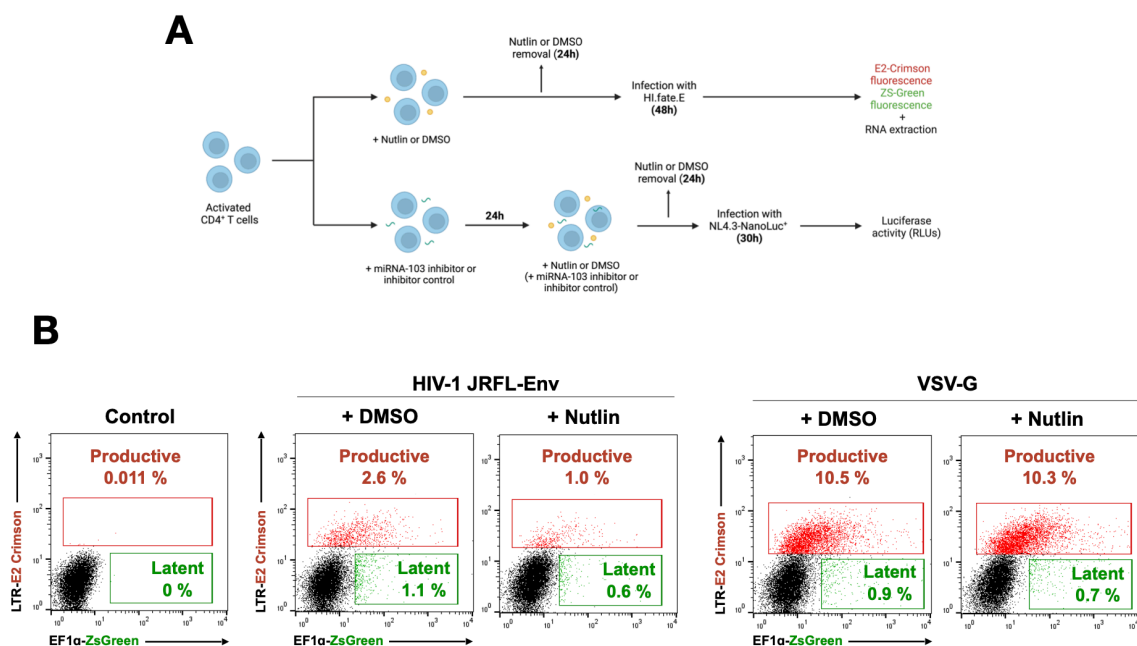
cytometry two days after infection. In (C), data shown were obtained from cells of seven different blood donors (5 ♀ / 2 ♂). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.* In (D), relative frequencies of latently and productively infected cells as shown in Panel C are expressed as ratios of latent over productive infections. Error bars represent SEM. See also **Figure S3**.

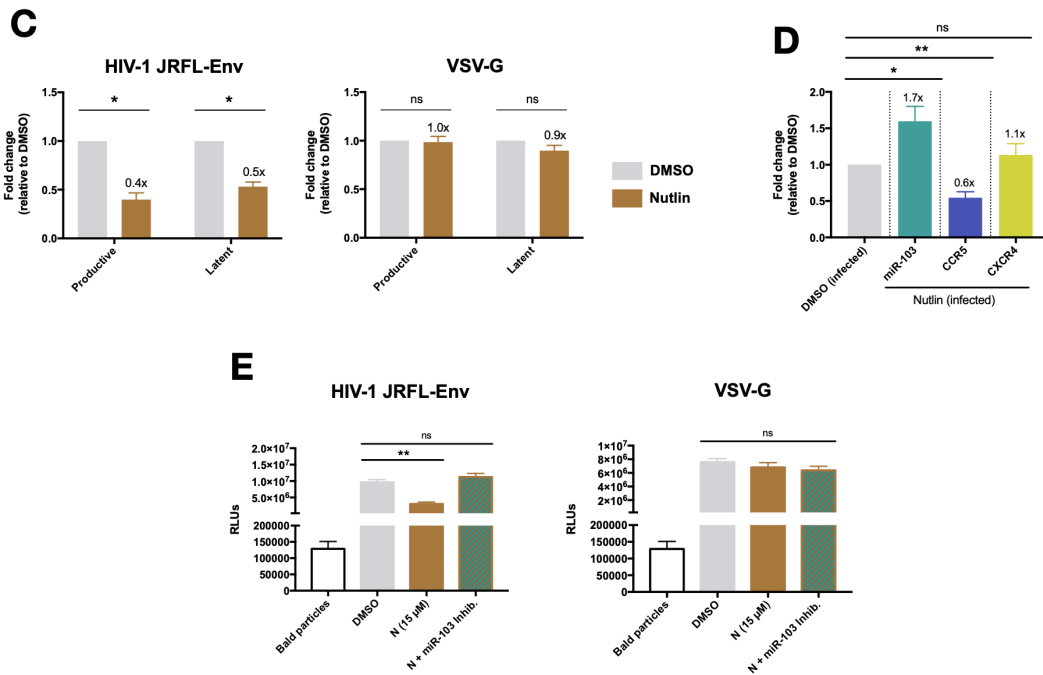
Using this system, we analyzed the establishment of latently and productively HIV-1 infected cell populations upon the infection of activated CD4<sup>+</sup> T cells or during their transition to a resting phenotype. Our data reveal that HIV-1 infection was overall comparable on day 11 (with a mean of ~5.2% infection, n = 7, “activated-to-memory”), as compared to that on day 4 (mean of ~4.3% infection, n = 7, “activated cells”) despite significant differences in the expression levels of CCR5 in these two cell populations (**Figures 2, 4B and 4C, left panel**). Interestingly, activated-to-memory transitioning cells showed a higher frequency of latent infection (2% of productively infected versus 3.2% of latently infected), when compared to activated infected cells (compare 3.1% productively infected to 1.2% latently infected (**Figure 4C, right panel**)). In contrast, cells on day 18 were largely refractory to infection despite expressing CCR5 at levels comparable to that on activated CD4<sup>+</sup> T cells (day 4) (**Figures 2 and 4C**). This phenotype most likely reflects the multiple post-entry blocks reported in T cells with a resting phenotype (Baldauf et al., 2012). Taken together (**Figure 4D**), these results provide additional evidence that CD4<sup>+</sup> T cells transitioning from an activated to a memory phenotype are more prone to latent HIV-1 infection.

#### *Nutlin-3 decreases CD4<sup>+</sup> T cell susceptibility to human immunodeficiency virus type-1 infection by inducing miRNA-103-mediated downregulation of CCR5*

Given that we observed different levels of latent HIV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T cells depending on their transitioning phenotype, we investigated the impact of p53-regulated miRNA-103 on the establishment of latent and productive HIV-1 infections in post-activated CD4<sup>+</sup> T cells. To this end, we infected Nutlin-3-pre-treated (15µM for 24h) CD4<sup>+</sup> T cells with the HI.fate HIV-1 reporter virus pseudotyped with either HIV-1 JRFL-Env glycoproteins (CCR5-dependent HIV-1 entry) or VSV-G (CCR5-independent HIV-1 entry) for 48h (**Figure 5A**). When compared to control (DMSO),

Nutlin-3 decreased the frequency of both productive and latent populations by 50% in the context of CCR5-dependent HIV-1 infection ( $p = 0.0286$ ) but not in the case of VSV-G-mediated entry (**Figures 5B and 5C**). Moreover, real-time qPCR analysis of infected cells revealed that CCR5 mRNA was reduced in Nutlin-3-treated cells which also had higher levels of miRNA-103 (**Figure 5D**). These results suggest that Nutlin-3 specifically impacts the entry of CCR5-tropic HIV-1 viruses by inducing miRNA-103-mediated CCR5 downregulation. To further establish this link, we took advantage of a highly sensitive Nano-Luciferase (NanoLuc) virus reporter system ([Schmidt et al., 2020](#)). Activated CD4<sup>+</sup> T cells were treated with Nutlin-3 in the presence of a miRNA-103 inhibitor or a control inhibitor and then infected with JRFL-Env or VSV-G-coated NanoLuc HIV-1 viruses (NL4.3-NanoLuc<sup>+</sup>-JRFL or NL4.3-NanoLuc<sup>+</sup>-VSV-G) (**Figure 5A**). As previously shown, treatment with Nutlin-3 reduced CCR5-dependent HIV-1 infection by approximately 10-fold ( $p = 0.0042$ ), while having no significant impact on VSV-G-mediated, CCR5-independent viral entry (**Figure 5E**). Importantly, the presence of a miRNA-103 inhibitor completely negated the Nutlin-3 inhibitory effect on CCR5-dependent HIV-1 infection. Taken together, these results demonstrate that Nutlin-3 can limit HIV-1 entry and infection in transitioning CD4<sup>+</sup> T cells by decreasing CCR5 expression through a process that involves miRNA-103.





**Figure 5 - Nutlin-3 treatment decreases the susceptibility of transitioning CD4<sup>+</sup> T cells to HIV-1 infection by downregulating CCR5 expression through miRNA-103 upregulation.**

(A) Experimental design of Nutlin-3 treatment and HIV-1 infection.

(B and C) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were activated for 4 days, treated with DMSO or Nutlin-3 (15μM) for 24h, and then infected for 2 days with HI.fate viruses expressing either the HIV-1 JRFL-Env or VSV-G. The frequencies of productively and latently infected cells were determined by flow cytometry based on E2-Crimson and ZsGreen expression. In (B), shown are data from a representative donor. In (C), data were obtained from cells of four different blood donors (2 ♀/2 ♂). Shown are the mean fold changes normalized to vehicle (DMSO)-treated cells. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*p < 0.05.*

(D) Total RNAs from infected cells previously treated with vehicle (DMSO) or Nutlin-3 were extracted and expression of CCR5 mRNA, miRNA-103, and CXCR4 mRNA were analyzed by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to vehicle-treated infected cells. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.*

(E) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were activated for 4 days, transfected with the miRNA-103 inhibitor or control inhibitor, treated with vehicle (DMSO) or Nutlin-3 (N) at 15μM for 24h, and then infected with NL4.3-NanoLuc<sup>+</sup> virus pseudotyped with HIV-1 JRFL-Env or VSV-G. Bald particles (without any viral glycoproteins) were also used as a control. NanoLuciferase activity was measured in cell lysates after 30h of infection. Shown are the results obtained from four different blood donors (2 ♀/2 ♂). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\*p < 0.01.*

### *MiRNA-103 expression is inversely correlated with the levels of CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells in vivo*

In view of our data showing that CCR5 expression is regulated by miRNA-103, we investigated whether such a relationship could be observed in HIV-1-infected

individuals that control or not HIV-1 infection (Deeks and Walker, 2007; Jiang et al., 2020; Okulicz et al., 2009). We measured the levels of miRNA-103 and CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes isolated from ART-naïve progressors or in untreated individuals living with HIV-1 who can control the infection by maintaining an undetectable viral load, the so-called elite controllers (ECs) (**Table 1**).

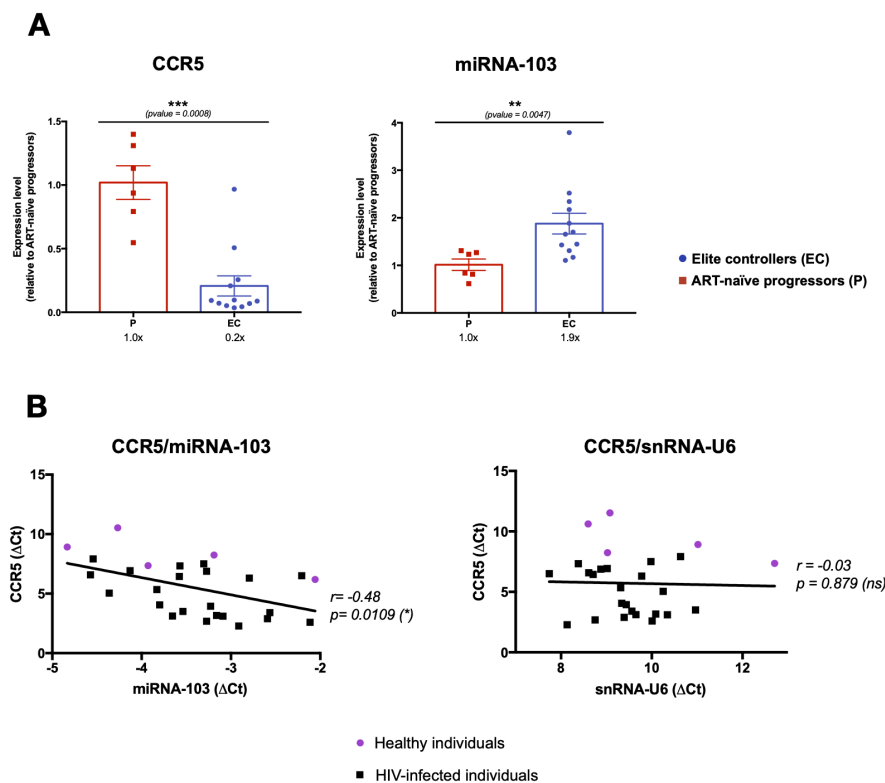
**Table 1 - Clinical data of HIV-1 infected individuals included in the study.**

	<b>Elite controllers (EC)</b>	<b>ART-naïve progressors</b>
Number of participants	12	6
Number of males/females	8/4	5/1
Age in years* <sup>#</sup>	42 (26-57)	35 (24 - 60)
Duration of infection (year)* <sup>#</sup>	10.5 (2 - 29)	< 0.5
CD4 counts (cells/μL of blood)* <sup>#</sup>	735 (260 - 1080)	565 (510 - 810)
CD8 counts (cells/μl of blood)* <sup>#</sup>	760 (260 - 1590)	1435 (1050- 3832)
Viral loads (copies/mL of plasma)* <sup>#</sup>	< 50	145 557 (34 276 - 248 677)
Years of undetectable viral load (EC)* <sup>#</sup>	6 (1 - 20)	N/A

\* Median with range; # at sample acquisition; N/A: not applicable

We observed that CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-1 ECs (n = 12) expressed significantly less CCR5 mRNA (5-fold, p = 0.0008) than those from ART-naïve progressors (n = 6). This decrease in CCR5 mRNA was accompanied by a pronounced increase in miRNA-103 expression in CD4<sup>+</sup>T cells obtained from ECs (1.9-fold, p = 0.0047) as compared to those from ART-naïve progressors (**Figure 6A**). To assess whatever viral replication may have impacted the overall expression of miRNAs, we analyzed the level of miRNA-103 and CCR5 mRNA in healthy individuals. To this end, we found that the inverse relationship between miRNA-103 and CCR5 in HIV-1 infected individuals (**Figure 6A**) was also observed in healthy persons (r = -0.48, p = 0.0109), further

strengthening the notion of the modulation of CCR5 by miRNA-103 (**Figure 6B**). In contrast, no correlation was observed between small nuclear RNA (snRNA)-U6 and CCR5 mRNA expression ( $r = -0.03$ ). Overall, these results indicate that the extent of miRNA-103 expression is inversely correlated with the level of CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells of HIV-1-infected individuals and further suggest that miRNA-103 may be a host factor contributing to the differential CCR5 expression observed among HIV-1 ECs and ART-naïve progressors.



**Figure 6 - Analyses of miRNA-103 and CCR5 mRNA expression levels in CD4<sup>+</sup> T cells isolated from HIV-1-infected and healthy individuals.**

(A) CD4<sup>+</sup> T cells from ART-naïve progressors (P) and elite controllers (EC) were isolated from PBMCs by negative selection. Following total RNA extraction, the expression of miRNA-103 and CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from EC ( $n = 12$ ) and P ( $n = 6$ ) were determined by real-time qPCR. Shown are expression levels (in fold change) relative to the mean of ART-naïve progressors (which was set to 1). Error bars represent  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney test, values: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . See also **Table 1**.

(B) The inclusion of healthy individuals ( $n = 6$ , 3 ♀/3 ♂, purple dots) in the analysis as shown in (A) demonstrates a negative correlation between miRNA-103 expression and CCR5 mRNA levels in CD4<sup>+</sup> T cells, as determined by Pearson  $r$  test, values: \* $p < 0.05$ . As controls, snRNA-U6 and CCR5 mRNA levels in these cells were compared by the Pearson  $r$  test.

## **Discussion**

Levels of CCR5 expression on CD4<sup>+</sup> T cells influence not only the susceptibility to HIV-1 infection and, ultimately, the establishment of latent viral reservoirs, but also the preservation of highly functional CD4<sup>+</sup>T lymphocyte populations for HIV-1 control (Lederman et al., 2006). Indeed, so far, cases of sterilizing cure have been achieved in patients that received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from donors homozygous for the CCR5-Δ32 deletion, which impairs surface expression of the CCR5 receptor and therefore confers resistance to infection (Gupta et al., 2019, 2020; Hütter et al., 2009). Furthermore, highly functional HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells of ECs were found less susceptible to HIV-1 entry owing to a negative regulation of the CCR5 co-receptor, a characteristic that appears to protect these cells from depletion and promote HIV-1 control (Claireaux et al., 2022; Gonzalo-Gil et al., 2019; Meijerink et al., 2014). Thus, understanding how CCR5 is regulated in CD4<sup>+</sup> T cells is essential for the development of CCR5-targeted therapies aimed at reducing the establishment of latent viral reservoirs and achieving a functional HIV-1 cure.

In this study, we provide evidence that miRNA-103, a miRNA regulated by p53, exerts a control on CCR5 mRNA levels in CD4<sup>+</sup> T cells. We further show that the downregulation of p53 following CD4<sup>+</sup> T lymphocyte activation and the resulting downregulation of miRNA-103 contributes to CCR5 upregulation in activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells, a population that is particularly prone to HIV-1 latent infection. These results extend our previous findings in HIV-1-infected macrophages where we identified miRNA-103 and its paralog miRNA-107 as important p53-regulated effectors of the antiviral response triggered by the proinflammatory cytokine IL-1β, which downregulates CCR5 and renders macrophages refractory to HIV-1 entry (Lodge et al., 2020). As miRNA abundance relative to target mRNAs as well as the outcome of miRNA-mediated repression can vary in different cell types or under different cellular conditions (Dexheimer and Cochella, 2020), these results highlight a conservation of miRNA-103 targeting and repressing functions toward CCR5 expression in distinct immune cell types. Interestingly, miRNA-103 is not the only miRNA reported to modulate CCR5 mRNA



expression. MiRNA-1224 was found to stimulate a -1 ribosomal frameshift in the CCR5 mRNA sequence by forming a triplex RNA structure, which directs translating ribosomes to slip back one base and encounter a premature termination codon, thus leading to an unstable truncated form of CCR5 (Belew et al., 2014). A long non-coding RNA, CCR5AS, which is associated with HIV-1 disease outcome, also contributes to the post-transcriptional regulation of CCR5 mRNAs by protecting these from degradation induced by Raly proteins (Kulkarni et al., 2019). It has also been shown that the level of CCR5 in CD4<sup>+</sup> T cells can be controlled by the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent signaling pathway, and more specifically by the CREB1 transcription factor (Banerjee et al., 2011). Interestingly, our data reveal that although p53 mRNA levels decrease in activated CD4<sup>+</sup> T cells (day 4) and activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells (day 11) as compared to resting T cells (**Figure 3A**), there is not an important fluctuation in the levels of miRNA-103 and p53 mRNA in the initial period after activation where CCR5 expression levels are increasing. This suggests that the levels of miRNA-103 during this period are not sufficient to counter the increase in CCR5 observed (**Figure 2**). Therefore, while miRNA-103 appears not directly involved in the upregulation of CCR5 that takes place following activation, the lack of sufficient up-modulation during that period (day 4 to day 11) is likely to facilitate CCR5 upregulation. Indeed, T cell activation has been shown to induce the demethylation of *cis* regions of *CCR5*, a process that conceivably contributes to CCR5 expression upregulation (Gornalusse et al., 2015). As CCR5 levels vary widely across T cell subsets, it is more than likely that this regulation is the result of several of these mechanisms acting together. Thus, miRNA-103 is part of the multiple mechanisms regulating CCR5 mRNA levels and variations in its abundance during the transition of CD4<sup>+</sup> T cells from an activated stage to a resting memory phenotype influence their susceptibility to HIV-1 infection.

Our results confirm and extend the results of Shan and colleagues (Shan et al., 2017) showing that activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells are more prone to latent HIV-1 infection. Using a dual-reporter virus that distinguishes between productively and latently infected cells (Battivelli et al., 2018; Lopez et al., 2022; Ratnapriya et al., 2021), we show that the frequency of latent cells increases in activated-to-memory

transitioning CD4<sup>+</sup> T cells, which, indeed, display a transient increase in CCR5 expression. The mechanism involved in the gradual increase in CCR5 expression following the activation of the TCR with anti-CD3/CD28 antibodies appears partially linked to a decrease in the levels of p53 mRNA. These findings are consistent with results in mice showing that TCR signaling results in early termination of p53 protein expression by decreasing p53 mRNA as well as strong transcriptional induction of the p53-regulating E3 ubiquitin ligase, Mdm2. Down modulation of p53 in response to antigen stimulation is, indeed, a critical step for the proliferation of antigen-specific T cells in mice (Watanabe et al., 2014). This decrease in p53 mRNA levels following CD4<sup>+</sup> T cell activation and its sustained low levels in activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells as compared to resting cells support the notion that the control exerted by p53-regulated miRNA-103 on CCR5 mRNA levels is drastically reduced and not effective after CD4<sup>+</sup> T cell activation. Interestingly, however, miRNA-103 levels and control over CCR5 expression are gradually re-established as CD4<sup>+</sup> T cells further progress to a resting memory phenotype. In line with the reported p53 mRNA decrease and Mdm2 upregulation after TCR signaling (Watanabe et al., 2014), pharmacological stabilization of the p53 protein by Nutlin-3, an inhibitor of Mdm2, resulted in an increase of miRNA-103 and a decrease of CCR5, which reduced HIV-1 entry and in consequence, viral infection. Importantly, the effect of Nutlin-3 was alleviated by the presence of miRNA-103 inhibitors demonstrating the involvement of this miRNA. Taken together, our results indicate that upregulating miRNA-103 by stabilizing p53 limits the levels of CCR5 expression after CD4<sup>+</sup> T cell activation, a condition that dampens viral entry and the establishment of HIV-1 latent infection. These findings afford a sound scientific rationale for considering p53-activating drugs, which are currently tested in cancer clinical trials (Khurana and Shafer, 2019), as agents to limit the establishment of viral reservoirs in both T cells and macrophages in HIV-1 cure strategies.

Several studies have shown that PBMCs from ECs have a miRNA repertoire that is distinct from that of HIV-1 ART-naïve progressors, and such a difference may in part explain the control of viral infection in ECs (Witwer et al., 2012; Reynoso et al., 2014; Ayala-Suárez et al., 2020). In this context, we assessed the levels of miRNA-

103 and CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells from ECs and ART-naïve progressors and found that CCR5 mRNA in CD4<sup>+</sup> T cells obtained from ECs was significantly decreased when compared to that in CD4<sup>+</sup> T cells from ART-naïve progressors, in line with recently published results (Claireaux et al., 2022; Gonzalo-Gil et al., 2019; Meijerink et al., 2014). Thus, in addition to displaying specific immune signatures (Krishnan et al., 2014; Nguyen et al., 2019), ECs could also control HIV-1 infection by limiting CCR5 expression levels, particularly in HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells, via multiple mechanisms, a characteristic that results in decreased susceptibility to viral infection and depletion (Claireaux et al., 2022). Protection of highly functional CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-1 controllers may be sufficient to sustain a fully adaptive antiviral response and thus viral control. The upregulation in miRNA-103 expression that we observe in CD4<sup>+</sup>T cells from ECs suggests that this miRNA contributes to CCR5 downregulation in HIV-1 controllers although the mechanism is not exclusive given that multiple transcriptional and post-transcriptional mechanisms regulate CCR5 expression and accumulation at the cell surface (Brelot and Chakrabarti, 2018). Nevertheless, pathways that enhance miRNA-103 have been reported to be upregulated in CD4<sup>+</sup> T cells from ECs as compared to ART-naïve progressors. Indeed, increased p21 mRNA and protein in CD4<sup>+</sup>T cells from the EC group suggest that the p53 pathway is more active in CD4<sup>+</sup> T cells from these individuals and may explain the enhancement of p53-regulated miRNA-103 that we observe (Chen et al., 2011). Thus, the analysis of miRNA-103 and p53 in a larger cohort of ECs is, therefore, warranted to further assess the role of p53-regulated miRNA-103 in the modulation of CCR5 expression in these patients. Previous meta-analyses of genetic studies showed a genome-wide significant association between the CCR5 locus and viral load, highlighting the impact of CCR5 expression limitation on HIV-1 replication and control (McLaren et al., 2015). Indeed, it has been shown that PBMCs from ART-naïve progressors may have less total miRNAs than cells from ECs (Ayala-Suárez et al., 2020). As well, viral infection can have an impact on miRNA expression (Bennasser et al., 2005; Triboulet et al., 2007) as viral proteins such as Tat and Vpr have been reported to act as RNA silencing suppressors (Casey Klockow et al., 2013; Cojo et al., 2017). However, the fact that the negative correlation between miRNA-103 and CCR5 was also observed with

healthy individuals supports the idea that this relationship is independent of plasma viral loads.

In conclusion, our study identifies miRNA-103 as a post-transcriptional negative regulator of CCR5 expression and HIV-1 entry in CD4<sup>+</sup> T cells. We also provide evidence that the upregulation of this miRNA may limit the establishment of latent HIV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T cells. Lastly, we document that low-level CCR5 mRNA in HIV-1 ECs is associated with an enhancement of miRNA-103 expression. Given the central role played by CCR5 inactivation or downregulation in the natural control of HIV-1 infection (Tebas et al., 2021; Zeidan et al., 2021), strategies aimed at enhancing the expression of miRNA-103 might represent a promising complementary approach toward achieving a functional HIV-1 cure.

## **STAR★Methods**

### **Key resources tables**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse anti-human CD3	BioLegend	Cat #300438
Mouse anti-human CD28	BioLegend	Cat #302934
Mouse anti-human CCR5 (BV421)	BioLegend	Cat #359118
Mouse anti-human CD4 (APC)	BioLegend	Cat #317416
Mouse anti-human CD4 (PE/Cy7)	BioLegend	Cat #317414
Mouse anti-human BST2 (PE)	BioLegend	Cat #348406
Mouse anti-human CD3 (Pacific Blue)	BioLegend	Cat #300330
Mouse anti-human CD25 (PE)	BioLegend	Cat #302606
Mouse anti-human CD69 (PE)	BioLegend	Cat #310906
Mouse anti-human HLA-DR (PE)	BioLegend	Cat #307606
Mouse anti-human CXCR4 (PerCp Cy5.5)	BioLegend	Cat #306516
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
HIV: HI.fate	Obtained from Dr. A. Herschhorn (Ratnapriya et al., 2021)	N/A
HIV: pNL4.3-Env-Vpr <sup>+</sup> Luc <sup>+</sup>	Obtained from Dr. N.R.Landau (Connor et al., 1995)	N/A
HIV: pNL4.3-Env-NanoLuc <sup>+</sup>	Obtained from Dr. P.Bieniasz (Schmidt et al., 2020)	N/A
<b>Biological samples</b>		
Healthy individuals (PBMCs)	Informed volunteers	N/A
Elite controllers (PBMCs)	Informed volunteers	N/A
ART-naïve progressors (PBMCs)	Informed volunteers	N/A

<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Interleukin-2	Peprtech	Cat #200-02-100UG
Interleukin-7	Abcam	Cat #73201
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	MP Biomedicals	Cat #191418
Nutlin-3	Sigma Aldrich	Cat #N6287
Raltegravir	Santa Cruz Biotechnology	Cat # sc-364600
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Fixable violet dead cell stain kit	ThermoFisher	Cat #L34963
SuperScript II Reverse Transcriptase	ThermoFisher	Cat #18064-014
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	ThermoFisher	Cat #10777-019
RNeasy Mini plus kit	Qiagen Sciences	Cat #74136
Human CD4 <sup>+</sup> isolation kit	Mitenyi Biotec	Cat #130-096-533
Dead Cell Removal kit	Mitenyi Biotec	Cat #130-090-101
Powerup Sybergreen Mastermix	Applied Biosystems	Cat #A25741
Lipofectamine™ 3000	ThermoFisher	Cat # L3000001
Human T Cell Nucleofector Kit	Lonza	Cat #VPA-1002
Luciferase Assay System	Promega	Cat #E1501
Nano-Glo® Luciferase Assay System	Promega	Cat #N1110
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
Human : HEK293T	ATCC	Cat #CRL-3216
Human : CEM.NKR-CCR5	NIH AIDS Reagent Program	Cat #ARP-4376
Human : C10/MJ	NIH AIDS Reagent Program	Cat #ARP-4407
<b>Oligonucleotides</b>		
Primers	See Table S1	N/A
<b>Mimic miRNA-103:</b> AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	Qiagen/Exiqon	Cat #339173 YM00470828-ADB
<b>Control mimic:</b> UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	Qiagen/Exiqon	Cat #339173 YM00479902-ADB
<b>miRNA-103 inhibitor:</b> GCCCTGTACAATGCTGCT	Qiagen/Exiqon	Cat #339121 YI04107448-ADC
<b>Control inhibitor:</b> TAACACCGTCTATACGCCCA	Qiagen/Exiqon	Cat #339126YI00199006-ADC
<b>Recombinant DNA</b>		
psvIIenv-JRFL	Obtained from Dr. P.Clapham ( <a href="#">Peters et al., 2004</a> )	N/A
psvIIenv-ADA	Obtained from Dr. J.Sodroski ( <a href="#">Sullivan et al., 1995</a> )	N/A
psvCMV-VSV-G	Obtained from Dr. D.Ory and Dr. R. Mulligan ( <a href="#">Lodge et al., 1997</a> )	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
FACS Diva	BD Biosciences	<a href="https://www.bdbiosciences.com">https://www.bdbiosciences.com</a>
FlowJo (Version 10)	TreeStar	<a href="https://www.flowjo.com">https://www.flowjo.com</a>
Biorender	Biorender	<a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>
Prism (Version 8)	GraphPad	<a href="https://www.graphpad.com">https://www.graphpad.com</a>

### ***Human subjects***

Peripheral blood samples and leukaphereses were obtained from HIV and HCV seronegative adults (of either sex). Untreated progressor (n = 6) were treatment-naïve adults with viral load (VL) > 30 000 copies of HIV RNA per mL (c/mL) of plasma. Elite controllers (n = 12) were treatment-naïve adults, tested for HIV-1 viral load every 6 months and having VL < 50 copies of HIV RNA per mL (c/ml) of plasma (Deeks and Walker, 2007). ECs were enrolled in the Canadian Cohort of HIV Infected Slow Progressors. ART-naïve progressor PBMCs were obtained from the primary infection cohort of the FRQ-S AIDS and Infectious Diseases Research Network. The sex, age, and all clinical information of these individuals are summarized in Table 1.

All participants had given written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocols approved by the research ethics review board of the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).

### ***Cell lines***

HEK-293T (obtained from ATCC) were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM (Wisent) supplemented with 10% FBS. CEM-NKR-CCR5 and C10/MJ (obtained from NIH AIDS reagent program) were maintained at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Wisent) supplemented with 10% FBS.

### ***Preparation of activated, activated-to-memory transitioning, and resting memory CD4<sup>+</sup> T cells***

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors by negative depletion using the human CD4<sup>+</sup> Isolation Kit II (Miltenyi) according to manufacturer's instructions. Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Resting CD4<sup>+</sup> T cells were isolated by flow cytometry according to the following phenotypic markers: CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, CD69<sup>-</sup>. Activated CD4<sup>+</sup> T cells were generated by co-stimulation of resting cells with anti-CD3 (10 µg/mL) and anti-CD28 (2 µg/mL) and cultured in the presence of IL-2 (100U/mL) and IL-7 (100U/mL) for 4 days. To obtain activated-to-memory transitioning lymphocytes, activated cells were cultured

in basal medium (RPMI-1640) with IL-2/IL-7 (20U/mL) without anti-CD3 and anti-CD28 antibodies.

### ***Flow cytometry***

Briefly, fluorochrome-labeled antibodies were added directly to the CD4<sup>+</sup> T cells (1:150), incubated 45min on ice, washed twice in FACS buffer (PBS, 1% of FBS) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Finally, cells were resuspended in PBS-EDTA for analyses. Flow cytometry analyses and cell sorting were performed on a FACSAria III (BD), LSR Fortessa (BD) or CyAn (Beckman) equipped with appropriate lasers. Acquired data were analyzed with FlowJo 10 software (TreeStar).

### ***RNA extraction, reverse-transcription, and real-time qPCR analyses***

Total cellular RNAs were extracted using RNeasy RNA extraction columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and conserved at -80°C. Total RNAs (100 to 200 ng) were reversed transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) with poly(dT) and specific loop primers for the appropriate microRNAs using the two-tailed real-time qPCR method (Androvic et al., 2017). For real-time qPCR, cDNA and appropriate primers (see **Table S1**) were added to SYBR green select master mix (Applied Biosystems) in 96-well plates and run on a ViiA96 thermocycler (Thermo Fisher Scientific) with the following cycling conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 5 min, and 40 cycles of 95°C for 20 sec and 60°C for 40 sec. Dissociation curve analysis after the end of the PCR confirmed the presence of a single and specific product. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or small nuclear RNA (snRNA) U6 were used as loading endogenous controls. Control conditions, as described in each figure legend, were set at 1 to determine the fold change.

### ***Transfection of C10/MJ cells and primary CD4<sup>+</sup> T cells***

Primary CD4<sup>+</sup> T cells or C10/MJ cells were transfected with either control RNA, mimics of miRNA-103, or inhibitors of miRNA-103 by nucleofection (Lonza) according to the manufacturer's instructions and cultured for 48h in 48-well plates in basal medium (RPMI-1640) supplemented with IL-2/IL-7 (100U/mL). The miRNA-103 and negative

control miRCURY locked nucleic acid (LNA) mimics, or the miRNA-103 and negative control inhibitors were FAM-labeled (see **key resources table**).

### ***Virus production***

Pseudotyped double fluorescent HI.fate (JRFL-Env or VSV-G), NL4.3-Vpr<sup>+</sup>Luc<sup>+</sup>-(ADA-Env or VSV-G) and NL4.3-NanoLuc<sup>+</sup>-(JRFL-Env or VSV-G) were generated by co-transfecting the corresponding proviral constructs with HIV-1 Env or VSV-G expression vectors in 5x10<sup>6</sup> HEK 293T cells using lipofectamine 3000. In all cases, HEK 293T cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% heat inactivated FBS at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Virus-containing supernatants were recovered 48h post-transfection. Supernatants were cleared of cells by centrifugation at low speed, filtered and virus pellets recovered following ultracentrifugation on a 20% sucrose cushion. Viruses were resuspended in DMEM, and aliquots kept at -80°C. The multiplicity of infection (MOI) was determined using the CEM.NKR-CCR5 cell line.

### ***Infection of primary CD4<sup>+</sup> T cells***

Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with NL4.3-based viruses at MOI of 1 (VSV-G) or 2 (HIV-1 CCR5 tropic strains) by spinoculation (centrifugation for 2h at 1200g, 22°C). In the case of HI.fate-based viruses, treatment with Raltegravir (15µM) was used as a negative control. Cells were pre-treated 2 hours before infection and thereafter, the drug was retained throughout the infection. Infection rates were determined 48h post-infection by measurement of E2-Crimson-positive (Crim<sup>+</sup>), and GFP-positive (GFP<sup>+</sup>) cells by flow cytometry.

Cells infected with NL4.3-Vpr<sup>+</sup>Luc<sup>+</sup> or NL4.3-NanoLuc<sup>+</sup> virus were washed 6h after viral adsorption and lysed 48h (F-Luc) or 30h (NanoLuc) post-infection. The levels of viral entry were determined by measuring Luciferase activity using either the F-Luc or the Nano-Glo Luciferase Assay Systems on a GloMax luminometer (Promega).

### ***Nutlin-3 treatment***

Primary CD4<sup>+</sup> T cells previously activated with anti-CD3 (10 µg/mL) and anti-CD28 (2 µg/mL) and cultured in the presence of IL-2/IL-7 for 4 days were treated with the



Mdm2 inhibitor Nutlin-3 (Sigma) at 15  $\mu$ M, unless mentioned otherwise, for 24h in RPMI-1640 supplemented with IL-2/IL-7 (100U/mL). Cell death was determined using the live/dead fixable violet dead cell stain kit (ThermoFisher).

### **Quantification and statistical analyses**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 8). Non-parametric Kruskal Wallis tests were used to compare ranks between more than two groups. Non-parametric Mann-Whitney's U-tests (two-tailed) were used to compare ranks between two groups. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* signify <0.05, <0.01, <0.001, <0.0001, respectively; ns, not significant.

### **Limitations of the study**

We acknowledge several limitations to our study. We show that the HIV-1 infection of activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells, which transiently express higher levels of CCR5, leads preferentially to latent infection. However, we are mindful to term these cells "activated-to-memory transitioning CD4<sup>+</sup> T cells," although no single phenotypic marker might faithfully identify these cells exclusively. It is also important to mention that the levels of CCR5, p53, and miRNA-103 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, as well as the efficiency of infection by a CCR5-tropic HIV-1 strain, are very variable in cells from one blood donor to another, which can lead to variations in the results.

Also, owing to the rarity of ECs and ART-naïve samples, the number of individuals included in this study from these two groups is low. We conclude that miRNA-103 might participate in the decrease in CCR5 observed in CD4<sup>+</sup> T cells from ECs as compared to ART-naïve individuals; however, we cannot exclude that a different activation profile between the cells of the two groups plays an important role in this decrease. The number of cells per sample did not allow us to verify the activation profile of CD4<sup>+</sup> T cells, but this variable could be included in future studies.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank all the study participants, Martine Gauthier (IRCM Clinic) for coordinating access to blood donors as well as Mario Legault (Réseau SIDA/Maladies Infectieuses, FRQS), Stéphanie Matte, and Tsoarello Mabanga for their assistance with the preparation of ART-naïve progressor or slow progressor cohort patient samples. We thank Mélanie Laporte for excellent technical support. We also thank Julie Lord and Eric Massicotte (IRCM cytometry platform) for their assistance. We thank Drs. Nicolas Chomont (CRCHUM) and Martin Sauvageau (IRCM) for their guidance, assistance, and helpful discussions throughout this study. The following reagents were obtained from the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: C10/MJ cells contributed by Dr. Dean Mann and Dr. Miklaus Popovic; CEM.NKR CCR5<sup>+</sup> cells (ARP-4376) contributed by Dr. Alexandra Trkola. Figures 4A and 5A, and the graphical abstract were produced using the Biorender.com website. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants FDN-154324 and HB2-164064 (Canadian HIV Cure Enterprise-CanCURE) to E.A.C. This work was also supported in part by the Fonds de la Recherche Québec-Santé (FRQS)-funded Réseau SIDA/Maladies Infectieuses. E.A.C is the recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV Research.

## **Author contributions**

N.B and E.A.C designed the study. N.B performed the experiments. N.B and E.A.C analyzed data. T.N.Q.P and R.L assisted with data analyses. J.J and T.T.M assisted with the characterization of the dual-fluorescent HIV-1 vector system, which was provided by A.H. J.P.R provided access to the cohort of ART-naïve progressors, whereas C.L.T and N.F.B provided samples from the cohort of slow progressors. N.B, R.L, T.N.Q.P, and E.A.C wrote the article. E.A.C secured funding.

## **References**

- Ahluwalia, J.K., Khan, S.Z., Soni, K., Rawat, P., Gupta, A., Hariharan, M., Scaria, V., Lalwani, M., Pillai, B., Mitra, D., et al. (2008). Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology* 5, 117. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-117>.
- Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R., and Kubista, M. (2017). Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 45, e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>.
- Ayala-Suárez, R., Díez-Fuertes, F., Calonge, E., De La Torre Tarazona, H.E., Gracia-Ruiz de Alda, M., Capa, L., and Alcamí, J. (2020). Insight in miRNome of Long-Term Non-Progressors and Elite Controllers Exposes Potential RNAi Role in Restraining HIV-1 Infection. *J Clin Med* 9. <https://doi.org/10.3390/jcm9082452>.
- Balasubramaniam, M., Pandhare, J., and Dash, C. (2018). Are microRNAs Important Players in HIV-1 Infection? An Update. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10030110>.
- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* 18, 1682–1687. <https://doi.org/10.1038/nm.2964>.
- Banerjee, A., Pirrone, V., Wigdahl, B., and Nonnemacher, M.R. (2011). Transcriptional regulation of the chemokine co-receptor CCR5 by the cAMP/PKA/CREB pathway. *Biomed Pharmacother* 65, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.03.009>.
- Battivelli, E., Dahabieh, M.S., Abdel-Mohsen, M., Svensson, J.P., Tojal Da Silva, I., Cohn, L.B., Gramatica, A., Deeks, S., Greene, W.C., Pillai, S.K., et al. (2018). Distinct chromatin functional states correlate with HIV latency reactivation in infected primary CD4+ T cells. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34655>.
- Belew, A.T., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Advani, V.M., Sulima, S.O., Kasprzak, W.K., Shapiro, B.A., and Dinman, J.D. (2014). Ribosomal frameshifting in the CCR5 mRNA is regulated by miRNAs and the NMD pathway. *Nature* 512, 265–269. <https://doi.org/10.1038/nature13429>.
- Bennasser, Y., Le, S.-Y., Benkirane, M., and Jeang, K.-T. (2005). Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 22, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.010>.
- Brelot, A., and Chakrabarti, L.A. (2018). CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. *J Mol Biol* 430, 2557–2589. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.027>.
- Casey Klockow, L., Sharifi, H.J., Wen, X., Flagg, M., Furuya, A.K.M., Nekorchuk, M., and de Noronha, C.M.C. (2013). The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology* 444, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.010>.

Chavez, L., Calvanese, V., and Verdin, E. (2015). HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS Pathog* 11, e1004955. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004955>.

Chen, H., Li, C., Huang, J., Cung, T., Seiss, K., Beamon, J., Carrington, M.F., Porter, L.C., Burke, P.S., Yang, Y., et al. (2011). CD4<sup>+</sup> T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest* 121, 1549–1560. <https://doi.org/10.1172/JCI44539>.

Chiang, K., Sung, T.-L., and Rice, A.P. (2012). Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 86, 3244–3252. <https://doi.org/10.1128/JVI.05065-11>.

Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>.

Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997a). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13193–13197. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13193>.

Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997b). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183–188. <https://doi.org/10.1038/387183a0>.

Claireaux, M., Robinot, R., Kervevan, J., Patgaonkar, M., Staropoli, I., Brelot, A., Nouël, A., Gellenoncourt, S., Tang, X., Héry, M., et al. (2022). Low CCR5 expression protects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells of elite controllers from viral entry. *Nat Commun* 13, 521. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28130-0>.

Cojo, M.S.-D., López-Huertas, M.R., Díez-Fuertes, F., Rodríguez-Mora, S., Bermejo, M., López-Campos, G., Mateos, E., Jiménez-Tormo, L., Gómez-Esquer, F., Díaz-Gil, G., et al. (2017). Changes in the cellular microRNA profile by the intracellular expression of HIV-1 Tat regulator: A potential mechanism for resistance to apoptosis and impaired proliferation in HIV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells. *PLOS ONE* 12, e0185677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185677>.

Dahabieh, M.S., Ooms, M., Simon, V., and Sadowski, I. (2013). A Doubly Fluorescent HIV-1 Reporter Shows that the Majority of Integrated HIV-1 Is Latent Shortly after Infection. *J Virol* 87, 4716–4727. <https://doi.org/10.1128/JVI.03478-12>.

Deeks, S.G., and Walker, B.D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27, 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010>.

Dexheimer, P.J., and Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 409.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>.

Evans, V.A., Kumar, N., Filali, A., Procopio, F.A., Yegorov, O., Goulet, J.-P., Saleh, S., Haddad, E.K., da Fonseca Pereira, C., Ellenberg, P.C., et al. (2013). Myeloid dendritic cells induce HIV-1 latency in non-proliferating CD4<sup>+</sup> T cells. *PLoS Pathog* 9, e1003799. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003799>.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295–1300. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1295>.

Gonzalo-Gil, E., Rapuano, P.B., Ikediobi, U., Leibowitz, R., Mehta, S., Coskun, A.K., Porterfield, J.Z., Lampkin, T.D., Marconi, V.C., Rimland, D., et al. (2019). Transcriptional down-regulation of *ccr5* in a subset of HIV<sup>+</sup> controllers and their family members. *ELife* 8, e44360. <https://doi.org/10.7554/eLife.44360>.

Gornalusse, G.G., Mummidi, S., Gaitan, A.A., Jimenez, F., Ramsuran, V., Picton, A., Rogers, K., Manoharan, M.S., Avadhanam, N., Murthy, K.K., et al. (2015). Epigenetic mechanisms, T-cell activation, and CCR5 genetics interact to regulate T-cell expression of CCR5, the major HIV-1 coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4762-4771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423228112>.

Gupta, R.K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L.E., Mok, H.P., Peppia, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A.M.J., Lee, H., et al. (2019). HIV-1 remission following CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 568, 244–248. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>.

Gupta, R.K., Peppia, D., Hill, A.L., Gálvez, C., Salgado, M., Pace, M., McCoy, L.E., Griffith, S.A., Thornhill, J., Alrubayyi, A., et al. (2020). Evidence for HIV-1 cure after CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *The Lancet HIV* 7, e340–e347. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(20\)30069-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30069-2).

Hammond, S.M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 87, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>.

Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., and Zhang, H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Nat Med* 13, 1241–1247. <https://doi.org/10.1038/nm1639>.

Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., et al. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* 360, 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>.

Jiang, C., Lian, X., Gao, C., Sun, X., Einkauf, K.B., Chevalier, J.M., Chen, S.M.Y., Hua, S., Rhee, B., Chang, K., et al. (2020). Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature* 585, 261–267. <https://doi.org/10.1038/s41586->

020-2651-8.

Khurana, A., and Shafer, D.A. (2019). MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic potential of idasanutlin (RG7388). *Onco Targets Ther* 12, 2903–2910. <https://doi.org/10.2147/OTT.S172315>.

Krishnan, S., Wilson, E.M.P., Sheikh, V., Rupert, A., Mendoza, D., Yang, J., Lempicki, R., Migueles, S.A., and Sereti, I. (2014). Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J Infect Dis* 209, 931–939. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit581>.

Kulkarni, S., Lied, A., Kulkarni, V., Rucevic, M., Martin, M.P., Walker-Sperling, V., Anderson, S.K., Ewy, R., Singh, S., Nguyen, H., et al. (2019). CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nat Immunol* 20, 824–834. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0406-1>.

Lederman, M.M., Penn-Nicholson, A., Cho, M., and Mosier, D. (2006). Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA* 296, 815–826. <https://doi.org/10.1001/jama.296.7.815>.

Leslie, P.L., Franklin, D.A., Liu, Y., and Zhang, Y. (2018). p53 Regulates the Expression of LRP1 and Apoptosis through a Stress Intensity-Dependent MicroRNA Feedback Loop. *Cell Rep* 24, 1484–1495. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.010>.

Lodge, R., Ferreira Barbosa, J.A., Lombard-Vadnais, F., Gilmore, J.C., Deshiere, A., Gosselin, A., Wiche Salinas, T.R., Bego, M.G., Power, C., Routy, J.-P., et al. (2017). Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell Rep* 21, 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.030>.

Lodge, R., Bellini, N., Laporte, M., Salahuddin, S., Routy, J.-P., Ancuta, P., Costiniuk, C.T., Jenabian, M.-A., and Cohen, É.A. (2020). Interleukin-1 $\beta$  Triggers p53-Mediated Downmodulation of CCR5 and HIV-1 Entry in Macrophages through MicroRNAs 103 and 107. *MBio* 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02314-20>.

Lopez, P., Ajibola, O., Pagliuzza, A., Zayats, R., Koh, W.H., Herschhorn, A., Chomont, N., and Murooka, T.T. (2022). T cell migration potentiates HIV infection by enhancing viral fusion and integration. *Cell Reports* 38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110406>.

Majka, M., Rozmyslowicz, T., Honczarenko, M., Ratajczak, J., Wasik, M.A., Gaulton, G.N., and Ratajczak, M.Z. (2000). Biological significance of the expression of HIV-related chemokine coreceptors (CCR5 and CXCR4) and their ligands by human hematopoietic cell lines. *Leukemia* 14, 1821–1832. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401891>.

McLaren, P.J., Coulonges, C., Bartha, I., Lenz, T.L., Deutsch, A.J., Bashirova, A., Buchbinder, S., Carrington, M.N., Cossarizza, A., Dalmau, J., et al. (2015). Polymorphisms of large effect explain the majority of the host genetic contribution to

variation of HIV-1 virus load. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 14658–14663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514867112>.

Meijerink, H., Indrati, A.R., van Crevel, R., Joosten, I., Koenen, H., and van der Ven, A.J. (2014). The number of CCR5 expressing CD4+ T lymphocytes is lower in HIV-infected long-term non-progressors with viral control compared to normal progressors: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases* 14, 683. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0683-0>.

Moghoofei, M., Bokharaei-Salim, F., Esghaei, M., Keyvani, H., Honardoost, M., Mostafaei, S., Ghasemi, A., Tavakoli, A., Javanmard, D., Babaei, F., et al. (2018). microRNAs 29, 150, 155, 223 level and their relation to viral and immunological markers in HIV-1 infected naive patients. *Future Virology* 13, 637–645. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0055>.

Nahand, J.S., Bokharaei-Salim, F., Karimzadeh, M., Moghoofei, M., Karampoor, S., Mirzaei, H.R., Tabibzadeh, A., Jafari, A., Ghaderi, A., Asemi, Z., et al. (2020). MicroRNAs and exosomes: key players in HIV pathogenesis. *HIV Medicine* 21, 246–278. <https://doi.org/10.1111/hiv.12822>.

Nguyen, S., Deleage, C., Darko, S., Ransier, A., Truong, D.P., Agarwal, D., Japp, A.S., Wu, V.H., Kuri-Cervantes, L., Abdel-Mohsen, M., et al. (2019). Elite control of HIV is associated with distinct functional and transcriptional signatures in lymphoid tissue CD8+ T cells. *Science Translational Medicine* 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4077>.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.

Okulicz, J.F., Marconi, V.C., Landrum, M.L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., et al. (2009). Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* 200, 1714–1723. <https://doi.org/10.1086/646609>.

Orecchini, E., Doria, M., Michienzi, A., Giuliani, E., Vassena, L., Ciafrè, S.A., Farace, M.G., and Galardi, S. (2014). The HIV-1 Tat protein modulates CD4 expression in human T cells through the induction of miR-222. *RNA Biol* 11, 334–338. <https://doi.org/10.4161/rna.28372>.

Ratnapriya, S., Harris, M., Chov, A., Herbert, Z.T., Vrbanac, V., Deruaz, M., Achuthan, V., Engelman, A.N., Sodroski, J., and Herschhorn, A. (2021). Intra- and extra-cellular environments contribute to the fate of HIV-1 infection. *Cell Reports* 36, 109622. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109622>.

Reynoso, R., Laufer, N., Hackl, M., Skalicky, S., Monteforte, R., Turk, G., Carobene, M., Quarleri, J., Cahn, P., Werner, R., et al. (2014). MicroRNAs differentially present in the plasma of HIV elite controllers reduce HIV infection in vitro. *Sci Rep* 4, 5915. <https://doi.org/10.1038/srep05915>.

Riess, M., Fuchs, N.V., Idica, A., Hamdorf, M., Flory, E., Pedersen, I.M., and König, R. (2017). Interferons Induce Expression of SAMHD1 in Monocytes through Down-regulation of miR-181a and miR-30a. *J Biol Chem* 292, 264–277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752584>.

Ruelas, D.S., Chan, J.K., Oh, E., Heidersbach, A.J., Hebbeler, A.M., Chavez, L., Verdin, E., Rape, M., and Greene, W.C. (2015). MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency. *J Biol Chem* 290, 13736–13748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641837>.

Saleh, S., Solomon, A., Wightman, F., Xhilaga, M., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. (2007). CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting memory CD4<sup>+</sup> T cells to HIV-1 infection: a novel model of HIV-1 latency. *Blood* 110, 4161–4164. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-097907>.

Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Lorenzi, J.C.C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, E., Gaebler, C., et al. (2020). Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity. *Journal of Experimental Medicine* 217. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>.

Sengupta, S., and Siliciano, R.F. (2018). Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity* 48, 872–895. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.030>.

Shan, L., Deng, K., Gao, H., Xing, S., Capoferri, A.A., Durand, C.M., Rabi, S.A., Laird, G.M., Kim, M., Hosmane, N.N., et al. (2017). Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4<sup>+</sup> T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity* 47, 766-775.e3. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.014>.

Shen, C.-J., Jia, Y.-H., Tian, R.-R., Ding, M., Zhang, C., and Wang, J.-H. (2012). Translation of Pur- $\alpha$  is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB J* 26, 4755–4764. <https://doi.org/10.1096/fj.12-209023>.

Tebas, P., Jadowsky, J.K., Shaw, P.A., Tian, L., Esparza, E., Brennan, A.L., Kim, S., Naing, S.Y., Richardson, M.W., Vogel, A.N., et al. (2021). CCR5-edited CD4<sup>+</sup> T cells augment HIV-specific immunity to enable post-rebound control of HIV replication. *J Clin Invest* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI144486>.

Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.-L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V., et al. (2007). Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315, 1579–1582. <https://doi.org/10.1126/science.1136319>.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>.

Watanabe, M., Moon, K.D., Vacchio, M.S., Hathcock, K.S., and Hodes, R.J. (2014). Downmodulation of tumor suppressor p53 by T cell receptor signaling is critical for



antigen-specific CD4(+) T cell responses. *Immunity* 40, 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.006>.

Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., et al. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512, 74–77. <https://doi.org/10.1038/nature13594>.

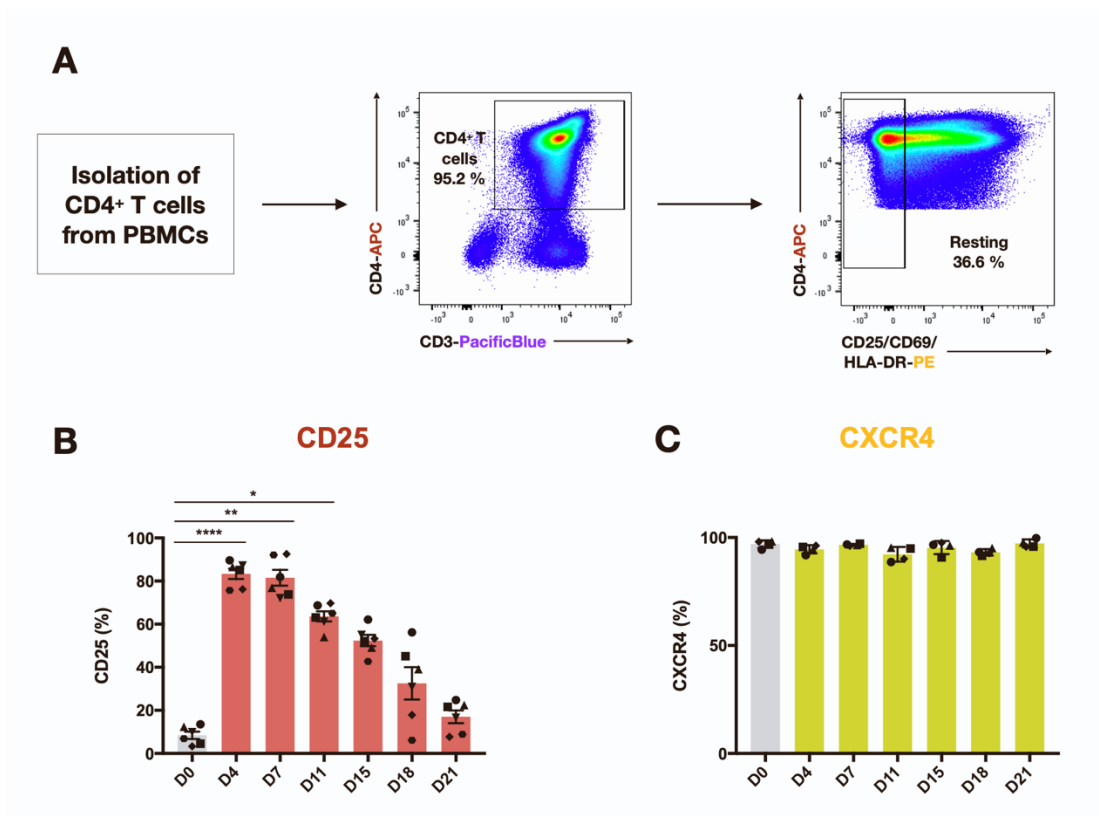
Whitney, J.B., Lim, S.-Y., Osuna, C.E., Kublin, J.L., Chen, E., Yoon, G., Liu, P.-T., Abbink, P., Borducci, E.N., Hill, A., et al. (2018). Prevention of SIVmac251 reservoir seeding in rhesus monkeys by early antiretroviral therapy. *Nat Commun* 9, 5429. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07881-9>.

Witwer, K.W., Watson, A.K., Blankson, J.N., and Clements, J.E. (2012). Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients. *Retrovirology* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-5>.

Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278, 1291–1295. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1291>.

Yousefpouran, S., Mostafaei, S., Manesh, P.V., Iranifar, E., Bokharaei-Salim, F., Nahand, J.S., Mirzaei, H., Taran, M., Babaei, F., Sayad, B., et al. (2020). The assessment of selected MiRNAs profile in HIV, HBV, HCV, HIV/HCV, HIV/HBV Co-infection and elite controllers for determination of biomarker. *Microb Pathog* 147, 104355. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104355>.

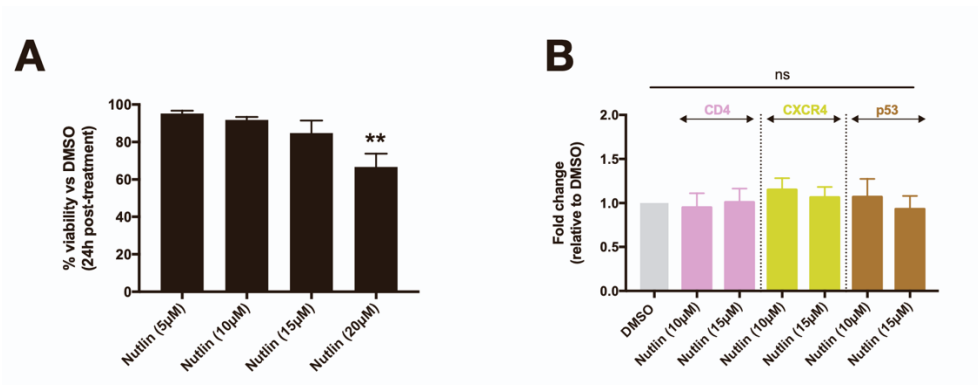
Zeidan, J., Sharma, A.A., Lee, G., Raad, A., Fromentin, R., Fourati, S., Ghneim, K., Sanchez, G.P., Benne, C., Canderan, G., et al. (2021). Infusion of CCR5 Gene-Edited T Cells Allows Immune Reconstitution, HIV Reservoir Decay, and Long-Term Virological Control. 2021.02.28.433290. <https://doi.org/10.1101/2021.02.28.433290>.



**Figure S1 - CD4<sup>+</sup> T cell phenotype characterization at different activation time-points, related to Figure 2.**

(A) Resting CD4<sup>+</sup> T cells were isolated by flow cytometry according to the following parameters: CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD69<sup>-</sup> HLA-DR<sup>-</sup>.

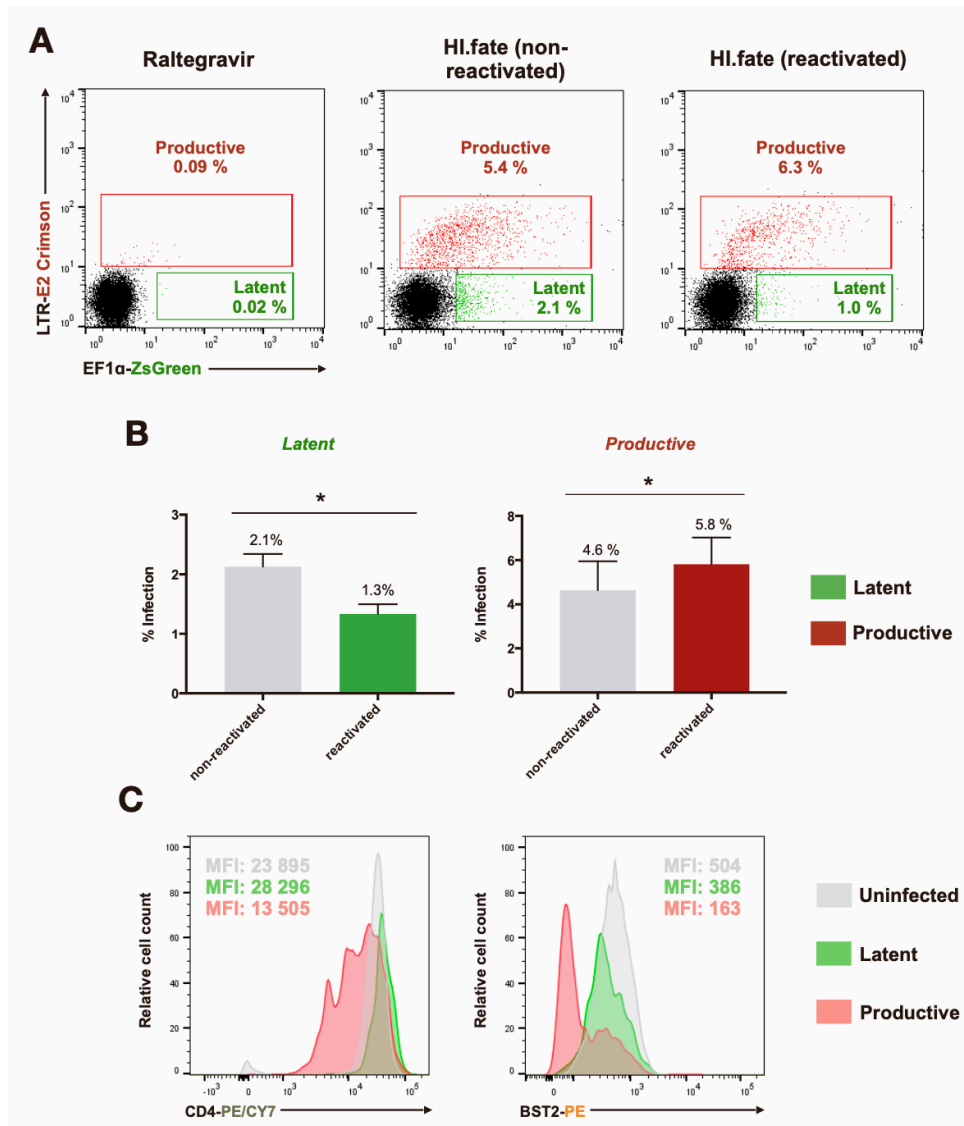
(B and C) HIV-1 co-receptor CXCR4 and the T cell activation marker CD25 were measured by flow cytometry and compared in resting, activated, and relaxed CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the blood of healthy donors. Data were obtained with CD4<sup>+</sup> T cells isolated from four (CXCR4) or six (CD25) different blood donors (2 ♀/2 ♂ and 2 ♀/4 ♂, respectively). Error bars represent +/- SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figure S2 - Nutlin-3 treatment of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes does not affect the expression of CD4, CXCR4 or p53 mRNA, related to Figure 3.**

(A) Percentage of viable cells treated with increasing concentrations of Nutlin-3 as compared to DMSO (vehicle). Data were obtained with CD4<sup>+</sup> T cells isolated from three different blood donors (1 ♀/2 ♂). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\*p < 0.01.*

(B) Different concentrations of Nutlin-3 were added to primary CD4<sup>+</sup> T cells and the levels of p53, CD4 and CXCR4 mRNA determined by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to vehicle-treated cells (in grey). Data were obtained with CD4<sup>+</sup> T cells isolated from three different blood donors (1 ♀/2 ♂). Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test.*



**Figure S3 - Characterization of CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations following infection with doubly fluorescent HI.fate HIV-1 virus, related to Figure 4.**

(A) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with HI.fate-JRFL for two days in the presence or absence of Raltegravir treatment. In one of the cases, cells were reactivated after 24h of infection with immobilized anti-CD3 (10 $\mu$ M/mL) and soluble anti-CD28 (2 $\mu$ M/mL) antibodies for one day. The percentage of productively and latently HIV-1 infected cells was determined by flow cytometry based on E2-Crimson and ZsGreen expression 48h after infection.

(B) Data were obtained with CD4<sup>+</sup> T cells isolated from five different blood donors (4♀/1♂). Shown is the mean percentage of cells expressing ZsGreen (latent) or E2-Crimson and ZsGreen (productive) under the indicated conditions. Error bars represent SEM. *Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \*p < 0.05.*

(C) CD4 and BST2 expression were analyzed by flow cytometry in uninfected, as well as in latently and productively HIV-1 infected, cell populations. Shown is data from a representative donor (of 3 donors).

Table S1 - Oligonucleotides, related to STAR methods

<u>Target</u>	<u>Oligo name</u>	<u>Oligo sequence</u>
<i>GAPDH</i>	GAPDH Reverse	TTGACGGTGCCATGGAATTT
	GAPDH Forward	GCCATCAATGACCCCTTCAT
<i>snRNA-U6</i>	snRNA-U6 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACCAAAAATATG
	snRNA-U6 Reverse	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
	snRNA-U6 Forward	GCGCGTCGTGAAGCGTTC
<i>miRNA-103</i>	miRNA-103 RT	TACAATGTCAAGCTCTCCAGGTACAG TTGGTACCTGACTCCACGCTCATAG
	miRNA-103 Reverse	GGAGCAGCATTGTACAGGGCT
	miRNA-103 Forward	ACAATGTCAAGCTCTCCAGGTACAGT
<i>CCR5</i>	CCR5 Reverse	CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTCG
	CCR5 Forward	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC
<i>CXCR4</i>	CXCR4 Reverse	CTTGGCCTTTGACTGTTGGT
	CXCR4 Forward	TCAGTGGCTGACCTCCTCTT
<i>p21</i>	p21 Reverse	ACAAGTGGGGAGGAGGAAGT
	p21 Forward	TCCTCATCCCGTGTTCCTCT
<i>p53</i>	p53 Reverse	CCTGGGCATCCTTGAGTTCC
	p53 Forward	GCCCAACAACACCAGCTCCT
<i>CD4</i>	CD4 Reverse	TCTTCCCTGAGTGGCTGCT
	CD4 Forward	GTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCT

## **Chapitre 5 : Manuscrit #3**

## Rôle du miARN-26a dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

---

**Contexte** : Comme nous l'avons vu précédemment, les miARN jouent un rôle au cours de l'infection par le VIH-1. Ces miARN peuvent soit être bénéfiques pour le virus et favoriser sa réplication, soit être utilisés par la cellule pour contrôler l'infection virale, par exemple en ciblant des facteurs nécessaires à la réplication du virus. Dans ce contexte, nous avons décidé d'examiner le profil d'expression des miARN et la transcriptomique (ARN messager) par séquençage de l'ARN dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> productivement infectées, non infectées productivement, et non infectées. L'analyse des données nous a permis d'identifier le miARN-26a comme miARN participant à la régulation négative de CD59, une protéine jouant un rôle clé dans l'activation du complément en inhibant la formation du complexe d'attaque membranaire.

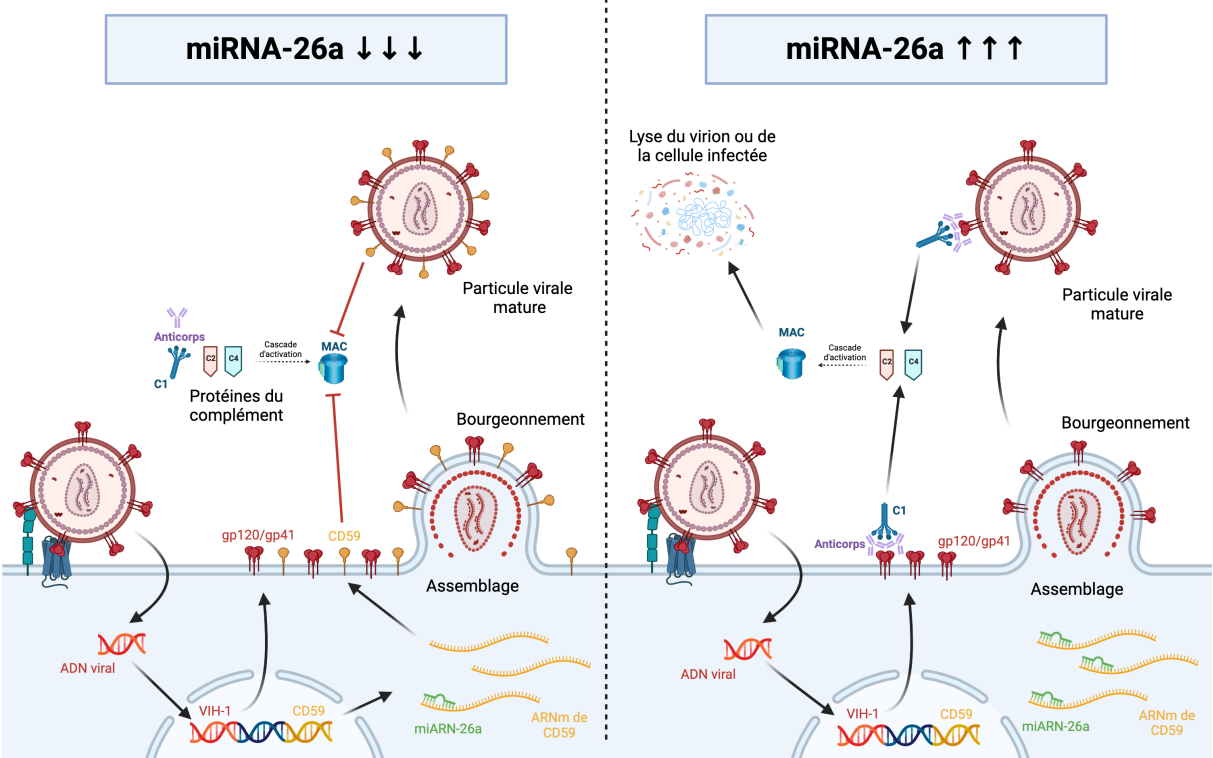
**Objectif et hypothèse** : L'objectif de cette étude était d'identifier et caractériser fonctionnellement de nouveaux miARN jouant un rôle régulateur prépondérant au cours de l'infection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par le VIH-1. Dans un deuxième temps, l'objectif était de caractériser fonctionnellement le miARN-26a afin d'étudier son impact sur la lyse médiée par le complément au cours de l'infection par le VIH-1.

**Statut de l'article** : Cet article sera soumis prochainement dans la revue *mBio*. Bien que toutes les expériences soient complétées, la version présentée dans cette thèse n'est pas la version définitive.

**Contribution détaillée de chacun des auteurs** : Ma contribution personnelle à cet article est de 70%. J'ai réalisé et participé à toutes les expériences présentées dans cet article. J'ai également effectué toutes les analyses de données, réalisé toutes les figures et j'ai participé à la majorité de l'écriture des versions initiales du manuscrit. Chengyu Ye a réalisé les constructions nécessaires à l'expérience MiR-report (Figure 4C) et a participé à l'expérience du MiR-report (Figure 4D). Oluwaseun Ajibola et Thomas T. Murooka ont conçu et fourni la construction virale bi-cistronique de

dernière génération. Tram Pham a contribué à la conception des expériences. Robert Lodge a participé l'analyse des données ainsi que l'écriture de l'article. Éric A. Cohen a supervisé chaque étape de cette étude, a participé à l'écriture du manuscrit.

Résumé graphique :





**Downregulation of miRNA-26a by HIV-1 enhances CD59 expression and packaging impacting virus susceptibility to antibody-dependent complement-mediated lysis**

Nicolas Bellini<sup>a,b</sup>, Chengyu Ye<sup>a,c</sup>, Oluwaseun Ajibola<sup>d</sup>, Tram N. Q. Pham<sup>a,b</sup>, Thomas T. Murooka<sup>d</sup>, Robert Lodge<sup>a</sup>, and Éric A. Cohen<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Human Retrovirology, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Infectious Diseases, and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>c</sup>Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada

<sup>d</sup>Department of Immunology, Rady Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

#Corresponding author.

Correspondence:

Éric A. Cohen  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec,  
Canada, H2W 1R7  
Tel: 514-987-5804  
Email: [eric.cohen@ircm.qc.ca](mailto:eric.cohen@ircm.qc.ca)

## Article N°3

---

**Abstract:** MicroRNAs (miRNAs) play important roles as effectors of the host response against viruses and notably human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Here, we performed a global RNAseq analyses of the differentially expressed cellular miRNAs and mRNAs in productively infected, bystander and uninfected primary CD4<sup>+</sup> T cells. Profile analyses showed an important differential expression of both miRNAs and mRNAs in productively infected cells when compared to uninfected lymphocytes, which was not the case in bystander cells. We identified miRNA-26a as one of the miRNAs downregulated in productively infected cells. Among the predicted mRNAs that are miRNA-26a targets, we found CD59, an inhibitor of complement-mediated lysis, which is incorporated in HIV-1 virions. Addition of miRNA-26a mimics in CD4<sup>+</sup> T cells resulted in a reduction of CD59 mRNA and surface expression, validating CD59 as a target of miRNA26a. Following HIV-1 infection, CD59 CRISPR/Cas9 knock-out cells and the progeny virions were both more sensitive to antibody-dependent complement-mediated lysis (ADCML). Addition of miRNA-26a mimics on HIV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells results in downregulation of CD59 expression and packaging into released virions, which are linked to enhanced sensitivity to ADCML. These effects were observed using the broadly neutralizing antibody PGT121 and antibodies isolated from the sera of viremic individuals. Finally, miRNA-26a reduction in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells is dependent on HIV-1 integration and expression but is not mediated by any of the HIV-1 accessory proteins. Overall, these results highlight how HIV-1 limits ADCML by downregulating miRNA26a, which regulates CD59 expression and packaging into HIV-1 particles.

**Importance:** HIV-1 has evolved several mechanisms to evade the immune response. CD59 is a protein expressed at the cell surface that inhibits the formation of the membrane attack complex following complement activation. HIV-1 hijacks the function of CD59 to its advantage by integrating the protein into its viral envelope during the budding process. This allows newly infectious viral particles to be better protected from complement-mediated lysis. Here, we identified a regulatory RNA, miRNA-26a, that targets CD59 mRNA and reduces its expression and packaging

during the infection of CD4<sup>+</sup> T cells, leading to increased sensitivity of viruses to complement-mediated lysis. Our results highlight a new mean by which HIV-1 evades host antiviral responses by modulating host miRNA expression.

## **Introduction**

The identification of host and viral determinants that govern human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission and infection is critical for the development of effective targeted prevention approaches. Following transmission and infection by a transmitter founder (T/F) virus, a humoral response is rapidly established (1). Antibodies specific to HIV-1 envelope glycoproteins (Env, gp120 and gp41) are detected in the blood of people living with HIV-1 within the first few weeks (2) but are not neutralizing although they may still bind to surface Env glycoproteins (3). Neutralizing antibodies specific for the T/F virus then promptly emerge but these autologous neutralizing antibodies rapidly select virus-escape mutants, which in turn induce new antibody specificities (4). These neutralizing antibodies recognize a relatively narrow spectrum of viral epitopes, as they target highly variable regions of the Env glycoprotein (5, 6). The ensuing antibody-virus "arms race" leads after years of infection to the induction of broadly neutralizing antibodies (bnAb) in only 10-25% of chronically-infected individuals which, in contrast to other neutralizing antibodies, target highly conserved Env regions and have higher and broader neutralizing potency (7). While the host humoral response exerts an immune pressure directly on replicating viruses, the binding of antibodies to epitopes on Env glycoproteins can also lead to activation of the classical complement pathway, a process that results in lysis of infected cells and virions (8). HIV-1 can also activate complement in the absence of antibodies through direct interactions between Env glycoproteins and components of the complement (9).

Complement can be activated by three canonical mechanisms, described as classical, alternative and lectin pathways (10). Ultimately, all three pathways lead to the formation of the membrane attack complex (MAC) as well as the formation of anaphylatoxins, which contribute to inflammation by attracting leukocytes to the site of infection (11). Among the complement regulatory proteins that are present at the

surface of human cells is CD59, a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked cellular receptor, which prevents the polymerization of component 9 (C9) and thus inhibits the formation of MAC (12, 13). Interestingly, HIV-1 has been shown to incorporate CD59 and other complement regulatory proteins into its viral envelope, a condition that confers protection against complement-mediated lysis (14). While antibody-dependent mediated complement activity directed against HIV-1 virions is detected during acute infection (15, 16), it remains unclear whether HIV-1 has evolved to limit this host antiviral response.

MicroRNAs (miRNAs) are small single-stranded non-coding RNA molecules (containing about 22 nucleotides) found in plants, mammals, and even viruses. They are involved in post-transcriptional regulation of gene expression and RNA silencing (17). MiRNAs work by base pairing with complementary sequences in the target mRNA, primarily in the 3' untranslated region (UTR). As a result, the targeted mRNA is silenced by one or more mechanisms, including mRNA cleavage and mRNA translation blockage by ribosomes (18). MiRNAs have been shown to play a key role during HIV-1 infection by regulating host factors that govern the susceptibility of target cells to viral infection (19). For instance, miRNAs can modulate HIV-1 entry into host target cells. Indeed, upregulation of miRNAs-221/222 inhibits HIV-1 infection by downregulating CD4, the virus primary receptor, in lymphocytes as well as in monocyte-derived macrophages (MDMs) (20, 21). More recently, we provided evidence that the p53-regulated miRNA-103 participates in the modulation of CCR5 during the different stages of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation (22) as well as in macrophages (23), playing a key role in the process of HIV-1 entry into these cells. MiRNAs can also regulate HIV-1 infection at post-entry steps as shown for miRNA-181, which targets the restriction factor SAMHD1 in monocytes; SAMHD1 is a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcription by virtue of its ability to strongly reduce the pool of cellular deoxynucleoside triphosphates (24). This is also the case of MiRNA-155 (which targets TRIM32, an E3 ubiquitin ligase that activates NF- $\kappa$ B) thus promoting HIV-1 latency (25). In the context of HIV-1 infection, a large number of host factor-targeting miRNAs identified so far are upregulated and limit viral replication by downregulating the expression of HIV-1-dependency factors.

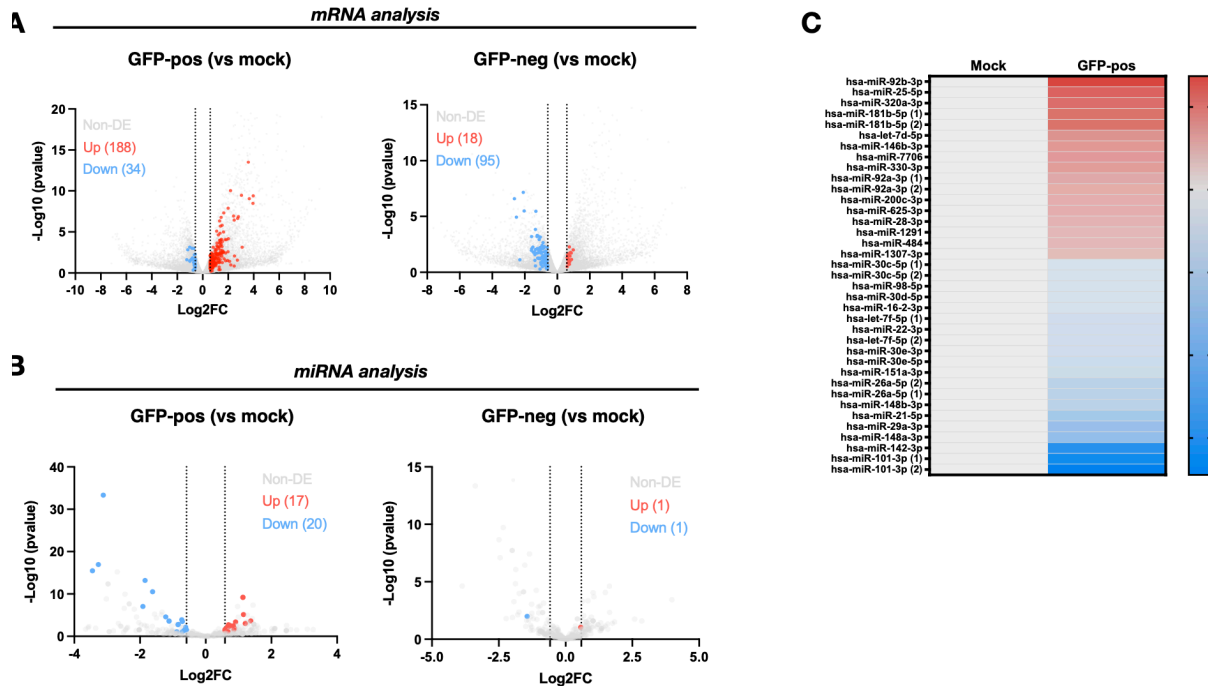
In this study, we performed a global transcriptomic analysis of productively infected and bystander CD4<sup>+</sup> T cells and compared their miRNA and mRNA profiles with uninfected cells. Among the miRNAs analyzed, we show that miRNA-26a is downregulated in productively infected cells and further identify the MAC regulatory CD59 factor as a target of this miRNA. Accordingly, we document that enhanced expression of miRNA-26a in HIV-1 infected cells reduces CD59 expression and packaging into HIV-1 virions, a condition that impacts their susceptibility to antibody-dependent complement-mediated lysis. These results underscore the role of miRNA-26a in regulating CD59 expression in CD4<sup>+</sup> T cells and highlight how the modulation of miRNA-26a may affect HIV-1 susceptibility to antibody-dependent complement-mediated lysis by regulating the extent of CD59 packaging in HIV-1 virions.

## **Results**

### *HIV-1 modulates the miRNA expression profile during infection of CD4<sup>+</sup> T cells*

In order to identify miRNAs and mRNAs that are modulated upon HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 3 distinct blood donors and infected for 48 hours with green fluorescent protein (GFP)-marked HIV-1 (CCR5-tropic NL4.3-ADA-GFP). Productively infected cells (GFP-positive) or bystander cells (GFP-negative) were then sorted (**Figure S1A**) and total RNAs extracted. RNAs from uninfected CD4<sup>+</sup> T cells were also included as control. To verify the extent of HIV-1 expression in the sorted populations, we performed qPCR using primers specific for *tat* and *rev* to measure multiply spliced (ms) HIV-1 mRNAs (msRNA). The detection of these msRNA products in cells provided a measure of viral mRNA expression, as these products are not found in virions that could be associated to cells. As expected, we detected significant amounts of HIV-1 msRNA in productively infected cells (p=0.0022) as compared to the uninfected control, validating that these cells are productively infected. Interestingly, bystander cells displayed a three order of magnitude decrease in the levels of viral msRNA detected suggesting that a subpopulation of GFP-negative cells might be infected without however expressing viral proteins as this cell population

was GFP- negative (**Figure S1B**). Next, we defined the miRNA and mRNA expression profiles in uninfected, GFP-negative and GFP-positive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by next-generation RNAseq (**Figure 1**). MiRNAs or mRNAs with a log<sub>2</sub> fold change (Fc) of >0.585 (Fc= ~1.5) and a computed (using DeSeq2) base mean >100 were deemed upregulated whereas those with a log<sub>2</sub>Fc <-0.585 were considered downregulated. Furthermore, mRNAs that were either upmodulated or downmodulated in both GFP-positive and GFP-negative populations were excluded. GFP-negative cells displayed a distinct profile of cellular mRNAs as compared to uninfected cells, with 18 mRNAs upregulated and 95 downregulated (**Figure 1 and Figure S2**). The difference in mRNA profile in GFP-positive cells relative to the uninfected control was more pronounced, with 188 upregulated and 34 downregulated genes (**Figure 1A and Figure S3**). Interestingly, while the comparison of miRNAseq between GFP-negative and uninfected cells did not reveal significant differences, comparing the miRNAseq profiles of the GFP-positive cells with that of uninfected cells identified 16 upregulated and 20 downregulated miRNAs (**Figure 1B**), indicating that productive infection of cells impacted the cellular miRNA expression profile. Our analyses identified several miRNAs whose expression is modulated upon HIV-1 infection (**Figure 1C**). For instance, as reported previously, miRNA-181, a miRNA which is known to target the restriction factor SAMHD1, was found to be upregulated in productively infected cells (24). Similarly, miRNA-25, a miRNA that we recently found to target peroxisomes components (26) as well as the E3 ubiquitin ligase MARCH1 (27) was similarly increased in infected CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast, we found that some miRNAs, such as miRNA-16, were downregulated in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells (**Figure 1C**). MiRNA-16 was previously reported to target Pur- $\alpha$ , a DNA and RNA binding protein that promotes Tat-induced transactivation (28). Only one upregulated (miRNA-27a) and one downregulated (miRNA-3609) miRNAs were identified in GFP-negative cells as compared to uninfected lymphocytes (**Figure 1B**). Considering the small number of differentially regulated miRNAs identified in the bystander cells versus the uninfected, only differentially regulated miRNAs found in GFP-positive compared to uninfected cells were selected for further analysis (**Figure 1C**).



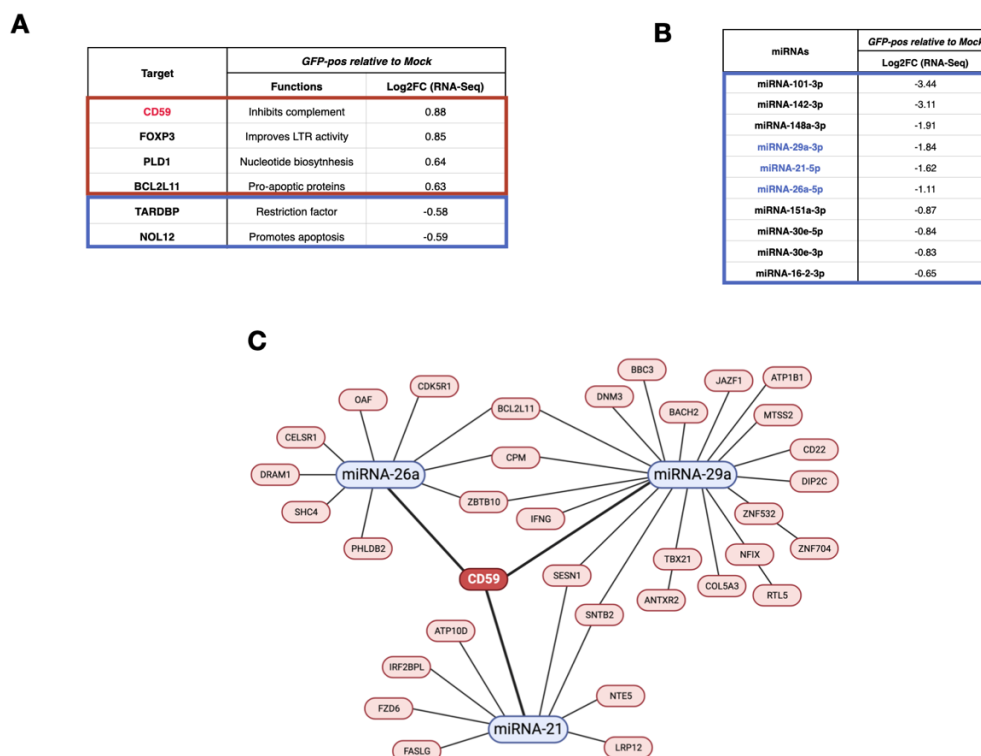
**Figure 1 - RNA-seq mRNA and miRNA profiles in productively infected and bystander CD4<sup>+</sup> T-cells compared to uninfected cells.**

(A and B) Volcano plots representing differential expression (fc= fold change) of mRNAs (A) or miRNAs (B) in productively infected (GFP-positive, GFP-pos) or bystander (GFP-negative, GFP-neg) CD4<sup>+</sup> T-cells as compared to uninfected cells (Mock). MiRNAs or mRNAs with a log2Fc of >0.585 and a DeSeq2 base mean >100 are in red, while those with a log2Fc <-0.585 are in blue. Non-differentially expressed (non-DE) are in grey. (C) The heatmap depicts the 37 miRNAs specifically dysregulated in the GFP-pos population detected in this study. The scale bar is in log2(Fc). MiRNAs with forms 1 and 2 are identical miRNAs produced by two distinct loci. See also **Figures S1-S3**.

### *Analyses of mRNA and miRNA profiles in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells link CD59 upregulation to a decrease of specific targeting miRNAs*

Among the 34 genes which mRNA levels were downregulated in GFP-positive compared to uninfected cells, we identified genes relevant to HIV-1 infection based on the reported literature (**Figure 2A**). For example, Transactive Response DNA-binding protein (*TARDBP*) encodes a protein that regulates cell permissivity to HIV-1 infection by positively acting on the processing of histone deacetylase 6 (HDAC6) transcripts, which is a negative regulator of HIV-1 restriction by APOBEC3G, among others (29) (log2fc = -0.58). *NOL12* encodes for a RNA binding protein which plays an important role in repairing DNA damage pathways and maintaining genome integrity, although its effect on HIV-1 infection remains unclear (30) (log2fc = -0.59). On the other hand, among the 188 genes which mRNA levels were upregulated in GFP-

positive compared to uninfected cells, we also identified HIV-1 infection relevant cellular genes. For example, *BCL2L11* (or *BIM*), encodes for a regulator of Bcl2, involved in pro-apoptotic signaling in HIV-1 infection (31) ( $\log_2\text{fc} = 0.63$ ); *PLD1*, which encodes for Phospholipase D1, an enzyme that links T cell activation signals to increased cell permissivity to HIV-1 infection (32) ( $\log_2\text{fc} = 0.64$ ), and *FOXP3*, encodes for a marker of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (33) ( $\log_2\text{fc} = 0.85$ ) are all upregulated in GFP-positive cells (**Figure 2A**). Another upregulated gene was *CD59* (**Figure 2A**), which encodes for a GPI-linked protein that has a key role in regulating complement activation (12, 13), was also significantly upregulated in GFP-positive cells ( $\log_2\text{fc} = 0.88$ ). In order to assess whether the upregulation of CD59 mRNA was linked to the downregulation of specific miRNAs, we first identified the miRNAs that were the most downregulated in GFP-positive cells (**Figure 2B**). Analysis using online databases (mirDIP, <http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), singled out three potential miRNAs that could target CD59 mRNA (**Figure 2B and 2C**): miRNA-21 ( $\log_2\text{fc} = -1.62$ ), miRNA-26a ( $\log_2\text{fc} = -1.11$ ) and miRNA-29a ( $\log_2\text{fc} = -1.84$ ).



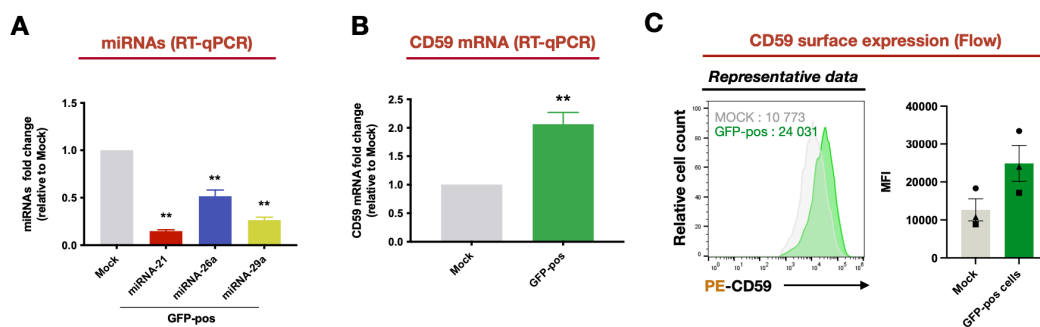
**Figure 2 - CD59 is predicted to be regulated in productively infected cells by three miRNAs.**

(A) Example of genes that are dysregulated in GFP-positive (GFP-pos) cells compared to uninfected cells (Mock) and that are relevant in the context of HIV-1 infection based on current literature. The Fc values indicated correspond to the values obtained following



RNA-seq. (B) Shown are the 10 most downregulated miRNAs in GFP-pos cells compared to Mock, ranked from most to least decreased. The Fc values indicated correspond to the values obtained following RNA-seq. (C) MiRNAs-21, -26a and 29a potentially target many dysregulated genes in GFP-pos cells, including CD59. Cross-referencing of miRNA and transcriptomic RNA data was performed using online databases (mirDIP, <http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>).

Further validation of the miRNA-seq data using real-time qPCR revealed that miRNAs-21, -26a and -29a are indeed decreased in productively HIV-1-infected primary CD4<sup>+</sup> T cells as compared to uninfected cells (~ 6-, 2- and 4-fold less,  $p=0.0003$ ,  $p=0.0484$ ,  $p=0.0020$ , respectively) (**Figure 3A**). We also validated the mRNA-seq data and found that CD59 mRNA levels are increased in GFP-positive relative to uninfected primary CD4<sup>+</sup> T cells (FC=2.1-fold,  $p$ value = 0.0022) (**Figure 3B**). Furthermore, flow cytometry analyses indicated that HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressed 1.5-2.0 times more CD59 protein at their cell surface as compared to uninfected cells (**Figure 3C**). Taken together, these results indicate that HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells induces an upregulation of CD59 at the mRNA and cell-surface protein levels and this condition appears to be linked to a downregulation of miRNAs, namely miRNA-21, -26a and 29a, predicted to target CD59.



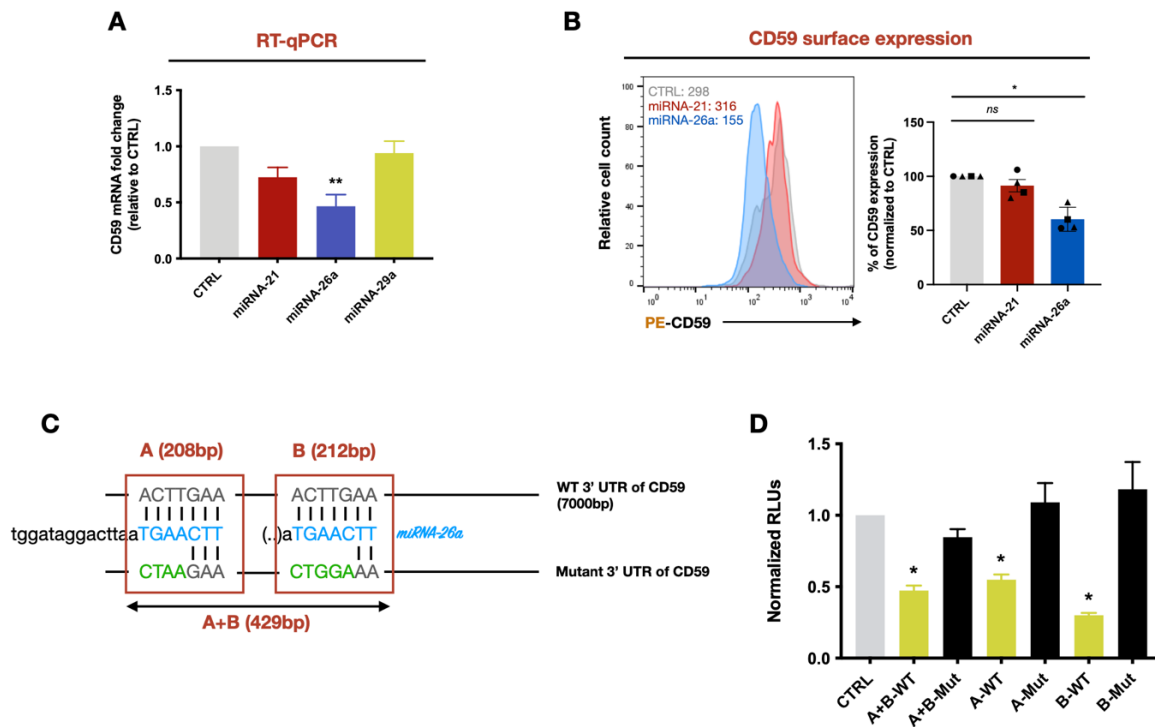
**Figure 3 - The downregulation of miRNA-21, miRNA-26a and miRNA-29a are linked to an upregulation of CD59 expression levels in productively infected cells.**

(A) MiRNA-21, -26a and -29a levels in uninfected (Mock) and productively infected (GFP-pos) CD4<sup>+</sup> T cells ( $n = 6$ ) were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to uninfected cells (in gray, which is set at 1). Error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values:  $**p < 0.01$ . (B) CD59 mRNA levels in uninfected (Mock) and productively infected (GFP-pos) CD4<sup>+</sup> T cells ( $n = 6$ ) were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold change compared to uninfected cells (in gray, which is set at 1). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values:  $**p < 0.01$ . (C) Cell-surface CD59 expression was evaluated by flow cytometry and the mean fluorescent intensity (MFI) was compared between uninfected (Mock) and infected CD4<sup>+</sup> T cells (GFP-positive) obtained from healthy blood donors. Error bars represent SEM ( $n=3$ ).

### *CD59 is a target of miRNA-26a*

To evaluate the impact of these miRNAs on the levels of CD59 mRNA and surface protein expression levels, we nucleofected miRNA-21, -26a and -29a mimics into CD4<sup>+</sup> T cells obtained from the PBMCs of healthy blood donors. Transfection of miRNA-26a mimics significantly decreased CD59 mRNA levels after 48h of culture (~ 2-fold less,  $p = 0.0065$ ) and CD59 surface expression following 96h of culture (approximately 50%,  $p = 0.0285$ ) when compared to controls (**Figure 4A and 4B**). Neither miRNA-21 nor miRNA-29a mimics had a significant effect on CD59 mRNA. Consistent with the previous qPCR mRNA results, we confirmed that miRNA-21 mimics had no effect on CD59 surface expression levels (**Figures 4A, 4B**). These results suggest that CD59 can be targeted by miRNA-26a but not by miRNA-21 and -29a in CD4<sup>+</sup> T cells.

An online database (TargetScanHuman: [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) analysis predicted that the 3'UTR of CD59 mRNA could be targeted by miRNA-26a at two potential sites (**Figure 4C**). In order to validate these sites as targets of miRNA-26a, we transiently expressed a construct encoding the Firefly Luciferase (F-Luc) gene fused to a 429 base pair fragment of the 3'UTR encompassing the two potential target sites (A+B-WT) in HEK293T cells. These cells were also co-transfected with miRNA-26a or control mimics. F-Luc activity in the cell lysates (was significantly reduced in cells transfected with miRNA-26a mimics (~ 2-fold less,  $p=0.0338$ ) when compared to control (**Figure 4D**). Furthermore, mutations in the CD59 3'UTR sequences predicted to be targeted by miRNA-26a (**Figure 4C**, A+B-Mut) prevented the silencing effect on F-Luc (**Figure 4D**). We also tested in this system two different CD59 3'UTR fragments (A and B) (**Figure 4C**), each containing one of the two single individual sites targeted by miRNA-26a and found that both sites are functional and independent (**Figure 4D**). Altogether, these data further validate that miRNA-26a can regulate CD59 expression levels by targeting two specific sites complementary to the miRNA-26a seed sequence located in the 3'UTR of CD59 mRNA.



**Figure 4 - CD59 is a target of miRNA-26a.**

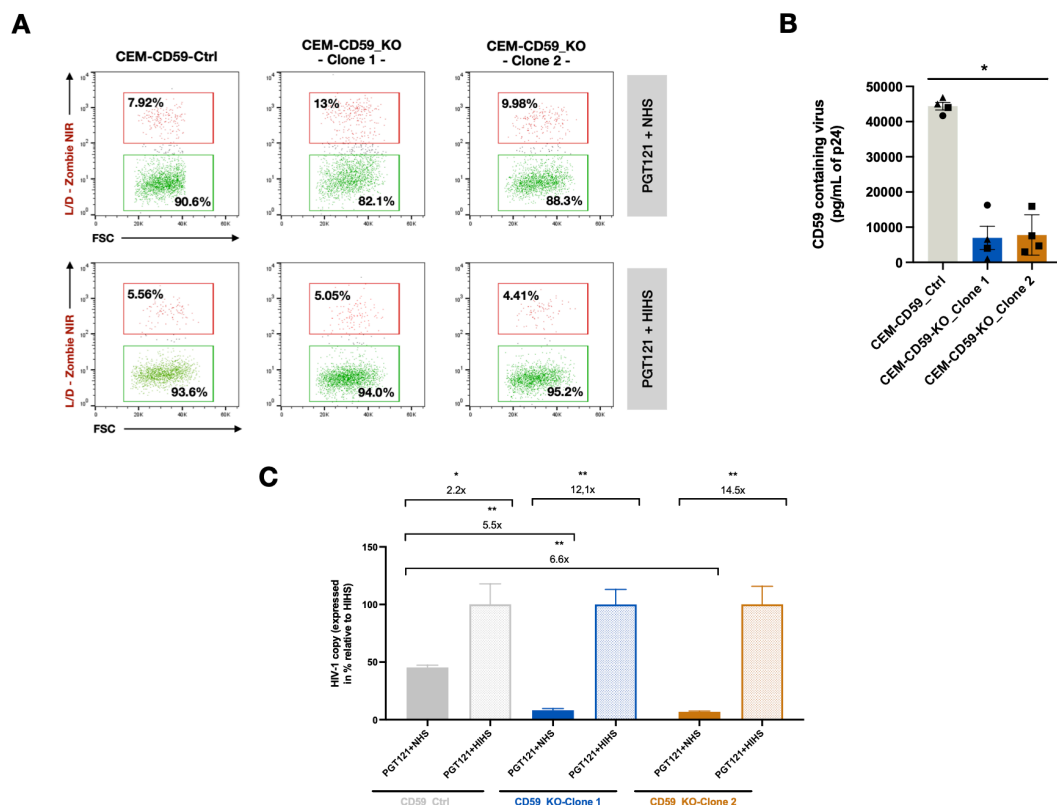
(A) CD59 mRNA levels were measured in miRNA-21, -26a and -29a mimics or control-nucleofected primary CD4<sup>+</sup> T cells by real-time qPCR. Shown is the mean fold change compared to control transfected cells (in gray, which is set at 1) (n = 4). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\* $p < 0.01$ . (B) CD59 surface expression was evaluated in miRNA-21, -26a mimics or control-nucleofected primary CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry. Shown is the cell surface expression of CD59 from CD4<sup>+</sup> T cells of four blood donors (normalized to CTRL which was set at 100%) with a representative result on the left (MFI are shown). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \* $p < 0.05$ . (C) The MiR-Report system was used to validate whether the CD59 3'UTR was a target of miRNA-26a. MiRNA blue nucleotides represent those predicted to interact with the CD59 3'UTR. WT or mutated (substituted nucleotides in green) fragments of the 3'UTR encompassing the predicted sequences recognized by miRNA-26a were fused to the F-Luciferase (F-Luc) gene. (D) HEK293T cells were transfected with miRNA-26 mimics, the reporter plasmids with the indicated fragment of the WT (in yellow) or mutated (in black) 3' UTR, and a Renilla-Luciferase (R-Luc) normalizing control. Cells were lysed, relative light units (RLUs) were measured, and F-Luc normalized to negative control (in grey, which is set at 1). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \* $p < 0.05$ .

### *CD59 affects the susceptibility of HIV-1 to antibody-dependent complement-mediated lysis*

Given the critical regulatory function of CD59 in complement-mediated lysis and the fact that its expression is upregulated during productive HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte, we examined the impact of CD59 expression modulation on the

susceptibility of HIV-1-infected cells and released virions to antibody-dependent complement-mediated lysis. To this end, we took advantage of a T lymphoblast CEM-CCR5 cell line (34) as a model for the regulation of CD59 by miRNA-26a. Indeed, upon infection of this cell line with HIV-1, we could observe a downregulation of miRNA-26a expression (~ 2-fold less,  $p=0.0286$ ) and a concomitant upregulation of CD59 mRNA (3.5-fold,  $p=0.0079$ ) and surface protein levels (**Figure S4A**). We thus generated two CD59\_knock-out (KO) clones of the CEM-CCR5 cell line (CEM-CD59\_KO\_clone 1 and CEM-CD59\_KO\_clone 2) by the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9 technique, as well as a CEM-CD59\_control cell line in which the CRISPR/Cas9 guide sequence was absent as described in Methods. As shown in **Figure S4B**, both CEM-CD59\_KO clones exhibited a marked reduction of total as well as surface CD59 expression as compared to the control cell line (Mean fluorescent intensity (MFI) of surface CD59 = 132 for the CEM-CD59\_control vs ~10 for the CEM-CD59\_KO cell lines; MFI for total CD59 = 275 for the CEM-CD59\_control vs ~33 for the CEM-CD59\_KO cell lines). Neither cell proliferation, nor CD4/CCR5 HIV-1 receptor levels, were affected by knocking-out CD59 in the CEM-CCR5 cell line (**Figure S4C**). Using these cell lines, we first tested the impact of knocking-out CD59 on the susceptibility of HIV-1 infected cells to complement-mediated lysis. We used PGT121, a broadly neutralizing antibody (BnAb) that targets a V3-glycan-dependent site on HIV-1 gp120 (35), as a model antibody in this system. HIV-1-infected control or infected CEM-CD59\_KO cells were exposed to PGT121 in the presence of normal human serum (NHS), as a source of active complement, or in the presence of heat-inactivated human serum (HIHS) as control. The percentage of dead cells in the GFP-positive cells (based on Zombie NIR fluorescence) was measured by flow cytometry (**Figure 5A, higher panels**). In the presence of NHS, infected CEM-CD59\_KO cells were more susceptible to antibody-dependent-complement-mediated lysis (ADCML) as compared to the CEM-CD59\_control cells. This increased susceptibility of CEM-CD59\_KO cells to ADCML was abolished in conditions using HIHS (**Figure 5A, lower panels**).

Knowing that CD59 is packaged into HIV-1 virions likely as a mean to protect viral particles from ADCML (14), we characterized the impact of CD59 packaging into released virions or the lack thereof on their susceptibility to lysis. Using a virion capture-assay allowing for the detection of CD59-containing virions, we confirmed that infected CEM-CD59\_KO cell lines produced virions with significantly reduced CD59 levels, as compared to viral particles produced from their control cell line counterpart (~6.5-fold less,  $p=0.285$  for clone 1; ~5-fold less,  $p=0.0482$  for clone 2) (**Figure 5B**). These results are consistent with the difference in the degree of CD59 expression observed at the cell surface of the CEM-CD59\_KO and CEM-CD59\_control cell lines (**Figure S4B**). HIV-1 virions released from CEM-CD59\_KO and CEM-CD59\_control cells were treated with PGT121 and either NHS or HIHS. RNA released from lysed virions was then digested by RNase treatment, and viral RNA from the remaining complement-mediated lysis resistant intact virions was extracted and quantified by real-time PCR. As shown in **Figure 5C**, viruses produced from the CEM-CD59\_KO cell lines were much more sensitive to ADCML (NHS conditions) than those produced from the control cell line (5.5-fold for clone 1 and 6.6-fold for clone 2,  $p=0.0022$ ), confirming that packaging of CD59 into HIV-1 virions protects viruses from ADCML.



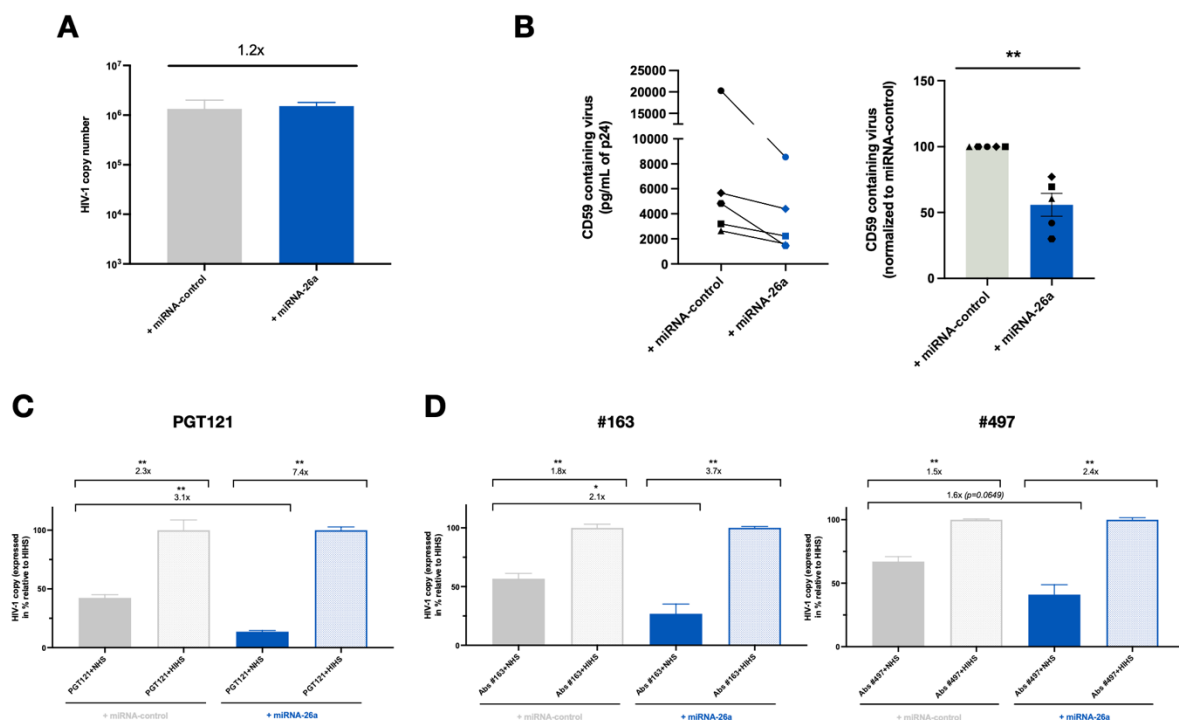
**Figure 5 - Reduction of CD59 expression in HIV-1 infected cells and decreased packaging of CD59 in released virions enhance their susceptibility to ADCML.**

(A) The level of dead cells in GFP-positive populations was measured by flow cytometry and compared between CEM-CD59\_Control or CEM-CD59\_KO cells exposed to the indicated conditions (PGT121 BnAb + normal human serum (NHS) and PGT121 BnAb + heat-inactivated human serum (HIHS)). Shown are data for one representative experiment (n=2). (B) Detection of CD59 incorporation in virions produced from HIV-1-infected CEM-CD59\_control or CEM-CD59\_KO cells by Ab capture assay. Data shown indicate the mean levels of CD59-containing virus as measured by p24 ELISA (pg/mL) following lysis of anti-CD59 bead-associated virus (background capture with the isotypic control has been removed). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \* $p < 0.05$ . (C) Shown are the normalized total HIV-1 of PGT121-treated viruses (with either NHS or HIHS) from CEM-CD59\_control or CEM-CD59\_KO infected cells measured by real-time qPCR, following reverse transcription of viral RNA. Values are normalized relative to the mean HIHS condition, which is set at 100%). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \*\* $p < 0.01$ . **See also Figure S4.**

*Enhanced expression of miRNA-26a promotes ADCML of HIV-1 by reducing CD59 packaging into released virions*

To specifically examine the impact of miRNA-26a expression during HIV-1 infection, we nucleofected primary CD4<sup>+</sup> T cells with miRNA-26a or control mimics and infected them with HIV-1. **Figure 6A** shows that transfection of miRNA-26a mimics does not interfere with viral replication as virus production was comparable between miRNA-26a and control mimics-treated cells. Using the virion capture-assay described above, we also confirmed that cells treated with the miRNA-26a mimics produced approximately 50% less CD59-containing virions than their control-treated counterparts (~2-fold less,  $p=0.0079$ ), suggesting that downregulation of CD59 expression by miRNA-26a leads to a reduction of the protein packaging into released virions (**Figure 6B**). Importantly, viruses produced from miRNA-26a mimic-treated cells displayed an enhanced susceptibility to PGT-121-dependent complement lysis (NHS conditions) as compared to the control (3.1-fold,  $p=0.0022$ ) (**Figure 6C**). These results suggest that a 50% modulation in CD59 expression and incorporation levels into released virus particles is sufficient to effectively affect their sensitivity to ADCML (**Figures 4A-B and 6B**). To further validate the result that we obtained with PGT121, we repeated these experiments using purified antibodies (Ab) from sera of viremic individuals (#163 and #497). We first confirmed that exposure of virus to purified Ab alone did not induce lysis of virions (**Figure S5A**). Viruses produced by cells treated

with miRNA-26a mimics displayed an enhanced susceptibility to ADCML in the presence of Ab from sera #163 (2.1-fold,  $p=0.0260$ ) or #497 (1.6-fold,  $p=0.0649$ ) as compared to controls (**Figure 6D**). The results obtained with Ab from serum #163 were further validated using virus produced during infection of CEM-CD59 KO\_clone 1 (**Figure S4B**); in this context, virus produced displayed a 4.4-fold increased susceptibility to ADCML compared to control (**Figure S5B**). Taken together, these results show that modulation of CD59 expression and packaging during infection of  $CD4^+$  T cells is regulated by miRNA-26a, a condition that affects the susceptibility of released virions to ADCML. Based on these results, we infer that downregulation of miRNA-26a by HIV-1 is likely a mean to render infected cells and released virions more resistant to ADCML through optimal CD59 expression and packaging into virions.



**Figure 6 - Enhanced expression of miRNA-26a during HIV-1 infection renders released virions more susceptible to ADCML.**

(A) Primary  $CD4^+$  T cells were nucleofected with miRNA-26a or a miRNA-control mimics for 72h and infected with HIV-1 for 48h ( $n=3$ ). Data shown are the total HIV-1 (as RNA copy numbers of HIV-1) from infected cells as measured by real-time qPCR, following reverse transcription of viral RNA. Error bars represent SEM. (B) Detection and quantification of CD59-containing virus particles by Ab capture assay of virions produced by infected cells transfected with miRNA-26a or negative control mimics. The left panel indicates the mean level of CD59-containing virus as determined by p24 ELISA (pg/mL) after lysis of virus captured with CD59-antibody-conjugated beads (the capture assay

background obtained with isotype control was removed). The right panel indicates the mean level of CD59-containing virus normalized to the value obtained with the control mimic condition (set at 100%). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values:  $**p < 0.01$ . (C) Shown are the normalized total HIV-1 of PGT121-treated viruses from infected cells transfected with miRNA-26a or negative control mimics measured by real-time qPCR, following reverse transcription of viral RNA. Values are normalized relative to the mean of those obtained with HIHS-treated viruses, which were set at 100%. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values:  $**p < 0.01$ . (D) Shown are the normalized total HIV-1 of Ab-treated viruses from infected cells transfected with miRNA-26a or negative control mimics measured by real-time qPCR, following reverse transcription of viral RNA. Values are normalized relative to the mean of those obtained with HIHS-treated viruses, which were set at 100%. Antibodies were purified from sera of infected individuals #163 (left panel) or #497 (right panel). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values:  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ . **See also Figure S5.**

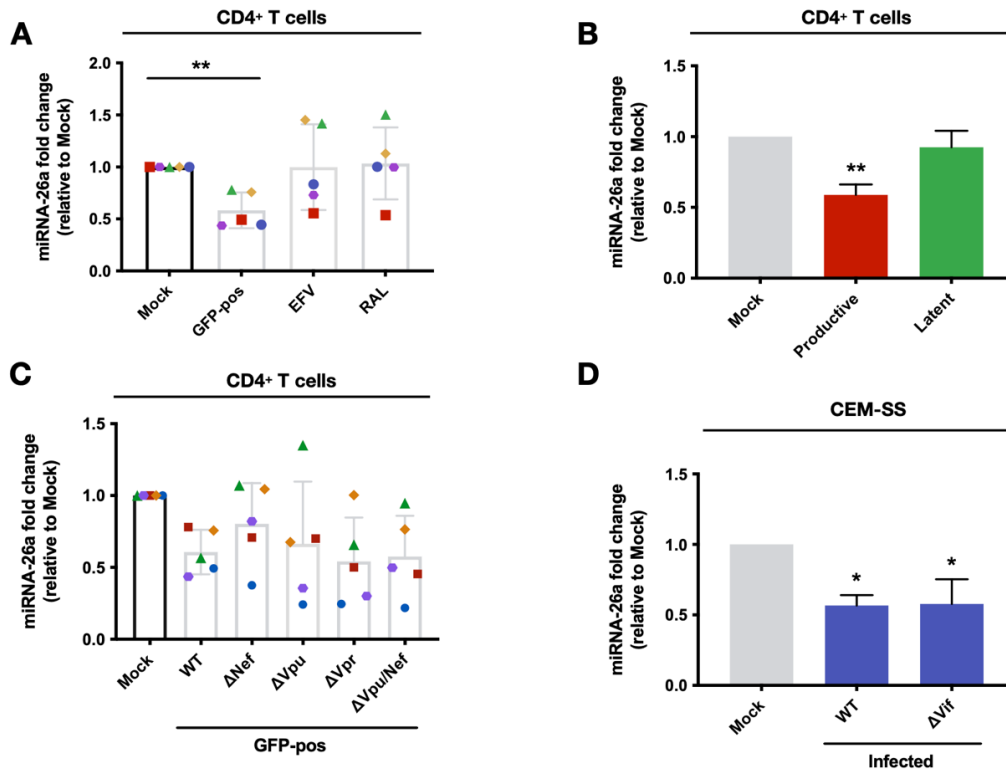
### *The downregulation of miRNA-26a during HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is contingent on viral DNA integration and expression*

We next analyzed the viral determinants that contribute to the downregulation of miRNA-26a expression in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes during HIV-1 infection. In order to define the step of the infection cycle which is important for miRNA-26a expression downregulation, we pretreated cells with either the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, efavirenz (EFV), or the HIV-1 integrase inhibitor, raltegravir (RAL), prior to their infection with HIV-1. As shown in **Figure 7A**, we observed a downregulation of miRNA-26a in GFP-positive sorted cells. However, we did not find this downregulation in cells treated with EFV or RAL, suggesting that integration of proviral DNA into the genome of target cells is a necessary step for miRNA-26a downregulation. Importantly, it is necessary to sort GFP-positive cells in order to detect the modulation of miRNA-26a because of the low infection efficiency in primary CD4<sup>+</sup> T cells. Given EFV and RAL treatments do not lead to productive infection, it is not possible to sort these cells, making it difficult to truly assess miRNA-26a modulation. In order to circumvent this difficulty, we used a fully replicative dual reporter virus system, which is very similar to a single-cycle dual reporter virus system that we previously described and characterized (22, 36). This fully infectious and replicative reporter virus system enables to distinguish cells harboring a transcriptionally-inactive provirus from cells that contain transcriptionally-active integrated provirus. Indeed, we show that following activation of infected cells with TNF-alpha, the frequency of



transcriptionally-inactive infected cells (ZS-green positive; latent) was reduced and a concomitant increase in the frequency of infected cells with transcriptionally-active integrated provirus (E2-crimson positive; productive) was detected (**Figure S6A**). Additionally, productively infected cells, which are predicted to express Nef and Vpu, were found to display, as expected, a downregulation of the CD4 receptor, a condition not observed in uninfected or latently infected cells (**Figure S6B**).

Analysis of miRNA expression in the different isolated populations of infected lymphocytes revealed a decrease in the miRNA-26a expression levels in productively infected cells (~1.7-fold less,  $p=0.0015$ ) but not in latently infected cells (**Figure 7B**). These results suggest that HIV-1 gene expression is necessary for the downregulation of miRNA-26a during infection. Given that HIV-1 accessory proteins, such as Vpu, have been reported to modulate the expression of miRNAs (27), we tested if their expression could impact miRNA-26a levels. To this end, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were infected with well-established and -characterized GFP-marked HIV-1 that are isogenic except for the expression of Nef, Vpu or Vpr (37-39). As shown in **Figure 7C**, expression levels of miRNA-26 were downregulated in cells infected with the different mutant HIV-1 viruses to comparable extent than in cells infected with WT HIV-1, suggesting that reduction of miRNA-26a expression during HIV-1 infection appears independent of Vpr, Vpu or Nef expression. Given the important role of the Vif accessory protein in counteracting the potent restriction mediated by APOBEC3F/G on HIV-1 reverse transcription (40), we evaluated the effect of Vif on miRNA-26a expression in the CEM-SS cell line, which does not express APOBEC3F/G and is permissive to infection by Vif-defective viruses (41). MiRNA-26a expression was found to be downregulated to the same extent in CEM-SS cells infected with WT virus (~1.8-fold less,  $p=0.0500$ ) or Vif-deficient virus (~1.8-fold less,  $p=0.0500$ ), suggesting that the reduction of miRNA-26a expression in HIV-1 infected cells is independent from Vif expression (**Figure 7D**). Taken together, our results indicate that while downregulation of miRNA26a during HIV-1 infection appears to require viral gene expression, this regulation does not appear to be dependent on HIV-1 accessory gene expression.



**Figure 7 - Downregulation of MiRNA-26 is contingent on viral DNA integration and expression but does not involve accessory gene expression.**

(A) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were pre-treated with efavirenz (EFV – 10μM) or raltegravir (RAL – 20μM), infected with NL4.3-ADA-GFP (WT) and their total RNA was extracted. MiRNA-26a levels in uninfected, GFP-positive and treated (EFV or RAL) cells were measured by real-time qPCR (n = 5). Shown are the mean fold changes compared to uninfected cells (in black, which is set at 1). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \*\**p* < 0.01. (B) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with the dual reporter HIV Nef-2A-CRIMZs viruses, which allows the distinction between cells harboring LTR-directed active transcription (E2-Crimson-positive and ZsGreen-positive) from cells harboring LTR-directed inactive transcription (E2-Crimson-negative and ZsGreen-positive) cells. The different cell populations were sorted, and their total RNA was extracted. MiRNA-26a expression levels in uninfected, productively, and latently infected CD4<sup>+</sup> T cells were measured by real-time qPCR (n = 6). Shown are the mean fold changes compared to uninfected cells (in gray, which is set at 1). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Kruskal Wallis test, values: \*\**p* < 0.01. (C) Primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with the indicated mutant NL4.3-ADA-GFP viruses and their RNA was extracted 48 hours post-infection. MiRNA-26a expression in uninfected and GFP-positive cells were measured by real-time qPCR (n = 5). Shown are the mean fold changes compared to uninfected cells (in black, which is set at 1). Error bars represent SEM. (D) CEM-SS cells were infected with NL4.3-ADA-GFP (WT) or NL4.3-ADA-GFP (ΔVif) and their RNA extracted 48 hours post-infection. MiRNA-26a expression levels in uninfected and infected cells were measured by real-time qPCR (n = 3). Shown are the mean fold change compared to uninfected cells (in gray, which is set at 1). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann Whitney's test, values: \**p* < 0.05. **See also Figure S6.**

## **Discussion**

In this study, we performed RNA-seq of miRNAs and mRNAs in HIV-1 productively infected CD4<sup>+</sup> T cells, bystander cells, and uninfected cells and further analyzed their expression profiles (**Figure 1**). We took advantage that both next generation sequencing data were provided from the same samples, which originated from distinct populations of sorted cells (GFP-positive and GFP-negative). We found that the productively-infected (GFP-positive) population that upregulated mRNAs corresponded to that with the greatest number of differentially expressed mRNAs. Among these 188 genes (**Figure S3**), we concentrated our analyses on those relevant for HIV-1 infection based on literature search. This search allowed us to identify CD59 as an intriguing candidate that warranted further investigation. CD59 is a protein playing a key role in the complement pathway and is incorporated in budding viruses (14). Furthermore, analyses of the downregulated miRNAs in the GFP-positive cells revealed three potential miRNAs (miRNA-21, -26a and -29a) that regulate CD59, further confirming CD59 as an interesting candidate.

MiRNAs have been shown to play a key role in regulating target cell susceptibility to HIV-1 infection and persistence (19). We thus set out to identify new miRNAs that could have an important role during HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells. Of the three miRNAs that potentially target CD59, we validated that miRNA-26a is the only one that regulates CD59 (**Figure 2**). MiRNA-26a is a member of the miR-26 family, which includes miRNA-26a and miRNA-26b. This family has previously been described to play a role in the regulation of muscle development (42) or glucose metabolism (43), but surprisingly little is known about its role in immune cell functions. Recently, a study showed that the miR-26 family plays a role in the early development and transformation of B lymphocytes, particularly in the differentiation of pre-B cells, although the mechanism behind this phenomenon is not fully elucidated (44). Herein, we report a new function for miRNA-26a in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Indeed, we show that this miRNA targets CD59 mRNA using miRNA-26a mimics in both a F-Luc-reporter assay and nucleofected primary CD4<sup>+</sup> T cells (**Figure 4**). Furthermore, knowing that CD59 is incorporated into the viral envelope, which protects against complement activity, our results suggest an important role of miRNA-26a in regulating

the susceptibility of HIV-1 to complement-mediated lysis (**Figures 5 and 6**). Moreover, packaging of CD59 in other enveloped viruses has also been shown and is not an exclusive property of HIV-1 (45, 46).

MiRNA-26a is decreased in CD4<sup>+</sup> T cells following HIV-1 infection. Our results indicate that the reduction of miRNA-26a requires at least the integration of the virus into the genome of the target cell as well as the expression of HIV-1 genes (**Figure 7**). However, accessory proteins Vif, Vpr, Nef and Vpu are not responsible for this downregulation, although this does not exclude the potential role of other viral proteins such as Tat, Rev, Gag, Gag-pol or the Env glycoproteins. Little is known about the direct regulators of miRNA-26a expression although previous reports have shown a double negative feedback loop between miRNA-26a and the restriction factors EZH2 (47) and E2F7 (48).

HIV-1 is protected from complement-mediated lysis by the incorporation of several complement regulatory proteins into its viral envelope, such as CD46, CD55, and CD59 (13). CD59 controls the formation of the membrane attack complex (MAC) at the terminal stage of the complement activation (common to all three activation pathways) (12), while CD55 prevents the formation of C3 convertases and C5 (49) and CD46 acts as an inactivator of C3b and C4b (50). In this study, we demonstrate that HIV-mediated enhancement of CD59 expression helps protect virions and infected cells from ADCML. The fact that knocking down CD59 by CRISPR-Cas9 in target cells enhanced susceptibility of cells and virions to ADCML further strengthens the role of CD59 in this process. These findings are collectively consistent with results obtained previously with Ab-mediated blockade of CD59 (51, 52). A previous study also shows that glycosylphosphatidylinositol anchor deficiency, which leads to an absence of CD59 at the cell surface, renders produced virions susceptible to complement attack but attenuates the production of infectious HIV-1 (53). Taken together, these results confirm that blocking surface proteins, such as CD59, that protect against complement lysis, could represent a therapeutic approach to eliminate HIV-1. However, it remains to be determined whether abrogation of all three proteins (CD46,

CD55 and CD59) would have a significantly greater effect than the targeting of CD59 alone.

Several HIV-1-specific bNAbs are currently under development as potential tools to treat and prevent HIV-1 infection. The bNAbs (alone or in combination) have been shown to decrease plasma HIV-1 RNA levels in ART-naïve infected participants (54, 55). However, resistance to bNAbs could be observed depending on the situation and the Ab (56, 57). Recently, the PGT121 Ab (a bNAb that targets the V3 loop) was tested in humans infected with HIV-1 in a phase 1 clinical trial (58). Preliminary results show no serious adverse effects associated with a reduction in plasma viremia, suggesting the usefulness of bNAbs as a therapeutic approach to counter HIV-1. Blocking surface proteins that protect against complement lysis could be used in association with a combination of bNAbs that target different region of Env to control viremia. Moreover, this association could be used in combination with latency reversal agents to control the latent reservoir.

The ability to activate complement in response to HIV-1 infection is antibody dependent and epitope specific. Indeed, studies have tested numerous monoclonal antibodies targeting different envelope glycoprotein epitopes, and determined that bNAbs against the glycans of the CD4 binding site (CD4bs) loop and the V3 loop of gp120 are much more effective than non-neutralizing antibodies, or neutralizing antibodies targeting the V1/V2 regions of gp120, the gp41/gp120 interface or the MPER region of gp41 (59, 60). Similarly, Dufloo *et al* show that polyclonal antibodies present in the sera of infected individuals trigger complement activation less effectively than bNAbs (59). These observations are consistent with our results, which show a much greater ADCML on virions exposed to PGT121 as compared to a pool of Ab purified from the sera of viremic individuals, which most likely target diverse epitopes (**Figure 6**). Furthermore, it is likely that the neutralizing power of antibodies present in the patient sera used is less significant than that of bNAbs, which development takes place late in the course of infection and only in certain individuals (7). Given that complement is activated by antibody hexamers assembled on the surface by Fc-Fc interactions (61), it is likely that the orientation of the Fc region as

well as Ab density are critical factors for complement activation by a given bNAb. Indeed, Ab targeting CD4 binding site or the V3 loop can bind up to 3 Fab fragments on an Env trimer, which would promote Fc-Fc interactions (62). Altogether, these points could explain why a more efficient ADCML of virions was observed using PGT121 as compared to Abs purified from infected patient sera and could also explain the variability detected using Ab from the sera of the two viremic individuals (**Figure 6**).

In conclusion, our study identifies miRNA-26a as a post-transcriptional negative regulator of CD59 expression in CD4<sup>+</sup> T cells. Our results show that HIV-1 reduces the level of this miRNA during infection likely via the expression of a viral protein whose identity remains to be identified. We also provide evidence that the addition of exogenous miRNA-26a mimics to infected cells reduces the resistance of HIV-1 to ADCML. This miRNA is yet another example of a miRNA of which modulation of expression allows HIV-1 to escape the host immune response.

## **Methods**

### ***Human subjects***

Peripheral blood samples and leukaphereses were obtained from HIV-1 and HCV seronegative adults (of either sex). All participants had given written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocols approved by the research ethics review board of the Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).

### ***Cells***

Human embryonic kidney (HEK)-293T cells were obtained from ATCC and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS).

CEM.NKR-CCR5 were obtained from the NIH AIDS reagent program (designated as CEM-CCR5 throughout the text) and were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Wisent) supplemented with 10% FBS.

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by negative depletion using the human CD4<sup>+</sup> Isolation Kit II (Miltenyi, #130-096-533) according to manufacturer's instructions. Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FBS. Activated CD4<sup>+</sup> T cells were generated by co-stimulation with 10 µg/mL of anti-CD3 (Biolegend, #300438) and 2 µg/mL of anti-CD28 (Biolegend, #302934) and cultured in the presence of 100U/mL of IL-2 (Peprotech, #200-02-100UG) for 4 days.

### ***Proviral DNA constructs***

The CCR5-tropic NL4.3-ADA-GFP-IRES-NEF proviral construct (named NL4.3-ADA-GFP throughout the text), which encodes all accessory protein, and its isogenic derivatives: Vpr-deficient ( $\Delta$ Vpr), Vpu-deficient ( $\Delta$ Vpu), Nef-deficient ( $\Delta$ Nef), Nef- and Vpu-deficient ( $\Delta$ Nef $\Delta$ Vpu) were previously described (37-39). The Vif-deficient ( $\Delta$ Vif) isogenic derivative was generated by inserting a SpeI (NEB, #R3133L) to Sall (NEB, #R3138L) fragment encompassing a *vif* deletion from the NL-PI*vif*- construct (63) into NL4.3-ADA-GFP.

The E2-Crimson-EF1a-ZsGreen DNA insert was amplified from the Hi.Fate latency plasmid (36) using primers 5'-TGC ACG CGT GGA GGG GGC GGT ATG GAT AGC ACT GAG AAC G-3' and 5'-GCT ACC CGG GTC AGG GCA AGG CGG AGC CGG AGG CG-3' by PCR, and inserted into the R5-tropic 'HIV-GFP' proviral vector (64) using unique restriction enzyme sites XmaI (NEB, #R0180S) and MluI (NEB, #R0198S). The P2A sequence from Porcine Teschovirus-1 (65) was generated using custom oligonucleotides and inserted into the MluI site between the *Nef* and *E2-Crimson* gene locus. The resulting plasmid, termed 'HIV Nef-2A-CRIMZs', was sequenced on both strands before transfection into HEK293T cells.

### ***Virus and infection***

NL4.3-ADA-GFP-derived viruses were generated by co-transfecting the corresponding proviral constructs with pSVCMV-VSV-G (66) (except in the case of viruses used in RNAseq) in 5x10<sup>6</sup> HEK-293T cells using lipofectamine 3000 according to manufacturer's instructions. Virus-containing supernatants were recovered 48h post-transfection, cleared of cells by centrifugation at low speed, filtered and virus

pellets recovered following an ultracentrifugation (35000 rpm for 3h) on a 20% sucrose cushion. Viruses were resuspended in DMEM, and aliquots were kept at -80°C. The multiplicity of infection (MOI) was determined using the CEM-CCR5 cell line.

Activated primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected with NL4.3-ADA-GFP in the case of RNAseq sorted cells (at a MOI of 2) or pseudotyped with VSV-G (at a MOI of 1) in all other cases (WT or mutant NL4.3-ADA-GFP infection). Infections were performed by spinoculation (centrifugation for 2h at 1200g, 22°C). Cells were washed 6h after viral adsorption with PBS and the infection efficiency was determined 48h post-infection by measurement of the frequency of GFP-positive (GFP-pos) cells by flow cytometry. In some cases, primary CD4<sup>+</sup> T cells were pre-treated with efavirenz (EFV – 10µM, Sigma-Aldrich, #SML0536) or raltegravir (RAL - 20µM, Santa Cruz Biotechnology, #sc-364600) overnight and replenished in new media accordingly during the infection.

### ***Antibodies and flow cytometry***

The following Ab were used in flow cytometry assays: BV421 anti-human CCR5 (Biolegend, #359118), PE/Cyanine7 anti-human CD4 (Biolegend, #317414), PE anti-human CD59 (Miltenyi, #130-120-048) as well as its isotype control (Miltenyi, #130-113-438). For surface staining, fluorochrome-labeled Ab were added directly to the CD4<sup>+</sup> T cells at a final dilution 1:50 (Miltenyi) or 1:150 (Biolegend), incubated 45min on ice, washed twice in FACS buffer (PBS, 1% of FBS) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. For total CD59, cells were fixed and permeabilized using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, #554714) as per manufacturer's instructions and stained with anti-CD59 Ab. Finally, cells were resuspended in PBS-EDTA for analyses. Flow cytometry analyses and cell sorting were performed on a FACSAria III (BD), or CyAn (Beckman) equipped with appropriate lasers. Acquired data were analyzed with FlowJo 10.9 software (TreeStar).

### ***Transfection of primary CD4<sup>+</sup> T cells***

Primary CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with either negative control RNA (Qiagen, #YM00479902-ADB), mimics of miRNA-21 (Qiagen, #YM00473093-ADB), mimics of miRNA-26a (Qiagen, #YM00471417-ADB) or mimics of miRNA-29a (Qiagen,



#YM00472650-ADB) by nucleofection (Lonza) according to the manufacturer's instructions and cultured for 48h in 48-well plates in basal medium (RPMI-1640) supplemented with IL-2 (100U/mL). The negative control and all the miRCURY locked nucleic acid (LNA) mimics were fluorescein amidites (FAM)-labeled (see **Table S1**).

### ***RNA extraction, reverse-transcription, and real-time qPCR analyses***

CD4<sup>+</sup> T cells infected with the different viruses described above were sorted using an Influx cell sorter (BD Biosciences) and recovered in RLT buffer. Total cellular RNAs were extracted using RNeasy RNA extraction columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs (100ng) were reverse transcribed using SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen) with poly(dT) and specific loop primers (see **Table S2**) for the appropriate miRNAs using the two-tailed real-time qPCR method (67). For real-time qPCR, cDNA and appropriate primers (see Table S3) were added to SYBR green select master mix (Applied Biosystems) in 96-well plates and run on a ViiA96 thermocycler (Thermo Fisher Scientific) with the following cycling conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 5 min, and 40 cycles at 95°C for 20 sec and at 60°C for 40 sec. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or small nuclear RNA (snRNA) U6 were used as endogenous controls and  $\Delta\Delta CT$  variations were calculated.

Multiply spliced HIV-1 mRNA were quantified by modified nested real-time PCR using Taq DNA polymerase (BioLabs) in a first PCR and TaqMax Fast Advanced Master Mix (Applied Bio-systems) in a second PCR as previously described (68) (see primers in **Table S2**). The resulting HIV-1 copy numbers were determined using a standard curve. This standard curve was generated by extracting and amplifying DNA from serially diluted ACH-2 cells, which contain a single integrated copy of HIV-1 (NIH AIDS Reagent Program). In each assay, samples were tested in triplicate.

### ***CD59 3'UTR validation assay***

To generate pMIR-REPORT-CD59-Luc, a PCR was performed on the cDNA of primary CD4<sup>+</sup> T cells using pfu DNA polymerase (see primers in **Table S3**), and different fragments of the 3' UTR of CD59 were inserted into the SpeI and MluI sites of pMIR-REPORT-Luc. Site-directed mutagenesis of the 3' UTR of CD59 was

performed by PCR (see primers in Table S3) to generate the mutants indicated in Figure 4C and cloned into pMIR-REPORT-Luc using the same strategy described above. Fragment A corresponds to nucleotides 449-657 of the 3' UTR of CD59 (based on accession number #NM\_000611.6) while fragment B corresponds to nucleotides 666-878. Finally, the AB fragment corresponds to nucleotides 449-878 of the 3' UTR of CD59 and was generated using primers indicated in Table S3.

For the miR-REPORT assay, HEK-293T cells were co-transfected with pGL4.70Actin1.2(8) (69) and either one of the plasmids derived from pMIR-REPORT-CD59-Luc. Twenty-four-hours post transfection, cells were further treated with either control or mimics of miRNA-26a and lysed after 24h. Luciferase activity was measured using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) on a GloMax luminometer (Promega).

#### ***Generation of the CEM-CCR5 CD59 knockout cell line***

To generate a CD59KO CEM-CCR5 cell lines, a guide sequence previously described as targeting CD59 (70) was inserted into the lentiCRISPR v2 vector (71). Lentiviruses were produced by transfection of this vector in combination with pSVCMV-VSV-G in HEK 293T cells. Control lentiviruses were also produced using the lentiCRISPR v2 without the single guide RNA (sgRNA). CEM-CCR5 cells were transduced with either the control or sgRNA-expressing lentiviruses and transduced cells selected with puromycin (2 $\mu$ g/mL). Individual clones (CEM-CD59\_KO) were obtained by single-cell sorting.

#### ***Purification of antibodies***

Ab from sera of viremic individuals were purified using protein G Dynabeads (Life Technologies; #10003D). Briefly, protein G Dynabeads were washed with Binding Buffer (0.1M sodium phosphate, pH 8.0) and then incubated with serum for 1h at 4°C with agitation. Beads were washed five times with Binding Buffer, and Ab were eluted using 0.2M glycine (pH 2.5). The elution product was neutralized using 1M Tris-HCl (pH 9.0). The quantity of Ab obtained was evaluated by a protein assay (Bio-Rad).

### ***Antibody-dependent complement-mediated lysis assay***

A mix of sera from three to five healthy donors was used as a source of complement. The virion ADCML assay was performed as previously described (15) with some modifications. HIV-1 virions were incubated with 1mg/mL of RNase A (Invitrogen, #12091021), the bNAb PGT121 (10 µg/ml, obtained from the NIH AIDS reagent program) or the purified antibodies from patient sera (final dilution 1:5) and with either NHS or HIHS (dilution 1:2) in RPMI 1640 for a total volume of 140µL. The mixture was then incubated for 3 h at 37°C prior to freezing at -20°C. Following thawing, the samples were treated with RNase A (1mg/ml) and DNase I (1mg/ml) (Sigma-Aldrich, #11284932001) for 1 h at 37°C and subsequently treated with proteinase K (1mg/ml) (Invitrogen, #25530049) to remove RNase and DNase activity. Residual viral RNA in intact virions was extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions, reverse-transcribed, and quantified by real-time PCR. Total HIV-1 viral RNA was quantified by a modified nested real-time PCR assay using Taq DNA polymerase (BioLabs) in a first PCR and the TaqMax Fast Advanced Master Mix (Applied Bio-systems) in a second PCR as previously described (72) (see HIV-TOT primers in **Table S2**). The resulting HIV-1 copy numbers were determined using a standard curve as described above. In each assay, samples were tested in triplicate. For ADCML of cells, CEM-CD59-control or CEM-CD59\_KO were infected with NL4.3-ADA-GFP and incubated in the presence of 50% NHS or HIHS, either with or without PGT121 (10µM) overnight. To measure ADCML, cells were treated with the Zombie NIR Fixable Viability marker (1:150 in PBS; Biolegend, #423105) and analyzed by flow cytometry.

### ***Virion Capture Assay***

Virus capture assays were performed as previously described (73) with some modifications. Immunomagnetic bead-based virion capture was performed with 20µL of protein G Dynabeads (Life Technologies; #10003D), which were incubated with 2µL of mouse anti-CD59 (Biolegend, #304702) for 20 min at room temperature (RT) and then washed with PBS to remove unbound Ab. At the start of capture assays, virus input was normalized across all viruses tested, with inputs corresponding to equal virus volumes (100µL) and same infection rates. Virus samples were incubated with

Ab-armed beads for 1h at RT to allow virus capture. Beads were then washed five times with PBS to extensively remove unbound virus particles. The bead-associated virus was then lysed with lysis buffer and quantified by p24 ELISA following the manufacturer's instructions (XpressBio, Cat#XB-1000). Background levels of virion capture were assessed by using an isotype control Ab (Biolegend, #401501). The level of background virus capture was removed from each data point.

### ***RNA-Seq of sorted HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T cells for mRNA/miRNA profiling and analyses of their expression***

Productively infected (GFP-positive), bystander (GFP-negative) and uninfected (mock) CD4<sup>+</sup> T cell populations were sorted using an Influx cell sorter (BD Biosciences), and directly recovered in RLT lysis buffer. The same samples were used for miRNAseq and mRNAseq using the Illumina TruSeq mRNA or Small RNA system (Illumina Technologies) at the IRCM Molecular Biology and Functional Genomics Core Facility. Specific tagging was used to identify RNA from each blood donor. The resulting library was sequenced using a NovaSeq 6000 system (Illumina Technologies). Differential expression of miRNAs and mRNAs was assessed using p values computed using DESeq2. Volcano plots were generated using GraphPad Prism9 (GraphPad Software, LLC). Online GEO accession numbers for the reported mRNA-seq and miRNA-seq data are GSE247191 (mRNA-seq) and GSE247194 (miRNA-seq), respectively. The online search for miRNA and mRNA pairing was performed using mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>).

### ***Quantification and statistical analyses***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 8). Non-parametric Mann-Whitney's U-tests (two-tailed) were used to compare ranks between two groups or more. The non-parametric Kruskal Wallis test was used when indicated. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. \*, \*\*, \*\*\* signify <0.05, <0.01, <0.001, respectively, ns, not significant.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank all the study participants as well as IRCM Clinic staff for coordinating access to blood donors. We also thank Julie Lord and Eric Massicotte for their assistance for flow cytometry analyses, Odile Neyret and the IRCM Molecular Biology Core staff for their support with the Illumina technology and cDNA sequencing, and Virginie Calderon for her help with database bioinformatics analyses. The following reagent was obtained through the NIH HIV Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Monoclonal Anti-HIV-1 gp120 (PGT121) (ARP-12343), contributed by the International AIDS Vaccine Initiative; CEM.NKR CCR5+ cells (ARP-4376) contributed by Dr. Alexandra Trkola; ACH-2 Cells (ARP-349) contributed by Dr. Thomas Folks. This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants FDN-154324 and HB2-164064 (Canadian HIV Cure Enterprise-CanCURE 2.0) to E.A.C as well as by the the Fonds de la Recherche Québec-Santé (FRQS)-funded Réseau SIDA/Maladies Infectieuses. E.A.C is the recipient of the IRCM-Université de Montréal Chair of Excellence in HIV Research.

## **Author contributions**

N.B and E.A.C designed the study. N.B performed all experiments and C.Y contributed to the generation of plasmid constructs for the miR-REPORT assays. N.B, R.L and E.A.C analyzed data. T.T.M and O.A provided reagents. T.N.Q.P assisted with experimental design. N.B, R.L and E.A.C wrote the manuscript. E.A.C secured funding.

## **References**

1. Alter G, Moody MA. 2010. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *The Journal of Infectious Diseases* 202 Suppl 2:S315-322.
2. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, Decamp AC, Parks RJ, Ashley VC, Lucas JT, Cohen M, Eron J, Hicks CB, Liao H-X, Self SG, Landucci G, Forthal DN, Weinhold KJ, Keele BF, Hahn BH, Greenberg ML, Morris L, Karim SSA, Blattner WA, Montefiori DC, Shaw GM, Perelson AS, Haynes BF. 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *Journal of Virology* 82:12449-12463.
3. Poignard P, Moulard M, Golez E, Vivona V, Franti M, Venturini S, Wang M, Parren PWHI, Burton DR. 2003. Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. *Journal of Virology* 77:353-365.
4. Haynes BF, Shaw GM, Korber B, Kelsoe G, Sodroski J, Hahn BH, Borrow P, McMichael AJ. 2016. HIV-Host Interactions: Implications for Vaccine Design. *Cell Host & Microbe* 19:292-303.
5. Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H. 2008. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* 82:7932-7941.
6. Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SSA, Williamson C, Morris L, Team CS. 2007. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *Journal of Virology* 81:6187-6196.
7. Liu Y, Cao W, Sun M, Li T. 2020. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerging Microbes & Infections* 9:194-206.
8. Ebenbichler CF, Thielens NM, Vornhagen R, Marschang P, Arlaud GJ, Dierich MP. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical

- pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. *The Journal of Experimental Medicine* 174:1417-1424.
9. Stoiber H, Ebenbichler C, Schneider R, Janatova J, Dierich MP. 1995. Interaction of several complement proteins with gp120 and gp41, the two envelope glycoproteins of HIV-1. *AIDS (London, England)* 9:19-26.
  10. Walport MJ. 2001. Complement. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 344:1058-1066.
  11. Dunkelberger JR, Song W-C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research* 20:34-50.
  12. Couves EC, Gardner S, Voisin TB, Bickel JK, Stansfeld PJ, Tate EW, Bubeck D. 2023. Structural basis for membrane attack complex inhibition by CD59. *Nature Communications* 14:890.
  13. Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology* 9:729-740.
  14. Saifuddin M, Hedayati T, Atkinson JP, Holguin MH, Parker CJ, Spear GT. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *The Journal of General Virology* 78 ( Pt 8):1907-1911.
  15. Huber M, Fischer M, Misselwitz B, Manrique A, Kuster H, Niederöst B, Weber R, von Wyl V, Günthard HF, Trkola A. 2006. Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection. *PLoS medicine* 3:e441.
  16. Aasa-Chapman MMI, Holuigue S, Aubin K, Wong M, Jones NA, Cornforth D, Pellegrino P, Newton P, Williams I, Borrow P, McKnight A. 2005. Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* 79:2823-2830.
  17. Hammond SM. 2015. An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 87:3-14.

18. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9:402.
19. Balasubramaniam M, Pandhare J, Dash C. 2018. Are microRNAs Important Players in HIV-1 Infection? An Update. *Viruses* 10:110.
20. Orecchini E, Doria M, Michienzi A, Giuliani E, Vassena L, Ciafrè SA, Farace MG, Galardi S. 2014. The HIV-1 Tat protein modulates CD4 expression in human T cells through the induction of miR-222. *RNA biology* 11:334-338.
21. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, Wiche Salinas TR, Bego MG, Power C, Routy J-P, Ancuta P, Tremblay MJ, Cohen ÉA. 2017. Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell Reports* 21:141-153.
22. Bellini N, Lodge R, Pham TNQ, Jain J, Murooka TT, Herschhorn A, Bernard NF, Routy J-P, Tremblay CL, Cohen ÉA. 2022. MiRNA-103 downmodulates CCR5 expression reducing human immunodeficiency virus type-1 entry and impacting latency establishment in CD4+ T cells. *iScience* 25:105234.
23. Lodge R, Bellini N, Laporte M, Salahuddin S, Routy J-P, Ancuta P, Costiniuk CT, Jenabian M-A, Cohen ÉA. 2020. Interleukin-1 $\beta$  Triggers p53-Mediated Downmodulation of CCR5 and HIV-1 Entry in Macrophages through MicroRNAs 103 and 107. *mBio* 11:e02314-20.
24. Riess M, Fuchs NV, Idica A, Hamdorf M, Flory E, Pedersen IM, König R. 2017. Interferons Induce Expression of SAMHD1 in Monocytes through Downregulation of miR-181a and miR-30a. *The Journal of Biological Chemistry* 292:264-277.
25. Ruelas DS, Chan JK, Oh E, Heidersbach AJ, Hebbeler AM, Chavez L, Verdin E, Rape M, Greene WC. 2015. MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency. *The Journal of Biological Chemistry* 290:13736-13748.
26. Xu Z, Lodge R, Power C, Cohen EA, Hobman TC. 2020. The HIV-1 Accessory Protein Vpu Downregulates Peroxisome Biogenesis. *mBio* 11:e03395-19.
27. Lodge R, Xu Z, Eklund M, Stürzel C, Kirchhoff F, Tremblay MJ, Hobman TC, Cohen ÉA. 2023. MicroRNA-25/93 induction by Vpu as a mechanism for



- counteracting MARCH1-restriction on HIV-1 infectivity in macrophages. *mBio* 14:e0195023.
28. Shen C-J, Jia Y-H, Tian R-R, Ding M, Zhang C, Wang J-H. 2012. Translation of Pur- $\alpha$  is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26:4755-4764.
  29. Cabrera-Rodríguez R, Pérez-Yanes S, Montelongo R, Lorenzo-Salazar JM, Estévez-Herrera J, García-Luis J, Íñigo-Campos A, Rubio-Rodríguez LA, Muñoz-Barrera A, Trujillo-González R, Dorta-Guerra R, Casado C, Pernas M, Blanco J, Flores C, Valenzuela-Fernández A. 2022. Transactive Response DNA-Binding Protein (TARDBP/TDP-43) Regulates Cell Permissivity to HIV-1 Infection by Acting on HDAC6. *International Journal of Molecular Sciences* 23:6180.
  30. Scott DD, Trahan C, Zindy PJ, Aguilar LC, Delubac MY, Van Nostrand EL, Adivarahan S, Wei KE, Yeo GW, Zenklusen D, Oeffinger M. 2017. Nol12 is a multifunctional RNA binding protein at the nexus of RNA and DNA metabolism. *Nucleic Acids Research* 45:12509-12528.
  31. Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. 2002. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *The EMBO journal* 21:6801-6810.
  32. Taylor HE, Simmons GE, Mathews TP, Khatua AK, Popik W, Lindsley CW, D'Aquila RT, Brown HA. 2015. Phospholipase D1 Couples CD4<sup>+</sup> T Cell Activation to c-Myc-Dependent Deoxyribonucleotide Pool Expansion and HIV-1 Replication. *PLoS pathogens* 11:e1004864.
  33. Jiang Q, Zhang L, Wang R, Jeffrey J, Washburn ML, Brouwer D, Barbour S, Kovalev GI, Unutmaz D, Su L. 2008. FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells play an important role in acute HIV-1 infection in humanized Rag2<sup>-/-</sup>gammaC<sup>-/-</sup> mice in vivo. *Blood* 112:2858-2868.
  34. Trkola A, Matthews J, Gordon C, Ketas T, Moore JP. 1999. A cell line-based neutralization assay for primary human immunodeficiency virus type 1 isolates

- that use either the CCR5 or the CXCR4 coreceptor. *Journal of Virology* 73:8966-8974.
35. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien J-P, Wang S-K, Ramos A, Chan-Hui P-Y, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong C-H, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Investigators PGP, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477:466-470.
  36. Ratnapriya S, Harris M, Chov A, Herbert ZT, Vrbanac V, Deruaz M, Achuthan V, Engelman AN, Sodroski J, Herschhorn A. 2021. Intra- and extra-cellular environments contribute to the fate of HIV-1 infection. *Cell Reports* 36:109622.
  37. Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad É, Cohen ÉA. 2013. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10:128.
  38. Richard J, Sindhu S, Pham TNQ, Belzile J-P, Cohen EA. 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115:1354-1363.
  39. Pham TNQ, Lukhele S, Hajjar F, Routy J-P, Cohen ÉA. 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11:15.
  40. Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Molecular Cell* 12:591-601.
  41. Han Y, Wang X, Dang Y, Zheng Y-H. 2008. APOBEC3G and APOBEC3F require an endogenous cofactor to block HIV-1 replication. *PLoS pathogens* 4:e1000095.
  42. Dey BK, Gagan J, Yan Z, Dutta A. 2012. miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes & Development* 26:2180-2191.
  43. Fu X, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, Pattou F, Han W, Wang X, Lou F, Jove R, Staels B, Moore DD, Huang W. 2015. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *The Journal of Clinical Investigation* 125:2497-2509.

44. Hutter K, Lindner SE, Kurschat C, Rüllicke T, Villunger A, Herzog S. 2022. The miR-26 family regulates early B cell development and transformation. *Life Science Alliance* 5:e202101303.
45. Spear GT, Lurain NS, Parker CJ, Ghassemi M, Payne GH, Saifuddin M. 1995. Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 155:4376-4381.
46. Amet T, Ghabril M, Chalasani N, Byrd D, Hu N, Grantham A, Liu Z, Qin X, He JJ, Yu Q. 2012. CD59 incorporation protects hepatitis C virus against complement-mediated destruction. *Hepatology (Baltimore, Md)* 55:354-363.
47. Zhuang C, Wang P, Huang D, Xu L, Wang X, Wang L, Hu L. 2016. A double-negative feedback loop between EZH2 and miR-26a regulates tumor cell growth in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology* 48:1195-1204.
48. Liu J, Li X, Wang M, Xiao G, Yang G, Wang H, Li Y, Sun X, Qin S, Du N, Ren H, Pang Y. 2018. A miR-26a/E2F7 feedback loop contributes to tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. *International Journal of Oncology* 53:1601-1612.
49. Lukacik P, Roversi P, White J, Esser D, Smith GP, Billington J, Williams PA, Rudd PM, Wormald MR, Harvey DJ, Crispin MDM, Radcliffe CM, Dwek RA, Evans DJ, Morgan BP, Smith RaG, Lea SM. 2004. Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1279-1284.
50. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. 2004. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in Immunology* 25:496-503.
51. Lan J, Yang K, Byrd D, Hu N, Amet T, Shepherd N, Desai M, Gao J, Gupta S, Sun Y, Yu Q. 2014. Provirus activation plus CD59 blockage triggers antibody-dependent complement-mediated lysis of latently HIV-1-infected cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 193:3577-3589.

52. Yang K, Lan J, Shepherd N, Hu N, Xing Y, Byrd D, Amet T, Jewell C, Gupta S, Kouniga C, Gao J, Yu Q. 2015. Blockage of CD59 Function Restores Activities of Neutralizing and Nonneutralizing Antibodies in Triggering Antibody-Dependent Complement-Mediated Lysis of HIV-1 Virions and Provirus-Activated Latently Infected Cells. *Journal of Virology* 89:9393-9406.
53. Amet T, Lan J, Shepherd N, Yang K, Byrd D, Xing Y, Yu Q. 2016. Glycosylphosphatidylinositol Anchor Deficiency Attenuates the Production of Infectious HIV-1 and Renders Virions Sensitive to Complement Attack. *AIDS research and human retroviruses* 32:1100-1112.
54. Bar-On Y, Gruell H, Schoofs T, Pai JA, Nogueira L, Butler AL, Millard K, Lehmann C, Suárez I, Oliveira TY, Karagounis T, Cohen YZ, Wyen C, Scholten S, Handl L, Belblidia S, Dizon JP, Vehreschild JJ, Witmer-Pack M, Shimeliovich I, Jain K, Fiddike K, Seaton KE, Yates NL, Horowitz J, Gulick RM, Pfeifer N, Tomaras GD, Seaman MS, Fätkenheuer G, Caskey M, Klein F, Nussenzweig MC. 2018. Safety and antiviral activity of combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals. *Nature Medicine* 24:1701-1707.
55. Crowell TA, Colby DJ, Pinyakorn S, Sacdalan C, Pagliuzza A, Intasan J, Benjapornpong K, Tangnaree K, Chomchey N, Kroon E, de Souza MS, Tovanabutra S, Rolland M, Eller MA, Paquin-Proulx D, Bolton DL, Tokarev A, Thomas R, Takata H, Trautmann L, Krebs SJ, Modjarrad K, McDermott AB, Bailer RT, Doria-Rose N, Patel B, Gorelick RJ, Fullmer BA, Schuetz A, Grandin PV, O'Connell RJ, Ledgerwood JE, Graham BS, Tressler R, Mascola JR, Chomont N, Michael NL, Robb ML, Phanuphak N, Ananworanich J, Group RS. 2019. Safety and efficacy of VRC01 broadly neutralising antibodies in adults with acutely treated HIV (RV397): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The lancet HIV* 6:e297-e306.
56. Caskey M, Klein F, Lorenzi JCC, Seaman MS, West AP, Buckley N, Kremer G, Nogueira L, Braunschweig M, Scheid JF, Horwitz JA, Shimeliovich I, Ben-Avraham S, Witmer-Pack M, Platten M, Lehmann C, Burke LA, Hawthorne T, Gorelick RJ, Walker BD, Keler T, Gulick RM, Fätkenheuer G, Schlesinger SJ, Nussenzweig MC. 2015. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 522:487-491.

57. Caskey M, Schoofs T, Gruell H, Settler A, Karagounis T, Kreider EF, Murrell B, Pfeifer N, Nogueira L, Oliveira TY, Learn GH, Cohen YZ, Lehmann C, Gillor D, Shimeliovich I, Unson-O'Brien C, Weiland D, Robles A, Kümmerle T, Wyen C, Levin R, Witmer-Pack M, Eren K, Ignacio C, Kiss S, West AP, Mouquet H, Zingman BS, Gulick RM, Keler T, Bjorkman PJ, Seaman MS, Hahn BH, Fätkenheuer G, Schlesinger SJ, Nussenzweig MC, Klein F. 2017. Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nature Medicine* 23:185-191.
58. Stephenson KE, Julg B, Tan CS, Zash R, Walsh SR, Rolle C-P, Monczor AN, Lupo S, Gelderblom HC, Ansel JL, Kanjilal DG, Maxfield LF, Nkolola J, Borducchi EN, Abbink P, Liu J, Peter L, Chandrashekar A, Nityanandam R, Lin Z, Setaro A, Sapiente J, Chen Z, Sunner L, Cassidy T, Bennett C, Sato A, Mayer B, Perelson AS, deCamp A, Priddy FH, Wagh K, Giorgi EE, Yates NL, Arduino RC, DeJesus E, Tomaras GD, Seaman MS, Korber B, Barouch DH. 2021. Safety, pharmacokinetics and antiviral activity of PGT121, a broadly neutralizing monoclonal antibody against HIV-1: a randomized, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Nature Medicine* 27:1718-1724.
59. Dufloo J, Guivel-Benhassine F, Buchrieser J, Lorin V, Grzelak L, Dupouy E, Mestrallet G, Bourdic K, Lambotte O, Mouquet H, Bruel T, Schwartz O. 2020. Anti-HIV-1 antibodies trigger non-lytic complement deposition on infected cells. *EMBO reports* 21:e49351.
60. Pham TNQ, Lukhele S, Dallaire F, Perron G, Cohen ÉA. 2016. Enhancing Virion Tethering by BST2 Sensitizes Productively and Latently HIV-infected T cells to ADCC Mediated by Broadly Neutralizing Antibodies. *Scientific Reports* 6:37225.
61. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ETJ, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, Gros P, Schuurman J, Parren PWHI, Heck AJR. 2016. Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Molecular Cell* 63:135-145.
62. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang Z-Y, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD. 2010. Structural basis for broad and potent

- neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science (New York, NY)* 329:811-817.
63. Norman JM, Mashiba M, McNamara LA, Onafuwa-Nuga A, Chiari-Fort E, Shen W, Collins KL. 2011. The antiviral factor APOBEC3G enhances the recognition of HIV-infected primary T cells by natural killer cells. *Nature Immunology* 12:975-983.
  64. Murooka TT, Deruaz M, Marangoni F, Vrbanac VD, Seung E, von Andrian UH, Tager AM, Luster AD, Mempel TR. 2012. HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* 490:283-287.
  65. Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, Kim M-K, Shin BA, Choi S-Y. 2011. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS One* 6:e18556.
  66. Lodge R, Lalonde JP, Lemay G, Cohen EA. 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *The EMBO journal* 16:695-705.
  67. Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. 2017. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Research* 45:e144.
  68. Procopio FA, Fromentin R, Kulpa DA, Brehm JH, Bebin A-G, Strain MC, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Hecht FM, Hoh R, Barnard RJO, Miller MD, Hazuda DJ, Deeks SG, Sékaly R-P, Chomont N. 2015. A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine* 2:874-883.
  69. Bego MG, Mercier J, Cohen EA. 2012. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *Journal of Virology* 86:3513-3527.
  70. Thielen AJF, van Baarsen IM, Jongma ML, Zeerleder S, Spaapen RM, Wouters D. 2018. CRISPR/Cas9 generated human CD46, CD55 and CD59 knockout cell lines as a tool for complement research. *Journal of Immunological Methods* 456:15-22.

71. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* 11:783-784.
72. Vandergeeten C, Fromentin R, Merlini E, Lawani MB, DaFonseca S, Bakeman W, McNulty A, Ramgopal M, Michael N, Kim JH, Ananworanich J, Chomont N. 2014. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies. *Journal of Virology* 88:12385-12396.
73. Burnie J, Tang VA, Welsh JA, Persaud AT, Thaya L, Jones JC, Guzzo C. 2020. Flow Virometry Quantification of Host Proteins on the Surface of HIV-1 Pseudovirus Particles. *Viruses* 12:1296.

Table S1 - Sequences of miRNAs mimics.

<b>miRNAs mimics</b>	
<b>Name</b>	<b>Sequence</b>
Control mimic	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
miRNA-21-5p mimic	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miRNA-26-5p mimic	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
miRNA-29a-3p mimic	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA

Table S2 - Oligonucleotides used for qPCR in this study.

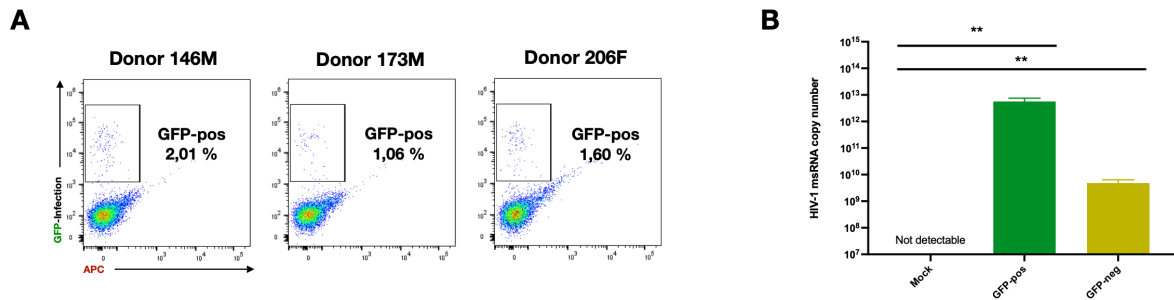
<b>Target</b>	<b>Name</b>	<b>Sequence</b>
<b>General qPCR</b>		
GAPDH	GAPDH - Reverse	TTGACGGTGCCATGGAATTT
	GAPDH - Forward	GCCATCAATGACCCCTTCAT
snRNA-U6	snRNA-U6 - RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGA CCAAAAATATG
	snRNA-U6 - Reverse	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
	snRNA-U6 - Forward	GCGCGTCGTGAAGCGTTC
miRNA-21	miRNA-21 - RT	TAAGCTAGATATGTGAGACGTACGTTG AGTACGTCAAGTCAAGGTCAACAT
	miRNA-21 - Reverse	GGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGA
	miRNA-21 - Forward	TAAGCTAGATATGTGAGACGTACGTTGAGT
miR-26a	miR-26a - RT	ACTTGAAGATATGTGAGACGTACGTTGAGTACGTCAAGTGAAGT CCTATCC
	miR-26a - Reverse	GGGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCT
	miR-26a - Forward	ACTTGAAGATATGTGAGACGTACGTTGAG
miR-29a	miR-29a - RT	GGTGCTAGATATGTGAGACGTACGTTGAGTACGTCAAGTGAAGT CTAACCGA
	miR-29a - Reverse	GGGTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
	miR-29a - Forward	GGTGCTAGATATGTGAGACGTACGTTGA
CD59	CD59 - Reverse	TACACTTGTAACCCAGCTTTGG
	CD59 - Forward	GCCAGTCTTTAGCACCAAGTTG
<b>HIV-1 qPCR</b>		
HIV-TOT	ULF1 (1 <sup>st</sup> PCR)	ATGCCACGTAAGCGAACTCTGGGTCTCTCTGGTTAGAC
	UR1 (1 <sup>st</sup> PCR)	CCATCTCTCTCCTTCTAGC
	LambdaT (2 <sup>nd</sup> PCR)	ATGCCACGTAAGCGAACT
	UR2 (2 <sup>nd</sup> PCR)	CTGAGGGATCTCTAGTTACC
	HIV-tot probe	/56-FAM/CACTCAAGG/ZEN/CAAGCTTTATTGAGGC/3IABkFQ/
HIV-ms	Tat 1.4 (1 <sup>st</sup> PCR)	TGGCAGGAAGAAGCGGAGA
	Rev (1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> PCR)	GGATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCACC
	Tat 2 (2 <sup>nd</sup> PCR)	ACAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCA
	HIV-ms probe	/56-FAM/TTCCTTCGG/ZEN/GCCTGTCCGGTCCC/3IABkFQ/



Table S3 - Oligonucleotides used to generate pMIR-REPORT-CD59-Luc.

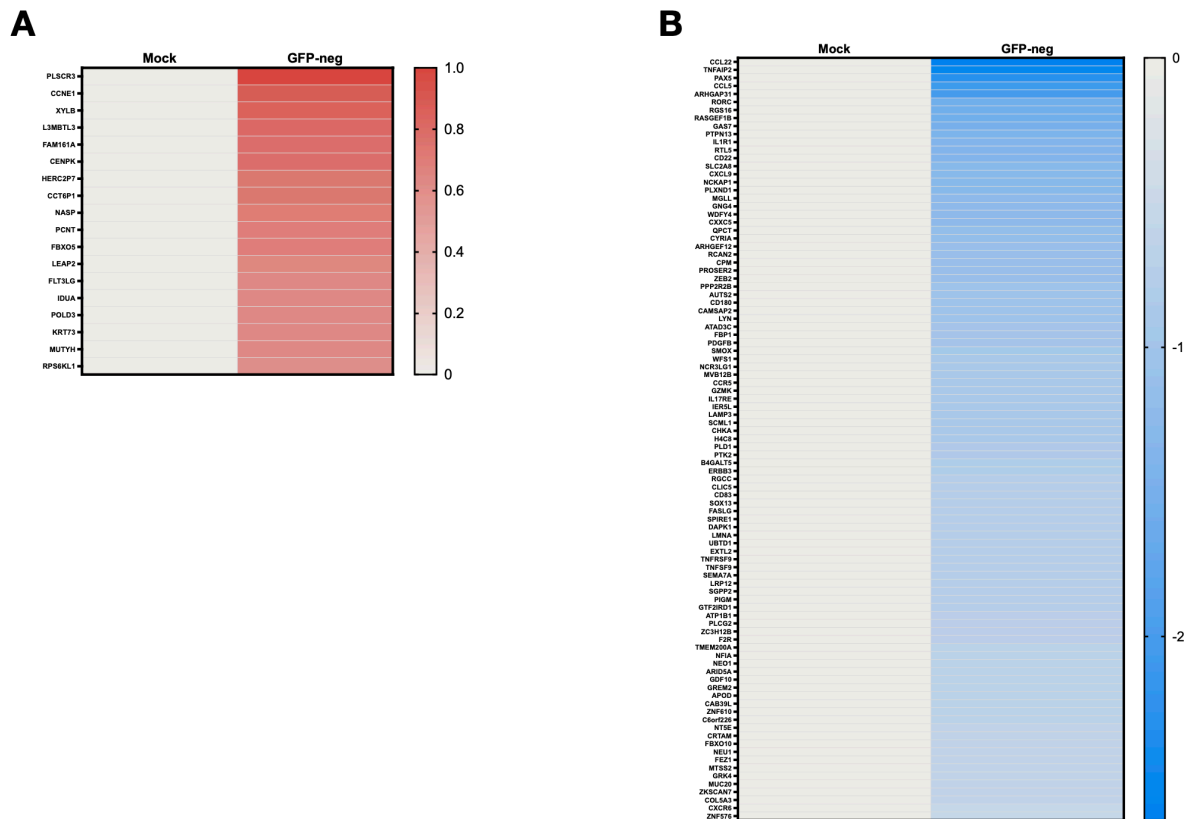
<b>miR-Report assay</b>		
<b>Target</b>	<b>Name</b>	<b>Sequence</b>
<i>3' UTR CD59 (Fragment A)</i>	3'UTR CD59-A Forward	GGACTAGTCCTCAACACCAGGAGAGCTTCTCCCAA
	3'UTR CD59-A Reverse (WT)	CCGACGCGTCGGACTTCTTCCTTCAAGTGGGGCTTCCC
	3'UTR CD59-A Reverse (Mut)	CCGACGCGTCGGACTTCTTCCTTCTTAGGGGGCTTCCC
<i>3' UTR CD59 (Fragment B)</i>	3'UTR CD59-B Forward (WT)	GGACTAGTCCTGAAGTAGGTGTGACTTGAAGTAGATTGCATGC
	3'UTR CD59-B Forward (Mut)	GGACTAGTCCTGAAGTAGGTGTGCTGGAAACTAGATTGCATG
	3'UTR CD59-B Reverse	CCGACGCGTCGGGTTTATGAAAGCGTTCCATGTGAGAGAGGATG
<i>3' UTR CD59 (Fragment AB)</i>	3' UTR CD59-AB Forward	GGACTAGTCCTCAACACCAGGAGAGCTTCTCCCAA
	3' UTR CD59-AB Reverse	CCGACGCGTCGGGTTTATGAAAGCGTTCCATGTGAGAGAGGATG

Figure S1



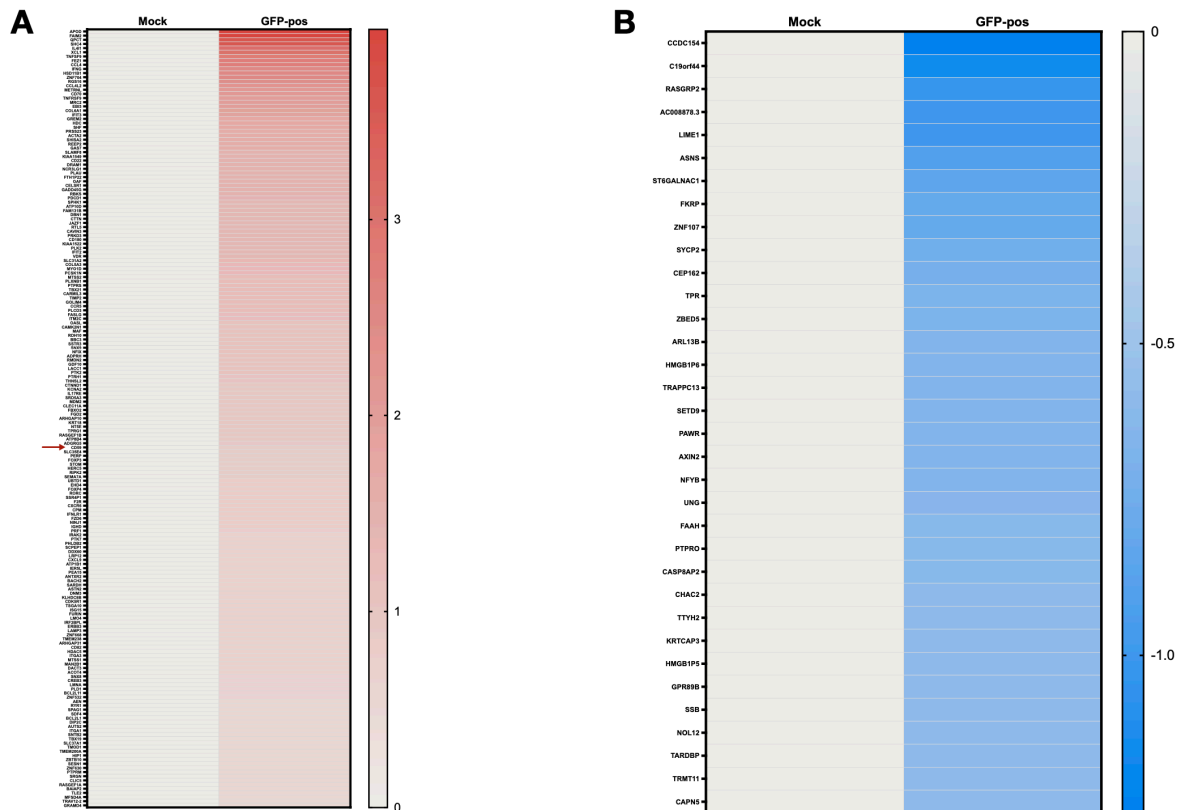
**Figure S1 - Characterization of the cell populations used for the RNA-seq, related to Figure 1.**

A) Primary CD4<sup>+</sup> T-cells from three different donors were isolated, activated and then infected with NL4.3-ADA-GFP (WT). Frequency (%) of infected cells was determined by measuring GFP expression using flow cytometry. (B) Multiply spliced HIV-1 mRNA (msRNA) in productively infected GFP-positive (GFP-pos), bystander GFP-negative (GFP-neg) and uninfected cells were measured by real-time qPCR (n = 3). Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \*\* $p < 0.01$ .



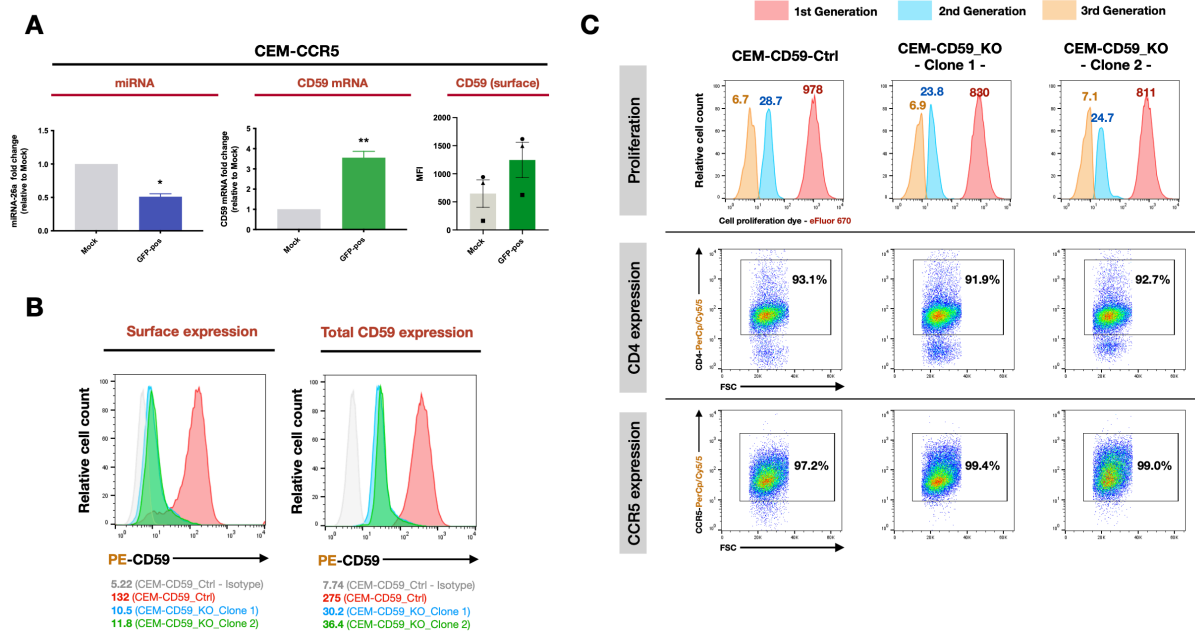
**Figure S2 - List of genes of which mRNA expression levels are modulated in the GFP-negative population compared to Mock, related to Figure 1.**

(A) The heatmap depicts the 18 mRNAs specifically upregulated in the GFP-negative population. (B) The heatmap depicts the 95 mRNAs specifically downregulated in the GFP-negative population. In (A) and (B), the scale bar is in  $\log_2(F_c)$ .



**Figure S3 - List of genes of which mRNA expression levels are modulated in the GFP-positive population compared to Mock, related to Figure 1.**

(A) The heatmap depicts the 188 mRNAs specifically upregulated in the GFP-positive population. CD59 is identified with a red arrow. (B) The heatmap depicts the 34 mRNAs specifically downregulated in the GFP-positive population. In (A) and (B), the scale bar is in  $\log_2(F_c)$ .

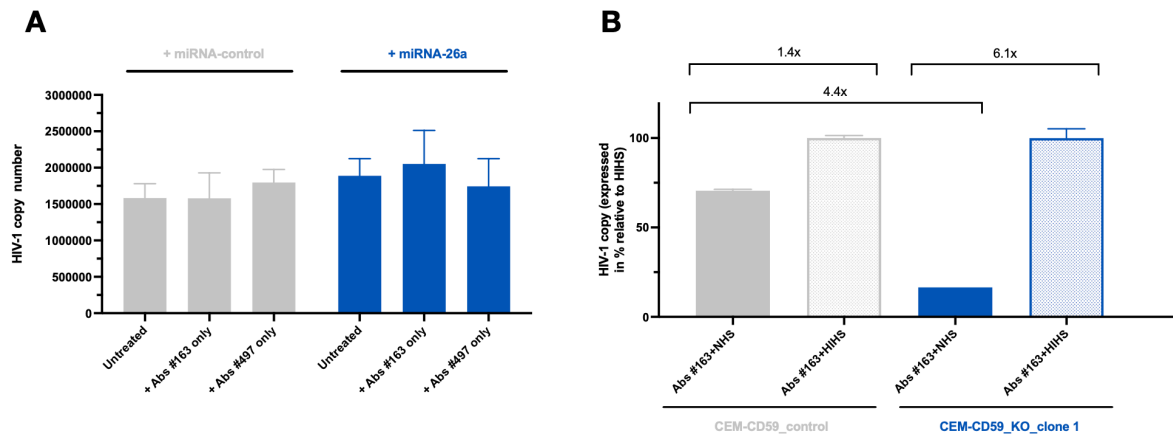


**Figure S4 - Modulation of miRNA-26a and CD59 expression levels in HIV-1 infected CEM-CCR5 cells and characterization of CEM-CD59\_KO cells, related to Figure 5.**

(A) MiRNA-26a and CD59 mRNA levels in uninfected (mock) and HIV-1 infected CEM-CCR5 (GFP-positive) (n=4) were measured by real-time qPCR. Shown are the mean fold changes compared to uninfected cells (in gray, which is set at 1.0). Cell-surface CD59 expression levels were evaluated by flow cytometry and the MFI was compared between uninfected and infected CEM-CCR5. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined by the nonparametric Mann-Whitney's test, values: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

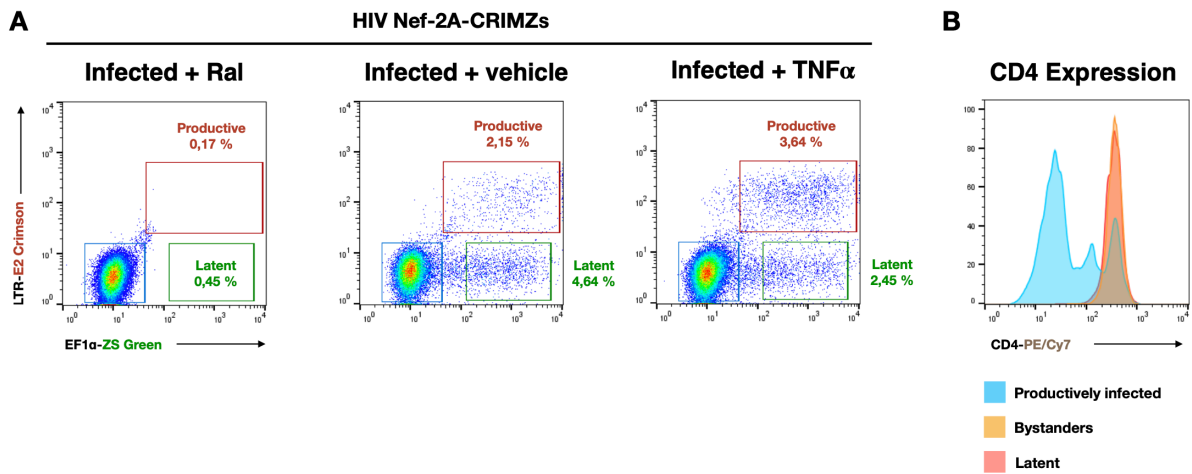
(B) Cell-surface as well as total CD59 expression levels were determined by flow cytometry and the MFI was compared in CEM-CD59\_control and CEM-CD59\_KO cell lines. Shown are data from one representative experiment (n=3).

(C) Cell proliferation (eFluor-670), CD4 (PerCp/Cy5.5) or CCR5 (PerCp/Cy5.5) were measured by flow cytometry in the CEM-CCR5 parental cell line and two different CEM-CD59\_KO lines. Shown are a representative experiment (n=2).



**Figure S5 - ADCML assay with antibodies purified from the sera of viremic individuals, related to Figure 6.**

(A) Shown are the total HIV-1 of viruses from infected cells transfected with miRNA-26a or negative control mimics measured by real-time qPCR, following reverse transcription of viral RNA. Viruses were further treated with either NHS or HIHS and either Abs#163 or not. Error bars represent SEM. (B) Shown are the normalized total HIV-1 of Abs#163-treated viruses from CEM-CD59\_control or CEM-CD59\_KO infected cells. Values are normalized relative to the mean of those obtained with HIHS-treated viruses, which were set at 100%. Error bars represent SEM (n=2).



**Figure S6 - Characterization of CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations following infection with doubly fluorescent HIV Nef-2A-CRIMZs virus, related to Figure 7.**

(A) CEM-CCR5 cells were infected with HIV Nef-2A-CRIMZs for two days in the presence or absence of Raltegravir treatment. In one case, cells were reactivated after 24h of infection with TNF- $\alpha$  (10ng/mL) or the vehicle control for one day. The frequency of productively and latently HIV-1 infected cells was determined by flow cytometry based on E2-Crimson and ZsGreen expression 48h after infection. Productively infected cells are defined as E2-Crimson-positive/ZsGreen-positive while latently-infected cells are identified as E2-Crimson-negative/ZsGreen-positive. Shown is data from a representative experiment. (B) CD4 expression was analyzed by flow cytometry in uninfected as well as in latently and productively HIV-1 infected cell populations. Shown is data from a representative experiment.

## **Chapitre 6 : Discussion & Conclusion**



## Discussion

---

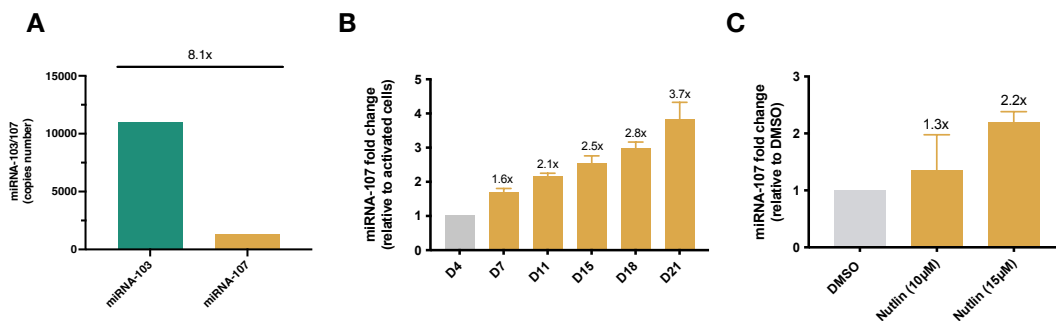
Cette section vise à mettre en évidence les éléments importants et mettre en perspectives les résultats présentés dans les chapitres 3-5, en tenant compte de la littérature actuelle. Les points déjà discutés dans les articles ne seront pas mentionnés dans cette section.

### 1. Importance et régulation du corécepteur CCR5

Comme nous l'avons vu dans les chapitres 3 et 4, le récepteur CCR5 est une protéine qui joue un rôle clé dans l'infection par le VIH-1. Bien qu'il soit utilisé par le virus pour son entrée dans la cellule, le CCR5 est également impliqué dans plusieurs fonctions de la réponse immunitaire innée et adaptative. Par exemple, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages comme l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  sont dépendants du CCR5 (296). Le CCR5 joue aussi un rôle important dans le recrutement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires sur les sites d'infection (297). De plus il a été montré que les niveaux d'expression du CCR5 sont très variables chez les individus, à cause de facteurs génétiques ainsi que des stimuli environnementaux (298–300). Le CCR5 semble jouer essentiellement un rôle complémentaire dans la réponse immunitaire car son absence ne compromet pas la réponse antivirale en raison d'autres récepteurs aux chimiokines qui peuvent le remplacer (301,302). En effet, afin d'approfondir les connaissances de la mutation CCR5 $\Delta$ 32 mentionnée précédemment, plusieurs analyses ont été réalisées et aucune corrélation avec la mortalité n'a été trouvée (303), bien qu'une précédente étude (désormais rétractée) affirmé initialement le contraire (304). Ces informations, en plus de toutes celles déjà discutées précédemment, confirme que l'absence d'expression de CCR5 ne semble pas affecter la durée de vie d'un individu et viennent confirmer la viabilité d'une stratégie thérapeutique dirigé contre CCR5 afin de contrer le VIH-1.

Les résultats présentés dans cette thèse nous ont permis de montrer que les miARN, par exemple par l'intermédiaire du miARN-103, participent à la régulation du corécepteur CCR5 dans les macrophages (chapitre 3) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

(chapitre 4). Nous avons également montré que son paralogue, le miARN-107 participe également à ce phénomène dans les macrophages. L'analyse du miARN-107 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> nous a permis de déterminer que son niveau d'expression pouvait être jusqu'à 10x inférieur à celui du miARN-103, dépendant du stade d'activation des cellules. Pour cette raison, nous avons décidé de nous focaliser sur le miARN-103 dans l'étude visant à définir son rôle sur l'expression de CCR5 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (chapitre 4). Cependant, bien que les résultats n'aient pas été inclus dans les publications, nous avons tout de même analysé le niveau d'expression du miARN-107 au cours des différents stades d'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et obtenu des résultats similaires aux observations avec le miARN-103. Nous avons également confirmé que le traitement à la Nutlin-3 augmente le miARN-107 dans des proportions similaires à celles du miARN-103. Globalement, ces résultats nous indiquent que, bien que les effets que nous observons sont en grande partie dûs au miARN-103 étant donné son niveau d'expression plus importante, nous ne pouvons pas exclure que le miARN-107 participe également aux effets sur CCR5 que nous observons.



**Figure 1 - Le profil d'expression du miARN-107 est similaire au miARN-103.**

(A) Quantification absolue du miARN-103 et du miARN-107 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos. (B) Modulation du miARN-107 dans les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mesurée par RT-qPCR. (C) Mesure de l'expression du miARN-107 par RT-qPCR dans les cellules T CD4<sup>+</sup> activées traitées avec du DMSO ou différentes concentrations de Nutlin.

De nombreuses approches thérapeutiques contre le VIH-1 axées sur le CCR5 ont été développées, allant des petites molécules inhibitrices du CCR5 (305), des anticorps anti-CCR5 (306), ou enfin utilisant des médicaments tels que la rapamycine (307) afin d'empêcher l'expression du CCR5 à la surface des cellules. Des approches basées sur l'ARN, via l'interférence sur l'ARNm de CCR5 par des petits ARN interférents (308)

ou des ribozymes (des molécules d'ARN capables d'agir comme catalyseurs) (309), ont également été mises au point. Les ARN interférents sont des petits ARNs de 20-24 nucléotides dont le mode de fonctionnement est très similaire aux miARN. La différence majeure entre les petits ARN interférents et les miARN est que les premiers inhibent l'expression d'un ARNm cible spécifique tandis que les seconds peuvent réguler l'expression de plusieurs ARNm (310). Malheureusement, les thérapies virales basées sur les ARN interférents et les miARN, bien que prometteuses, se heurtent encore à des défis importants, tels que les difficultés d'un système de délivrance ciblé, leur grande instabilité, ainsi que des effets non-ciblés ou sur des cibles non identifiées des miARN (311). Cependant, malgré ces contraintes, quelques médicaments utilisant l'interférence par ARN ont été récemment approuvés par la FDA (312), ce qui confirme le grand potentiel de l'ARN pour l'intervention thérapeutique. A ce titre, le vaccin iHIVARNA-01, basé notamment sur l'administration d'ARNm qui est actuellement en phase d'essai clinique IIa (313) est un excellent exemple des possibilités offertes par l'ARN dans la lutte contre le VIH-1.

## **2. Avantages et limites de notre analyse par séquençage de l'ARN**

Il existe plusieurs études transcriptomiques réalisées dans les lymphocytes T CD4+ infectés par le VIH-1 (314–317). Cependant, notre analyse basée sur le séquençage de l'ARN présentée dans le chapitre 5 a plusieurs nouveautés. Tout d'abord, notre analyse a été réalisée sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés *in vitro* par un virus rapporteur pour GFP à tropisme R5. L'utilisation du tropisme R5 diminue grandement le taux d'infection (par rapport à un virus X4), mais rend mieux compte de ce qui se passe *in vivo* au cours d'une infection. Ceci nous a permis de trier en deux groupes différents : les populations productivement infectées (GFP-positives), ainsi que les populations en contact avec les virus mais non infectées productivement (GFP-négatives), auquel nous avons ajoutés des cellules non infectées. De plus, nous avons réalisé un double séquençage de l'ARN pour les mêmes échantillons (miARN et ARNm) ce qui nous a permis de mettre les deux séquençages en relation l'un avec l'autre.

En revanche, notre analyse possède également de nombreuses limites. Tout d'abord, nous pouvons constater que le nombre total de miARN qui sont différentiellement régulés entre les différentes conditions dans notre analyse est faible par rapport à une analyse similaire qui avait été réalisée par notre équipe dans les macrophages (284). En effet, nous avons obtenu un total de 37 miARN dérégulés dans les cellules T CD4<sup>+</sup> productivement infectées par rapport aux cellules non infectées (17 augmentés et 20 diminués) par rapport aux 96 miARN dérégulés (40 augmentés, 56 diminués) dans le cas des macrophages (284). Ce constat est d'autant plus vrai en analysant la fraction GFP-négative où nous avons obtenu seulement 2 miARN dérégulés (1 augmenté et 1 diminué) par rapport aux cellules T CD4<sup>+</sup> non infectées. À l'inverse, c'est dans la fraction GFP-négative que la dérégulation des miARN était la plus importante dans les macrophages : 137 miARN y étaient dérégulés (56 augmentés et 81 réduits). Nous expliquons cette différence probablement en raison des différences phénotypiques et morphologiques de ces deux types cellulaires : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> possèdent un cytoplasme très restreint, il est possible que la quantité d'ARN par cellule soit donc bien plus faible. De plus, il est important de noter que la durée d'infection n'est pas similaire entre nos deux études (6 jours pour les macrophages par rapport à 2 jours pour les lymphocytes, notamment car les macrophages sont plus résistants aux effets cytopathiques du virus par rapport aux cellules T CD4<sup>+</sup>). Ainsi, il est probable que notre analyse dans les lymphocytes se focalise sur les changements très précoces dans le profil de miARN au cours de l'infection par le VIH-1. Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier si le nombre de miARN dérégulés augmente sensiblement ou non avec une durée d'infection plus longue, bien que cela soit plus difficile à mettre en place dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dû à la cytotoxicité de l'infection.

Les résultats que nous obtenons dans la fraction GFP-négative sont intéressants. L'analyse des miARN semble montrer que cette fraction est très similaire aux cellules non infectées, pourtant nous pouvons y détecter de l'ARN multi-épissé du VIH-1. Il est difficile de déterminer avec précision ce que contient cette fraction, quoique qu'il est fort probable qu'elle contienne à la fois: des cellules non infectées, des cellules en cours d'infection, des cellules où l'infection n'arrive pas à terme à cause d'un virus défectueux, ainsi que très probablement des cellules latentes. Afin de mieux

caractériser la fraction GFP-négative, une analyse de séquençage de l'ARN pourrait être utilisée à l'aide d'un virus à double fluorescence permettant de distinguer les cellules productivement infectées des cellules latentes, ce qui permettrait d'identifier de nouveaux miARN jouant un rôle dans l'établissement de la latence.

Notre analyse est basée sur le séquençage de l'ARN d'un ensemble de cellules. Cette technique est limitée, car on peut retrouver au sein d'un même type cellulaire des sous-populations avec des profils transcriptionnels uniques. Pour pallier cela, il est possible de faire du séquençage à la cellule près (*single-cell*) (318). La technique *single-cell* vient toutefois avec son lot de complications : la faible quantité d'ARN au départ peut entraîner un biais important dans l'analyse des données de l'expression de gènes faiblement exprimés. Cependant, elle permet une analyse transcriptomique à l'échelle d'une seule cellule, ce qui ouvre davantage les champs de possibilités dans l'analyse des changements de profils transcriptomiques des cellules à la suite de l'infection.

### **3. Autres ARN régulateurs**

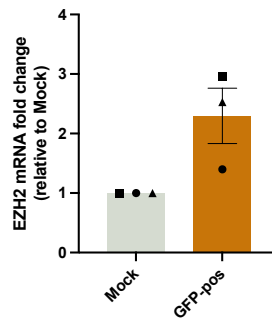
Au cours de notre étude, nous nous sommes focalisés sur les miARN. Cependant il existe d'autres types d'ARN régulateurs comme les petits ARN interférents que nous avons mentionné précédemment ou les longs ARN non-codants (lncRNA) que nous avons écarté de notre analyse à la suite du séquençage. Les lncRNA sont des transcrits de plus de 500 nucléotides et qui ne codent pas pour une protéine (319). Ils sont localisés principalement dans le noyau cellulaire où ils sont particulièrement enrichis au niveau de la chromatine (320). Bien que leur fonction ne soit pas encore totalement élucidée, il apparaît clair que les lncRNA agissent en régulant l'expression des gènes, soit par une action en *cis* sur les gènes voisins (321–323), soit par une action en *trans* quel que soit l'emplacement du gène (324,325). Comme mentionné précédemment dans la discussion de l'article n°2, le lncRNA CCR5AS contribue à la régulation post-transcriptionnelle des ARNm de CCR5 en les protégeant de la dégradation induite par les protéines Raly (289,326). Cependant, le rôle des lncRNA au sens large dans l'infection par le VIH-1 reste encore largement méconnu. Dans ce

contexte, une analyse bio-informatique des données issues de notre séquençage incluant les profils d'expressions des lncRNA dans les cellules productivement infectées par rapport aux cellules non infectées pourrait être une perspective intéressante afin de clarifier le rôle des lncRNA dans l'infection par le VIH-1. Toutefois, le défi majeur reste la caractérisation fonctionnelle des lncRNA, car contrairement aux protéines, il est impossible de prédire leur fonction à partir de leur séquence (pas de domaines fonctionnels bien définis).

#### **4. Régulation du miARN-26a**

Nous avons identifié que le miARN-26a est diminué dans les lymphocytes productivement infectés par rapport aux lymphocytes non infectés par le VIH-1. Cette diminution est associée à une augmentation de l'ARNm de CD59, qui est l'une des cibles du miARN-26a. Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous n'avons pas été en mesure de déterminer comment le miARN-26a est régulé au cours de l'infection par le VIH-1, et cela reste une question intéressante à élucider.

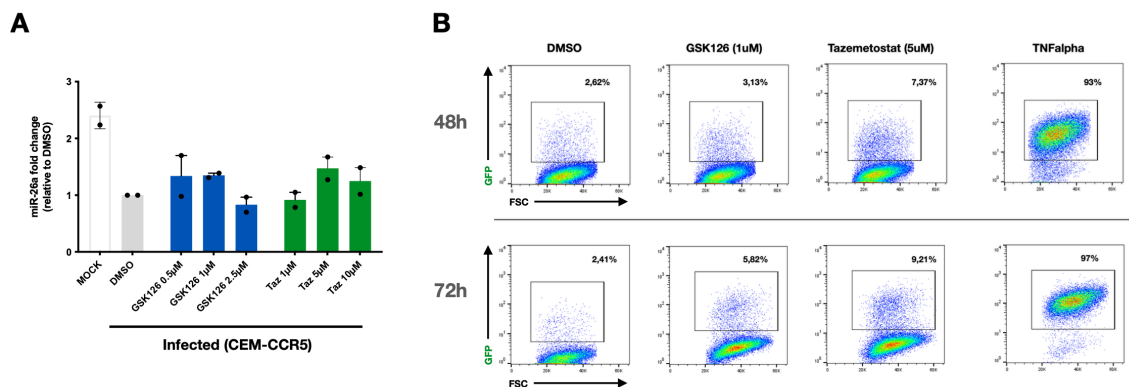
Des données dans la littérature suggère qu'il existerait une boucle de rétroaction double-négative entre EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) et le miARN-26a (327). EZH2 est une histone méthyltransférase importante dont la fonction est de triméthyliser la lysine 27 sur l'histone H3 (H3K27me3). Il est un composant clé du complexe répresseur *Polycomb 2* (PRC2), qui médie le silençage des gènes par des modification post-traductionnelle des histones (329). Ainsi, dans les cellules CD4<sup>+</sup> au repos et les cellules latentes du VIH-1, l'augmentation de l'expression d'EZH2 a été liée à l'inactivation de l'expression des gènes du VIH-1 (328,329). De façon surprenante, nos résultats indiquent une augmentation de l'ARNm de EZH2 dans les cellules productivement infectées, ce qui peut s'expliquer par le fait que notre analyse se place dans une fenêtre très courte après l'infection (48h), et pourrait suggérer une réponse intrinsèque de la cellule afin de réduire l'expression du VIH-1 ou bien un rôle de EZH2 dans l'établissement d'une infection latente plus tard au cours de l'infection.



**Figure 2 - EZH2 est augmenté dans les cellules productivement infectées par rapport aux cellules non infectées.**

Le niveau de l'ARNm de EZH2 a été quantifié par RT-qPCR dans les échantillons utilisés pour l'analyse du séquençage de l'ARN précédemment décrit.

Afin de tester si la diminution du miARN-26 au cours de l'infection par le VIH-1 est due à EZH2, nous avons utilisé deux inhibiteurs de EZH2 qui inhibent son activité de méthylation: le Tazemetostat qui est approuvé par la FDA (330,331) et le GSK126 qui est en phase 1 d'essai clinique (332,333). L'inhibition de EZH2 n'a pas contré la diminution du miARN-26a dans les cellules infectées, suggérant que EZH2 n'est pas responsable de la modulation à la baisse du miARN-26a au cours de l'infection.



**Figure 3 - Effet de l'inhibition de EZH2 sur l'expression du miARN-26.**

(A) Les cellules CEM-CCR5 ont été prétraitées pendant 24h par l'un des inhibiteurs de EZH2 ou du DMSO puis infectées avec le VIH-1 (souche NL4.3-ADA-GFP) pendant 48h (en présence des inhibiteurs). L'ARN a été extrait puis le niveau de miARN-26 quantifié par RT-qPCR. (B) L'efficacité des inhibiteurs sur la réactivation du VIH-1 a été déterminé à l'aide de la lignée cellulaire 2D10 (48h et 72h après le traitement). Cette lignée cellulaire contient un seul génome du VIH-1 (codant pour le gène indicateur GFP), silencieux sur le plan transcriptionnel mais intégré à l'ADN cellulaire.

Une analyse en profondeur du promoteur du miARN-26a permettrait sans doute d'identifier des facteurs de transcription pouvant potentiellement réguler ce miARN. Une telle analyse a déjà été réalisée pour le miARN-26b (334), mais elle reste à faire pour le miARN-26a.

## 5. Les miARN comme biomarqueurs de l'infection

Les liens entre l'expression des miARN et celle de leurs cibles dans les précédents exemples ont surtout été démontrés par des études mécanistiques en culture cellulaire *ex vivo*. Cependant, d'importants indices sur l'impact des miARN dans le contexte de l'infection par le VIH-1 peuvent être obtenus en comparant et quantifiant ces ARN chez les individus vivants avec le VIH-1, par exemple entre ceux qui contrôlent l'infection et les cas où l'infection progresse plus rapidement. La problématique d'interprétation de ces données survient de la difficulté de lier un miARN à la modulation d'un ARNm cible particulier, car ceux-ci peuvent varier selon le contexte, le tissu et le type cellulaire (335). D'un autre côté, ces études donnent la possibilité de se servir de profils d'expression des miARN pour identifier des biomarqueurs potentiels de pathogénèse.

Ainsi, Houzet *et al.* ont comparé le profil des miARN des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) d'individus vivant avec le VIH-1 avec celles d'individus non-infectés (336). Ils ont trouvé que les miARN-16, -150, -191 et -223 étaient significativement réduits dans les PBMCs de patients infectés. À ce sujet, il est intéressant de noter que le miARN-16 (qui ciblerait Pur- $\alpha$ ) est également diminué dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés de notre étude, comme nous l'avons mentionné dans l'article n°3. De plus, ils montrent également que le miARN-155, jouant un rôle important dans le maintien de la latence, était diminué dans les PBMCs d'individus infectés à faible nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et à ARN viraux élevés. En parallèle, l'étude de Duskova *et al.* a rapporté que les miR-19b, -34a, -144, -146a, -155, -382 et -615-3p, qui sont connus pour notamment cibler des facteurs inflammatoires, étaient augmentés dans les PBMCs d'individus à ARN viraux élevés (337).

Une autre étude a comparé les PBMCs de ECs (avec une charge virale très faible/indétectable) avec ceux des patients virémiques ou ceux d'individus non-infectés (338). Bien que pour de nombreux miARN, les patients ECs et virémiques partageaient des profils d'expression similaires, il a été montré que plusieurs miARN jouant un rôle dans la latence du VIH-1 étaient exprimés de manière différentielle entre les deux groupes : les miARN de la famille des miARN-29, le miARN-125b ou encore



le miARN-150. De plus, cette précédente étude met en évidence que les patients ECs avec un faible nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> avait des profils de miARN plus proches des patients virémiques que les non-infectés. Inversement, d'autres analyses suggèrent un regroupement de profils d'expression des miARN des ECs et individus non-infectés (par exemple, miARN-27a, -27b, -29b et -221 sont augmentés), par rapport aux patients virémiques et patients sous traitement antirétroviral (où les miARN-146a et miARN-155 sont diminués) (339,340). De notre côté, les résultats présentés dans le chapitre 4 de cette thèse montrent que le miARN-103 est augmenté dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> d'individus ECs par rapport aux individus infectés non traités, ce qui corrèle avec une diminution du CCR5.

Une importante variation des profils de miARN ressort de ces analyses, ce qui rend leur développement comme biomarqueurs compliqué. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations, comme par exemple, le contrôle de la virémie par les thérapies antirétrovirales. Mais il est également important de prendre compte que le niveau d'activation des cellules obtenues, ainsi que le type cellulaire étudié peuvent être très variable parmi les différentes publications. Les résultats présentés dans cette thèse montrent qu'au moins pour un miARN (miARN-103), le niveau d'expression varie considérablement selon le stade d'activation des cellules, et plusieurs études suggèrent un remodelage important du profil des miARN au cours de l'activation cellulaire (341,342). A ce sujet, l'un des points forts de notre étude est l'analyse réalisée à partir d'une population purifiée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issue d'individus vivants avec le VIH-1. Ceci qui nous a permis de déterminer le niveau d'expression du miARN-103 spécifiquement dans ses cellules cibles, excluant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes B et les monocytes présents en quantités importantes dans les PBMCs. Il est clair qu'un ensemble de candidats de miARN devra être analysé pour mettre au point un test biomarqueur valable, mais les avancées dans les techniques de séquençage et d'identification pourraient permettre d'avoir une meilleure image précise des profils des miARN afin de s'en servir comme biomarqueurs de l'infection.

## Conclusion générale et contributions de la thèse

---

Les travaux présentés dans le premier article (Chapitre 3) nous ont permis d'identifier le miARN-103, et son paralogue le miARN-107, comme régulateurs négatifs du corécepteur CCR5. Nous avons montré que la transfection d'analogues du miARN-103 dans les macrophages dérivés des monocytes (MDMs) a réduit les niveaux d'expression de CCR5 et a inhibé l'entrée du VIH-1 dépendante de CCR5, tandis que les inhibiteurs du miARN-103 ont amélioré la propagation du virus dans les MDMs infectés. Plus important, nous avons également montré que les miARN-103/107 sont régulés par le facteur de transcription p53 dans les macrophages.

Les travaux présentés dans le deuxième article (Chapitre 4) nous ont permis de pousser davantage notre étude sur le miARN-103 dans les lymphocytes. Nos travaux ont montré que le miARN-103 participe à l'augmentation transitoire du CCR5 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> activées en transition vers un état de repos. Cette augmentation transitoire du CCR5, associée à un environnement cellulaire peu favorable à l'expression des gènes du VIH-1, favorise l'établissement d'une infection latente dans ces cellules. Tout comme dans les macrophages, nous avons montré que le miARN-103 peut-être régulé par l'intermédiaire de p53 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Enfin, nous avons également montré que l'expression du miARN-103 est augmentée dans les individus contrôlant l'infection par le VIH-1 par rapport à des individus non-traités, une condition qui est associée à une diminution de l'ARNm de CCR5. Pris ensemble, ces deux chapitres confirment l'importance des stratégies dirigées contre CCR5 pour combattre l'infection et soulignent le potentiel rôle des miARNs dans ces stratégies.

Enfin, les travaux présentés dans le troisième article (Chapitre 5) nous ont permis de comparer le profil d'expression des miARNs et ARNm des lymphocytes productivement infectés (GFP-positifs), non infectés productivement (GFP-négatifs) ou non infectés. L'analyse différentielle de ces profils d'expression nous a permis d'identifier le miARN-26a comme un régulateur négatif de la protéine CD59. Nous avons montré que la transfection d'analogues du miARN-26a dans les lymphocytes

T CD4<sup>+</sup> rend les virions produits par les dites-cellules plus sensibles à la lyse médiée par le complément dépendant des anticorps. Nous avons également confirmé que cet effet est bonifié en utilisant un anticorps largement neutralisant dirigé contre la région V3 de la glycoprotéine 120 de l'enveloppe virale par rapport à des anticorps anti-VIH aux multiples épitopes.

### **Contributions de la thèse :**

- **Validation du CCR5 comme une cible du miARN-103 dans les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**
- **Identification de la participation du miARN-103 dans l'établissement de la latence : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés en transition vers un phénotype mémoire, qui sont sujet à une infection latente, réduisent leurs niveaux de p53 et du miARN-103.**
- **Identification du miARN-103 comme un éventuel biomarqueur pour les individus contrôleurs élites.**
- **Séquençage de l'ARN dans les lymphocytes productivement infectés par le VIH-1, les cellules non infectées productivement, et les cellules non infectées. Nous avons obtenu le profil des miARNs et des ARNm dans les mêmes échantillons.**
- **Validation de CD59 comme cible du miARN-26a dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**
- **Importance du miARN-26a dans les mécanismes d'évasion à la lyse médiée par le complément.**

## Références

---

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, 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*. 20 mai 1983;220(4599):868-71.
2. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 nov 1997;94(24):13193-7.
3. Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 14 nov 1997;278(5341):1291-5.
4. De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol*. mars 1990;64(3):1207-16.
5. Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. sept 1998;4(9):1032-7.
6. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. août 2009;15(8):871-2.
7. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*. 2 oct 2008;455(7213):661-4.
8. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*. 10 avr 2008;358(15):1590-602.
9. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 8 janv 1999;285(1):1-32.
10. Checkley MA, Luttmann BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*. 22 juill 2011;410(4):582-608.
11. Mateu MG. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J*. nov 2009;276(21):6098-109.
12. Fouchier RA, Simon JH, Jaffe AB, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J Virol*. déc 1996;70(12):8263-9.
13. Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*. déc 1993;67(12):7229-37.
14. Welker R, Harris M, Cardel B, Kräusslich HG. 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. *J Virol*. nov 1998;72(11):8833-40.

15. Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*. 12 juin 2008;3(6):388-98.
16. Bell NM, Lever AML. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol*. mars 2013;21(3):136-44.
17. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1986;83(14):5038-42.
18. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 25 juin 1990;265(18):10373-82.
19. Botarelli P, Houlden BA, Haigwood NL, Servis C, Montagna D, Abrignani S. N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J Immunol*. 1 nov 1991;147(9):3128-32.
20. Wang W, Nie J, Prochnow C, Truong C, Jia Z, Wang S, et al. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology*. 6 févr 2013;10:14.
21. Bernstein HB, Tucker SP, Hunter E, Schutzbach JS, Compans RW. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides. *J Virol*. janv 1994;68(1):463-8.
22. Curlin ME, Zioni R, Hawes SE, Liu Y, Deng W, Gottlieb GS, et al. HIV-1 envelope subregion length variation during disease progression. *PLoS Pathog*. 16 déc 2010;6(12):e1001228.
23. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*. 5 juill 1991;253(5015):71-4.
24. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses*. févr 2005;21(2):171-89.
25. Wyatt R, Sullivan N, Thali M, Repke H, Ho D, Robinson J, et al. Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J Virol*. août 1993;67(8):4557-65.
26. Julien JP, Lee PS, Wilson IA. Structural insights into key sites of vulnerability on HIV-1 Env and influenza HA. *Immunol Rev*. nov 2012;250(1):180-98.
27. Caffrey M. HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors. *Trends Microbiol*. avr 2011;19(4):191-7.
28. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juin 1990;87(12):4650-4.
29. Delahunty MD, Rhee I, Freed EO, Bonifacino JS. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical

glycine residues. *Virology*. 1 avr 1996;218(1):94-102.

30. Freed EO, Delwart EL, Buchschacher GL, Panganiban AT. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 janv 1992;89(1):70-4.
31. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. 22 mai 1997;387(6631):426-30.
32. Salzwedel K, West JT, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol*. mars 1999;73(3):2469-80.
33. 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. *J Virol*. juin 2008;82(11):5417-28.
34. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature*. 29 mai 1997;387(6632):527-30.
35. Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 19 nov 1987;330(6145):256-9.
36. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*. sept 2004;4(9):675-87.
37. Lovatt M, Filby A, Parravicini V, Werlen G, Palmer E, Zamoyska R. Lck regulates the threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the magnitude of the extracellular signal-related kinase response. *Mol Cell Biol*. nov 2006;26(22):8655-65.
38. 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*. 18 juin 1998;393(6686):648-59.
39. Kwong PD, Wyatt R, Majeed S, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, et al. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure*. 15 déc 2000;8(12):1329-39.
40. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 28 juin 1996;272(5270):1955-8.
41. Jansson M, Popovic M, Karlsson A, Cocchi F, Rossi P, Albert J, et al. Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 déc 1996;93(26):15382-7.
42. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 10 mai 1996;272(5263):872-7.
43. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. nov 2004;16(11):1201-10.
44. Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*. 20 sept

2013;341(6152):1387-90.

45. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* août 2001;250(2):91-104.
46. Stone MJ, Hayward JA, Huang C, E Huma Z, Sanchez J. Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int J Mol Sci.* 7 févr 2017;18(2):342.
47. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses.* mars 2007;23(3):415-26.
48. Neumann E, Khawaja K, Müller-Ladner U. G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol.* juill 2014;10(7):429-36.
49. Sattentau QJ, Moore JP. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med.* 1 août 1991;174(2):407-15.
50. 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.* 7 nov 2014;346(6210):759-63.
51. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, et al. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 19 juin 1998;280(5371):1949-53.
52. Blumenthal R, Durell S, Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J Biol Chem.* 30 nov 2012;287(49):40841-9.
53. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 18 avr 1997;89(2):263-73.
54. Esté JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet.* 7 juill 2007;370(9581):81-8.
55. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
56. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4<sup>+</sup> T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol.* 26 avr 2020;38:705-25.
57. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med.* 2002;53:557-93.
58. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol.* févr 2004;78(3):1160-8.
59. Roederer M, Raju PA, Mitra DK, Herzenberg LA, Herzenberg LA. HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28. *J Clin Invest.* 1 avr 1997;99(7):1555-64.
60. Chun TW, Chadwick K, Margolick J, Siliciano RF. Differential susceptibility of naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI. *J Virol.* juin 1997;71(6):4436-44.
61. Groot F, van Capel TMM, Schuitemaker J, Berkhout B, de Jong EC. Differential

susceptibility of naïve, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. *Retrovirology*. 17 août 2006;3:52.

62. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad*. avr 2015;1(2):59-66.

63. Joseph SB, Arrildt KT, Swanstrom AE, Schnell G, Lee B, Hoxie JA, et al. Quantification of entry phenotypes of macrophage-tropic HIV-1 across a wide range of CD4 densities. *J Virol*. févr 2014;88(4):1858-69.

64. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*. 15 mai 2014;123(20):e110-122.

65. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. nov 2015;53(5):676-88.

66. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491.

67. Parrish NF, Wilen CB, Banks LB, Iyer SS, Pfaff JM, Salazar-Gonzalez JF, 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(5):e1002686.

68. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, et al. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med*. 8 juin 2009;206(6):1273-89.

69. Shan L, Deng K, Gao H, Xing S, Capoferri AA, Durand CM, et al. Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4+ T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection. *Immunity*. 17 oct 2017;47(4):766-775.e3.

70. Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, Jamieson BD, Phair JP, Piazza P, et al. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study. *J Infect Dis*. 15 oct 2008;198(8):1104-12.

71. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin  $\alpha 4\beta 7$ , the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol*. mars 2008;9(3):301-9.

72. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 23 mai 2003;300(5623):1295-7.

73. van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. sept 2003;3(9):697-709.

74. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. août 2015;13(8):471-83.

75. Levin JG, Mitra M, Mascarenhas A, Musier-Forsyth K. Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol*. 2010;7(6):754-74.



76. Matreyek KA, Engelman A. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses*. 7 oct 2013;5(10):2483-511.
77. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. févr 2012;2(2):a006916.
78. Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature*. 10 juin 2010;465(7299):747-51.
79. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*. août 2015;13(8):484-96.
80. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. juill 2012;2(7):a006924.
81. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med*. 5 avr 1990;322(14):941-9.
82. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. avr 2012;2(4):a007161.
83. Kirschner DE, Webb GF. Understanding drug resistance for monotherapy treatment of HIV infection. *Bull Math Biol*. juill 1997;59(4):763-85.
84. Shafer RW, Vuitton DA. Highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Biomed Pharmacother*. mars 1999;53(2):73-86.
85. Margolis AM, Heverling H, Pham PA, Stolbach A. A review of the toxicity of HIV medications. *J Med Toxicol*. mars 2014;10(1):26-39.
86. Deen KC, McDougal JS, Inacker R, Folena-Wasserman G, Arthos J, Rosenberg J, et al. A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature*. 7 janv 1988;331(6151):82-4.
87. Turner S, Tizard R, DeMarinis J, Pepinsky RB, Zullo J, Schooley R, et al. Resistance of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by soluble CD4 is not due to lower affinity with the viral envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 févr 1992;89(4):1335-9.
88. Langley DR, Kimura SR, Sivaprakasam P, Zhou N, Dicker I, McAuliffe B, et al. Homology models of the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529 bound to gp120 suggest a unique mechanism of action. *Proteins*. févr 2015;83(2):331-50.
89. Song R, Franco D, Kao CY, Yu F, Huang Y, Ho DD. Epitope mapping of ibalizumab, a humanized anti-CD4 monoclonal antibody with anti-HIV-1 activity in infected patients. *J Virol*. juill 2010;84(14):6935-42.
90. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 22 août 1996;382(6593):722-5.

91. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by *ccr5delta32*. *J Biol Chem*. 5 déc 1997;272(49):30603-6.
92. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 27 sept 1996;273(5283):1856-62.
93. Roche M, Jakobsen MR, Ellett A, Salimiseyedabad H, Jubb B, Westby M, et al. HIV-1 predisposed to acquiring resistance to maraviroc (MVC) and other CCR5 antagonists in vitro has an inherent, low-level ability to utilize MVC-bound CCR5 for entry. *Retrovirology*. 7 nov 2011;8:89.
94. Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1 oct 2004;37(2):1253-62.
95. Stone ND, Dunaway SB, Flexner C, Tierney C, Calandra GB, Becker S, et al. Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2007;51(7):2351-8.
96. Hatse S, Princen K, De Clercq E, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Hernandez-Abad PE, et al. AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 1 sept 2005;70(5):752-61.
97. Zhang C, Zhu R, Cao Q, Yang X, Huang Z, An J. Discoveries and developments of CXCR4-targeted HIV-1 entry inhibitors. *Exp Biol Med (Maywood)*. mars 2020;245(5):477-85.
98. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 nov 2012;2(11):a006965.
99. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med*. 15 août 1996;125(4):257-64.
100. Lindbäck S, Thorstensson R, Karlsson AC, von Sydow M, Flamholc L, Blaxhult A, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*. 20 oct 2000;14(15):2333-9.
101. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 19 mai 2011;364(20):1943-54.
102. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. mars 2006;12(3):289-95.
103. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*. mars

1992;66(3):1354-60.

104. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. sept 2007;27(3):406-16.

105. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*. mai 2012;2(5):a006940.

106. Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*. 11 juill 2003;114(1):21-31.

107. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*. 16 mai 2003;300(5622):1112.

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*. 3 juill 2003;424(6944):94-8.

109. Malim MH. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 12 mars 2009;364(1517):675-87.

110. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 25 mai 2011;474(7353):654-7.

111. Coiras M, Bermejo M, Descours B, Mateos E, García-Pérez J, López-Huertas MR, et al. IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Rep*. 8 mars 2016;14(9):2100-7.

112. Manganaro L, Hong P, Hernandez MM, Argyle D, Mulder LCF, Potla U, et al. IL-15 regulates susceptibility of CD4+ T cells to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 oct 2018;115(41):E9659-67.

113. Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology*. 23 oct 2012;9:87.

114. Chen S, Bonifati S, Qin Z, St Gelais C, Kodigepalli KM, Barrett BS, et al. SAMHD1 suppresses innate immune responses to viral infections and inflammatory stimuli by inhibiting the NF- $\kappa$ B and interferon pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 avr 2018;115(16):E3798-807.

115. 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*. 17 avr 2008;3(4):245-52.

116. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 24 janv 2008;451(7177):425-30.

117. Sakuma T, Noda T, Urata S, Kawaoka Y, Yasuda J. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol*. mars 2009;83(5):2382-5.

118. Dafa-Berger A, Kuzmina A, Fassler M, Yitzhak-Asraf H, Shemer-Avni Y, Taube R. Modulation of hepatitis C virus release by the interferon-induced protein BST-

2/tetherin. *Virology*. 5 juill 2012;428(2):98-111.

119. Blondeau C, Pelchen-Matthews A, Mlcochova P, Marsh M, Milne RSB, Towers GJ. Tetherin restricts herpes simplex virus 1 and is antagonized by glycoprotein M. *J Virol*. déc 2013;87(24):13124-33.

120. Compton AA, Bruel T, Porrot F, Mallet A, Sachse M, Euvrard M, et al. IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe*. 10 déc 2014;16(6):736-47.

121. Yu J, Li M, Wilkins J, Ding S, Swartz TH, Esposito AM, et al. IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell Rep*. 6 oct 2015;13(1):145-56.

122. Tartour K, Nguyen XN, Appourchaux R, Assil S, Barateau V, Bloyet LM, et al. Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs. *PLoS Pathog*. sept 2017;13(9):e1006610.

123. Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol*. 2018;9:2876.

124. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. avr 2009;21(4):317-37.

125. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol*. févr 2014;16(2):185-94.

126. Browne EP. The Role of Toll-Like Receptors in Retroviral Infection. *Microorganisms*. 14 nov 2020;8(11):1787.

127. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 5 mars 2004;303(5663):1526-9.

128. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1 mai 2002;168(9):4531-7.

129. Pham TNQ, Meziane O, Miah MA, Volodina O, Colas C, Béland K, et al. Flt3L-Mediated Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells Suppresses HIV Infection in Humanized Mice. *Cell Rep*. 26 nov 2019;29(9):2770-2782.e5.

130. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. nov 2005;115(11):3265-75.

131. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 28 avr 2011;472(7344):481-5.

132. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RTR, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*. 31 juill 2014;511(7511):601-5.

133. Sedaghat AR, German J, Teslovich TM, Cofrancesco J, Jie CC, Talbot CC, et al. Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J Virol.* févr 2008;82(4):1870-83.
134. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 5 avr 2001;344(14):1058-66.
135. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* janv 2011;343(1):227-35.
136. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.
137. Stoiber H, Kacani L, Speth C, Würzner R, Dierich MP. The supportive role of complement in HIV pathogenesis. *Immunol Rev.* avr 2001;180:168-76.
138. Huber M, Fischer M, Misselwitz B, Manrique A, Kuster H, Niederöst B, et al. Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection. *PLoS Med.* nov 2006;3(11):e441.
139. Süsal C, Kirschfink M, Kröpelin M, Daniel V, Opelz G. Identification of complement activation sites in human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein gp120. *Blood.* 15 mars 1996;87(6):2329-36.
140. Ebenbichler CF, Thielens NM, Vornhagen R, Marschang P, Arlaud GJ, Dierich MP. Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. *J Exp Med.* 1 déc 1991;174(6):1417-24.
141. Bajtay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol.* 15 oct 2004;173(8):4775-8.
142. Pruenster M, Wilflingseder D, Bánki Z, Ammann CG, Muellauer B, Meyer M, et al. C-type lectin-independent interaction of complement opsonized HIV with monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* sept 2005;35(9):2691-8.
143. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* sept 1994;68(9):6103-10.
144. Shankar P, Xu Z, Lieberman J. Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. *Blood.* 1 nov 1999;94(9):3084-93.
145. Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debré P. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J Immunol.* 1 août 1999;163(3):1105-9.
146. Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, et al. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature.* 26 févr 1998;391(6670):908-11.
147. Perdomo-Celis F, Taborda NA, Rugeles MT. CD8+ T-Cell Response to HIV Infection in the Era of Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:1896.

148. Flórez-Álvarez L, Hernandez JC, Zapata W. NK Cells in HIV-1 Infection: From Basic Science to Vaccine Strategies. *Front Immunol.* 2018;9:2290.
149. Forthal DN, Finzi A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infection. *AIDS.* 13 nov 2018;32(17):2439-51.
150. Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol.* 2012;3:335.
151. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, et al. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest.* 1 juill 1998;102(1):223-31.
152. Alter G, Moody MA. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J Infect Dis.* 15 oct 2010;202 Suppl 2(Suppl 2):S315-322.
153. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* janv 2010;10(1):11-23.
154. Burton DR, Hessel AJ, Keele BF, Klasse PJ, Ketas TA, Moldt B, et al. Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juill 2011;108(27):11181-6.
155. Forthal D, Hope TJ, Alter G. New paradigms for functional HIV-specific nonneutralizing antibodies. *Curr Opin HIV AIDS.* sept 2013;8(5):393-401.
156. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 avr 2003;100(7):4144-9.
157. Bunnik EM, Pisas L, van Nuenen AC, Schuitemaker H. Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* août 2008;82(16):7932-41.
158. Rong R, Bibollet-Ruche F, Mulenga J, Allen S, Blackwell JL, Derdeyn CA. Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J Virol.* févr 2007;81(3):1350-9.
159. Rong R, Li B, Lynch RM, Haaland RE, Murphy MK, Mulenga J, et al. Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog.* sept 2009;5(9):e1000594.
160. Moore PL, Ranchope N, Lambson BE, Gray ES, Cave E, Abrahams MR, et al. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* sept 2009;5(9):e1000598.
161. Frost SDW, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, et al. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 déc 2005;102(51):18514-9.
162. Mahalanabis M, Jayaraman P, Miura T, Pereyra F, Chester EM, Richardson B, et al. Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in

- drug-naive human immunodeficiency virus controllers. *J Virol.* janv 2009;83(2):662-72.
163. Liu Y, Cao W, Sun M, Li T. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):194-206.
164. 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. *J Virol.* mai 2011;85(10):4828-40.
165. Doria-Rose NA, Klein RM, Daniels MG, O'Dell S, Nason M, Lapedes A, et al. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol.* févr 2010;84(3):1631-6.
166. Powell RLR, Kinge T, Nyambi PN. Infection by discordant strains of HIV-1 markedly enhances the neutralizing antibody response against heterologous virus. *J Virol.* sept 2010;84(18):9415-26.
167. Cortez V, Odem-Davis K, McClelland RS, Jaoko W, Overbaugh J. HIV-1 superinfection in women broadens and strengthens the neutralizing antibody response. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002611.
168. Euler Z, van den Kerkhof TLGM, van Gils MJ, Burger JA, Edo-Matas D, Phung P, et al. Longitudinal analysis of early HIV-1-specific neutralizing activity in an elite neutralizer and in five patients who developed cross-reactive neutralizing activity. *J Virol.* févr 2012;86(4):2045-55.
169. Euler Z, Schuitemaker H. Cross-reactive broadly neutralizing antibodies: timing is everything. *Front Immunol.* 2012;3:215.
170. 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.* 15 nov 2012;491(7424):406-12.
171. 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.* 6 nov 2014;515(7525):138-42.
172. 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.* 15 mai 2014;40(5):657-68.
173. Julien JP, Sok D, Khayat R, Lee JH, Doores KJ, Walker LM, et al. Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003342.
174. Krisko JF, Martinez-Torres F, Foster JL, Garcia JV. HIV restriction by APOBEC3 in humanized mice. *PLoS Pathog.* mars 2013;9(3):e1003242.
175. Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell.* sept 2003;12(3):591-601.
176. Marelli S, Williamson JC, Protasio AV, Naamati A, Greenwood EJ, Deane JE, et

- al. Antagonism of PP2A is an independent and conserved function of HIV-1 Vif and causes cell cycle arrest. *Elife*. 15 avr 2020;9:e53036.
177. Okumura A, Alce T, Lubyova B, Ezelle H, Strebel K, Pitha PM. HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology*. 30 mars 2008;373(1):85-97.
178. Dubé M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, et al. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog*. 8 avr 2010;6(4):e1000856.
179. Wildum S, Schindler M, Münch J, Kirchhoff F. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol*. août 2006;80(16):8047-59.
180. Langer S, Hammer C, Hopfensperger K, Klein L, Hotter D, De Jesus PD, et al. HIV-1 Vpu is a potent transcriptional suppressor of NF- $\kappa$ B-elicited antiviral immune responses. *Elife*. 5 févr 2019;8:e41930.
181. Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, et al. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe*. 18 nov 2010;8(5):397-409.
182. Apps R, Del Prete GQ, Chatterjee P, Lara A, Brumme ZL, Brockman MA, et al. HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation. *Cell Host Microbe*. 11 mai 2016;19(5):686-95.
183. Ramirez PW, Famiglietti M, Sowrirajan B, DePaula-Silva AB, Rodesch C, Barker E, et al. Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu results in impaired migration and chemotactic signaling within CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell Rep*. 26 juin 2014;7(6):2019-30.
184. Pham TNQ, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen ÉA. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology*. 6 févr 2014;11:15.
185. Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*. 8 oct 2015;526(7572):218-23.
186. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 22 janv 1998;391(6665):397-401.
187. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 oct 2001;98(21):12144-9.
188. Mashiba M, Collins DR, Terry VH, Collins KL. Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. *Cell Host Microbe*. 10 déc 2014;16(6):722-35.
189. Zhang X, Zhou T, Frabutt DA, Zheng YH. HIV-1 Vpr increases Env expression by preventing Env from endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). *Virology*. sept 2016;496:194-202.
190. Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, et al. HIV-



- 1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med.* janv 1998;4(1):65-71.
191. Menéndez-Arias L. Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses.* déc 2009;1(3):1137-65.
192. Onafuwa-Nuga A, Telesnitsky A. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol Mol Biol Rev.* sept 2009;73(3):451-80, Table of Contents.
193. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* nov 2012;169(2):415-29.
194. Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G, Tremblay M. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood.* 1 août 1997;90(3):1091-100.
195. Fortin JF, 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. *J Virol.* mai 1997;71(5):3588-96.
196. Barbeau B, Fortin JF, Genois N, Tremblay MJ. Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay. *J Virol.* sept 1998;72(9):7125-36.
197. Saifuddin M, Parker CJ, Peeples ME, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Ghassemi M, et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med.* 1 août 1995;182(2):501-9.
198. Saifuddin M, Hedayati T, Atkinson JP, Holguin MH, Parker CJ, Spear GT. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J Gen Virol.* août 1997;78 ( Pt 8):1907-11.
199. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* sept 2004;25(9):496-503.
200. Lukacik P, Roversi P, White J, Esser D, Smith GP, Billington J, et al. Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 févr 2004;101(5):1279-84.
201. Rudd PM, Morgan BP, Wormald MR, Harvey DJ, van den Berg CW, Davis SJ, et al. The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59. *J Biol Chem.* 14 mars 1997;272(11):7229-44.
202. Ninomiya H, Stewart BH, Rollins SA, Zhao J, Bothwell AL, Sims PJ. Contribution of the N-linked carbohydrate of erythrocyte antigen CD59 to its complement-inhibitory activity. *J Biol Chem.* 25 avr 1992;267(12):8404-10.
203. Menu E, Tsai BC, Bothwell AL, Sims PJ, Bierer BE. CD59 costimulation of T cell activation. CD58 dependence and requirement for glycosylation. *J Immunol.* 15

sept 1994;153(6):2444-56.

204. Akami T, Arakawa K, Okamoto M, Akioka K, Fujiwara I, Nakai I, et al. Enhancement of the complement regulatory function of CD59 by site-directed mutagenesis at the N-glycosylation site. *Transplant Proc.* juin 1994;26(3):1256-8.

205. Korty PE, Brando C, Shevach EM. CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation. *J Immunol.* 15 juin 1991;146(12):4092-8.

206. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.* 1999;19(3):173-98.

207. Doorduyn DJ, Bardoel BW, Heesterbeek DAC, Ruyken M, Benn G, Parsons ES, et al. Bacterial killing by complement requires direct anchoring of membrane attack complex precursor C5b-7. *PLoS Pathog.* juin 2020;16(6):e1008606.

208. Schmitz J, Zimmer JP, Kluxen B, Aries S, Bögel M, Gigli I, et al. Antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity in sera from patients with HIV-1 infection is controlled by CD55 and CD59. *J Clin Invest.* sept 1995;96(3):1520-6.

209. Hu W, Yu Q, Hu N, Byrd D, Amet T, Shikuma C, et al. A high-affinity inhibitor of human CD59 enhances complement-mediated virolysis of HIV-1: implications for treatment of HIV-1/AIDS. *J Immunol.* 1 janv 2010;184(1):359-68.

210. Yang Z, Yang J, Wang J, Lu X, Jin C, Xie T, et al. Identify Potential Regulators in HIV-1 Latency by Joint microRNA and mRNA Analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(2):569-84.

211. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 juill 1998;95(15):8869-73.

212. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature.* 7 août 2014;512(7512):74-7.

213. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 20 avr 1990;61(2):213-22.

214. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med.* sept 2011;1(1):a007096.

215. Kumar A, Darcis G, Van Lint C, Herbein G. Epigenetic control of HIV-1 post integration latency: implications for therapy. *Clin Epigenetics.* 2015;7:103.

216. Peterlin BM, Brogie JE, Price DH. 7SK snRNA: a noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(1):92-103.

217. Churchill MJ, Deeks SG, Margolis DM, Siliciano RF, Swanstrom R. HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nat Rev Microbiol.* janv 2016;14(1):55-60.

218. Cohn LB, Chomont N, Deeks SG. The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell Host Microbe.* 8 avr 2020;27(4):519-30.

219. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B,

et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* août 2009;15(8):893-900.

220. Andrade VM, Mavian C, Babic D, Cordeiro T, Sharkey M, Barrios L, et al. A minor population of macrophage-tropic HIV-1 variants is identified in recrudescing viremia following analytic treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 mai 2020;117(18):9981-90.

221. Krupkin M, Jackson LN, Ha B, Puglisi EV. Advances in understanding the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Curr Opin Struct Biol.* déc 2020;65:175-83.

222. Janssens J, Bruggemans A, Christ F, Debyser Z. Towards a Functional Cure of HIV-1: Insight Into the Chromatin Landscape of the Provirus. *Front Microbiol.* 2021;12:636642.

223. Van Lint C. Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. *Adv Pharmacol.* 2000;48:121-60.

224. Kinoshita S, Chen BK, Kaneshima H, Nolan GP. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell.* 25 nov 1998;95(5):595-604.

225. Zhou Q, Chen D, Pierstorff E, Luo K. Transcription elongation factor P-TEFb mediates Tat activation of HIV-1 transcription at multiple stages. *EMBO J.* 1 juill 1998;17(13):3681-91.

226. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol.* 1 févr 2010;184(3):1604-16.

227. Ruff CT, Ray SC, Kwon P, Zinn R, Pendleton A, Hutton N, et al. Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J Virol.* sept 2002;76(18):9481-92.

228. Clayton KL, Mylvaganam G, Villasmil-Ocando A, Stuart H, Maus MV, Rashidian M, et al. HIV-infected macrophages resist efficient NK cell-mediated killing while preserving inflammatory cytokine responses. *Cell Host Microbe.* 10 mars 2021;29(3):435-447.e9.

229. Wong ME, Jaworowski A, Hearps AC. The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages. *Front Immunol.* 2019;10:1435.

230. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, et al. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* avr 2009;83(7):3258-67.

231. Veenhuis RT, Abreu CM, Shirk EN, Gama L, Clements JE. HIV replication and latency in monocytes and macrophages. *Semin Immunol.* janv 2021;51:101472.

232. Hendricks CM, Cordeiro T, Gomes AP, Stevenson M. The Interplay of HIV-1 and Macrophages in Viral Persistence. *Front Microbiol.* 2021;12:646447.

233. Kruize Z, Kootstra NA. The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2019;10:2828.

234. McElrath MJ, Smythe K, Randolph-Habecker J, Melton KR, Goodpaster TA,

Hughes SM, et al. Comprehensive assessment of HIV target cells in the distal human gut suggests increasing HIV susceptibility toward the anus. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1 juill 2013;63(3):263-71.

235. Jambo KC, Banda DH, Kankwatira AM, Sukumar N, Allain TJ, Heyderman RS, et al. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol*. sept 2014;7(5):1116-26.

236. Ganor Y, Real F, Sennepin A, Dutertre CA, Prevedel L, Xu L, et al. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol*. avr 2019;4(4):633-44.

237. Schnell G, Spudich S, Harrington P, Price RW, Swanstrom R. Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 originates from long-lived cells in some subjects with HIV-1-associated dementia. *PLoS Pathog*. avr 2009;5(4):e1000395.

238. Cicilionyté A, Berkhout B, Pasternak AO. Assessing proviral competence: current approaches to evaluate HIV-1 persistence. *Curr Opin HIV AIDS*. 1 juill 2021;16(4):223-31.

239. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*. févr 2013;9(2):e1003174.

240. Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol*. juin 2013;21(6):277-85.

241. French AJ, Natesampillai S, Krogman A, Correia C, Peterson KL, Alto A, et al. Reactivating latent HIV with PKC agonists induces resistance to apoptosis and is associated with phosphorylation and activation of BCL2. *PLoS Pathog*. oct 2020;16(10):e1008906.

242. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the « Kill » into « Shock and Kill »: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe*. 10 janv 2018;23(1):14-26.

243. Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, Verdikt R, De Wit S, Gautier V, et al. Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front Microbiol*. 2019;10:3060.

244. Huang SH, Ren Y, Thomas AS, Chan D, Mueller S, Ward AR, et al. Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 1 févr 2018;128(2):876-89.

245. Ahlenstiel CL, Symonds G, Kent SJ, Kelleher AD. Block and Lock HIV Cure Strategies to Control the Latent Reservoir. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:424.

246. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 22 mars 2018;173(1):20-51.

247. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. janv 2009;19(1):92-105.

248. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. mai 2008;14(5):872-7.

249. Chandan K, Gupta M, Sarwat M. Role of Host and Pathogen-Derived MicroRNAs in Immune Regulation During Infectious and Inflammatory Diseases. *Front*

Immunol. 2019;10:3081.

250. Curtale G, Rubino M, Locati M. MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Front Immunol.* 2019;10:799.
251. Hirschberger S, Hinske LC, Kreth S. MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 1 sept 2018;431:11-21.
252. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 août 2006;103(33):12481-6.
253. Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* oct 2018;285(20):3695-716.
254. Jopling CL, Schütz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe.* 17 juill 2008;4(1):77-85.
255. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science.* 8 janv 2010;327(5962):198-201.
256. Kulkarni S, Savan R, Qi Y, Gao X, Yuki Y, Bass SE, et al. Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature.* 28 avr 2011;472(7344):495-8.
257. Riess M, Fuchs NV, Idica A, Hamdorf M, Flory E, Pedersen IM, et al. Interferons Induce Expression of SAMHD1 in Monocytes through Down-regulation of miR-181a and miR-30a. *J Biol Chem.* 6 janv 2017;292(1):264-77.
258. Farberov L, Herzig E, Modai S, Isakov O, Hizi A, Shomron N. MicroRNA-mediated regulation of p21 and TASK1 cellular restriction factors enhances HIV-1 infection. *J Cell Sci.* 15 avr 2015;128(8):1607-16.
259. Xu Z, Lodge R, Power C, Cohen EA, Hobman TC. The HIV-1 Accessory Protein Vpu Downregulates Peroxisome Biogenesis. *mBio.* 3 mars 2020;11(2):e03395-19.
260. Asahchop EL, Akinwumi SM, Branton WG, Fujiwara E, Gill MJ, Power C. Plasma microRNA profiling predicts HIV-associated neurocognitive disorder. *AIDS.* 24 août 2016;30(13):2021-31.
261. Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K, Rawat P, Gupta A, Hariharan M, et al. Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology.* 23 déc 2008;5:117.
262. Wang X, Ye L, Hou W, Zhou Y, Wang YJ, Metzger DS, et al. Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood.* 15 janv 2009;113(3):671-4.
263. Triboulet R, Mari B, Lin YL, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science.* 16 mars 2007;315(5818):1579-82.
264. Ruelas DS, Chan JK, Oh E, Heidersbach AJ, Hebbeler AM, Chavez L, et al. MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency. *J Biol Chem.* 29 mai 2015;290(22):13736-48.
265. Chiang K, Sung TL, Rice AP. Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by

- microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* mars 2012;86(6):3244-52.
266. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* oct 2007;13(10):1241-7.
267. Chiang K, Liu H, Rice AP. miR-132 enhances HIV-1 replication. *Virology.* 30 mars 2013;438(1):1-4.
268. Klein ME, Liroy DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci.* déc 2007;10(12):1513-4.
269. Zhang HS, Chen XY, Wu TC, Sang WW, Ruan Z. MiR-34a is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation through the SIRT1/NFκB pathway. *FEBS Lett.* 30 nov 2012;586(23):4203-7.
270. Zhang HS, Wu TC, Sang WW, Ruan Z. MiR-217 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation by down-regulation of SIRT1. *Biochim Biophys Acta.* mai 2012;1823(5):1017-23.
271. Chen XY, Zhang HS, Wu TC, Sang WW, Ruan Z. Down-regulation of NAMPT expression by miR-182 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation. *Int J Biochem Cell Biol.* févr 2013;45(2):292-8.
272. Swaminathan G, Rossi F, Sierra LJ, Gupta A, Navas-Martín S, Martín-García J. A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog.* sept 2012;8(9):e1002937.
273. Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc Biol.* nov 2006;80(5):1018-30.
274. Mallon DF, Buck A, Reece JC, Crowe SM, Cameron PU. Monocyte-derived dendritic cells as a model for the study of HIV-1 infection: productive infection and phenotypic changes during culture in human serum. *Immunol Cell Biol.* oct 1999;77(5):442-50.
275. Shen CJ, Jia YH, Tian RR, Ding M, Zhang C, Wang JH. Translation of Pur-α is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB J.* nov 2012;26(11):4755-64.
276. Battivelli E, Dahabieh MS, Abdel-Mohsen M, Svensson JP, Tojal Da Silva I, Cohn LB, et al. Distinct chromatin functional states correlate with HIV latency reactivation in infected primary CD4+ T cells. *Elife.* 1 mai 2018;7:e34655.
277. Allers K, Hütter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood.* 10 mars 2011;117(10):2791-9.
278. Lodge R, Gilmore JC, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Cohen ÉA. Regulation of CD4 Receptor and HIV-1 Entry by MicroRNAs-221 and -222 during Differentiation of THP-1 Cells. *Viruses.* 30 déc 2017;10(1):13.
279. Zhen A, Krutzik SR, Levin BR, Kasparian S, Zack JA, Kitchen SG. CD4 ligation on human blood monocytes triggers macrophage differentiation and enhances HIV infection. *J Virol.* 1 sept 2014;88(17):9934-46.

280. Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol.* juin 1996;70(6):3863-9.
281. Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, et al. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood.* 1 juill 2007;110(1):393-400.
282. Herbein G, Doyle AG, Montaner LJ, Gordon S. Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor (TNF) and IL-1 beta. *Clin Exp Immunol.* nov 1995;102(2):430-7.
283. Herbein G, Montaner LJ, Gordon S. Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. *J Virol.* nov 1996;70(11):7388-97.
284. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, et al. Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell Rep.* 3 oct 2017;21(1):141-53.
285. Lodge R, Bellini N, Laporte M, Salahuddin S, Routy JP, Ancuta P, et al. Interleukin-1 $\beta$  Triggers p53-Mediated Downmodulation of CCR5 and HIV-1 Entry in Macrophages through MicroRNAs 103 and 107. *mBio.* 29 sept 2020;11(5):e02314-20.
286. Orecchini E, Doria M, Michienzi A, Giuliani E, Vassena L, Ciafrè SA, et al. The HIV-1 Tat protein modulates CD4 expression in human T cells through the induction of miR-222. *RNA Biol.* 2014;11(4):334-8.
287. Quaranta MT, Olivetta E, Sanchez M, Spinello I, Paolillo R, Arenaccio C, et al. miR-146a controls CXCR4 expression in a pathway that involves PLZF and can be used to inhibit HIV-1 infection of CD4(+) T lymphocytes. *Virology.* avr 2015;478:27-38.
288. Heinson AI, Woo J, Mukim A, White CH, Moesker B, Bosque A, et al. Micro RNA Targets in HIV Latency: Insights into Novel Layers of Latency Control. *AIDS Res Hum Retroviruses.* févr 2021;37(2):109-21.
289. Kulkarni S, Lied A, Kulkarni V, Rucevic M, Martin MP, Walker-Sperling V, et al. CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nat Immunol.* juill 2019;20(7):824-34.
290. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402.
291. Bayraktar R, Bertilaccio MTS, Calin GA. The Interaction Between Two Worlds: MicroRNAs and Toll-Like Receptors. *Front Immunol.* 2019;10:1053.
292. Paddison PJ, Cleary M, Silva JM, Chang K, Sheth N, Sachidanandam R, et al. Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat Methods.* nov 2004;1(2):163-7.
293. Borel F, Kay MA, Mueller C. Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol Ther.* avr 2014;22(4):692-701.
294. López-Huertas MR, Morín M, Madrid-Elena N, Gutiérrez C, Jiménez-Tormo L, Santoyo J, et al. Selective miRNA Modulation Fails to Activate HIV Replication in

In Vitro Latency Models. *Mol Ther Nucleic Acids*. 6 sept 2019;17:323-36.

295. Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ribera E, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4<sup>+</sup> T subpopulations. *PLoS Pathog*. août 2019;15(8):e1007991.

296. Shaheen ZR, Christmann BS, Stafford JD, Moran JM, Buller RML, Corbett JA. CCR5 is a required signaling receptor for macrophage expression of inflammatory genes in response to viral double-stranded RNA. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1 mai 2019;316(5):R525-34.

297. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. 13 avr 2006;440(7086):890-5.

298. Reynes J, Portales P, Segondy M, Baillat V, André P, Réant B, et al. CD4<sup>+</sup> T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. mars 2000;181(3):927-32.

299. Clerici M, Butto S, Lukwiya M, Saresella M, Declich S, Trabattoni D, et al. Immune activation in africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. *Italian-Ugandan AIDS Project. AIDS*. 29 sept 2000;14(14):2083-92.

300. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*. 15 mai 2001;134(10):978-96.

301. de Lemos C, Christensen JE, Nansen A, Moos T, Lu B, Gerard C, et al. Opposing effects of CXCR3 and CCR5 deficiency on CD8<sup>+</sup> T cell-mediated inflammation in the central nervous system of virus-infected mice. *J Immunol*. 1 août 2005;175(3):1767-75.

302. Nansen A, Christensen JP, Andreasen SØ, Bartholdy C, Christensen JE, Thomsen AR. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood*. 15 févr 2002;99(4):1237-45.

303. Maier R, Akbari A, Wei X, Patterson N, Nielsen R, Reich D. No statistical evidence for an effect of CCR5-Δ32 on lifespan in the UK Biobank cohort. *Nat Med*. févr 2020;26(2):178-80.

304. Wei X, Nielsen R. CCR5-Δ32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nat Med*. juin 2019;25(6):909-10.

305. Moore JP, Kuritzkes DR. A pièce de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS*. mars 2009;4(2):118-24.

306. Olson WC, Jacobson JM. CCR5 monoclonal antibodies for HIV-1 therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. mars 2009;4(2):104-11.

307. Heredia A, Gilliam B, Latinovic O, Le N, Bamba D, Devico A, et al. Rapamycin reduces CCR5 density levels on CD4 T cells, and this effect results in potentiation of enfuvirtide (T-20) against R5 strains of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2007;51(7):2489-96.

308. Cordelier P, Morse B, Strayer DS. Targeting CCR5 with siRNAs: using recombinant SV40-derived vectors to protect macrophages and microglia from R5-



tropic HIV. *Oligonucleotides*. 2003;13(5):281-94.

309. González MA, Serrano F, Llorente M, Abad JL, García-Ortiz MJ, Bernad A. A hammerhead ribozyme targeted to the human chemokine receptor CCR5. *Biochem Biophys Res Commun*. 20 oct 1998;251(2):592-6.

310. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 15 sept 2015;4(9):e252.

311. Momin MY, Gaddam RR, Kravitz M, Gupta A, Vikram A. The Challenges and Opportunities in the Development of MicroRNA Therapeutics: A Multidisciplinary Viewpoint. *Cells*. 9 nov 2021;10(11):3097.

312. Zhang MM, Bahal R, Rasmussen TP, Manautou JE, Zhong XB. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochem Pharmacol*. juill 2021;189:114432.

313. de Jong W, Aerts J, Allard S, Brander C, Buyze J, Florence E, et al. iHIVARNA phase IIa, a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial to evaluate the safety and immunogenicity of iHIVARNA-01 in chronically HIV-infected patients under stable combined antiretroviral therapy. *Trials*. 17 juin 2019;20(1):361.

314. Wang XM, Zhang JY, Xing X, Huang HH, Xia P, Dai XP, et al. Global transcriptomic characterization of T cells in individuals with chronic HIV-1 infection. *Cell Discov*. 28 mars 2022;8(1):29.

315. Coelho AVC, Gratton R, Melo JPB de, Andrade-Santos JL, Guimarães RL, Crovella S, et al. HIV-1 Infection Transcriptomics: Meta-Analysis of CD4+ T Cells Gene Expression Profiles. *Viruses*. 4 févr 2021;13(2):244.

316. Pollara J, Khanal S, Edwards RW, Hora B, Ferrari G, Haynes BF, et al. Single-cell analysis of immune cell transcriptome during HIV-1 infection and therapy. *BMC Immunol*. 29 sept 2022;23(1):48.

317. Liao Q, Wang J, Pei Z, Xu J, Zhang X. Identification of miRNA-mRNA crosstalk in CD4+ T cells during HIV-1 infection by integrating transcriptome analyses. *J Transl Med*. 21 févr 2017;15(1):41.

318. Anaparthi N, Ho YJ, Martelotto L, Hammell M, Hicks J. Single-Cell Applications of Next-Generation Sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 oct 2019;9(10):a026898.

319. Sauvageau M. Diverging RNPs: Toward Understanding lncRNA-Protein Interactions and Functions. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1203:285-312.

320. Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*. 3 juill 2013;154(1):26-46.

321. Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell*. 24 oct 2008;32(2):232-46.

322. Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science*. 12 déc 2008;322(5908):1717-20.

323. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a

short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 31 oct 2008;322(5902):750-6.

324. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 29 juin 2007;129(7):1311-23.

325. Ørom UA, Shiekhhattar R. Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell*. 12 sept 2013;154(6):1190-3.

326. Skundric DS, Tse HY, Montgomery PC. Functional phenotypes of CCR5 on CD4+ T cells of relevance to its genetic and epigenetic associations with HIV infection. *Cell Mol Immunol*. juill 2020;17(7):680-1.

327. Zhuang C, Wang P, Huang D, Xu L, Wang X, Wang L, et al. A double-negative feedback loop between EZH2 and miR-26a regulates tumor cell growth in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. mars 2016;48(3):1195-204.

328. Friedman J, Cho WK, Chu CK, Keedy KS, Archin NM, Margolis DM, et al. Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J Virol*. sept 2011;85(17):9078-89.

329. Nguyen K, Das B, Dobrowolski C, Karn J. Multiple Histone Lysine Methyltransferases Are Required for the Establishment and Maintenance of HIV-1 Latency. *mBio*. 28 févr 2017;8(1):e00133-17.

330. Straining R, Eighmy W. Tazemetostat: EZH2 Inhibitor. *J Adv Pract Oncol*. mars 2022;13(2):158-63.

331. Julia E, Salles G. EZH2 inhibition by tazemetostat: mechanisms of action, safety and efficacy in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Future Oncol*. juin 2021;17(17):2127-40.

332. Zeng D, Liu M, Pan J. Blocking EZH2 methylation transferase activity by GSK126 decreases stem cell-like myeloma cells. *Oncotarget*. 10 janv 2017;8(2):3396-411.

333. Chen YT, Zhu F, Lin WR, Ying RB, Yang YP, Zeng LH. The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A. *Cancer Chemother Pharmacol*. avr 2016;77(4):757-65.

334. Wang H, Luo J, He Q, Yao D, Wu J, Looor JJ. miR-26b promoter analysis reveals regulatory mechanisms by lipid-related transcription factors in goat mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*. juill 2017;100(7):5837-49.

335. Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:409.

336. Houzet L, Yeung ML, de Lame V, Desai D, Smith SM, Jeang KT. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology*. 29 déc 2008;5:118.

337. Duskova K, Nagilla P, Le HS, Iyer P, Thalamuthu A, Martinson J, et al. MicroRNA regulation and its effects on cellular transcriptome in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals with distinct viral load and CD4 cell counts. *BMC Infect Dis*. 30 mai 2013;13:250.

338. Witwer KW, Watson AK, Blankson JN, Clements JE. Relationships of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients. *Retrovirology*. 12 janv 2012;9:5.
339. Egaña-Gorroño L, Escribà T, Boulanger N, Guardo AC, León A, Bargalló ME, et al. Differential microRNA expression profile between stimulated PBMCs from HIV-1 infected elite controllers and viremic progressors. *PLoS One*. 2014;9(9):e106360.
340. Reynoso R, Laufer N, Hackl M, Skalicky S, Monteforte R, Turk G, et al. MicroRNAs differentially present in the plasma of HIV elite controllers reduce HIV infection in vitro. *Sci Rep*. 1 août 2014;4:5915.
341. Teteloshvili N, Smigielska-Czepiel K, Kroesen BJ, Brouwer E, Kluiver J, Boots AMH, et al. T-cell Activation Induces Dynamic Changes in miRNA Expression Patterns in CD4 and CD8 T-cell Subsets. *Microna*. 2015;4(2):117-22.
342. Gutiérrez-Vázquez C, Rodríguez-Galán A, Fernández-Alfara M, Mittelbrunn M, Sánchez-Cabo F, Martínez-Herrera DJ, et al. miRNA profiling during antigen-dependent T cell activation: A role for miR-132-3p. *Sci Rep*. 14 juin 2017;7(1):3508.