

Université de Montréal

**Stabilité et fonctionnalité des glycoprotéines de l'enveloppe
du VIH-1 recombinant CRF01_AE : rôle de l'histidine en
position 375**

par Daria Zoubchenok

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

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

Octobre, 2016

© Daria Zoubchenok, 2016

Résumé

Les glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) sont impliquées dans une étape importante du cycle de réplication, l'entrée virale. La liaison de la glycoprotéine gp120 à CD4 contribue à la fixation du virus à la cellule cible et déclenche des changements conformationnels dans celle-ci afin de permettre à la gp120 se lier au récepteur de chimiokine CCR5 ou CXCR4.

Contrairement à tous les enveloppes du groupe phylogénétique M, qui possède une sérine à la position 375, ceux du clade CRF01_AE possèdent une histidine. Ce résidu fait partie d'une cavité "Phe43" dans laquelle le résidu 43 de CD4 fait contact avec la gp120. Ici, nous avons évalué les conséquences fonctionnelles du résidu 375 en le remplaçant par une sérine dans deux enveloppes CRF01_AE (CM244 et 92TH023), la sérine étant présente dans tous les autres clades du groupe M. Nous avons observé que la réversion de l'acide aminé 375 vers une sérine entraîne une perte de fonctions des deux Envs CRF-AE tel que mesuré par une perte de l'infectivité et leur capacité à médier la fusion cellule à cellule. Le phénotype observé était la conséquence d'une très faible interaction avec CD4, qui n'était pas le résultat d'une enveloppe défectueuse ou instable. Par conséquent, la modification de l'acide aminé en position 375 a aussi altéré la sensibilité de neutralisation du virus par sCD4, qui en était diminuée. De plus, on a observé que certaines mutations des couches topologiques du domaine interne de la gp120 ont permis un rétablissement partiel de la fonctionnalité en restaurant l'interaction avec CD4. Les niveaux d'infectivité et de fusion des mutants des couches topologiques se rapprochant des enveloppes sauvages de CRF01_AE suggèrent une coévolution entre la cavité phe43 et les résidus du domaine interne de la gp120.

Une compréhension des différences qui existent entre les enveloppes de CRF01_AE et les enveloppes de virus du groupe M, permettra d'avoir une idée sur la fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppe. Il serait possible de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans les changements conformationnels des Envs qui permettent l'évasion des anticorps dirigés contre elle. De plus, ces possibles différences dans les enveloppes de CRF01_AE pourraient être exploitées pour le développement des différentes approches vaccinales.

Mots-clés : VIH-1, CRF01_AE, glycoprotéines de l'enveloppe, cavité phe43, gp120, domaine interne

Abstract

The envelope glycoproteins (Env) from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediate viral entry. The binding of the HIV-1 gp120 glycoprotein to CD4 contributes to the attachment of the virus to the target cell and triggers conformational changes in gp120 that allow high-affinity binding to the chemokine receptor CCR5 ou CXCR4.

Contrary to all other Envs from the same phylogenetic group M, which possess a serine at position 375, the majority of CRF01_AE strains possess a histidine. This residue is part of the “Phe43” cavity, where residue 43 of CD4 engages with the gp120.

Here we evaluated the functional consequences of replacing this residue in two CRF01_AE Envs (CM244 and 92TH023) by a serine, present in all the other clades from group M. We observed that reversion of the 375 amino acid to a serine resulted in a loss of functionality of both CRF_AE Envs, as measured by a loss in infectivity and their ability to mediate cell-to-cell fusion. The observed phenotype was the result of a weak interaction with CD4, which was not due to defective processing or trimer stability of these Envs. Therefore, modification of the amino acid at position 375 has also altered the sensitivity of virus neutralization by sCD4, which was reduced. Importantly, mutation of certain residues of the gp120 inner domain layers were able to partially restore wild-type levels of infectivity and cell-to-cell fusion to both CRF01-AE H375S Envs, suggesting a co-evolution of the Phe43 cavity and the gp120 inner domain.

An understanding of the differences between the CRF01_AE envelopes and envelopes from group M presenting a serine at position 375 will provide a better knowledge about the functionality of the envelope glycoproteins. Among other things, it would be possible to identify the mechanisms involved in conformational changes of glycoproteins as well as those involved in the escape of envelope recognition by Env specific antibodies. Moreover, these possible differences in CRF01_AE envelopes could be exploited for the development of different vaccine approaches.

Keywords : HIV-1, CRF01_AE, envelope glycoproteins, phe43 cavity, gp120, inner domain

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
1. Problématique.....	1
1.1 L'épidémie du VIH/SIDA.....	1
1.2 Traitements actuels.....	1
2 Les rétrovirus.....	4
2.1 Classification.....	4
2.2 Origine.....	4
2.3 Génome.....	5
2.4 Structure.....	6
2.5 Cycle répliatif.....	7
2.6 Rôles de protéines virales.....	9
2.6.1 Rôle des protéines accessoires dans la réplication virale.....	9
2.6.1.1 Nef.....	9
2.6.1.2 Vpu.....	10
2.6.1.3 Vif.....	10
2.6.1.4 Vpr.....	11
2.7 Diversité génétique.....	11
2.7.1 Répartition géographique des clades et sous-types du VIH-1.....	12
2.7.2 Les formes recombinantes circulantes (CRF).....	13
2.7.2.1 Définition et classification des CRF.....	13

2.7.2.2 CRF01_AE.....	13
3 Les glycoprotéines de l'enveloppe.....	15
3.1 Synthèse et trafic de l'enveloppe	15
3.2 Structure de l'enveloppe	17
3.2.1 Structure de la gp120	17
3.2.2 Structure de la gp41	17
3.3 Changements conformationnels de l'enveloppe	18
3.3.1 Changements conformationnels de la gp120	18
3.3.2 Changements conformationnels de la gp41	20
3.3.3 Modulations de la conformation de l'enveloppe par les protéines virales.....	20
4 VIH-1 et le système immunitaire.....	22
4.1 Réponse immunitaire contre le VIH-1	22
4.2 Réponse immunitaire humorale contre les glycoprotéines de l'enveloppe	23
4.3 Réponse immunitaire vaccinale	25
4.3.1 Essais à base des gp120 recombinantes	25
4.3.2 Essais à base de vecteurs adénoviraux.....	26
4.3.3 Essai vaccinal RV144	27
Hypothèses et objectifs	30
Article	31
Discussion.....	68
1. La recombinaison : un mécanisme évolutif important pour CRF01_AE	68
1.1 Impact de la recombinaison sur la réplication du virus	68
1.2 Impact de la recombinaison sur l'évolution génétique	68
1.3 La recombinaison : un obstacle pour la classification	70
2. Cavité phe43 et pathogenèse : Comment la conformation de l'enveloppe peut moduler la progression de la maladie ?.....	71
2.1 Rôle potentiel de l'histidine 375 pour le changement de tropisme.....	71
2.2 Reconnaissance de l'enveloppe par les bNAbs : implications de l'histidine 375.....	72
3. Essai vaccinal RV144 : CRF01_AE la clé du succès	73
Conclusion	75

Bibliographie.....	76
Annexe I : Figures supplémentaires.....	xi

Liste des tableaux

Tableau I. Exemples d'anticorps neutralisant à large spectre et leurs sites de reconnaissance sur l'enveloppe.....	23
Tableau II. Essais vaccinaux contre le VIH-1, réalisé chez les humains, et leurs caractéristiques	28

Liste des figures

Figure 1 Organisation génomique du VIH-1.	5
Figure 2 Représentation schématique de la particule virale mature du VIH-1.....	6
Figure 3 Le cycle de réplication du VIH-1	8
Figure 4 Les différents niveaux de classification du VIH.	12
Figure 5 Organisation génomique du CRF01_AE.....	14
Figure 6 Trafic de l'enveloppe vers la membrane plasmique d'après.....	16
Figure 7 Organisation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 après clivage.	18
Figure 8 Différentes conformations adoptées par les glycoprotéines d'enveloppe lors de l'interaction avec la cellule cible durant l'entrée virale.....	21
Figure 9 Différences au niveau de l'acide aminé en position 375 de la cavité phe43 de différents alignements.	xi
Figure 10 Neutralisation des variantes de CRF01_AE par des anticorps neutralisants à large spectre.	xii
Figure 11 Modulation de la reconnaissance du virus CRF01_AE 703357 avec du sérum d'individus infectés par le VIH-1.	xiii

Liste des abréviations

ADCC : Réponse cytotoxique dépendante des anticorps (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)

ADN : Acide désoxyribonucléique

APOBEC3G : Polypeptide 3G d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm (*Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CA : Capside virale

CD4i : anticorps pouvant lier Env suite à son interaction avec CD4

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CRF : Formes circulantes recombinantes (*Circulating Recombinant Forms*)

CTL : Lymphocyte T cytotoxique (*Cytotoxic T lymphocyte*)

Env : Glycoprotéine d'enveloppe virale

ESCRT : *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

Fc : Fragment cristallisable

FDA : *Food and Drug Administration*

gp41 : Glycoprotéine de 41 kDa

gp120 : Glycoprotéine de 120 kDa

gp160 : *Glycoprotéine de 160 kDa*

HR1: *Helical heptad Repeat 1*

IN: Intégrase

LTR: *Long Terminal Repeat*

MA: Matrice

NC: Nucléocapside

Nef: *Negative factor*

NK : *Natural Killer*

NRTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (*Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor*)

NNRTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (*Non-Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitor*)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Phe43 : Phénylalanine 43

PIC : Complexe de pré-intégration (*Pre-Integration Complex*)

Pol : Polymérase

PR : Protéase

PR55^{gag} : Précurseur de gag de 55 kDa

PR160^{gag-pol} : Précurseur de gag-pol de 160 kDa

RE : Réticulum endoplasmique

RT : Transcriptase inverse (*Reverse transcriptase*)

Vif : *Virus Infectivity Factor*

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

VIH-2 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 2

VIS : Virus d'immunodéficience simienne

VIScpz : Virus d'immunodéficience simienne de chimpanzé

Vpr : *Viral protein R*

Vpu : *Viral protein U*

Remerciements

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, je souhaiterais remercier le Dr Andrés Finzi. En tant que superviseur de stage d'été, superviseur de mon cheminement honor et directeur de recherche de mon mémoire, il a su me guider et me soutenir tout au long de ce chemin périlleux qui m'a mené jusqu'ici. C'est dans son laboratoire que j'ai pu acquérir plusieurs compétences tant sur le plan académique, scientifique, professionnel, mais aussi personnel.

Je remercie également les autres membres du laboratoire et stagiaires, Halima, Nirmin, Shilei, Jonathan, Mathieu, Myriam, Jérémie et Maxime, avec lesquels j'ai partagé des heures de midi très divertissantes à rire et parler de tout et de rien.

Les travaux réalisés ici n'auraient pu être réalisés sans l'aide des divers collaborateurs ainsi que des organismes financiers. En ce sens, un merci particulier au Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) qui a financé mes études de maîtrise.

Je remercie aussi le jury d'évaluation de mon mémoire, composé de Dr Carolina Alfieri, Dr Roger Lippé et Dr Andrés Finzi. Le temps qu'ils ont consacré à fournir leurs commentaires est grandement apprécié et aura contribué à l'amélioration de ce mémoire.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : Mes parents, tous mes proches et amis, qui m'ont accompagnée, aidée, soutenue et encouragée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Finalement, réaliser une maîtrise constitue une expérience de vie unique et inoubliable pour moi. C'est avec confiance et fierté que j'en ressors grandie et prête à entreprendre les futurs défis qui se présenteront à moi.

Introduction

1. Problématique

1.1 L'épidémie du VIH/SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été identifié en 1983 comme étant l'agent étiologique responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (1, 2). À ce jour, on estime que plus de 36.7 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde et au moins 2.1 millions de personnes sont nouvellement infectées à chaque année (3). La répartition du VIH-1 est donc mondiale avec un taux d'incidence variable en fonction des différentes régions géographiques (4, 5). Des régions les plus touchées, on note les pays en voies de développement tel que l'Afrique sub-Saharienne avec plus de 25.3 millions de personnes atteintes par le SIDA (3). Grâce aux approches thérapeutiques telles que la trithérapie antivirale, on peut observer une diminution de l'incidence du VIH-1. Cependant, malgré tous les efforts les décès liés au SIDA représentent toujours un enjeu majeur pour la société. Non seulement le VIH-1 présente un poids sur le système de santé et le système économique, mais il renforce aussi les inégalités entre les pays industrialisés et les pays en voies de développement où l'accès à la thérapie antivirale est limité (3, 6-8). Ainsi, dans les pays en voies de développement tel que l'Afrique sub-saharienne, on peut y observer une baisse de la taille globale de la main-d'œuvre capable de contribuer à l'économie du pays. Ceci est le résultat d'un taux de mortalité élevé et une réduction du taux de natalité causée par l'infection par le VIH-1 (9). Finalement, la mort précoce de l'adulte à l'âge pouvant travailler et capable de reproduction sexuelle, affecte la structure de la population (7). Ceci résulte en une population de travailleurs de plus en plus jeune et une augmentation des orphelins dans la société (9, 10) .

1.2 Traitements actuels

La découverte de l'agent causal du VIH-1 et les connaissances sur le cycle répliatif ont permis un avancement majeur dans la conception d'une thérapie puissante. Aujourd'hui on dénombre 24 médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour

combattre ce virus (11). Ainsi, 17 millions de personnes bénéficient de la trithérapie antirétrovirale, ce qui représente que 45% des individus infectés par le VIH (3).

Ainsi, la thérapie actuelle contre le VIH-1 comprend une combinaison d'antirétroviraux avec au moins un médicament de la classe des inhibiteurs de la transcriptase inverse non analogues aux nucléosides (NNRTI), des inhibiteurs de la transcriptase inverse analogues aux nucléosides (NRTI) et des inhibiteurs de protéase. Une thérapie combinatoire hautement active, aussi connu sous le nom de HAART (*Highly active antiretroviral therapy*), permet de cibler plusieurs étapes du cycle de réplication du VIH-1 et réduire les risques que le virus puisse développer des résistances. Ce faisant, l'utilisation d'un traitement combinatoire comparativement à une monothérapie, a l'avantage de retarder la résistance au médicament en restreignant à plusieurs niveaux l'apparition de mutations dans la structure du virus qui lui permettrait d'échapper aux effets de la drogue. Par contre, dans certaines conditions, un virus résistant aux traitements peut émerger et causer la maladie même en présence d'antirétroviraux. Cette résistance provient de mutations génétiques qui mènent à des modifications des protéines virales visées par les antirétroviraux. Il faut aussi noter que la non adhérence au traitement est un effet facilitateur au développement de résistances aux médicaments (12). Cette non-adhérence est, entre autre, favorisée par la prise à vie des antirétroviraux et les nombreux effets secondaires allant de l'intolérance gastro-intestinale à l'augmentation de la susceptibilité à des maladies des os tel que l'ostéoporose (13).

Les individus infectés par le VIH-1 sous trithérapie profitent d'une espérance et qualité de vie nettement supérieure aux personnes non traitées grâce à la réduction considérable de la charge virale en-dessous des limites de détection de moins de 20 à 75 copies d'ARN viral par millilitre de sang dépendamment du protocole expérimental utilisé (13). Ainsi, pour la plupart des patients sous traitement, une réponse appropriée est définie par l'augmentation du taux de CD4 dans l'intervalle de 50 à 150 cellules/mm³ au cours de la première année sous trithérapie. Ceci permet le rétablissement des niveaux de lymphocytes T CD4 à un niveau physiologiquement fonctionnel, dont le seuil se situe à 500 lymphocytes T CD4 par mL, mais ces niveaux dépendent grandement de l'individu (14-19).

Cependant, en plus des problèmes d'accessibilité et adhérence, un des points faibles de HAART est qu'il ne permet pas d'éradiquer le virus de l'organisme. Le VIH-1 continue à

persister dans les réservoirs cellulaires, le protégeant du système immunitaire (20, 21). Ainsi, étant donné l'incapacité d'éradiquer le virus, plusieurs misent sur le développement d'un vaccin prophylactique afin de prévenir la transmission du VIH. À ce jour, aucun vaccin n'est approuvé par la FDA car l'efficacité des immunogènes utilisés ne démontre pas de protection suffisante contre la transmission du virus. Cependant l'essai clinique RV144 a pu se démarquer des autres vaccins, avec un corrélat de protection de 31.2 % dans les premiers mois (22, 23) et redonne de l'espoir quant à la découverte d'un vaccin prophylactique (se référer à la section 4.4).

2 Les rétrovirus

2.1 Classification

La classification primaire du VIH repose sur la nature de son génome et sur son mode de réplication. Le VIH appartient au genre des *lentivirus* de la famille des *rétroviridae*. Cette famille a la caractéristique de posséder une transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT) qui permet la formation d'un ADN bicaténaire à partir de molécules d'ARN monocaténares présentes dans la particule virale. Cet ADN bicaténaire, aussi appelé provirus, sera par la suite intégré de préférence dans les gènes transcriptionnellement actifs du génome de la cellule hôte (24-28).

De par l'organisation de son génome, le VIH-1 est subséquemment classifié dans le groupe des rétrovirus complexes. En effet, contrairement aux rétrovirus simples qui ne contiennent que des gènes structuraux essentiels, *gag*, *pol* et *env*, les rétrovirus complexes ont en plus des gènes non structuraux supplémentaires ayant des fonctions régulatrices ou auxiliaires nécessaires pour la réplication *in vivo* (29, 30). Dans ce même groupe on retrouve le virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) ainsi que le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), qui causent des maladies similaires au Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA) chez les humains et les primates respectivement.

2.2 Origine

L'apparition du VIH est le résultat de multiples transmissions inter-espèces du VIS, un virus infectant naturellement les primates africains tels que le chimpanzé et le gorille, vers les humains. L'utilisation de viande de primates en guise de nourriture et la domestication des singes auraient permis le contact nécessaire au passage du virus d'une espèce à l'autre (31). En effet, les similitudes entre le VIH et le VIS sont visibles au niveau de leur structure génomique et au niveau de leur forte proximité phylogénétique (31-33).

Le SIV provenant des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpz) serait à l'origine de multiples lignées de VIH-1 (31). En effet, SIVcpz est le virus le plus apparenté phylogénétiquement au VIH-1 et de multiples transmissions zoonotiques auraient permis

l'établissement des groupes M et N du VIH-1 (voir plus bas, section 2.2) (31, 34). Les groupes O et P sont, quant à eux, le résultat d'une transmission inter-espèce gorille à l'humain (31, 35-37).

2.3 Génome

Le VIH-1 est composé de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive qui codent pour trois gènes principaux, soit *gag*, *pol* et *env* flanquées de séquences répétées (Long Terminal Repeat; LTR) nécessaires pour l'infection productive des cellules.

Les protéines codées par ces gènes sont synthétisées sous forme de précurseurs protéiques dont un clivage enzymatique par la protéase (PR) est requis pour l'obtention de protéines virales actives à partir du précurseur gag-pol. Ainsi, la région *gag* (Pr55^{Gag}) code pour les protéines structurales de la matrice (MA), capsid (CA) et nucléocapsid (NC) ainsi que la protéine p6 et les peptides SP1 et SP2. La région *pol* code pour les protéines enzymatiques, soit la PR, la RT et l'intégrase (IN). La région *env*, quant à elle, code pour le précurseur de la glycoprotéine d'enveloppe gp160 qui est clivé par une protéase cellulaire de la famille des furines, pour former la gp120 et la gp41 (38). Le VIH-1 est un virus complexe. Ainsi, en plus des protéines communes aux rétrovirus simples, il encode plusieurs protéines de régulation ainsi que des protéines accessoires, soit Vif (*virus infectivity factor*), Vpr (*viral protein R*), Vpu (*viral protein U*), Nef (*negative factor*), Tat et Rev (Figure 1).

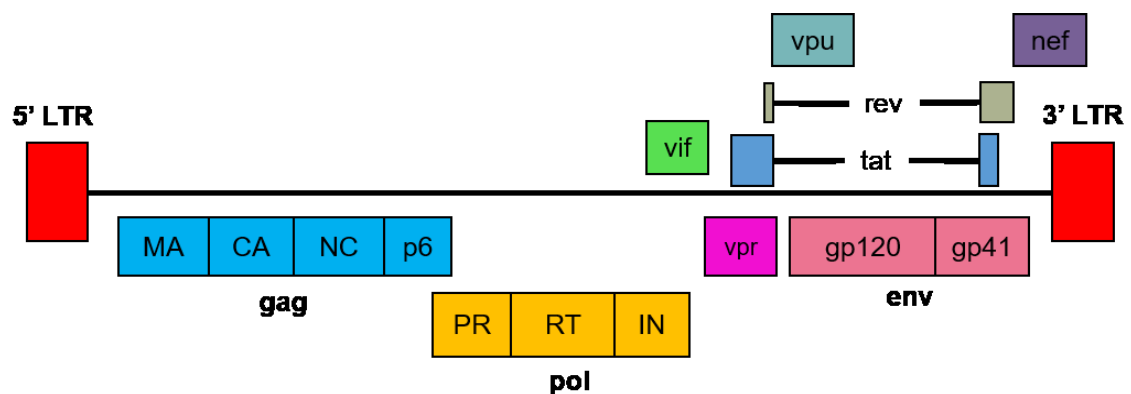


Figure 1 Organisation génomique du VIH-1.

2.4 Structure

Le VIH-1 forme des particules virales sphériques de taille variant entre 80 et 120 nm de diamètre. Ces particules virales sont composées de protéines de structure et renferment des enzymes nécessaires à leur propagation (Figure 2).

Au sein du virion, un cône cylindrique, formé de la protéine CA, renferme deux brins d'ARN monocaténaire de polarité positive, formant le génome viral, qui sont associés à des protéines de la NC. La NC permet de faciliter les réarrangements de l'ARN durant la retranscription. On y retrouve aussi la RT permettant de former un brin d'ADN bicaténaire à partir des molécules d'ARN monocaténaire lors de l'infection et l'IN qui intégrera ce provirus dans le génome de l'hôte. La particule virale renferme aussi une PR de même que des protéines de l'hôte. Par exemple, la protéine cellulaire Cyclophilin A est incorporée dans la particule virale et est nécessaire à la réplication virale via une interaction avec le domaine CA de la polyprotéine Gag (39, 40).

Finalement, une enveloppe dérivée de la membrane bilipidique d'origine cellulaire, acquise lors du bourgeonnement de la particule virale, entoure le tout. La couche intérieure lipidique de la membrane est tapissée de protéines de la matrice tandis que sa couche externe possède des protéines membranaires et transmembranaires d'origine virale qui forment les glycoprotéines de l'enveloppe (Env).

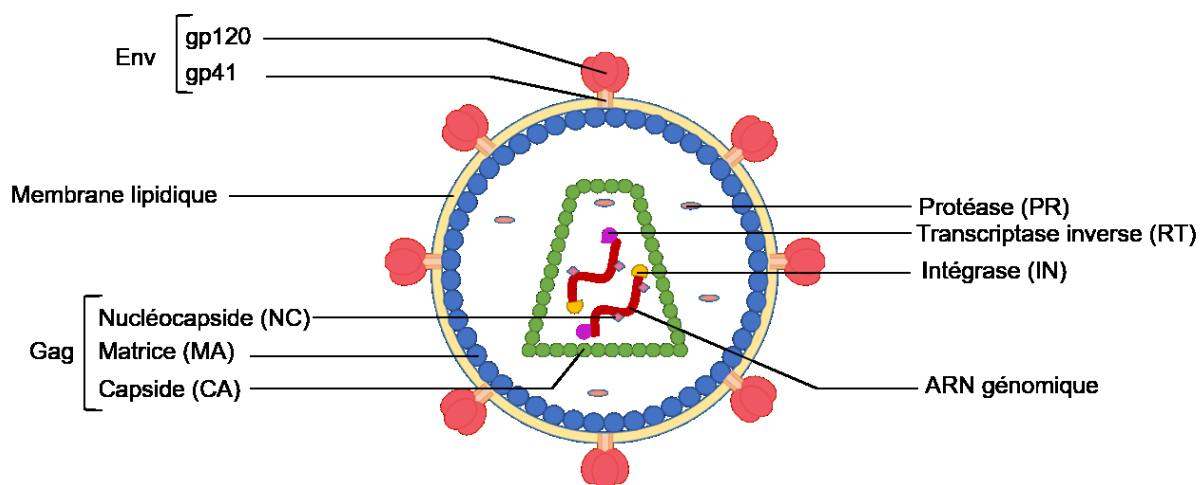


Figure 2 Représentation schématique de la particule virale mature du VIH-1

2.5 Cycle répliatif

La transmission du VIH-1 se produit au niveau des muqueuses, par voie sanguine ou de la mère à l'enfant (transmission verticale) (41-43). Le cycle de répliation du VIH-1 est représenté dans la Figure 3. La phase précoce débute par l'entrée virale, qui a lieu à la surface de cellules exprimant le récepteur CD4 et le récepteur de chimiokines CCR5 ou CXCR4, telles que les lymphocytes T auxiliaires, les macrophages et les cellules dendritiques (44-53), qui les rendent susceptibles au virus. En premier lieu, le virus fait contact avec la cellule cible via l'interaction de la glycoprotéine 120 (gp120) avec CD4. Ceci induit des changements conformationnels exposant la région variable 3 (V3) (54, 55) qui interagit avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4 selon le tropisme du virus (R5 ou X4 respectivement) (56, 57). Cette dernière interaction entraîne d'autres changements conformationnels qui permettent l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane cellulaire suivie par la formation d'une structure à six hélices chez la gp41 qui permet le rapprochement et la fusion des deux membranes lipidiques (58, 59).

Subséquentement, le core viral, défini comme étant la structure qui reste après que la bicouche lipidique soit éliminée, est relâchée dans le cytoplasme de la cellule. La décapsidation permet la relâche de l'ARN viral, qui est en complexe avec les protéines virales NC, RT, PR, Vpr, MA et IN (60). De manière concomitante à la décapsidation débute la retranscription du génome virale (ARN simple brin) en un ADN double brin (ADNv) qui est achevée dans le cytoplasme. L'ADNv ainsi formé est maintenu dans un complexe de pré-intégration (PIC) avec MA, IN, Vpr et est acheminé par les pores nucléaires au noyau, afin d'être intégré dans le génome de la cellule hôte par l'IN virale (61, 62). Le provirus intégré sert de matrice pour la transcription de l'ARN. La transcription est initiée par le transactivateur Tat et des facteurs cellulaires (NF- κ B et NFAT [*nuclear factor of activated T cells*]). Ces facteurs lient la séquence promotrice dans la région 5' LTR afin de recruter la polymérase cellulaire II (ARN Pol II) et initier la transcription des gènes (63-66). Ainsi, il y aura la formation d'ARN non épissés pour l'encapsidation dans les nouveaux virions ou d'ARNm pour la formation de protéines virales dans une phase tardive. Étant donné que les cellules eucaryotes ne peuvent exporter des ARNs non épissés en dehors du noyau, le VIH-1 encode la protéine Rev qui est responsable de ce transport (67). Rev lie les ARNm non épissés dans une région hautement structurée appelé RRE

(Rev responsive élément) (68). Par la suite, la région de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localisation signal*) de Rev permet son transport vers le noyau où REV recrute les protéines cellulaires (CRM1 et Ran liées à GTP) et l'ARNm (mono-épissés ou non-épissés) afin de former un complexe pouvant traverser les pores nucléaires et relâcher l'ARNm dans le cytoplasme (69-73).

L'assemblage de nouvelles particules virales se produit lorsque le précurseur de Gag Pr55^{Gag} et le précurseur de Gag-Pol Pr160^{gag-pol} sont synthétisés et se localisent dans le domaine de la membrane plasmique des cellules infectées par l'ARN génomique virale (74-77). L'assemblage spécifique des ARN rétroviraux dans des particules virales est médiée par des interactions des signaux d'encapsulation ψ et le domaine NC de Gag.

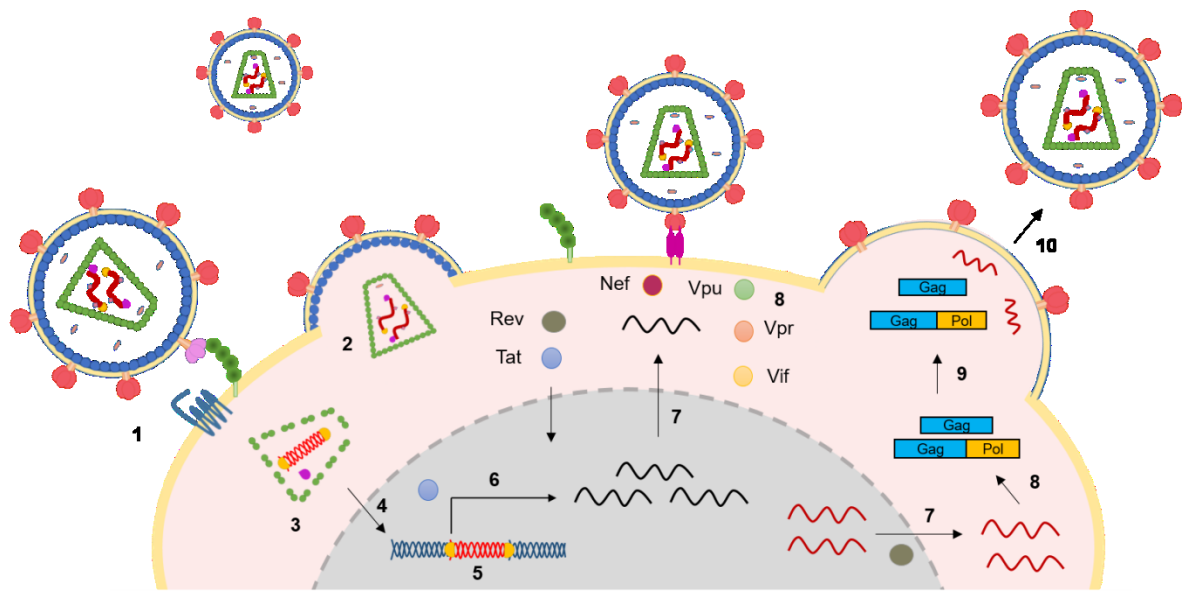


Figure 3 Le cycle de réplication du VIH-1

Représentation schématique des étapes du cycles répliatif viral, de l'entrée au bourgeonnement du VIH-1 : **1)** l'attachement du virus a la cellule cible, **2)** fusion des membranes virale et cellulaire et relargage de la capside dans le cytoplasme, **3)** transcription inverse, **4)** translocation du PIC vers le noyau, **5)** intégration du provirus dans le génome, **6)** transcription des ARNm viraux, **7)** export des ARNm (ARNm épissé en noir ou non-épissé en rouge), **8)** traduction des protéines virales, **9)** assemblage, **10)** relâche et maturation du virus.

Suite à l'assemblage, les particules virales nouvellement formées sont relâchées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement. A cette étape, le sous-domaine p6 du précurseur Gag permet le recrutement de la machinerie ESCRT, occasionnant la fission de la membrane plasmique pour former les nouvelles particules virales (76-78). Le VIH-1 peut aussi se propager par contact cellule à cellule via la formation de synapses virologiques. Ceci peut résulter dans la formation de syncytium, soit la fusion des membranes de plusieurs cellules en une seule cellule multi-nucléée (79-82).

Pendant l'assemblage et la relâche des particules virales, celles-ci entreprennent un processus de maturation afin de rendre les particules virales infectieuses (83, 84). PR clive les précurseurs polyprotéiques Gag et GagPol afin de générer les protéines virales MA, CA, NC, p6, PR, RT et IN. Ceci entraîne des réarrangements structuraux qui résultent en la formation de la capsidie conique caractéristique des rétrovirus (85-87).

2.6 Rôles de protéines virales

Les gènes accessoires du VIH sont exprimées tout au long du cycle du virus et régulent plusieurs aspect de la réplication du virus, y compris l'infectivité (Vif et Nef), l'expression des gènes viraux et cellulaire (Vpr, Nef et Vpu), la production de nouvelles particules virales (Vpu) ainsi que la modulation de la conformation de l'enveloppe (Nef et Vpu). Bien qu'accessoires *in vitro*, leur rôle est absolument essentiel *in vivo* car ils ciblent souvent des facteurs de restriction de la cellule hôte.

2.6.1 Rôle des protéines accessoires dans la réplication virale

2.6.1.1 Nef

Nef est une protéine sans activité enzymatique qui interfère avec plusieurs voies de signalisation impliquées dans le trafic de protéines cellulaires. Premièrement, elle est responsable de la réduction de l'expression de surface du récepteur CD4 par l'augmentation de son internalisation en recrutant la protéine adaptatrice associée à la clathrine AP2, qui participe au transport vésiculaire de la voie endocytaire (78-83). Ainsi, le virus évite la superinfection de la cellule de même que l'incorporation de CD4 dans les virions nouvellement produits, ce qui peut provoquer une interaction Env-CD4 précoce (84, 85). Nef interfère aussi avec l'expression des complexes

d'histocompatibilité de classe I et II grâce à sa rétention dans le golgi pour le CMH-I (HLA-A et HLA-B seulement) et l'augmentation de CMHII immature et la modulation à la baisse de CMH-II mature dans le cas du CMH-II (86-88). Ainsi le virus est protégé d'une part contre la réponse cellulaire cytotoxique et limite l'exposition d'antigènes viraux à la surface des cellules infectées.

2.6.1.2 *Vpu*

La protéine transmembranaire Vpu de 81 acides aminés joue son rôle tardivement dans le cycle répliatif. Présente exclusivement dans le VIH-1, à l'exception de deux SIV (SIVcpz et SIVgsn)(32, 89), elle a deux fonctions importantes pour la réplication du virus. Tout comme Nef, Vpu cible CD4 pour induire sa dégradation. Cependant, contrairement à Nef, Vpu ne peut qu'induire la dégradation de CD4 nouvellement synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE). L'interaction avec CD4 de même que la phosphorylation des serines S52 et S56 est essentielle à la fonction de Vpu pour le recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase responsable de la poly-ubiquitination de la queue cytoplasmique de CD4, qui le cible alors pour la dégradation protéasomale associé au RE (90-96) .

De plus, Vpu antagonise BST2/Tetherine. BST2 est un facteur de restriction cellulaire induit par la réponse interféron qui inhibe la relâche des particules virales nouvellement formées. Vpu augmente la relâche de particules virales en diminuant les niveaux de BST-2 à la surface cellulaire et en bloquant l'incorporation de BST2 au niveau des virions, soit par la séquestration intracellulaire dans le trans-golgi ou par la dégradation lysosomale de BST2 (97-102).

2.6.1.3 *Vif*

Le facteur viral Vif est essentiel pour la réplication du VIH-1 dans certains types de lymphocytes et les macrophages (103-105). Ces cellules codent pour un facteur de restriction APOBEC3G, une cytidine désaminase, qui induit les mutations cytidine à uracil dans l'ADN simple brin. Lors de la formation de la particule virale, ce facteur est intégré et cause des mutations au virus lors de l'étape de reverse transcription (106-108). Une forte accumulation de mutations cytidine à uracyl peut résulter en particules non fonctionnelles et déstabiliser la RT lors de la formation du provirus (109-111).

Afin de protéger l'intégrité du génome, la protéine Vif du VIH-1 empêche l'incorporation d'APOBEC3G en ciblant la protéine au protéasome où elle y sera dégradée (112, 113).

2.6.1.4 Vpr

La Vpr, tout comme Vif, est incorporée dans les particules virales. Unique aux lentivirus, elle possède des fonctions variées. Vpr a un rôle nécessaire pour la réplication du virus dans des cellules qui ne se divisent pas, telles que les macrophages (114). Dans ces cellules, l'importation nucléaire du complexe de pré-intégration du VIH-1 est facilitée par Vpr qui facilite la translocation du PIC dans le noyau (115-117). Vpr induit aussi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 dans des cellules qui peuvent proliférer et stimule la transcription virale en liant la séquence promotrice du LTR (118-121). Ces deux activités de Vpr induisent l'apoptose dans les cellules infectées (122, 123).

2.7 Diversité génétique

Plusieurs facteurs contribuent à la grande hétérogénéité génétique et antigénique du VIH-1. Ceci est en partie due à la transcriptase inverse peu fidèle, qui ne possède pas de mécanisme de correction et qui engendre de 1 à 2×10^{-5} mutations/nucléotide/cycle de réplication dans un système de culture *in vitro*, soit plus de 5×10^{-5} chez l'individu infecté (124). La RT permet aussi de faire des recombinaisons du génome viral résultant dans le remaniement génétique de l'ARN génomique viral. De plus, une cellule infectée produit un très grand nombre de particules virales, soit environ 10^{11} particules par jour (125). Combiné au nombre croissant d'individus infectés, la grande diversité du VIH-1 ne cesse d'augmenter.

Ainsi, un très grand nombre de souches virales a pu être identifié. Le VIH-1 est alors classé en 4 groupes d'isolats, soit le groupe M (pour *Main*), N (pour *non-M, non-O*), O (pour *Outlier*) et P (pour *Pending*). D'autres analyses phylogénétiques permettent de diviser le groupe principal M en neuf clades (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et multiples formes recombinantes circulantes (*circulating recombinant forms, CRF*) (126) (Figure 4).

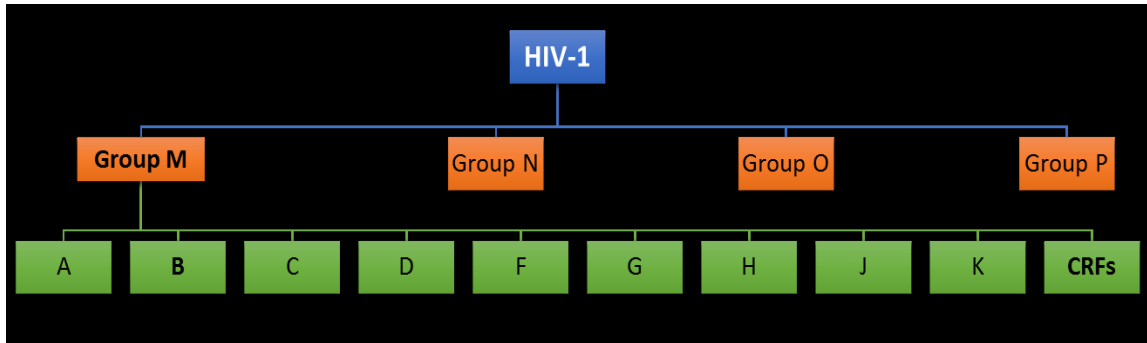


Figure 4 Les différents niveaux de classification du VIH.

2.7.1 Répartition géographique des clades et sous-types du VIH-1

Bien que l'épidémie du VIH-1 soit globale, une distribution inégale des différents groupes et clades peut être observée géographiquement. Ainsi, on peut observer la dominance de certains sous-types dans différentes régions du monde.

Globalement, les clades A, B et C dominent les infections dans le monde. Le clade A est dominant dans l'Afrique centrale, l'Afrique de l'ouest et l'Europe de l'est, tandis que l'Afrique du Sud et l'Inde sont, quant à elles, plus affectées par le clade C. Le clade B a une répartition beaucoup plus étendue. On le retrouve en Amérique du Nord et Sud, dans certaines régions de l'Europe, de l'Orient et de l'Asie. Le groupe M, comprenant le clade B, est responsable de la grande majorité de la présente pandémie. Ce groupe comprend 98% des souches en circulation (127, 128).

Il est aussi intéressant de remarquer que seule l'Afrique sub-saharienne n'a pas de souche dominante et qu'on retrouve la plus grande diversité de clades (aussi nommés sous-types) du VIH-1. De plus les groupes N, O et P sont exclusivement présents en Afrique.

Finalement, les souches CRF prennent de plus en plus d'importance. CRF01_AE est maintenant la forme dominante de l'Asie du Sud (129-131) et CRF01_AG de l'Afrique de l'ouest (132, 133).

2.7.2 Les formes recombinantes circulantes (CRF)

2.7.2.1 Définition et classification des CRF

Les formes recombinantes circulantes sont le résultat de multiples infections au sein d'un même individu. Lors de la co-infection de la même cellule, la production de virions hétérozygotes (encapsidation non sélective des ARN génomiques), puis l'infection de nouvelles cellules par ces virions, favorise la recombinaison entre les deux différentes copies d'ARN génomique (134). L'utilisation des deux ARN en alternance par la RT permet la génération d'une molécule d'ADN chimérique, et la création de virus recombinants (135-137). Afin d'être classé en tant que CRFs, un recombinant de deux clades différents doit avoir été isolé et séquencé dans au moins deux individus non épidémiologiquement reliés (138). À ce jour, la banque de données *Los Alamos HIV Database* (139), répertorie plus de 26 types de CRF caractérisés. Les CRFs regroupent aussi les doubles et triples recombinants appelés des CRF complexes (CRF_cpx).

2.7.2.2 CRF01_AE

Depuis la première apparition du sous-type CRF01_AE, ce virus est devenu la souche dominante dans de nombreux pays asiatiques, dont la Chine du Sud (140-142). De façon générale, l'Asie du Sud est particulièrement touchée par les CRFs. Au cours de la dernière décennie, une prévalence croissante du sous-type CRF01_AE a été observée et représente 42,5% de toutes les infections nationales en Chine en 2007 (140) et plus de 95% en Thaïlande en 2004 (4).

Tel que schématisé dans la Figure 5, le CRF01_AE possède un génome mosaïque composé de la région *gag-pol* et de la plupart des gènes accessoires provenant du clade A et le gène *env* provenant du clade E (143). Curieusement, aucune souche 100% E (parentale) n'a été identifiée à ce jour (143). En fonction de la nouvelle nomenclature (137) cette souche recombinante aurait dû être classifiée comme CRF01_AU, dont U signifie non classifié (*unclassified*).

L'infection par un CRF01_AE est associée à une charge virale plus élevée et un temps de survie plus court, comparé à l'infection par des virus de clade B (144-146); mais les causes sous-jacentes de ces différences restent inconnues. De plus, la progression de la maladie dans

une population implique d'autres facteurs, tel que l'environnement, et ceux-ci varient grandement entre les pays. Ainsi, la comparaison de plusieurs types de virus quant à la progression de la maladie est controversée à cause des facteurs confondants.

D'autres différences biologiques ont aussi été observées au niveau moléculaire. Le promoteur (LTR) des CRF01_AE est beaucoup plus actif que celui du clade B et aurait un impact considérable sur la réplication virale (147). Ceci a aussi été observé lors de l'isolation de trois virus d'un patient infecté par deux souches de clade B puis par un virus de clade CRF01_AE. Dans ce cas particulier, CRF01_AE présentait la plus grande transcription initiée par le LTR comparativement aux deux autres virus (148).

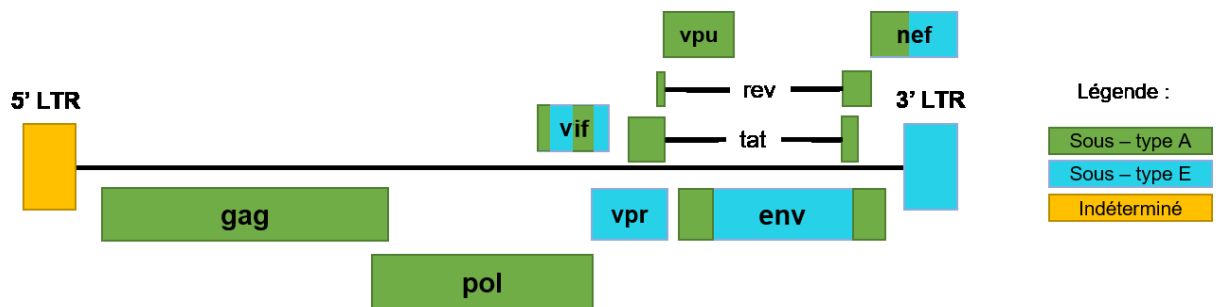


Figure 5 Organisation génomique du CRF01_AE.

Adapté de Los Alamos National Laboratory. HIV sequence database. Avril 2016 (139)

3 Les glycoprotéines de l'enveloppe

Les glycoprotéines de l'enveloppe possèdent un rôle central dans le cycle répliatif ainsi que dans la pathogénèse du virus. Tel que décrit précédemment, Env initie l'entrée du virus dans la cellule. De plus c'est la seule protéine exposée à la surface contre laquelle une réponse immunitaire peut être exercée afin de prévenir l'entrée ou la dissémination. Par conséquent, le virus accorde une très grande importance quant à la structure et la régulation de celle-ci.

3.1 Synthèse et trafic de l'enveloppe

Les glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme d'un précurseur nommé glycoprotéine 160 (gp160) codé par un ARNm polycistronique *vpu/env* (149, 150) (Figure 6). Le précurseur contient une séquence signal dans sa partie N terminal qui la cible à la membrane du RE. Ce peptide signal est éliminé par une peptidase cellulaire. Le domaine transmembranaire de la gp41 prend le relais afin de retenir la protéine à la membrane (151, 152). Le précurseur subi aussi plusieurs glycosylations post-traductionnelles par l'ajout d'oligosaccharides riches en mannose (153-156).

Le transport des gp160 par le réseau trans-golgi induit une trimérisation de l'enveloppe de même qu'un clivage par des protéases cellulaires de la famille des furines (38). Le trimère clivé est alors composé de l'hétérodimère constitué de la sous-unité transmembranaire gp41 liée à la protéine de surface gp120 par un lien non covalent (157-160).

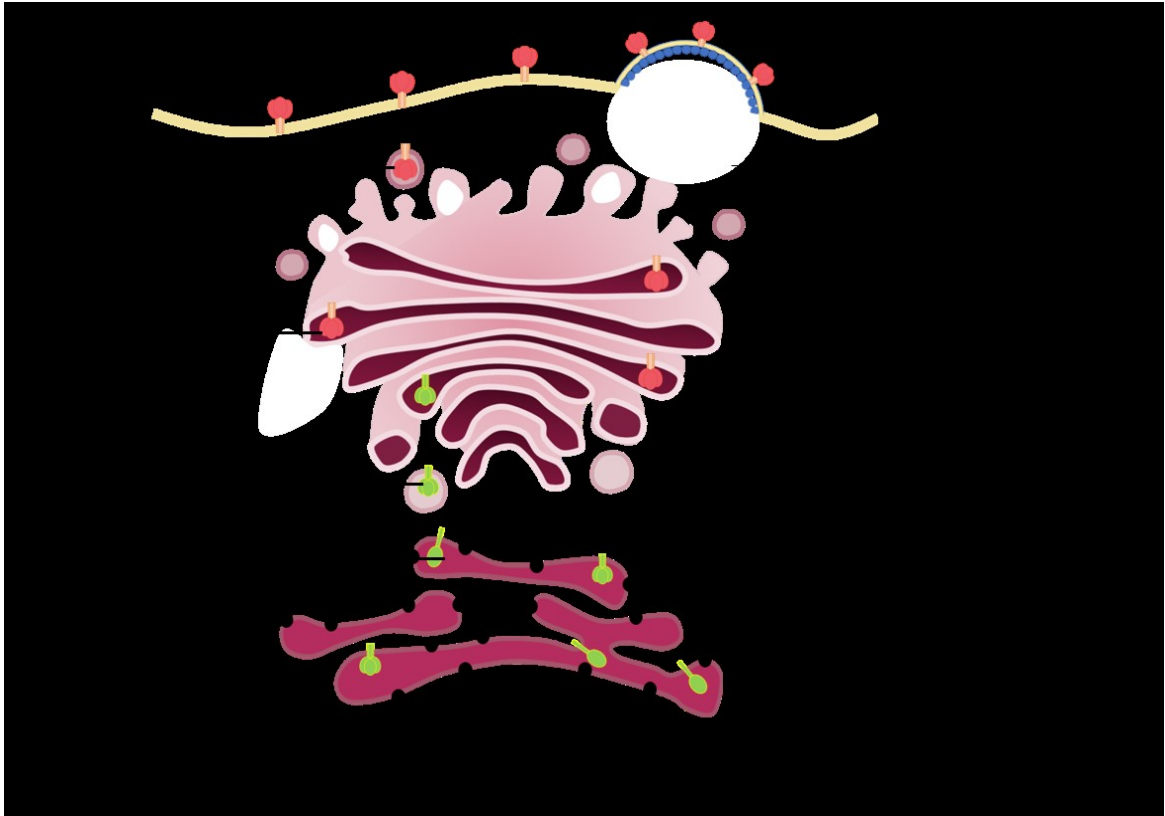


Figure 6 Trafic de l'enveloppe vers la membrane plasmique.

Adapté de Checkley, Luttge et Freed. *J Mol Biol.* Juillet 2011 (161)

Représentation schématique du trafic de l'enveloppe du RER à la surface de la membrane cellulaire avec les modifications qu'elle subit.

3.2 Structure de l'enveloppe

3.2.1 Structure de la gp120

La protéine de surface gp120, dont le rôle d'interaction avec CD4 est primordial, possède une structure définie et conservée, mais à la fois malléable (se référer à la section 3.3). La gp120 est composée de cinq régions variables (V1 à V5) intercalées par cinq régions constantes (C1 à C5) (162). Une fois la protéine repliée, ces régions forment des structures définies décrite ci-dessous (Figure 7).

Le domaine interne rassemble trois couches topologiques [*layers*] qui émanent d'une région composée de feuillet beta appelé *beta sandwich* (158-160). Ces couches topologiques interagissent ensemble et jouent un rôle important dans l'interaction avec CD4. Le feuillet de pontage, quant à lui, permet de stabiliser le trimère et l'interaction gp120-gp41 en reliant le domaine interne au domaine externe (159, 163).

3.2.2 Structure de la gp41

La gp41 est la portion transmembranaire du trimère qui permet la fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire. La gp41 est composée du domaine cytoplasmique, du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine dans la région N-terminale.

La gp41 permet d'ancrer le trimère aux membranes cellulaire via son domaine transmembranaire. Ainsi, un motif d'internalisation permet de restreindre la quantité de Env à la surface afin d'éviter une reconnaissance par le système immunitaire (164-166). Exposé à l'extérieur de la particule virale, l'ectodomaine possède le mécanisme fusogénique. Il est composé d'un peptide de fusion et de deux hélices alpha avec le potentiel de former deux régions de répétition heptade complémentaires (HR1 et HR2) afin de permettre la fusion (167). Finalement, la région proximale à la membrane, dénommée MPER (*membrane-proximal external region*), fait le lien entre HR2 et le domaine transmembranaire.

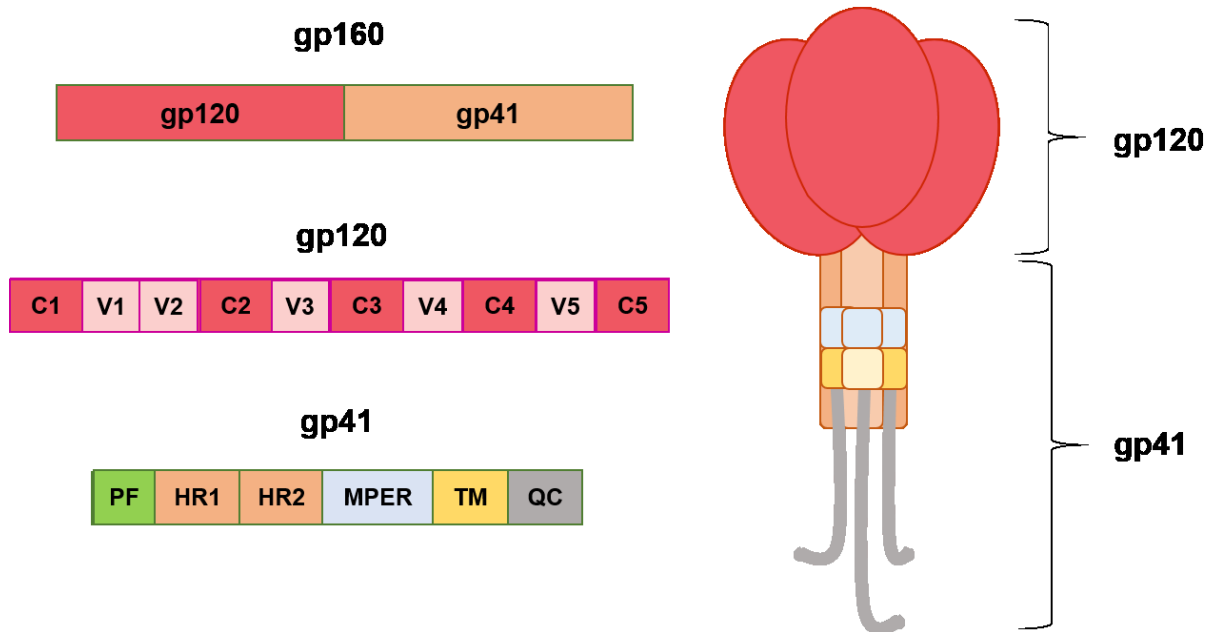


Figure 7 Organisation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 après clivage.

Schéma illustrant l'organisation de la gp120 et gp41. PF : peptide de fusion, HR1 : *heptad repeat 1*, HR2 : *heptad repeat 2*, MPER : *membrane-proximal external region*, TM : domaine transmembranaire, QC : queue cytoplasmique.

3.3 Changements conformationnels de l'enveloppe

3.3.1 Changements conformationnels de la gp120

La glycoprotéine de l'enveloppe est une protéine métastable qui peut changer de conformation. En effet, des changements conformationnels de l'enveloppe peuvent être observés en fonction de l'état de liaison avec son récepteur CD4. Sous forme native la glycoprotéine de l'enveloppe est fermée. Dans cette conformation, sans liaison avec CD4, il n'y a pas d'exposition des domaines internes de la gp120, des régions variables V1, V2, V3 ainsi que du site de liaison au co-récepteur (situé dans la V3). Cependant, suite à l'interaction avec le récepteur CD4, l'enveloppe adopte une conformation plus ouverte pour permettre l'exposition du site de liaison au co-récepteur. Ainsi, plusieurs éléments de la gp120 se replient en formant plusieurs liens afin de moduler et aider à l'établissement des différentes conformations.

Premièrement, les études structurales des enveloppes isolées de virus adaptés en laboratoire ainsi que des enveloppes de virus d'isolats primaires ont permis de déterminer les régions de contact entre la gp120 et CD4. Il a alors été démontré que CD4 interagissait à l'interface de trois domaines essentiels, soit le domaine interne, le domaine externe et le feuillet de pontage [*bridging sheet*] (168). Cette région conservée, nommée cavité phe43, forme une poche hydrophobique permettant l'insertion du résidu phénylalanine en position 43 du CD4. Suite à l'interaction avec CD4, un réarrangement des régions variables V1 et V2 se produit et occasionne l'exposition de la boucle variable 3 (V3) afin d'exposer le site de liaison au corécepteur (54, 55).

Les changements conformationnels d'Env peuvent être influencés par des altérations de cette cavité, et ces changements impliquent des résidus conservés. L'acide aminé en position 375 semble avoir un rôle majeur au niveau de cette cavité. En effet, une substitution de la sérine en position 375 par un tryptophane altère la conformation de la gp120 prédisposant l'Env à assumer spontanément une conformation liée à CD4 (169). En accord avec le rôle important de la conformation de l'enveloppe dans l'interaction avec CD4 (159, 169-171) une récente étude *in vivo* utilisant le modèle simien de l'immunodéficiência humaine (SHIV) chez les macaques rhésus a montré que le remplacement du résidu 375 par les grands acides aminés hydrophobes ou basiques améliore l'affinité d'Env pour CD4 et permet au virus de mieux entrer dans les cellules cibles, notamment les lymphocytes T CD4 du macaque (172).

En plus de la cavité Phe43, d'autres éléments de la gp120 jouent un rôle dans l'interaction avec CD4 et les changements conformationnels. En effet, les trois couches topologiques situées dans le domaine interne de la gp120 affectent l'interaction avec CD4 et les changements conformationnels ultérieurs. Ces couches topologiques permettent de conserver CD4 en place d'une part en exposant le domaine de liaison à CD4 (couche topologique 3) par la stabilisation de la cavité phe43 et d'autre part en stabilisant le complexe en empêchant la dissociation de CD4 (interaction entre les couches topologiques 1 et 2) (159, 170, 173).

Les changements conformationnels ont une importance non seulement sur la fonctionnalité de l'enveloppe mais aussi pour la protection de certains épitopes qui pourraient être reconnus par des anticorps. En effet, la réponse immunitaire naturelle dirigée contre le virus n'est pas capable de contrôler la réplication virale. Une très grande variabilité, un bouclier de

glycan (174-179) et l'exposition de région variables (180, 181) ne permettent pas une bonne reconnaissance d'Env par les anticorps.

Ainsi, la majorité des anticorps produits durant l'infection ne peut neutraliser le virus et prévenir l'infection d'une nouvelle cellule. Cependant, il a récemment été démontré qu'une conformation plus ouverte induite par l'interaction avec CD4 cellulaire permet l'exposition de plusieurs épitopes qui peuvent soutenir une réponse cytotoxique anticorps dépendante (ADCC) (182, 183). Les anticorps reconnaissant ces épitopes sont rapidement élicités durant l'infection et sont présents dans le sérum de patient, mais aussi aux niveaux des sites de transmission tels que les muqueuses et le lait maternel (183, 184). Bien que ces anticorps soient non neutralisants (i.e., incapables d'inhiber l'infectivité du virus), une réponse ADCC semble être un mécanisme important pour la prévention de la transmission tel qu'observé lors de l'essai vaccinal RV144 où il y a eu une corrélation importante entre la protection et une réponse ADCC chez les individus vaccinés (22, 185).

3.3.2 Changements conformationnels de la gp41

Les changements conformationnels de la gp120 suite à la liaison à CD4 sont aussi transmis à la gp41. Un premier changement conformationnel permet d'exposer les régions HR1 et HR2 et l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible. Deuxièmement, la complémentarité de ces régions provoque leur repliement afin de former un paquet de six hélices (58, 59). Ce changement physique provoque le rapprochement des deux membranes lipidiques (Figure 8).

3.3.3 Modulations de la conformation de l'enveloppe par les protéines virales

La modulation de la conformation de l'enveloppe n'est pas seulement intrinsèque. Plusieurs protéines accessoires virales permettent de moduler les niveaux d'expression des glycoprotéines d'enveloppe ainsi que la conformation adoptée par celle-ci. En effet, une particule virale contient très peu d'env à sa surface, soit environ 14 molécules par particule virale (186, 187). Étant donné qu'Env est la seule protéine pouvant servir de cible au système immunitaire, le fait de posséder un nombre limité d'Env exposé permet entre autres de restreindre la détection d'Env par celui-ci. Ainsi le VIH-1 code pour deux protéines accessoires qui ont un effet indirect sur l'expression et la conformation de l'Env.

La modulation de l'expression de l'enveloppe se fait entre autres par l'entremise de Vpu. Tel que décrit précédemment, Vpu diminue les niveaux de surface de BST2. Ceci se traduit par une diminution de l'accumulation des particules virales, et donc d'Env, à la surface des cellules infectées.

La modulation de la conformation de l'enveloppe est plus subtile, indirecte et implique l'interaction avec CD4. En effet, il a été démontré que l'interaction CD4-Env est nécessaire afin d'induire un changement conformationnel de l'enveloppe. Ce changement, similaire à celui qui se passe durant l'entrée virale, permet l'exposition d'épitopes autrement inaccessibles qui sont reconnus par des anticorps capables de médier une réponse cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC) (182, 183).

Ainsi, le virus met beaucoup d'efforts afin d'éviter de présenter la conformation ouverte d'Env de façon précoce.

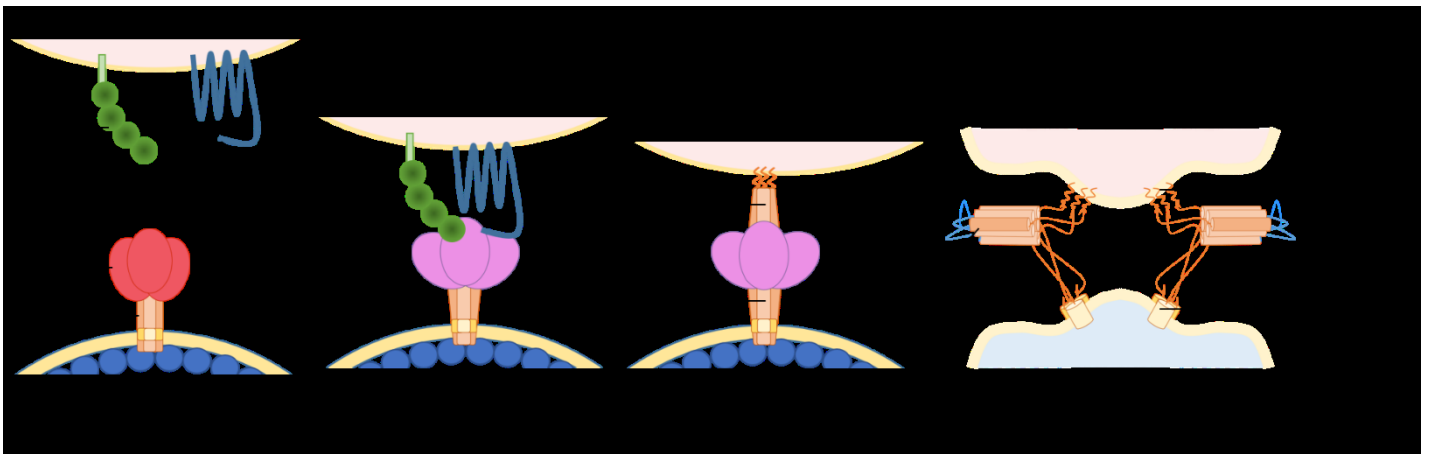


Figure 8 Différentes conformations adoptées par les glycoprotéines d'enveloppe lors de l'interaction avec la cellule cible durant l'entrée virale.

- 1) Env de la membrane virale et protéines de la membrane cellulaire avant interaction;
- 2) Interaction d'Env et le récepteur CD4 et le co-récepteur CCR5;
- 3) Insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire;
- 4) Formation du paquet de six hélices

4 VIH-1 et le système immunitaire

4.1 Réponse immunitaire contre le VIH-1

L'habileté du système immunitaire pour lutter contre le VIH-1 repose sur plusieurs facteurs tels que la réponse innée, la réponse adaptative et les facteurs génétiques de l'hôte, de même que la pathogénicité de la souche du VIH-1.

Durant l'infection par le VIH-1, la première réponse observée est celle du système immunitaire innée. Les produits viraux (e.g. ARN viral) sont reconnus par les toll-like receptor (TLR) présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques (DC)(188). Il y a alors la production de hauts niveaux d'interféron alpha et d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-2 et IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) entraînant une forte activation du système immunitaire (189). Parallèlement, il y a l'augmentation de cellules NK (natural killers) qui tuent les cellules présentant des ligands de stress (190). Mais l'activité de celles-ci déclinent progressivement durant l'infection en devenant anergiques (191).

La réponse du système innée est à double tranchant. Bien qu'elle favorise un état pro-inflammatoire, l'activation et le recrutement des cellules de la réponse cellulaire et la production intense des cytokines entraîne son épuisement. En effet, l'activation immunitaire cause l'apoptose des DC dont le déclin est notable chez l'individu infecté (192). De plus, certains facteurs de stress se retrouvent dans le sang et provoqueraient la mort des cellules non infectées avoisinantes. Ainsi, même si le système immunitaire essaye de contrôler le virus, l'infection virale des cellules immunitaires, la production de cytokines pro-inflammatoire par les cellules innées, la translocation des produits microbiens dans le sang par l'épithélium intestinal endommagé (189), et des co-infections mycobactériennes et virales chroniques (193) sont tous des facteurs qui contribuent à l'activation du système immunitaire et à son épuisement.

La réponse adaptative cellulaire joue aussi un rôle important pour l'immunorégulation du VIH-1. Une expansion rapide des lymphocytes T CD8 est observée. Activées par les peptides viraux présentés par le CMH-I, ces cellules contribuent à la réduction virale dans la phase aigüe en tuant les cellules nouvellement infectées. La coordination de la réponse T CD8 dépend des lymphocytes T auxiliaires qui sont les cibles du VIH-1. Ainsi la réponse CD8 est dépendante

des niveaux de T CD4 des individus infectés, des niveaux qui déclinent s'il n'y a pas d'intervention antirétrovirale (194).

4.2 Réponse immunitaire humorale contre les glycoprotéines de l'enveloppe

Dans les premières semaines suivant l'infection par le VIH-1, il est déjà possible de détecter des anticorps spécifiques au VIH-1 (195, 196). Ces anticorps sont dirigés contre Env. Les anticorps peuvent avoir plusieurs fonctions effectrices avec le potentiel de bloquer la réplication du VIH-1.

Les anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs ; *Broadly Neutralizing Antibodies*) se développent lentement et nécessitent plusieurs changements avant d'arriver à leur plein potentiel. Ainsi c'est seulement qu'après 12 semaines ou plus qu'on peut isoler les premiers bNAbs (178). Ces anticorps permettent de neutraliser le virus en se liant à Env présent sur les particules virales afin de prévenir la fusion des membranes virale et cellulaire et donc l'entrée virale. Les anticorps neutralisants sont classés selon l'endroit qu'ils ciblent sur la glycoprotéine de l'enveloppe. Les anticorps b12, VRC01, CH103 et 8ANC131 reconnaissent des épitopes de la région liant CD4 (CD4bs ; *CD4 binding site*), faisant ainsi compétition à la liaison au récepteur CD4. D'autres ciblent les régions variables de la gp120. PGT9 et PGT145 ciblent un épitope quaternaire des régions variables 1 et 2 du trimère (197). D'autres, PGT121, PGT128, PGT135 et 2G12, ont plutôt pour cibles les glycanes de la région variable V3. Les anticorps neutralisants peuvent aussi cibler la région MPER de la gp41. Cette catégorie regroupe les anticorps 2F5, 4^E10, 10^E8 et Z13. Le tableau I (p.36) permet de présenter quelques bNAbs ainsi que leur région d'interaction.

Tableau I. Exemples d'anticorps neutralisant à large spectre et leurs sites de reconnaissance sur l'enveloppe

<i>Site de reconnaissance</i>	Anticorps neutralisant à large spectre	Références
<i>Site de liaison à CD4 (gp120)</i>	b12	(198, 199)
	VRC01; VRC13; VRC16	(200-203)

<i>V1/V2 (gp120)</i>	CH103	(204)
	8ANC131	(201)
	PGT9	(197, 205-209)
	PGT145	(210)
	2G12	(211, 212)
<i>Glycans V3 (gp120)</i>	PGT121	(210, 213, 214)
	PGT128	(210, 215)
	PGT135	(210, 216)
	2F5	(211, 217, 218)
<i>MPER (gp41)</i>	4E10	(211, 217, 219)
	10E8	(220)
	Z13	(221)

Adapté de Kwong, Mascola, Nabel. Nat Rev Immunol. Septembre 2013 (222)

On retrouve aussi les anticorps dits non-neutralisants. Ils sont rapidement générés durant les premiers jours suivant l'infection, et présents dans plusieurs compartiments immunitaires soit les muqueuses, les sécrétions cervico-vaginales et rectales. Ils sont déterminés dans un modèle animal de primates non humains infectés par le SIV ou par le SHIV (223). Ces anticorps peuvent jouer d'autres fonctions toutes aussi importantes que les bNAbs. Grâce à leur partie Fc, ces anticorps non neutralisants sont capables de recruter des cellules effectrices comme les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques, qui à leur tour vont induire la cytolysse et l'apoptose de cellules infectées. De plus, la stimulation des cellules effectrices par la liaison à la partie Fc permet le relâche de cytokines antivirales. Ainsi, une inhibition virale dépendante des anticorps (*antibody-dependent cell-mediated viral inhibition ; ADCVI*) est possible grâce aux anticorps non neutralisants. Dans cette catégorie on retrouve les anticorps qui reconnaissent des épitopes conformationnels conservés de la région C1 tel que A32 (183, 224-227), qui sont présents seulement dans la forme CD4 lié, les anticorps N5-i5 et 2.2c (228) qui lient la gp41 dans sa forme native, de même que les anticorps qui reconnaissent un épitope formé de la couche topologique 1 et du domaine interne de la gp120.

4.3 Réponse immunitaire vaccinale

Après plus de 30 ans depuis la découverte du VIH-1 comme étant la cause du SIDA, il n'existe pas de vaccin approuvé pour l'utilisation clinique dans la prévention du VIH-1. Cependant, depuis le premier essai vaccinal en 1988, en combinaison avec la découverte sur la structure et les réponses immunitaires contre le VIH-1, il y a eu du progrès substantiel en ce domaine (229).

Ainsi, les vaccins actuels visent à éliciter une réponse humorale (génération d'anticorps neutralisants), cytotoxique (réponse CD8 dirigée contre les cellules infectées) ou bien une combinaison des deux (230). Afin d'obtenir une réponse immunitaire désirée, un certain nombre de vecteurs viraux et des systèmes de prestation font l'objet de recherches pour les vaccins de pointe du VIH.

L'utilisation de vecteurs viraux a permis l'incorporation de plusieurs protéines virales pour expression dans la cellule. Les protéines exprimées sont généralement Env et Gag provenant de virus primaires qui dominent dans la région où l'essai vaccinal a lieu. L'utilisation de virus primaires, notamment les virus fondateurs isolés dans les premières semaines post-infection permet de tenir compte des propriétés biologiques particulières de ceux-ci et qui pourraient être utiles pour l'induction d'une immunité protectrice (231, 232). La très grande variabilité génétique est aussi prise en compte en utilisant des protéines de plusieurs virus différents qui dominent les régions visées par l'essai vaccinal.

De plus, un régime de vaccination plus complexe est utilisé. La vaccination de type amorce-rappel (*prime-boost*) combine deux vaccins ainsi permettant une meilleure stimulation du système immunitaire (233-235). Ces types de vaccination permettent entre autres d'augmenter la réponse humorale, incluant les bNAbs (236, 237). Le tableau II présente les six vaccins qui ont été testés chez les humains.

4.3.1 Essais à base des gp120 recombinantes

Les VAX003 et VAX004 étaient les premiers vaccins ayant eu l'approbation pour être essayés chez l'homme. VAX004 était composé de la gp120 recombinante des souches de laboratoire MN (sous-type B) et de la souche de virus primaire GNE8 (sous-type B). VAX003 était composé de la gp120 recombinante des souches MN et la souche primaire A244

(CRF01_AE). L'injection était intramusculaire avec l'adjuvant à base d'aluminium (Alum). Ces essais ont démontré que les monomères de gp120 recombinante suscitaient des réponses d'anticorps neutralisants très limitées qui n'étaient pas assez afin de protéger contre l'infection par le VIH dans une population à haut risque. Les anticorps générés avaient un pouvoir neutralisant contre les virus de tiers 1 seulement et une stimulation constante avec VAX003 a altéré les propriétés fonctionnelles des anticorps anti-Env, i.e. une sélection d'anticorps de type IgG4 est favorisé (230, 238-240). Ces anticorps ont une affinité plus faible à l'antigène et régulent à la baisse les réponses immunitaires, car la partie Fc de l'anticorps ne permet par le recrutement des autres composantes tels que le complément ou les cellules effectrices (NK) (240-242).

4.3.2 Essais à base de vecteurs adénoviraux

Les vaccins à base de vecteurs d'adénovirus AD5 (243) (Essais HVTN-504 et HVTN-503) représentent la seconde vague de vaccins ayant eu l'approbation pour effectuer un essai chez les humains. Le vaccin était composé d'un vecteur adénoviral de type 5 non réplicatif, codant pour les genes *gag*, *pol* et *nef* provenant d'un virus de clade B similaire à la séquence consensus du clade B. Celui-ci a été administré dans deux cohortes où il y avait une prédominance de clade B (Amérique du Nord, les Caraïbes, l'Amérique du Sud et en Australie) ou clade C (Afrique du Sud) (244-246). Ayant démontré une activation soutenue du système immunitaire chez les primates non humains, ce vaccin laissait présager que la stimulation de la réponse des lymphocytes T spécifiques au VIH-1 permettrait une réduction de l'acquisition du virus. Or, l'effet obtenu était tout autre. En effet, le vaccin augmentait la susceptibilité à l'infection chez le groupe d'individus vaccinés comparativement au groupe placebo, en suscitant la migration des cellules cibles du VIH-1, les lymphocytes T CD4+ (247). De plus, bien que sécuritaire chez les primates non humains, plusieurs individus présentaient une immunité préexistante contre le vecteur lui-même (230, 245, 246). Finalement, un dernier vaccin à base d'adénovirus a été testé. En tenant compte des résultats des deux derniers essais vaccinaux, le vecteur AD5 utilisé a été modifié afin de ne plus induire de réponse immunitaire contre les protéines d'adénovirus. De plus, il exprimait une plus grande variété de protéines incluant Env qui provenait de différents clades, Malheureusement, toutes ces modifications n'ont pas permis de générer une réponse protectrice contre le VIH-1.

Aucun de ces vaccins n'a présenté une bonne efficacité à protéger les individus contre l'acquisition du VIH-1. En résumé, ces vaccins avaient un problème à maintenir la présence d'anticorps contre Env dans le temps. Les anticorps élicités avaient une diminution rapide de titre et revenaient au niveau basal non protecteur. De plus, étant donné que les lymphocytes T CD4 sont la cible du VIH-1 et qu'elles contribuent à la formation des anticorps en stimulant les cellules productrices d'anticorps, les lymphocytes B, le recrutement de ces cellules T au site d'infection doit être régulé. En effet, une forte localisation des lymphocytes T CD4 au site d'infection rapproche les cellules cible du virus, qui peut alors les infecter plus facilement. Ceci a été le cas lors de l'essai HVTN-504, dans lequel les individus vaccinés présentaient un risque plus accru d'être infecté comparativement aux individus non vaccinés.

4.3.3 Essai vaccinal RV144

Effectué en Thaïlande, l'essai vaccinal RV144 comportait deux vaccins ultérieurement utilisés seuls, soit ALVAC®-HIV (vCP1521) et AIDSVAX® B/E. ALVAC®-HIV (vCP1521) a été administré dans les semaines 0, 4, 12 et 14 suivi d'un rappel avec AIDSVAX® B/E gp120 B/E administré aux semaines 12 et 14. ALVAC®-HIV est un vecteur, fabriqué à partir du virus canary-pox (vCP1521) recombinant de deuxième génération et qui exprime la gp120 du virus CRF01_AE 92TH023 lié à la partie transmembranaire de la gp41 appartenant au virus LAI du groupe B. Ce vecteur code aussi pour Gag et PR de LAI. AIDSVAX® B/E gp120 B/E est un vecteur exprimant de manière bivalente l'enveloppe du VIH-1 CRF01_AE CM244 et l'enveloppe de la couche MN (Clade B). Suite à la vaccination, le suivi des patients à chaque 6 mois sur une période de 3 ans a permis de collecter plusieurs informations incluant l'effet de l'immunisation sur la réplication virale et les niveaux des T CD4.

Ainsi, pour la première fois, un vaccin anti-VIH-1 a permis une certaine diminution du risque d'acquisition après vaccination avec 31.2 % d'efficacité (23). Cette protection était en partie due à la présence d'IgG capable de reconnaître une molécule présentant les régions V₁ et V₂, tandis que la présence d'IgA reconnaissant Env augmentait le risque d'infection en faisant compétition à d'autres anticorps ciblant la région C1 de Env, qui contrairement au IgA pouvaient médier l'ADCC (22, 226, 248-251).

Tableau II : Essais vaccinaux contre le VIH-1, réalisés chez les humains, et leurs caractéristiques

Essai vaccinal (Années)	Concept du vaccin / protéine exprimée	Population à l'étude	Résultat	Références
	Gp120 recombinante			
VAX 003 (1998-2003)	Gp120 clades B et E / alum	Thaïlande, UDI, haut risque	Non efficace	(252)
VAX004 (1998-2003)	Gp120 clade B / alum	Amérique du Nord, Pays-Bas; MSM, Hétérosexuels	Non efficace	(253)

	Vecteur adénovirus			
HVTN-504 (Step) (2004-2007)	Clade B, gag, pol, nef AD5	Amérique du Nord et Sud, Caraïbe, Australie ; MSM	Non efficace et augmentation du risque de transmission	(254)
HVTN-503 (Phambili) (2007-2012)	Clade B, gag, pol, nef AD5	Afrique du Sud, Hétérosexuels	Non efficace et augmentation du risque de transmission	(238)
	Vecteur Canary-pox			
RV144 (2003-2006)	Clade CRF01/AE gp120, gag, pol,	Thaïlande; Hétérosexuels,MS M/UDI	31.2 % d'efficacité	(255)
HVTN-505 (2009-2013)	Clades A, B et C	États-Unis, MSM.	Non efficace	(256)

UDI, Utilisateurs de drogues injectables; MSM, hommes ayant des relations sexuelles avec
d'autres hommes (men who have sex with men)

Adapté de Lewis, DeVico, Gallo. PNAS. Novembre 2014

Hypothèses et objectifs

Les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) de l'immunodéficience humaine de type 1 possèdent un rôle central dans le cycle répliatif ainsi que dans la pathogenèse du virus. Env initie à elle seule l'entrée du virus dans la cellule. De plus, c'est la seule protéine virale exposée à la surface contre laquelle une réponse immunitaire peut être exercée afin de prévenir l'entrée ou la dissémination. Par conséquent, le virus accorde une très grande importance quant à la structure et la régulation de celle-ci.

Fait intéressant, les glycoprotéines de l'enveloppe du virus CRF-AE diffèrent des autres Env du même groupe M auquel il appartient. En effet, contrairement à tous les autres Env issues du même groupe phylogénétique, les souches du CRF_AE possèdent une histidine (H) en position 375 plutôt qu'une sérine (S). Le résidu 375 se trouve dans la cavité Phe43 qui est importante pour l'interaction avec le récepteur CD4.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'une modification des acides aminés présents dans cette cavité pourrait avoir un effet sur la fonctionnalité de l'enveloppe.

L'objectif du projet était alors d'évaluer l'implication de cet acide aminé sur la fonctionnalité des enveloppes de CRF01_AE 92TH et CM244. Plus spécifiquement, ce projet cherchait à élucider l'implication de cet acide aminé sur la capacité des Env à promouvoir la fusion cellule à cellule, son rôle dans le clivage et l'association des sous-unités de l'enveloppe ainsi que l'effet sur la conformation adoptée par l'enveloppe.

Article

Histidine 375 Modulates CD4 Binding in HIV-1 CRF01_AE Envelope Glycoproteins

Daria Zoubchenok^{1,2,*}, Maxime Veillette^{1,2,*}, Jérémie Prévost^{1,2}, Eric Sanders-Buell^{3,4}, Kshitij Wagh⁵, Bette Korber⁵, Agnès L Chenine^{3,4} and Andrés Finzi^{1,2,6,#}.

¹Centre de Recherche du CHUM, ²Department of Microbiology, Infection and Immunology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, ³U.S. Military HIV Research Program, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD, ⁴Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc., Bethesda, MD, ⁵Los Alamos National Laboratory, NM, USA, ⁶Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Qc, Canada.

* Contributed equally to this work

Contribution des auteurs :

Andrés Finzi, Daria Zoubchenok et Maxime Veillette ont contribué à l'élaboration des plans de l'étude. Eric Sanders-Buell et Agnès L Chenine ont fourni les plasmides d'expression d'enveloppes de CRF01_AE 92TH et CM244. Jérémie Prévost a réalisé les expériences de résonance de plasmons de surface. Daria Zoubchenok et Maxime Veillette ont réalisé les mutants d'enveloppe de CRF01_AE 92TH et CM244. Maxime Veillette a réalisé les expériences d'infectivité. Daria Zoubchenok a réalisé les expériences de fusion cellule-cellule, les expériences de clivage et l'association des sous-unités, immunoprécipitation et neutralisation. Daria Zoubchenok et Andrés Finzi ont écrit le manuscrit.

PRÉAMBULE

L'article suivant présente les résultats principaux de ce mémoire. Cet article décrit l'importance fonctionnelle de l'acide aminé 375 dans deux souches CRF01_AE et répond aux objectifs soulevés précédemment.

ABSTRACT

The envelope glycoproteins (Env) from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediate viral entry. The binding of the HIV-1 gp120 glycoprotein to CD4 triggers conformational changes in gp120 that allow high-affinity binding to its coreceptors. Contrary to all other Envs from the same phylogenetic group M, which possess a serine (S) at position 375, those from CRF01_AE strains possess a histidine (H) at this location. This residue is part of the Phe43 cavity where residue 43 of CD4 (a phenylalanine) engages with the gp120. Here we evaluated the functional consequences of replacing this residue in two CRF01_AE Envs (CM244 and 92TH023) by a serine. We observed that reversion of the 375 amino acid to a serine (H375S) resulted in a loss of functionality of both CRF01_AE Envs as measured by a dramatic loss in infectivity and their ability to mediate cell-to-cell fusion. While no effects on processing or trimer stability of these variants were observed, decreased functionality could be linked to a major defect in CD4 binding induced by the substitution of H375 by a serine. Importantly, mutation of residues 61 (Layer 1), 105, 108 (Layer 2) and 474 to 476 (Layer 3) of the CRF01_AE gp120 inner domain layers to the consensus residues present in group M restored CD4 binding and wild-type levels of infectivity and cell-to-cell fusion. These results suggest a functional co-evolution between the Phe43 cavity and the gp120 inner domain layers. Altogether, our observations describe the functional importance of 375H amino acid in CRF01_AE envelopes.

IMPORTANCE

A highly conserved serine located at position 375 in group M is replaced by an histidine in CRF01_AE Envs. Here we show that H375 is required for efficient CRF01_AE Env binding to CD4. Moreover, this work suggests that specific residues of the gp120 inner domain layers have co-evolved with H375 in order to maintain its ability to mediate viral entry.

INTRODUCTION

HIV-1 has a very high genetic variability owing to the error prone reverse transcriptase (lacking a proofreading function), many rounds of replication allowing high viral turnover rate and significant immune pressure from the host during the chronic infection (1-6). The vast genetic variability of HIV-1 resulted into its classification into 4 major groups M, N, O and P. The HIV-1 group M is responsible for the majority of the global pandemic. It comprises 9 major subtypes (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J and K) and circulating recombinant forms (CRFs) (7-11). These recombinant forms initially result from multiple infections within the same individual which favors recombination between two different genomic RNA copies upon co-infection of the same cell and production of heterozygous virions (12); CRFs are recombinants that are transmitted and repeatedly sampled (13-15). The utilization of the two distinct alternating templates by the reverse transcriptase allows the generation of a chimeric DNA molecule, and in major instances, results in the creation of new HIV-1 inter-subtype recombinant virus (13, 16, 17).

Southern Asia is particularly affected by the CRFs. CRF01 was originally established in central Africa, where it had undergone diversification by the time the Asian CRF01 epidemic began in the late 1980s in Thailand (14, 15). During the past decade, an increasing prevalence of the CRF01_AE subtype was observed and it accounted for 42.5% of all national infections in China in 2007 (18) and 95% in Thailand in 2004 (19). CRF01_AE has a mosaic genome composed by the gag-pol region and most of the accessory genes from clade A and the env gene from clade E (20). No parental clade E strain has been identified matching the CRF01_AE Env (20). Altering or exchanging fragments of genes encoding crucial proteins such as the envelope can have a sizeable impact on viral fitness (21, 22), virulence and ability to evade the host immune system, thus providing evolutionary advantages to the virus (8).

Host-cell entry is the first step of the HIV-1 replication cycle and requires the mature viral envelope glycoproteins, which result from the proteolytic cleavage of gp160 viral protein into exterior gp120 and transmembrane gp41 subunits. These subunits are linked by non-covalent links allowing conformational changes of the trimer during the entry process (23-25). The gp120 exterior subunit is important for the initial interaction with the CD4 receptor. The Phe43 cavity, located at the interface of the inner and outer domain of the gp120, allows the

engagement to CD4 via its Phe43 residue (26). Then, rearrangement of the variable regions V1 and V2 expose the binding site for the coreceptors (CCR5 and CXCR4) (27). A major conformational change in gp41 where a six-helix bundle structure, composed of three N-terminal heptad repeat (HR1) and three C-terminal heptad repeat (HR2) regions, brings together the viral envelope and the target cell membrane (28, 29).

It has been shown that some of these conformational rearrangements could be impacted by large alterations in the Phe43 cavity. Substitution of the well-conserved group M serine at position 375 by a large hydrophobic residue such as tryptophan alters Env conformation by predisposing gp120 to spontaneously assume a state closer to the CD4 bound conformation (30). In agreement with an important role played by Env conformation on CD4 interaction (23, 30-32), a recent study using the SHIV model in rhesus macaques showed that replacing residue 375 by larger hydrophobic or basic amino acids enhanced Env affinity to rhCD4 and allowed a better entry into rhCD4 lymphocyte T cells, *in vivo* (33), highlighting the importance of this residue and its context for viral replication.

In addition to the Phe43 cavity, other gp120 elements play a role in CD4 interaction and Env conformation. For example, it has been described that three topological layers located in the inner domain of gp120 affect CD4 interaction and subsequent conformational changes. These three layers (Layer 1, Layer 2 and Layer 3) of the inner domain secure CD4 binding by helping to expose the CD4-binding site (Layer 3) (31, 34) and then by keeping CD4 in place by decreasing the off rate (Layers 1 and 2). It has been suggested that the gp120 inner domain layers have evolved to accommodate for changes occurring in the Phe43 cavity (32, 34).

Despite high genetic diversity, some functional glycoprotein domains in HIV-1 envelope have been preserved over time, such as the Phe43 cavity. However, CRF01_AE Envs appear to have evolved differently from other subtypes. Their envelope glycoproteins possess a histidine at position 375. Here, we investigate the functional relevance of 375H residue in the Phe43 cavity of CRF01_AE Envs and its interplay with the inner domain layers.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines.

293T human embryonic kidney, Cf2Th canine thymocytes (American Type Culture Collection) and TZM-bl cell lines (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) were grown at 37°C and 5% CO² in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Sigma) and 100 µg/ml of penicillin-streptomycin (Mediatech). Cf2Th cells stably expressing human CD4 and CCR5 (Cf2Th-CD4-CCR5) (35) were grown in medium supplemented with 0.4 mg/ml of G418 (Invitrogen) and 0.15 mg/ml of hygromycin B (Roche Diagnostics). The TZM-bl cell line is a HeLa cell line stably expressing high levels of CD4 and CCR5 and possessing an integrated copy of the luciferase gene under the control of the HIV-1 long terminal repeat (36).

Site-directed mutagenesis.

Mutations were introduced individually or in combination into the pcDNA3.1 vector (Invitrogen) expressing the CRF01_AE 92TH023023 and CRF01_AE CM244 envelope glycoproteins. Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis protocol (Stratagene). The presence of the desired mutations was determined by automated DNA sequencing. The numbering of the CRF01_AE 92TH023023 and CRF01_AE CM244 envelope glycoprotein amino acid residues is based on that of the prototypic HXBc2 strain of HIV-1, where 1 is the initial methionine (37).

Immunoprecipitation of envelope glycoproteins.

For pulse-labeling experiments, 3×10^5 293T cells were transfected with pcDNA3.1-HIV-1 Yu2, CRF01-AE 92th023 or CM244 gp160 variants using a standard calcium phosphate method. One day after transfection, cells were metabolically labeled for 16 h with 100 µCi/ml [³⁵S]methionine-cysteine ([³⁵S] protein labeling mix; Perkin-Elmer) in Dulbecco's modified Eagle's medium lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed fetal bovine serum. Cells were subsequently lysed in RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% NP-40, and 0.05% sodium dodecyl sulfate [SDS]). Precipitation of radiolabeled Yu2, 92th023 and CM244 envelope glycoproteins from cell lysates or medium was performed with a mixture of sera from HIV-infected individuals.

The association index is a measure of the ability of the mutant gp120 molecule to remain associated with the Env trimer complex on the expressing cell, relative to that of the wild-type Env trimer. The association index is calculated as follows: $\text{association index} = ([\text{mutant gp120}]_{\text{cell}} \times [\text{wild-type gp120}]_{\text{supernatant}}) / ([\text{mutant gp120}]_{\text{supernatant}} \times [\text{wild-type gp120}]_{\text{cell}})$. The processing index is a measure of the conversion of the mutant gp160 Env precursor to mature gp120, relative to that of the wild-type Env trimer. The processing index was calculated by the formula: $\text{processing index} = ([\text{total gp120}]_{\text{mutant}} \times [\text{gp160}]_{\text{wild-type}}) / ([\text{gp160}]_{\text{mutant}} \times [\text{total gp120}]_{\text{wild-type}})$.

Alternatively, medium containing radiolabeled gp120 variants was immunoprecipitated with CD4-Ig for 1 h at 37°C in the presence of 50 µl of 10% protein A-Sepharose (General Electric). All samples were loaded on polyacrylamide gels and analyzed by autoradiography using a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Recombinant luciferase viruses.

Recombinant viruses containing the firefly luciferase gene were produced by calcium phosphate transfection of 293T cells with the HIV-1 proviral vector pNL4.3 Env- Luc and the plasmid expressing the wild-type or mutant Yu2, 92TH023 or CM244 envelope glycoproteins at a ratio of 2:1. Two days after transfection, the cell supernatants were harvested, and centrifuged for 5 min at 3000 rpm to pellet cell debris. The reverse transcriptase activity was measured for all viral preparations as described previously (38). The virus-containing supernatants were stored in aliquots at -80°C .

Cell-to-cell fusion.

To assess cell-to-cell fusion, 3×10^5 293T cells were cotransfected by the calcium phosphate method with an HIV-1 Tat-expressing plasmid, pLTR-Tat, and the Yu2, 92TH023 or CM244 envelope glycoproteins in an expression vector. Two days after transfection, 3×10^4 293T cells were added to TZM-bl target cells that were seeded at a density of 3×10^4 cells/well in 96-well luminometer-compatible tissue culture plates 24 h before the assay. Cells were co-incubated for 6 h at 37°C, after which they were lysed by the addition of 30 µl of passive lysisbuffer (Promega) and three freeze-thaw cycles. An LB 941 TriStar luminometer (Berthold Technologies) was used to measure the luciferase activity of each well after the addition of 100

μl of luciferin buffer (15 mM MgSO_4 , 15 mM KPO_4 [pH 7.8], 1 mM ATP, and 1 mM 170 dithiothreitol) and 50 μl of 1 mM D-luciferin potassium salt (Prolume).

Purification of recombinant 92TH023 and CM244 gp120 glycoproteins.

To produce soluble gp120, 10×10^6 293T cells were transfected with a plasmid expressing wild-type or mutant 92TH023 or CM244 gp120 using PEI MAX 40000 as directed by the manufacturer (Polysciences). Three days after transfection, supernatant was collected and cells pelleted and discarded. The supernatants were filtered (0.22- μ filter) (Corning) and soluble gp120 was purified by lectin affinity columns. Briefly, Agarose bound Galanthus Nivalis Lectin (Vector Laboratories) were added to the filtered supernatant and incubated overnight on a shaking platform. The mix (supernatant-containing beads) was then passed through columns (for washing with cold PBS, proteins were eluted with methyl- α -D-pyranoside 0,5M and followed by FPLC purification of monomeric gp120, as described (39). gp120 preparations were dialyzed against PBS and stored in aliquots at -80°C . To assess purity, recombinant proteins were loaded on SDS-PAGE polyacrylamide gels and stained with Coomassie Blue.

SPR biosensor analysis.

Surface plasmon resonance (SPR) biosensor data were collected on a Biacore 3000 optical biosensor (General Electric). CD4-Ig was immobilized onto separate flow cells within the same sensor chip (CM5; GE) to a surface density of around 500 response units (RU) using standard amine coupling chemistry (40). The binding capacities of CD4 surfaces were kept low to avoid mass transport effects and steric hindrance. Flow cell 1 or 3 was left blank as a control for nonspecific binding and refractive index changes. With the instrument operating in a parallel sensing mode, soluble gp120 was injected over flow cells 1 and 2 or 3 and 4 at different concentrations ranging from 100 to 750 nM at a flow rate of 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 3 min. This was followed by a 10-min dissociation phase to allow an estimation of off-rates and binding affinities. Sensor data were prepared for kinetic analysis by subtracting binding responses collected from the blank reference surface. The association and dissociation phase data were fitted simultaneously with BIAevaluation, version 3.2, RC1 software using a 1:1 Langmuir model of binding.

Infection by single-round luciferase viruses.

Cf2Th-CD4-CCR5 target cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/well in 96-well luminometer-compatible tissue culture plates (Perkin Elmer) 24 h before infection. Recombinant viruses in a final volume of 100 μ l were then added to the target cells containing different dilution of antibodies followed by incubation for 48 h at 37°C. The medium was then removed from each well, and the cells were lysed by the addition of 30 μ l of passive lysis buffer (Promega) and three freeze-thaw cycles. An LB 941 TriStar luminometer (Berthold Technologies) was used to measure the luciferase activity of each well after the addition of 100 μ l of luciferin buffer (15 mM MgSO₄, 15 mM KPO₄ [pH 7.8], 1 mM ATP, and 1 mM 170 dithiothreitol) and 50 μ l of 1 mM D-luciferin potassium salt (Prolume).

Sequence analyses.

The LOGO plots (41) for HIV were made using the Analyze Align tool at the HIV database, and are based on the LOGO program (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ANALYZEALIGN/analyze_align.html) and the HIV-1 database global curated and filtered alignment circa Oct, 2016, including 1 HIV-1 protein Env sequence per person Env from 4,632 individuals.

Signature analyses (42, 43) were used to track amino acids that co-varied with either H375 or S375. A subset of 1000 M group sequences from the more than 4,500 M group sequences were sampled from the full Los Alamos database alignment to use as input, reducing the dataset size to facilitate computationally intensive phylogenetic analyses and ancestral state reconstruction. To make the analysis more informative, the 1000 sequences were picked after first narrowing the field to include only subtypes and recombinant forms that had at least some sequences with H375, to enable identification of co-variation patterns across the M group. Because of their structural proximity, we were most interested in evaluating signature associations within the inner domain layer, and so we present these fully in Table 1. Other phylogenetically corrected associations were found in other regions of Env, however, that may be of interest to explore in future studies. In particular H375 was positively associated with A101, K231, N289, V341, A430, I519, and H629, and negatively associated with I307 and V430, (all with very low p values in phylogenetically corrected tests, ranging from 10^{-10} to 10^{-

¹⁵), raising the possibility that these sites may also somehow functionally interact with position 375.

RESULTS

Comparison of 375 residue in Phe43 cavity among HIV-1 strains.

The sequence comparison of CRF01_AE strains 92TH023 and CM244 to all the other HIV-1 types highlights the difference in the amino acid 375 in the Phe43 cavity (Figure 1A). CRF01_AE sequences have a conserved histidine at this position whereas the other clades have a serine (Figure 1B). Since it was previously suggested that the inner domain layers have co-evolved with the Phe43 cavity to accommodate the residue located at position 375 (32), we investigated whether residues located in the gp120 inner domain layers were enriched in sequences with residue H375 and by extension in CRF01_AE relative to other HIV-1 clades. Visual inspection of an initial alignment of Env protein sequences suggested differences between CRF01_AE and the rest of group M strains at positions 61 (Layer 1), 105 and 108 (Layer 2) and 474 to 476 (Layer 3) (Figure 1 A). This was further supported by a more extensive exploration of distinctive subtype variation in these sites, by determining the frequency of amino acid variants at each of these positions independently (Figure 1 B), based on the Los Alamos database curated Env alignment, which contained one sequence per person; the 2016 database alignment contained 4,632 sequences, 433 of which were from CRF01_AE. It is interesting to notice that HIV groups O and P share this histidine at position (H375 (Figure 1), and group N has a unique form with a methionine in this position (M375). Each of these groups arose from separate zoonoses events, from chimpanzees or gorilla into human (44) and position 375 is highly variable among SIVcpz viruses isolated from chimpanzees (Figure 1B). These groups share some of the amino acids that are enriched in CRF01 along with H375, in particular the Q105, highlighting its likely importance (Figure 1C).

The histidine at position 375 (H375) was found in greater than 99% of the 433 CRF01 sequences. The other inner domain amino acids were more than 75% conserved within CRF01_AE. We found two H375S mutations in the context of the CRF01_AE lineage in the HIV-1 database, as well as a small number of S375H substitutions in other M groups clades and subtypes. When H375S naturally arose in CRF01, it tended to be accompanied by some of the inner domain substitutions commonly found in the M group, and when S375H arose naturally in other clades it was generally accompanied by some of the inner domain amino acids commonly found in CRF01, indicative of co-evolution. These occurrences suggest that distinct

mutations in the inner domain preferentially accompany the shifts at position 375, but that not all changes are simultaneously required in all contexts.

To more explicitly explore the associations between position 375 and the other sites we identified to be of interest within the inner domain, we statistically characterized the frequency of association between amino acid variants in position 375 and the other positions. A simple Fisher's test yields very highly significant associations with the sites of interest we identified in the inner domain (Table 1), as expected given the profound associations with well-sampled clades illustrated in Figure 1B. In such cases founder effects and functional constraints are difficult to disentangle, and hence, it is not possible to resolve whether or not the associations observed are due to direct functional constraints or whether both amino acids are simply associated with the CRF01_AE lineage. Thus, we also used phylogenetic strategies to explore whether particular mutational events were more like to occur in the context of either H or S at 375 (Table 1). All but one (residue 105) of the sites of interest had significant phylogenetically supported associations, and some of the less common amino acids at each position were implicated as well as the consensus forms of the M group and CRF01 (Table 1). Of note, residue 105 was not associated toward the polymorphism more commonly found with residue 375 (H or S) in CRF01_AE, thus highlighting the limitation of visual inspection in identifying phylogenetic associations.

Effect of gp120 Phe43 cavity changes on processing and subunit association of CRF01_AE 92TH023 and CRF01_AE CM244 envelope glycoproteins.

To evaluate the role of H375 on CRF01_AE Env function, we replaced histidine 375 by a serine (H375S) that is the most common form in the remaining group M. These mutations were introduced into CRF01_AE 92TH023 and CM244 Envs. Site-directed mutagenesis was also used to modify the CRF01_AE Env residues 61, 105, 108, 474-476; these mutations (H61Y, Q105H, V108I, NIK474-476DMR) correspond to the most prevalent amino acid that are found in non CRF01_AE subtypes and are further referred as the layer mutations (LM).

We then evaluated the effect of these substitutions on processing and stability of the Env trimer. All mutants were efficiently expressed (Figure 2A-D) and the introduction of larger

amino-acid (histidine, H or tryptophan, W) in the Phe43 cavity did not affect the processing of Yu2 Env (clade B), 92TH023 and CM244 (clade CRF01_AE) Env relative to the corresponding wild type Env (Figure 2B). Similar levels of gp120 in the cell supernatant and the cell lysate were also observed in mutants harboring H or S at position 375 (Figure 2A) suggesting that these mutations do not impact the association between the two subunits (gp41 and gp120). Furthermore, a loss of association of the Yu2, 92TH023 and CM244 Env subunits was observed for 375W mutants (Figure 2C). We also evaluated the effect of the LM mutations in the presence of a serine or histidine at position 375. Introduction of the LM mutations described above increased the processing of Envs independently of the residue present at position 375 (Figure 2E) and decreased by almost 75% the association between the gp120 and the gp41 subunits (Figure 2F).

Effect of gp120 Phe43 cavity changes on CRF01_AE 92TH023 and CRF01_AE CM244 envelope glycoproteins function.

We then evaluated the role of H375 and LM on Env function. The entry phenotype was assessed by measuring the relative infectivity and cell-to-cell fusion ability of the variants described above. Briefly, relative infectivity was assessed by incubating Cf2Th-CD4/CCR5 cells with normalized amounts of recombinant HIV-1 virions pseudotyped with wild-type and mutant 92TH023 or CM244 Env variants. Cell-to-cell fusion was assessed by co-incubation of 293T cells expressing the envelope glycoprotein variants with the reporter TZM-bl cells for 6 h at 37°C as described in the materials and methods section.

The introduction of a serine at position 375 in CR01_AE Envs significantly decreased the infectivity of HIV-1 viral particles (Figure 3A) and presented lower ability to mediate cell-to-cell fusion (Figure 3B). Interestingly, introduction of the LM variants partially restored the ability of H375S to mediate viral entry and cell-to-cell fusion (Figure 3 and Table 2) suggesting that the LM mutations compensate for the H375S phenotype. Of note, we noticed that LM variants, on their own, enhanced viral entry and cell to cell fusion for CM244 but not 92TH023 Env, suggesting that some structural differences between these two strains exist.

Ability of mutant envelope glycoproteins to interact with CD4 and susceptibility to sCD4 neutralization.

Since residue 375 is known to modulate Env affinity for CD4 (23, 30, 33), we first evaluated the ability of 92TH023 LM and 375 mutants to interact with CD4 both by immunoprecipitation and SPR. For immunoprecipitation analysis, normalized amounts of radiolabeled wild-type and mutant gp120 glycoproteins were incubated with human CD4-Ig. The precipitates were washed, run on SDS-polyacrylamide gels, and analyzed by densitometry. For SPR analysis, purified gp120 variants were evaluated using a sensor chip where CD4-Ig was immobilized.

Interestingly, replacing H375 by a serine dramatically decreased the affinity for CD4 (Figure 4A). Introduction of the LM mutations alone did not significantly affect CD4 binding compared to the wild-type Env, but partially rescued CD4 binding for the H375S variant. A detailed analysis of the interaction by SPR indicated that the decreased recognition by H375S variant was due to an enhanced off-rate compared to that of the wild-type protein (Table 3). Interestingly, introduction of the LM variants restored CD4 binding of the H375S Env by decreasing the off-rate (Table 3). This is reminiscent of the role played by gp120 inner domain layer 1 residues (such as H66 and W69) which were previously shown to maintain CD4 binding by decreasing the off-rate, despite being located far from the CD4-binding site (23).

As expected from decreased affinity for CD4 (Figure 4A) viruses bearing the H375S variant were resistant to sCD4 neutralization (Figure 4B and 4C). While introduction of the LM mutations alone increased sCD4 sensitivity, introduction in the context of the H375S variant restored wild-type levels of sCD4 neutralization. Thus, these results indicate that in the context of CRF01_AE Envs sCD4 neutralization correlates with Env affinity for CD4.

FIGURES

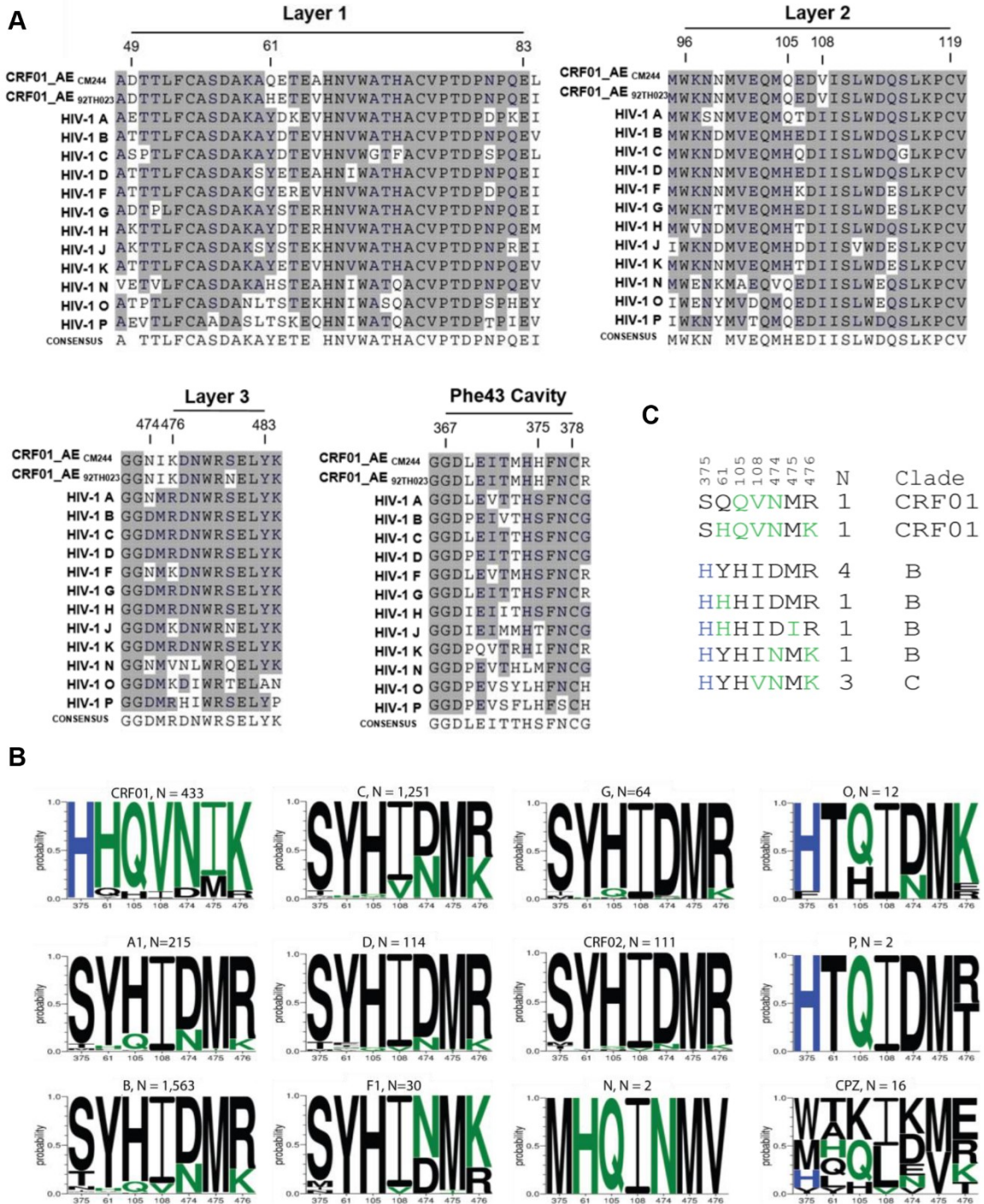


Figure 1. Phe43 cavity and inner domain layer HIV-1 Env sequences. (A) Primary sequence alignment of gp120 residues from the Phe43 cavity, Layer 1, Layer 2, and Layer 3 from a single sequence from each clade: HIV-1 A (accession number ABB29387.1), HIV-1 B (accession number K03455), HIV-1 C (AAB36507.1), HIV-1 D (P04581.1), HIV-1 F (ACR27173.1), HIV-1 G (ACO91925.1), HIV-1 H (AAF18394.1), HIV-1 J (ABR20452.1), HIV-1 K (CAB59009.1), HIV-1 N (AAT08775.1), HIV-1 O (AAA99883.1), HIV-1 P (GQ328744), and two studied viruses CRF01_AE CM244 (AY713425) and CRF01_AE 92TH023. Residue numbering is based on that of the HXBc2 strain of HIV-1. The shading highlights residues that are similar between CRF01_AE from the other subtype from group M. (B) A LOGO depiction of the frequency of each amino acid in positions we originally noted by eye based on figure (A) to be correlated with 375 H and 375 S/T. The height of the letter indicates its frequency. CRF01_AE has >99% 375 H, and the amino acids shown enriched among CRF01_AE sequences, so also associated with 375 H, are shown in green. Black indicates amino acids that are favored in other clades or are rare variants. Logos for sequences from following subtypes and groups are shown: HIV-1 M group major subtypes A1, B, C, D, F1 and G; M group CRFs 01 and 02; the HIV-1 groups N, O and P; and Envs isolated from chimpanzees (CPZ). Subtype and groups are noted above each LOGO, followed by their count. The 2016 Los Alamos database curated Env alignment was used as the basis for this figure, which contains 4,632 HIV-1 and related SIVcpz sequences. (C) An alignment of the positions of interest in the inner domain, ordered as in (B). The two times an H375S was found in CRF01_AE are indicated, and the 10 naturally occurring sequences from other M group major subtypes with the S375H mutation are also shown. As in (B) CRF01_AE common amino acids are shown in green, the positions are indicated above the alignment, the number of times the pattern was found (N) and the clade in which the variant arose are noted on the right.

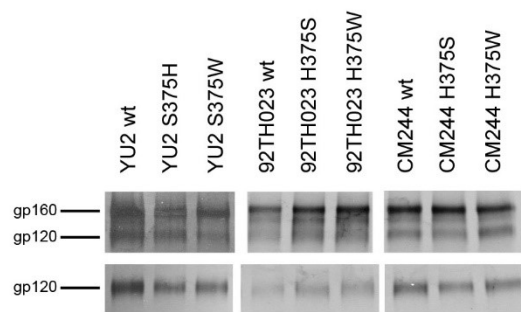
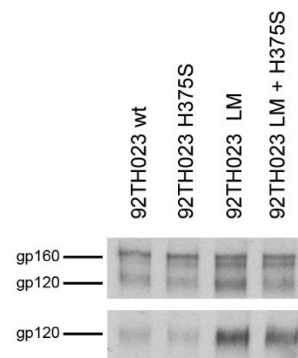
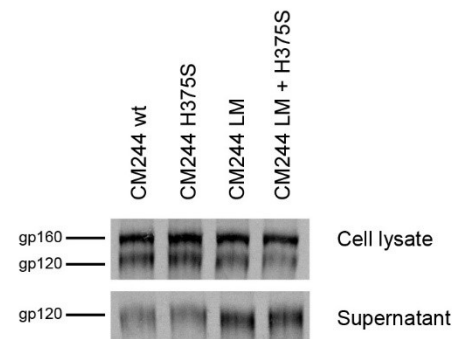
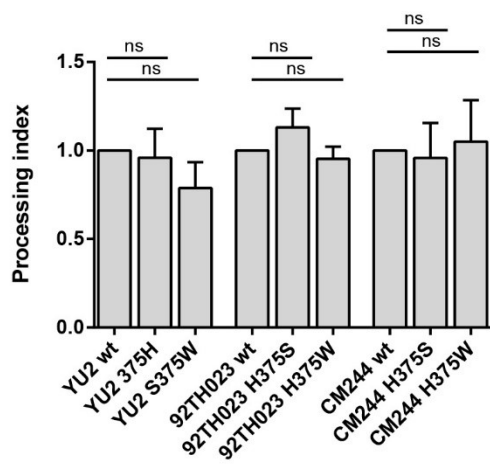
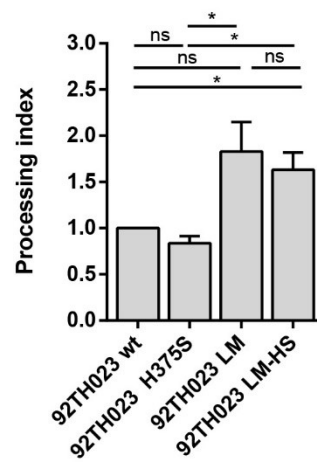
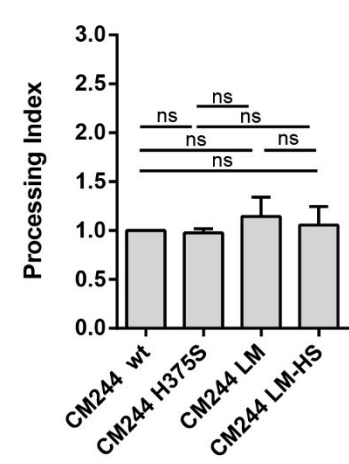
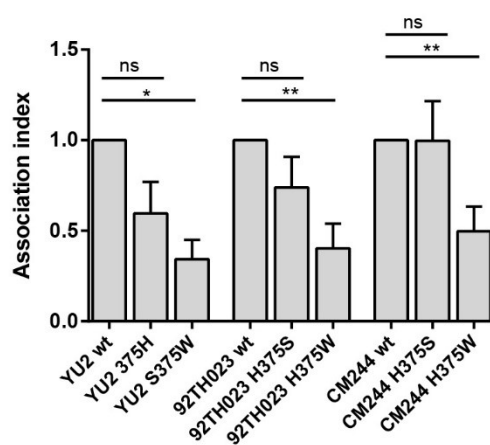
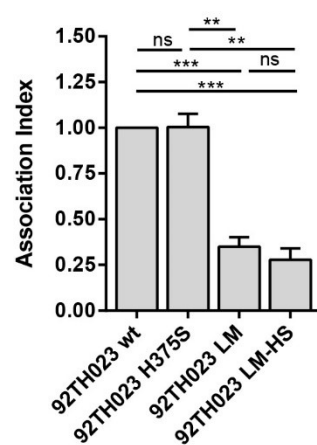
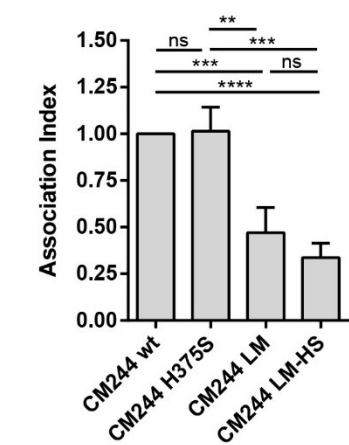
A**D****G****B****E****H****C****F****I**

Figure 2. Effect of 375 changes on processing and subunit association of CRF01_AE 92TH023 and CM244 Envs. Cell lysates and supernatants (SN) of 35S-labeled cells transiently expressing the HIV-1YU2, HIV-1CRF01_AE 92TH or HIV-1CM244 wild-type and indicated mutant envelope glycoproteins were precipitated with HIV+ sera. The precipitated proteins were loaded onto polyacrylamide gels (A, D and G) and analyzed by autoradiography and densitometry. (B, E and H) and (C, F and I) show respectively the processing index and association index of each envelope, calculated as described in materials and methods. Data represents the average +/- SEM from 3 independent experiments. Statistical significance was tested using unpaired t-test (ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

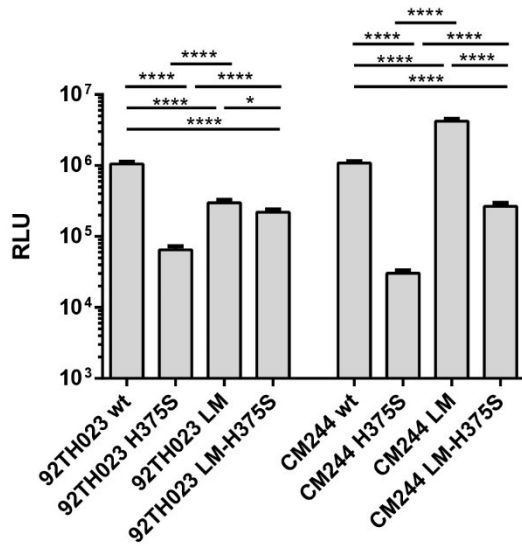
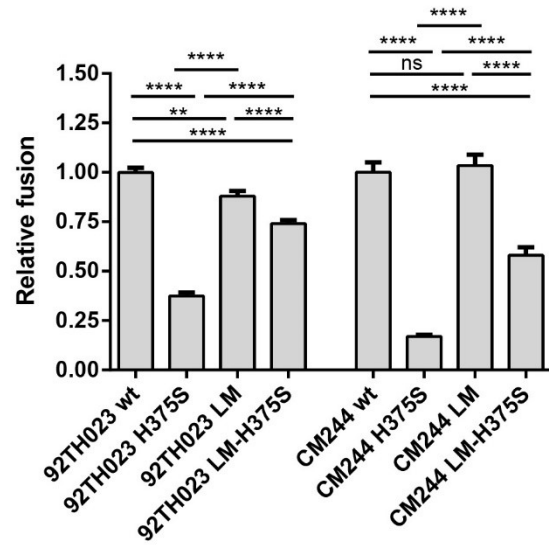
A**B**

Figure 3. Infectivity and cell-to cell fusion of CRF01_AE variants. (A) Relative infectivity was assessed by incubating Cf2Th-CD4/CCR5 cells with recombinant HIV-1 pseudotyped with wild-type and mutant CRF01_AE envelope glycoproteins, normalized according to reverse transcriptase. Data shown represent the means \pm SEM obtained in three independent experiments. (B) Cell-cell fusion ability was assessed by co-incubation of 293T cells expressing the envelope glycoprotein variants with the reporter TZM-bl cells for 6 h at 37°C. The activities of the mutant envelope glycoproteins were normalized to that of the wild-type (wt) envelope glycoproteins. The results shown represent the means \pm SEM obtained from four independent experiments. Statistical significance was tested using unpaired t-test (ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

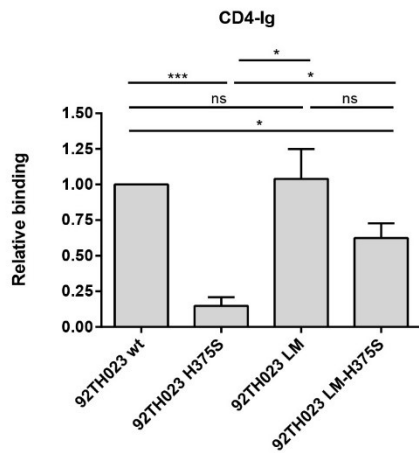
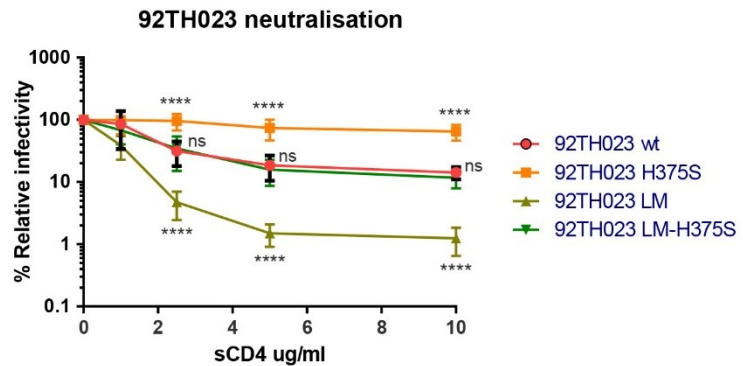
A**B**

Figure 4. CD4 interaction and sCD4 neutralization of CRF01_AE variants. (A) Normalized amounts of radiolabeled wild-type and mutant gp120 glycoproteins were immunoprecipitated with CD4-Ig as described in materials and methods for 1 h at 37°C. The precipitates were washed, run on SDS-polyacrylamide gels, and analyzed by densitometry. Fold increase in the binding of gp120 variants to ligands was normalized to wt. Data shown represent the means \pm SEM of four independent experiments. Statistical significance was tested using unpaired t-test (ns, not significant; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$). (B) Normalized amounts of recombinant HIV-1 virions expressing luciferase and bearing different Env mutant were incubated with serial dilutions of sCD4 for 1h at 37°C before infecting Cf2Th-CD4/CCR5 cells. Luciferase activity in cell lysates was measured to determine the infectivity. Infectivity was normalized to 100% in the absence of the ligand. Data shown are representative of results from at-least three independent experiments, performed in quadruplicate. (ns, not significant; ****, $P < 0.0001$).

Table 1. Summary of amino acids in positions within the inner domain layers that co-vary with amino acids found in Env position 375. ^d

Test	HXB2 Position	AA at 375	Query AA	p-value	r1c1	r1c2	r2c1	r2c2	q-value	Odds Ratio
T1 ^a	61	H	H	5.00E-103	44	142	785	27	6.40E-102	0.011
T1	61	H	I	0.021	186	0	783	20	0.061	Inf
T2	61	H	I	0.021	0	186	20	771	0.13	0
T1	61	H	P	0.035	184	2	813	0	0.098	0
T2	61	H	P	0.035	2	184	0	813	0.18	Inf
T2 ^b	61	H	Q	2.10E-09	13	169	1	812	2.00E-07	62
T1	61	H	Q	8.10E-11	169	15	812	1	3.40E-10	0.014
T1	61	H	Y	3.30E-102	162	24	68	734	3.50E-101	72
T2	61	H	Y	0.00058	5	160	7	24	0.0092	0.11
T1	61	S	H	2.90E-72	689	20	140	149	1.40E-71	36
T1	61	S	Q	1.60E-09	710	0	271	16	6.90E-09	Inf
T2	61	S	Q	2.00E-08	0	710	14	271	1.50E-06	0
T1	61	S	Y	2.90E-72	51	649	179	109	1.40E-71	0.048
T2	61	S	Y	0.0026	5	14	7	170	0.03	8.5
T1	105	H	H	4.70E-79	158	28	110	693	2.60E-78	35
T1	105	H	Q	2.10E-91	29	155	735	76	1.50E-90	0.02
T1	105	S	H	8.40E-50	93	608	175	113	3.40E-49	0.099
T1	105	S	Q	4.60E-59	645	63	119	168	1.90E-58	14
T2	108	H	I	0.0028	9	154	9	32	0.03	0.21
T1	108	H	I	4.40E-84	157	27	97	704	3.10E-83	42
T1	108	H	V	2.00E-91	30	156	737	76	1.40E-90	0.02
T2	108	H	Y	0.033	0	184	18	771	0.10	0
T1	108	S	I	1.00E-52	82	617	172	114	4.10E-52	0.088
T1	108	S	V	3.40E-58	646	64	121	168	1.40E-57	14
T1	474	H	D	2.60E-47	160	26	232	567	1.00E-46	15
T1	474	H	N	2.40E-54	29	155	623	189	9.90E-54	0.057
T1	474	H	R	0.029	185	1	770	28	0.09	6.7
T2	474	H	R	0.029	1	184	28	756	0.19	0.15
T1	474	S	D	3.50E-29	199	499	193	94	1.20E-28	0.19
T1	474	S	N	2.70E-32	546	163	106	181	1.00E-31	5.7
T1	475	H	I	8.80E-100	56	128	799	13	9.20E-99	0.0072
T3 ^c	475	H	I	3.10E-05	22	124	7	1	0.00092	0.026
T2	475	H	I	0.0044	4	34	12	792	0.043	7.7
T1	475	H	M	4.30E-80	136	50	51	747	2.50E-79	40
T2	475	H	M	8.50E-08	19	130	12	3	5.50E-06	0.038
T3	475	H	M	0.029	6	31	48	735	0.14	3
T1	475	H	Y	0.047	182	2	763	34	0.13	4.1
T2	475	H	Y	0.047	2	179	34	748	0.23	0.25
T1	475	S	I	3.70E-69	699	10	156	131	1.60E-68	58
T3	475	S	I	0.00018	5	0	24	125	0.0036	Inf
T2	475	S	I	0.034	10	694	6	132	0.18	0.32
T1	475	S	M	3.10E-54	42	655	145	142	1.30E-53	0.063
T2	475	S	M	5.70E-06	8	1	23	132	0.00017	44
T2	476	H	E	0.031	2	183	34	749	0.19	0.24
T1	476	H	E	0.048	184	2	764	34	0.13	4.1
T1	476	H	K	1.50E-57	24	162	611	200	6.30E-57	0.049
T1	476	H	M	0.035	184	2	813	0	0.098	0
T2	476	H	M	0.035	2	184	0	813	0.18	Inf
T1	476	H	R	3.00E-52	166	20	239	562	1.20E-51	19
T1	476	S	K	8.30E-38	541	168	94	194	3.00E-37	6.6
T2	476	S	K	0.018	65	530	19	77	0.13	0.5
T1	476	S	R	2.90E-34	201	498	204	84	1.10E-33	0.17
T3	476	S	R	0.026	93	484	24	68	0.13	0.54

a The signature analysis identified amino acids that co-varied with amino acids at position 375: either H375, the common amino acid in CRF01, or S375, the most common amino acid at position 375 in HIV-1 sequences from all other subtypes. We prioritized Env positions within the inner domain. The Test “T1” is just a simple Fisher’s exact test using a 2x2 contingency table with no phylogenetic correction. For position 375, starting with either H or not-H (or S or not-S), we tallied the number of times the 375 amino acid is present in association with each amino acid found in each other position in the alignment; thousands of tests were done. $r1c1$, $r1c2$, $r2c1$, and $r2c2$ are the rows (r) and columns (c) are the elements in a 2x2 contingency table, and are listed as columns. For example, in the first row, an H in position 375 is found 142 times in conjunction with an H at position 61 ($r1c2$), and 44 times with other amino acids at position 61 ($r1c1$), and H375 is significantly enriched for an H in position 61.

b To determine whether or not a given association could have resulted from a phylogenetic artifact due to a founder effect, we also did a phylogenetically corrected association analysis. For the H375-H61 T1 association, the H61 and H375 are both very common in CRF01, and so this could be just a founder, or lineage-based, association. In this case, the association was not supported by a phylogenetically corrected analysis, so leaving the possibilities that there may be a functional constraint, or that the association may simply result from CRF01 being enriched for both H375 and H61. On the other hand, several other amino acids at position 61 were statistically robust even after a phylogenetic correction, strongly supporting a co-variation pattern between the two sites. To do the phylogenetic correction, maximum likelihood was used to estimate the probability of a given amino acid at each ancestral node in a phylogenetic tree. The most probable amino acid in a given position in the last node prior to a leaf is considered to be the most likely ancestral amino acid in that position, given the tree and the evolutionary model. This approach was described in detail in (42). Changes to and from a given ancestral state in the query position, given the amino acid at 375, were tallied, and then used as a basis for Fisher’s exact test. An example of a “T2” corrected table can be found in row 6; T2 tests when the ancestral state is not the query amino acid. In this case, position 61 is much more likely to change to Q if there is an H at 375, than if there is not, $p = 2.1^{-09}$

c The third kind of comparison we evaluated is test T3: when the query amino acid is present in the ancestral state, the frequency it mutates away from that state associated with the

amino at 375. The first example of a T3 test is I475 (raw 32), in association with H375. In this case, I475 remains I 124/125 times when H is present at 375, while I475 mutates away from I much more frequently when an amino acid other than H is found at 375.

All amino acids in all positions in the Env alignment were evaluated for associations with the amino acids at 375, H375 and S375. The q-values to address multiple tests were calculated based on comparisons of each amino acid in all Env positions, and associations with a q value of < 0.20 were deemed of interest.

d Test T1 is a simple Fisher's test that tests for correlations between amino acids in position 375 and amino acids in other positions. It cannot resolve whether correlations between amino acids in position 375 and other sites are due to functional dependence, or founder effects. Therefore, a phylogenetically corrected signature analysis (42, 43) was also used for mutational events that were enriched in the sites of interest in the context of either H375 or S375 (Tests T2 and T3, shown in bold face). These tests evaluate whether amino acids either tend to mutate or to stay the same in the context of either H375 or S375, and these tests correct for overt clade effects. Query amino acids (AA) are blue if they are enriched in the context of the given AA at 375, and red if they are negatively associated. $r1c1$, $r1c2$, $r2c1$, and $r2c2$ are the rows (r) and columns (c) are the elements in a 2x2 contingency table, and the P values are 2-sided Fisher's exact test based on this table. Q values, or false positive rates, were calculated as described in (42, 43) to address multiple test issues, and only associations with q values < 0.20 are included here. Comparison with H375 are white, with S375 are lightly shaded.

Table 2. Phenotypes of CRF01_AE gp120 variants.^a

	Mutants ^b	Processing ^c	Association ^d	Relative infectivity ^e	Cell to cell fusion ^f	CD4-Ig ^g
CRF01_AE 92TH023	375H (wt)	1 ^h	1 ^h	1 +/- 0.06590	1 +/- 0.02257	1 ^h
	H375S	0.8369 +/- 0.07743	1.004 +/- 0.07331	0.0671 +/- 0.007230	0.3739 +/- 0.0181	0.1478 +/- 0.06188
	H375W	0.9534 +/- 0.06886	0.4035 +/- 0.1356	0.8202 +/- 0.1556	1.514 +/- 0.06388	ND
	LM	1.828 +/- 0.3201	0.3493 +/- 0.05255	0.2824 +/- 0.02690	0.8793 +/- 0.02617	1.039 +/- 0.2101
	LM-375S	1.632 +/- 0.1865	0.2786 +/- 0.06254	0.2090 +/- 0.01721	0.7412 +/- 0.01638	0.6248 +/- 0.1039
CRF01_AE CM244	375H (wt)	1 ^h	1 ^h	1 +/- 0.05814	1 +/- 0.05007	
	H375S	0.9751 +/- 0.04242	1.014 +/- 0.06434	0.02800 +/- 0.002716	0.1619 +/- 0.00874	
	H375W	1.051 +/- 0.2340	0.4974 +/- 0.1355	0.8026 +/- 0.2523	0.8326 +/- 0.05030	
	LM	1.144 +/- 0.1963	0.4709 +/- 0.06737	3.876 +/- 0.2968	1.1534 +/- 0.05501	
	LM-375S	1.057 +/- 0.1890	0.3363 +/- 0.03885	0.2464 +/- 0.02595	0.6263 +/- 0.03909	
YU2	375S (wt)	1 ^h	1 ^h	1 +/- 0.0558	1 +/- 0.01773	
	S375H	0.9599 +/- 0.1636	0.5956 +/- 0.1735	1.205 +/- 0.3382	0.9529 +/- 0.06498	
	S375W	0.7885 +/- 0.1457	0.3427 +/- 0.1062	0.9868 +/- 0.3191	0.9605 +/- 0.02366	

^a Values presented in this table represent the means of data from at least three independent experiments. Experimental variation is shown here as SEM is reported.

^b The numbering of the CRF01_AE and YU2 gp120 envelope glycoprotein amino acid residues are based on that of the prototypic HXBc2 strain of HIV-1, where 1 is the initial methionine (35). The mutations result in the substitution of the amino acid residue shown on the left for the amino acid residue shown on the right of the number; for example, H375S indicates a substitution of a histidine residue for the serine residue at position 375. LM represents the combination of the following mutations: H61Y, Q105H, V108I and NIK474-476DMR.

^c The processing index is a measure of the conversion of the mutant gp160 envelope glycoprotein precursor to mature gp120 relative to that of the wild-type envelope glycoproteins. The processing index was calculated by the following formula: processing index = $([\text{total gp120}]_{\text{mutant}} \times [\text{gp160}]_{\text{wild-type}}) / ([\text{gp160}]_{\text{mutant}} \times [\text{total gp120}]_{\text{wild-type}})$.

^d The association index is a measure of the ability of the mutant gp120 molecule to remain associated with the envelope glycoprotein complex on the expressing cell relative to that of the wild-type envelope glycoproteins. The association index is calculated as follows: association index = $([\text{mutant gp120}]_{\text{cell}} \times [\text{wild-type gp120}]_{\text{supernatant}}) / ([\text{mutant gp120}]_{\text{supernatant}} \times [\text{wild-type gp120}]_{\text{cell}})$.

^e Relative infectivity was assessed by infecting Cf2Th-CD4/CCR5 cells with similar amounts of recombinant HIV-1 pseudotyped with wild-type and mutant CRF01_AE envelope glycoproteins, normalized according to reverse transcriptase (see Materials and Methods). The ratio of mutant/wild-type virus infectivity is reported.

^f Cell-cell fusion ability was assessed by co-incubation for 6 h at 37°C of 293T cells expressing the 92TH023 or CM244 envelope glycoprotein variants with the reporter TZM-bl cells, as described in Materials and Methods.

^g Normalized amounts of radiolabeled wild-type and mutant gp120 glycoproteins were incubated with 13 nM CD4-Ig for 1 h at 37°C. The immunoprecipitates were washed, run on SDS-polyacrylamide gels, and analyzed by densitometry. ND, not determined.

^h For association/processing indexes and CD4-Ig immunoprecipitation no SEM are reported since values were normalized to 1 for the wt.

Table 3. Ability of HIV-1 CRF01_AE 92TH023 gp120 variants to interact with CD4-Ig by surface plasmon resonance^a

CRF01_AE 92TH023 gp120 variants	On-Rate Constant (M⁻¹s⁻¹)	Off-Rate Constant (s⁻¹)	KD (M) (Fold change)
Wt	3,34E+03	9,76E-04	2,92E-07 (1,00)
H375S	2,71E+03	1,89E-03	6,95E-07 (2,38)
LM	1,10E+04	1,49E-04	1,35E-08 (0,05)
LM + H375S	8,59E+03	3,22E-04	3,74E-08 (0,13)

^a CD4-Ig was immobilized directly onto a CM5 sensor chip and the binding of the indicated gp120 protein was evaluated as described in Materials and Methods. KD, equilibrium dissociation constant. wt, wild-type. LM, inner domain mutants H61Y, Q105H, V108I, NIK474-476DMR.

DISCUSSION

Since the first emergence of CRF01_AE in Africa and subsequent spread to Asia where it established a major epidemic, these viruses have become the dominant strains in many Asian countries, including Southern China and Thailand where they have the highest prevalence (18, 45, 46). Why this lineage of viruses was able to spread so rapidly is unclear at the moment, it did not spread particularly rapidly in Africa (14). Higher viral loads and shorter survival times in comparison with people infected in western countries have been associated with CRF01_AE infections (47-49).

Interestingly, we noticed that from all group M subtypes present in the NIH Los Alamos HIV database, only CRF01_AE has a highly conserved histidine at position 375. Since it has been previously shown that replacement of serine 375 by a histidine modified Env conformation towards a state closer to the CD4-bound conformation (30), we evaluated whether histidine 375 affected Env function in the CRF01_AE Env context.

Besides the Phe43 cavity, additional gp120 elements have been shown to play a role in the transition to the CD4-bound conformation (23, 50-54). Interestingly, potential co-evolution between certain gp120 inner domain layers residues and the Phe43 cavity has been suggested (32, 34). Therefore, we evaluated whether additional residues of the gp120 inner domain might be associated with H375. Sequence comparison of the CRF01_AE Env sequences to sequences from other subtypes allowed the identification of six residues of the gp120 inner domain layers (61, 105, 108, 474-476) that were conserved in CRF01_AE but not in other subtypes; these were likely candidates to compensate for the presence of a large residue at position 375 (H375) in CRF01_AE. Replacement of residue 375 by a tryptophan but not a histidine decreased association between gp120 and gp41 both in the clade B Yu2 and CRF01_AE Envs, however, no effect on Env processing was observed for all the variants tested. Replacement of H375 by a serine did not result in a significant decrease of Env stability or processing.

Mutating the six residues that were initially identified by eye, but then confirmed to be important by phylogenetically corrected signature analysis in 5/6 cases in the inner domain layers had a significant impact on the association and processing of the Env and this was independent of the amino acids (His or Ser) at position 375. Inner domain layer variants

enhanced the processing of the Env, and decreased the association of the gp120 and the gp41. CRF01_AE Envs had a better overall stability without the layer mutations. Our results indicate that the Phe43 cavity and the inner domain layers modulate the stability of CRF01_AE Envs. Of note, none of the individual inner domain layer mutations present in the LM variant restored the phenotype of H375S on their own, indicating that the combination of all mutations is required to compensate for the Phe43 cavity change (not shown).

It is well known that HIV-1 Env is a metastable and highly flexible protein (55). Therefore, functional Env trimers need to maintain a balance between the envelope stability, the magnitude of the conformational changes and binding affinity to CD4. In fact, premature triggering of the Env complex to downstream conformations results in functional inactivation (56), the exposure of non-neutralizing epitopes (57) and rapidly decaying intermediate states (56, 57). We observed that the capacity of CRF01_AE Envs to interact with CD4 depends on the presence of a histidine at position 375. Interestingly, the poor recognition of CD4 by CRF01_AE Envs with the H375S mutation could be compensated by restoring the nature of 6 layer residues conserved in the majority of non-CRF01_AE M group strains. Decreased CD4 interaction correlated with a lack of Env function as measured by infectivity and ability to mediate cell-to-cell fusion. Moreover, decreased CD4 interaction explained a dramatic loss in sCD4 sensitivity of the H375S mutant Envs, which was restored upon introduction of these inner domain mutations. Our results suggest that CRF01_AE strains have evolved to secure CD4 binding with the presence of a bigger amino acid in the Phe43 cavity and that additional changes in the inner domain layers co-evolved to compensate for the presence of H375.

Unlike the majority of HIV-1 Envs, some SIV groups have larger residues than a serine at Env position 375 (methionine, histidine, tyrosine, tryptophan). In several cases the strains with these larger amino acids successfully made the transition from primates into humans (the P, N and O groups). Since the presence of larger amino acids at 375 is known to enhance the affinity of Env for CD4 (23, 30, 33) it is possible that their presence in SIV strains is required to infect cells which express lower levels of CD4 on their surface, as shown for rhesus macaques macrophages (58-60). However, why a histidine was selected for in subtype CRF01_AE at position 375 for a virus infecting human cells is not clear. Additional work is needed to assess

the evolutionary pressures that resulted in the fixation of a histidine at position 375 in this rapidly spreading HIV-1 subtype.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a CIHR foundation grant #352417 to A.F. A.F. is the recipient of a Canada Research Chair on Retroviral Entry. D.Z. is the recipient of a FRQS master award #30888. M.V. is the recipient of a CIHR Doctoral Research Award #291485. K.W. and B.K. were supported by AI100663 Duke Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology and Immunogen Design (CHAVI-ID). Our funding sources had no role in data collection, analysis or interpretation, and were not involved in the writing of this manuscript. The authors have no conflicts of interest to report.

Disclaimer: The opinions expressed herein are those of the authors and should not be construed as official or representing the views of the U.S. Department of Defense or Department of the Army. Mention of trade names, commercial products, or organizations does not imply endorsement by the U.S. government.

REFERENCES

1. **Mansky LM, Temin HM.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69:5087-5094.
2. **O'Neil PK, Sun G, Yu H, Ron Y, Dougherty JP, Preston BD.** 2002. Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis. *J Biol Chem* 277:38053-38061.
3. **Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH.** 2010. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol* 84:9864-9878.
4. **Coffin JM.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.
5. **Frost SD, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, Chappey C, Galovich J, Beauchaine J, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD.** 2005. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18514-18519.
6. **Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
7. **McCutchan FE.** 2006. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* 78 Suppl 1:S7-S12.
8. **Burke DS.** 1997. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis* 3:253-259.
9. **Taylor BS, Hammer SM.** 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 359:1965-1966.
10. **Hemelaar J.** 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18:182-192.

11. **Hemelaar J.** 2013. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect* 66:391-400.
12. **Saksena NK, Lau KA, Dwyer DE, Wang B.** 2011. HIV Recombination and Pathogenesis – Biological and Epidemiological Implications, HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies. InTech doi:10.5772/23819.
13. **Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288:55-56.
14. **Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Korber B, Leitner T.** 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7:25.
15. **Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T.** 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789-1796.
16. **Hu WS, Temin HM.** 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250:1227-1233.
17. **Temin HM.** 1991. Sex and recombination in retroviruses. *Trends Genet* 7:71-74.
18. **Li X, Li W, Zhong P, Fang K, Zhu K, Musa TH, Song Y, Du G, Gao R, Guo Y, Yan W, Xuan Y, Wei P.** 2016. Nationwide Trends in Molecular Epidemiology of HIV-1 in China. *AIDS Res Hum Retroviruses* doi:10.1089/AID.2016.0029.
19. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.** 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20:W13-23.

20. Carr JK, Salminen MO, Koch C, Gotte D, Artenstein AW, Hegerich PA, St Louis D, Burke DS, McCutchan FE. 1996. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 70:5935-5943.
21. Simon-Loriere E, Galetto R, Hamoudi M, Archer J, Lefeuvre P, Martin DP, Robertson DL, Negroni M. 2009. Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus. *PLoS Pathog* 5:e1000418.
22. Archer J, Pinney JW, Fan J, Simon-Loriere E, Arts EJ, Negroni M, Robertson DL. 2008. Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints. *PLoS Comput Biol* 4:e1000178.
23. Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong PD, Sodroski J. 2010. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell* 37:656-667.
24. Helseth E, Olshevsky U, Furman C, Sodroski J. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 65:2119-2123.
25. Yang X, Mahony E, Holm GH, Kassa A, Sodroski J. 2003. Role of the gp120 inner domain beta-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits. *Virology* 313:117-125.
26. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659.
27. Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol* 69:5723-5733.
28. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2:1075-1082.

29. **Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-430.
30. **Xiang SH, Kwong PD, Gupta R, Rizzuto CD, Casper DJ, Wyatt R, Wang L, Hendrickson WA, Doyle ML, Sodroski J.** 2002. Mutagenic stabilization and/or disruption of a CD4-bound state reveals distinct conformations of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 76:9888-9899.
31. **Desormeaux A, Coutu M, Medjahed H, Pacheco B, Herschhorn A, Gu C, Xiang SH, Mao Y, Sodroski J, Finzi A.** 2013. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *J Virol* 87:2549-2562.
32. **Finzi A, Pacheco B, Xiang SH, Pancera M, Herschhorn A, Wang L, Zeng X, Desormeaux A, Kwong PD, Sodroski J.** 2012. Lineage-specific differences between human and simian immunodeficiency virus regulation of gp120 trimer association and CD4 binding. *J Virol* 86:8974-8986.
33. **Li H, Wang S, Kong R, Ding W, Lee FH, Parker Z, Kim E, Learn GH, Hahn P, Policicchio B, Brocca-Cofano E, Deleage C, Hao X, Chuang GY, Gorman J, Gardner M, Lewis MG, Hatziioannou T, Santra S, Apetrei C, Pandrea I, Alam SM, Liao HX, Shen X, Tomaras GD, Farzan M, Chertova E, Keele BF, Estes JD, Lifson JD, Doms RW, Montefiori DC, Haynes BF, Sodroski JG, Kwong PD, Hahn BH, Shaw GM.** 2016. Envelope residue 375 substitutions in simian-human immunodeficiency viruses enhance CD4 binding and replication in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E3413-3422.
34. **Ding S, Medjahed H, Prevost J, Coutu M, Xiang SH, Finzi A.** 2016. Lineage-specific differences in the gp120 Inner Domain Layer 3 of Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01215-16.
35. **LaBonte JA, Patel T, Hofmann W, Sodroski J.** 2000. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol* 74:10690-10698.

36. **Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:2855-2864.
37. **Korber B, Foley BT, Kuiken C, Pillai SK, Sodroski JG.** 1998. Numbering positions in HIV relative to HXB2CG.
38. **Rho HM, Poiesz B, Ruscetti FW, Gallo RC.** 1981. Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology* 112:355-360.
39. **Coutu M, Finzi A.** 2015. HIV-1 gp120 dimers decrease the overall affinity of gp120 preparations for CD4-induced ligands. *J Virol Methods* 215-216:37-44.
40. **Johnsson B, Lofas S, Lindquist G.** 1991. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198:268-277.
41. **Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188-1190.
42. **Bhattacharya T, Daniels M, Heckerman D, Foley B, Frahm N, Kadie C, Carlson J, Yusim K, McMahon B, Gaschen B, Mallal S, Mullins JI, Nickle DC, Herbeck J, Rousseau C, Learn GH, Miura T, Brander C, Walker B, Korber B.** 2007. Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science* 315:1583-1586.
43. **Gnanakaran S, Daniels MG, Bhattacharya T, Lapedes AS, Sethi A, Li M, Tang H, Greene K, Gao H, Haynes BF, Cohen MS, Shaw GM, Seaman MS, Kumar A, Gao F, Montefiori DC, Korber B.** 2010. Genetic signatures in the envelope glycoproteins of HIV-1 that associate with broadly neutralizing antibodies. *PLoS Comput Biol* 6:e1000955.
44. **Sharp PM, Hahn BH.** 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006841.

45. **Zhong P, Pan Q, Ning Z, Xue Y, Gong J, Zhen X, Zhou L, Sheng F, Zhang W, Gai J, Cheng H, Yue Q, Xing H, Zhuang M, Lu W, Shao Y, Kang L.** 2007. Genetic diversity and drug resistance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains circulating in Shanghai. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:847-856.
46. **He X, Xing H, Ruan Y, Hong K, Cheng C, Hu Y, Xin R, Wei J, Feng Y, Hsi JH, Takebe Y, Shao Y, Group for HIVMES.** 2012. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey. *PLoS One* 7:e47289.
47. **Hu DJ, Vanichseni S, Mastro TD, Raktham S, Young NL, Mock PA, Subbarao S, Parekh BS, Srisuwanvilai L, Sutthent R, Wasi C, Heneine W, Choopanya K.** 2001. Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *AIDS* 15:683-691.
48. **Rangsin R, Piyaraj P, Sirisanthana T, Sirisopana N, Short O, Nelson KE.** 2007. The natural history of HIV-1 subtype E infection in young men in Thailand with up to 14 years of follow-up. *AIDS* 21 Suppl 6:S39-46.
49. **Rangsin R, Chiu J, Khamboonruang C, Sirisopana N, Eiumtrakul S, Brown AE, Robb M, Beyrer C, Ruangyuttikarn C, Markowitz LE, Nelson KE.** 2004. The natural history of HIV-1 infection in young Thai men after seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 36:622-629.
50. **Mao Y, Wang L, Gu C, Herschhorn A, Xiang SH, Haim H, Yang X, Sodroski J.** 2012. Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nat Struct Mol Biol* doi:10.1038/nsmb.2351.
51. **Kang CY, Hariharan K, Nara PL, Sodroski J, Moore JP.** 1994. Immunization with a soluble CD4-gp120 complex preferentially induces neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies directed to conformation-dependent epitopes of gp120. *J Virol* 68:5854-5862.

52. **Myszka DG, Sweet RW, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong PD, Hendrickson WA, Wyatt R, Sodroski J, Doyle ML.** 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9026-9031.
53. **Kwon YD, Finzi A, Wu X, Dogo-Isonagie C, Lee LK, Moore LR, Schmidt SD, Stuckey J, Yang Y, Zhou T, Zhu J, Vicic DA, Debnath AK, Shapiro L, Bewley CA, Mascola JR, Sodroski JG, Kwong PD.** 2012. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5663-5668.
54. **Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH, Haynes BF, Robinson JE, Kaufmann DE, Bonsignori M, Sodroski J, Finzi A.** 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* 88:2633-2644.
55. **Wyatt R, Sodroski J.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-1888.
56. **Haim H, Si Z, Madani N, Wang L, Courter JR, Princiotta A, Kassa A, DeGrace M, McGee-Estrada K, Mefford M, Gabuzda D, Smith AB, 3rd, Sodroski J.** 2009. Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS Pathog* 5:e1000360.
57. **Haim H, Strack B, Kassa A, Madani N, Wang L, Courter JR, Princiotta A, McGee K, Pacheco B, Seaman MS, Smith AB, 3rd, Sodroski J.** 2011. Contribution of Intrinsic Reactivity of the HIV-1 Envelope Glycoproteins to CD4-Independent Infection and Global Inhibitor Sensitivity. *PLoS Pathog* 7:e1002101.
58. **Mori K, Rosenzweig M, Desrosiers RC.** 2000. Mechanisms for adaptation of simian immunodeficiency virus to replication in alveolar macrophages. *J Virol* 74:10852-10859.
59. **Marcon L, Choe H, Martin KA, Farzan M, Ponath PD, Wu L, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1997. Utilization of C-C chemokine receptor 5 by the envelope

glycoproteins of a pathogenic simian immunodeficiency virus, SIVmac239. *J Virol* 71:2522-2527.

60. **Marcon L, Sodroski J.** 1997. High degree of sensitivity of the simian immunodeficiency virus (SIVmac) envelope glycoprotein subunit association to amino acid changes in the glycoprotein 41 ectodomain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:441-447.

Discussion

1. La recombinaison : un mécanisme évolutif important pour CRF01_AE

La recombinaison qui permet la création de CRFs est importante à considérer. En effet, les nouveaux virus émergeant de la recombinaison possèdent leurs propres caractéristiques. Ceux-ci peuvent être semblables ou tout à fait différents des souches duquel le virus est issu. Ces virus seront alors avantagés ou désavantagés dépendamment des caractéristiques obtenues.

Généralement, l'intérêt est porté sur la pathogenèse du virus et sur les conséquences qu'elle peut avoir sur l'hôte. Mais qu'en est-il du virus lui-même? Quelles sont les conséquences d'un changement brusque impliquant de larges portions de protéines codantes qui peuvent être critiques pour la réplication virale? Le virus peut-il supporter un tel changement drastique ?

1.1 Impact de la recombinaison sur la réplication du virus

La recombinaison peut permettre l'acquisition de nouvelles propriétés, qui ont un impact sur la réplication. La souche CRF02_AG en est un bon exemple. Cette souche présente des caractéristiques autres que celles de ses clades parents, les sous-groupes A et G. Ainsi, l'événement de recombinaison qui a conduit à la formation de la souche CRF02_AG a permis la sélection d'une variante avec une meilleure capacité répliquative comparativement aux sous-types parentaux. Cette adaptation serait un facteur important qui contribue à la propagation du VIH-1 et sa dominance dans l'Afrique centrale (257). De manière similaire, l'infection avec un virus recombinant A/D est caractérisée par une progression nettement plus rapide que celle du sous-type A (258). Finalement, la souche recombinante complexe CRF19_cpx ayant des fragments de sous-groupes A, D et G a été associée à une progression rapide de la maladie puisqu'elle posséderait une meilleure protéase, utiliserait CXCR4 comme corécepteur et activerait fortement le système immunitaire. Ainsi, les patients infectés par cette souche présentent une progression rapide dans les 3 premières années (259).

1.2 Impact de la recombinaison sur l'évolution génétique

La recombinaison est un mécanisme important pour le virus et contribue grandement à la diversité génétique. Bien que les gènes évoluent de façon progressive via des mutations

ponctuelles, des modifications génétiques importantes lors des événements de recombinaison permettent une évolution accélérée.

Dans l'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire, il a été possible de mettre en évidence une particularité de la glycoprotéine d'enveloppe de la souche CRF01_AE qui a pu être héritée d'une recombinaison entre les sous-types A et E. Les changements des acides aminés au niveau d'une protéine dont la fonction est primordiale pour la survie du virus, telle que Env, s'accompagnent souvent de changements complémentaires qui permettent de conserver sa structure et fonction.

Ayant cette idée en tête, deux points importants en ressortent. Premièrement, l'enveloppe du virus CRF01_AE a probablement été acquise en un seul fragment provenant d'un virus parental qui à ce jour n'a pas été identifié et donc cette affirmation ne peut être vérifiée. Cependant, les points de cassure de l'enveloppe CRF01_AE sont à la bordure du gène, loin du polymorphisme de la position 375, suggérant une recombinaison en périphérie de la séquence. Deuxièmement, la coévolution préexistante entre la cavité phe43 et la couche topologique aurait été façonnée dans l'enveloppe parentale, ce qui a permis de conserver les interactions intra moléculaire de l'enveloppe. Ces interactions sont très importantes pour le mécanisme d'entrée du virus.

En changeant de grands fragments de gènes, une coévolution entre ces fragments permet de façonner les protéines virales afin de les optimiser. Ainsi, la recombinaison est un mécanisme à double tranchant, c'est-à-dire qu'il peut avoir un rôle bénéfique sur l'évolution du virus et la diversité génétique en favorisant l'apparition de nouvelles propriétés qui ont permis de façonner un virus capable d'échapper efficacement au système immunitaire. Dans le cas de l'enveloppe de CRF01_AE, cette étude suggère qu'une coévolution entre la cavité phe43 et les couches topologiques a été nécessaire afin de maintenir l'intégrité fonctionnelle de l'enveloppe.

Finalement, lorsqu'on s'attarde au génome complet du CRF01_AE on peut aussi remarquer qu'une partie du gène *nef* provient du clade E et une autre partie du clade A. Ainsi, dans ce gène les points de cassure ont vraisemblablement eu lieu au sein même de la protéine, ce qui pourrait perturber ou modifier la fonction protéique. Une comparaison avec le Nef du clade A parental serait alors intéressante afin de comprendre les interactions fonctionnelles avec

l'enveloppe de clade AE. De plus, une étude plus approfondie de la capacité du Nef CRF01_AE à réaliser ses différentes fonctions serait utile. Entre autres, l'évaluation de la capacité de Nef à réguler à la baisse CD4 devrait être évaluée, puisque celle-ci peut indirectement moduler la conformation de l'enveloppe (se référer à la section 3.3.3).

Somme toute, la recombinaison semble être un avantage évolutif majeur en accélérant l'évolution, tant qu'il y a maintien de l'intégrité des fonctions des fragments de gènes qui ont été changés. Les changements ponctuels s'ajoutent à ceux issus de la recombinaison afin de compenser ou compléter les modifications dues à une recombinaison au sein d'un gène. La pression évolutive qu'un virus a subie peut également se transmettre par recombinaison à un autre virus qui n'aurait pas été exposé à celle-ci.

1.3 La recombinaison : un obstacle pour la classification

Le VIH est parmi les virus humains les plus génétiquement variables. En plus des sous-types purs, de plus en plus de formes recombinantes sont découvertes chaque année. Bien que classées dans une même catégorie, les CRFs peuvent se présenter sous différentes formes. De plus, étant issus de la recombinaison entre des virus de sous-types distincts, de groupes distincts et de recombinaison entre les CRF, leur génome se retrouve à être modifié.

L'alignement des séquences du groupe M et du sous-type CRF01_AE et sous-type B obtenues de la banque de données de Los Alamos reflète bien cette disparité qui peut exister entre les souches CRF et les souches du groupe M dans lequel ils sont classées (Annexe 1, Figure 9). Lorsqu'on regarde la probabilité de l'acide aminé en position 375, celle-ci change si on inclut ou pas le sous-type CRF01_AE dans l'alignement. La comparaison du groupe M complet incluant les recombinants (Annexe 1, Figure 9C) au groupe M sans les recombinants (Annexe 1, Figure 9A) reflète aussi que l'inclusion de CRF01_AE altère considérablement la distribution de l'acide aminé le plus probable en position 375. Lorsqu'on inclut les recombinants dans l'alignement, la probabilité d'avoir une histidine passe d'une très faible probabilité à 11.20%. Cet effet n'est pas surprenant puisque 99.18% des CRF01_AE possèdent une histidine en position 375. Finalement, le logo de la cavité phe43 du sous-type CRF01_AE (Annexe 1, Figure 9B) est unique, c'est-à-dire qu'il ne ressemble pas au logo du groupe M auquel il appartient. Le groupe B, quant à lui, a la même distribution au niveau de l'acide aminé en position 375, une

distribution très similaire au groupe M. Ainsi, l'acide aminé de la cavité phe43 du sous-type CRF01_AE est mis en valeur lorsqu'il n'est pas inclus dans le groupe M.

2. Cavité phe43 et pathogénèse : Comment la conformation de l'enveloppe peut moduler la progression de la maladie ?

2.1 Rôle potentiel de l'histidine 375 pour le changement de tropisme

L'analyse de tous les CRF01_AE en provenance de la Chine, accessible dans la banque de données de « *Los Alamos HIV sequence Database* », souligne la grande prépondérance de virus CRF01_AE à tropisme X4. Ainsi, seulement 38.7 % de ces virus ont un tropisme R5 et 61.3 % présentent un tropisme X4 (260). Un changement de tropisme dans les derniers stades de la maladie est souvent associé à une progression plus rapide de la maladie qui s'accompagne d'un déclin rapide des niveaux de lymphocytes T CD4+ et une forte immunosuppression (261, 262). Ceci est particulièrement le cas chez le sous-type CRF01_AE où il est possible d'observer une durée de survie plus courte chez les individus infectés avec CRF01_AE lorsque comparé avec des individus infectés par des virus de sous-type B (260)

Ainsi, bien qu'il ne soit pas encore possible de déterminer si le changement de tropisme est un facteur de risque causatif d'une progression rapide de la maladie chez les patients infectés par CRF01_AE, une grande prévalence de souches X4 chez les CRF01_AE suggérerait une sélection préférentielle de ce tropisme.

Étant donné qu'Env est un déterminant important dans le choix du tropisme, puisque c'est l'endroit d'interaction avec le co-récepteur, un lien intéressant peut-être fait entre l'enveloppe, sa conformation et le choix du tropisme. En effet, il a été suggéré que l'adoption d'une conformation plus ouverte des enveloppes de virus avec tropisme R5 était la première étape du changement de tropisme (263). Ainsi, une pression de sélection pour une meilleure utilisation de CD4 pousserait l'enveloppe à adopter une conformation ouverte, permettant dans un second temps la sélection d'autres facteurs essentiels au changement de tropisme (263, 264). Ce concept pourrait s'appliquer dans le cas de CRF01_AE. En effet, la cavité phe43 de l'Env du CRF01_AE, différente de la cavité de clade B, pourrait jouer un rôle dans ce phénomène de changement de tropisme. L'histidine comblerait la cavité et conférerait un changement

conformationnel important, franchissant cette première étape. La présence de l'histidine serait alors un facteur déterminant qui pourrait expliquer les niveaux élevés de souche X4 au sein de la population infectée par CRF01_AE. Cependant, la commutation de co-récepteur qui implique plusieurs changements au sein des glycoprotéines s'accompagne souvent d'une perte de fitness. Les couches topologiques, qui jouent un rôle important dans les changements conformationnels des Env seraient alors intéressantes à considérer, car elles pourraient compenser pour les contraintes acquises lors de ce changement. Ainsi la conformation agit au-delà des mécanismes d'entrée et serait impliquée indirectement dans la progression de la maladie.

2.2 Reconnaissance de l'enveloppe par les bNAbs : implications de l'histidine 375

La modification de l'acide aminé 375 peut aussi moduler la progression de la maladie en changeant la capacité de reconnaissance des Envs par les bNAbs. Les anticorps dirigés contre le CD4BS sont particulièrement susceptibles aux changements conformationnels. Situés à l'interface du domaine interne et externe, non loin de la cavité phe43, les anticorps contre cette région peuvent entrer en compétition avec CD4 pour s'y lier. Premièrement, un phénotype très intéressant peut être observé lors d'essais de neutralisation avec du CD4 soluble (Annexe 1, Figure 10). La présence de la sérine en position 375 des Envs CRF01_AE confère une résistance totale à la neutralisation par sCD4 qui est totalement perdue lorsque les mutations compensatoires du domaine y sont ajoutées. Par conséquent, les différences dans l'affinité de la gp120 monomérique à CD4 contribueraient à la résistance observée avec sCD4 pour le virus avec l'enveloppe CRF01_AE H375S et des changements dans les couches topologiques du domaine interne de la gp120 modifient cette sensibilité.

Ainsi seul le niveau de comblement de la cavité en harmonie avec les couches topologiques du domaine interne de la gp120 jouerait un rôle au-delà de la reconnaissance de CD4. Les anticorps VRC01, VRC16, b12 et VRC13, qui ont par ailleurs une forte capacité de neutralisation sur un large éventail de virus de clade B et clade C et qui peuvent être retrouvés dans le sérum d'individus infectés, n'ont pas pu neutraliser les différents mutants de CR01_AE. Ainsi, la conformation de l'enveloppe semble être différente des enveloppes de clade B et C pour ne pas permettre la neutralisation même à forte concentration de ces anticorps. Il serait alors important d'évaluer quels types de bNAbs sont élicités lors d'une infection avec un

CRF01_AE. Pour ce faire, il serait intéressant d'identifier et d'isoler des bNAbs de sérums de patients infectés par un virus CRF01_AE afin de les quantifier. Par la suite, une comparaison avec les quantités de bNAbs produits lors d'une infection par un virus de clade B servirait de comparatif.

3. Essai vaccinal RV144 : CRF01_AE la clé du succès

Étant donné la nature invasive du virus et l'incapacité de l'éradiquer suite à l'infection, plusieurs misent sur le développement d'un vaccin prophylactique. À ce jour, aucun vaccin n'est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration), car l'efficacité des immunogènes utilisés jusqu'à ce jour ne démontre pas de protection suffisamment importante. Cependant, l'essai clinique RV144 a pu se démarquer des autres vaccins avec un corrélat de protection de 31.2 % contre l'acquisition du virus.

Il est intéressant de remarquer que le seul et unique essai qui a donné un certain niveau de protection contre l'acquisition du VIH-1 était basé sur une enveloppe de CRF01_AE (se référer à la section 4.3.3). Or, dans cet ouvrage nous avons observé que la seule présence d'une histidine dans la cavité phe43 affecte la fonctionnalité de l'enveloppe. Mais qu'en est-il de la réponse immunitaire ? Est-ce que la présence de l'histidine influence la reconnaissance par les anticorps anti- Env ?

Il est maintenant connu que l'acide aminé en position 375 joue un rôle important dans la conformation de l'enveloppe. En effet, dans une enveloppe d'isolat primaire de clade B, une mutation du résidu en 375 par un plus grand acide aminé tel que le tryptophane pousse l'enveloppe vers une conformation plus ouverte (169). Ceci s'est avéré être un très grand avantage chez les virus des primates non humains dont une préouverture d'Env est nécessaire afin d'infecter des cellules exprimant une faible quantité de CD4 (159, 169, 172, 265-267). Chez les humains, les niveaux de CD4 sont beaucoup plus élevés et la nécessité de pré-ouverture de l'enveloppe n'est pas nécessaire. De plus, une ouverture plus grande de l'enveloppe expose des épitopes autrement camouflés. De récentes études ont démontré que les anticorps ciblant ces épitopes peuvent induire une réponse ADCC. Ainsi, l'avantage de restreindre l'ouverture de l'enveloppe est d'ordre immunitaire. Une des hypothèses qui peut être émise est que la présence de l'histidine dans CRF01_AE a eu une contribution majeure dans l'essai vaccinal dont la

protection corrélait avec une réponse ADCC. Il est envisageable que les isolats de CRF01_AE présentent intrinsèquement une conformation plus ouverte les rendant plus susceptibles à la réponse ADCC.

Les anticorps pouvant faire l'ADCC sont générés chez la plupart des individus infectés peu importe le sous-type avec lequel ils sont infectés. Ainsi, c'est au niveau de la reconnaissance que les différences pourraient avoir un effet. Les enveloppes de clade B et C étant fermées, elles nécessitent l'interaction avec CD4 pour exposer les épitopes reconnus par les anticorps capables d'éliciter une réponse ADCC (182, 183). Or, des protéines accessoires enlèvent CD4 de la surface pour, entre autres, le protéger de cette exposition. Nos données suggèrent que les Env de CRF01_AE ayant une histidine en 375 seraient beaucoup mieux reconnus par les anticorps capables d'éliciter l'ADCC ou des sérums de patients VIH+ qu'un CRF01_AE avec une sérine (Annexe 1, Figure 11). Ceci suggère que la capacité intrinsèque de CRF01_AE de supporter une plus grande ouverture a un impact sur la reconnaissance par les anticorps non neutralisants.

Finalement, afin d'évaluer ce concept et déterminer si la meilleure reconnaissance des Env de CRF01_AE se traduit par une meilleure susceptibilité des enveloppes à l'ADCC, plusieurs protocoles expérimentaux peuvent être utilisés (268-272). Dans l'hypothèse où la reconnaissance des Envs par les anticorps pouvant éliciter l'ADCC corrèle avec une susceptibilité accrue à l'ADCC, les cellules infectées par le virus CRF01_AE sauvage comparé au mutant H375S devraient alors être plus facilement éliminées par ce mécanisme.

Conclusion

La grande diversité que représente le VIH-1 est toujours un obstacle majeur à la prévention de la transmission du virus. La mise en évidence d'une importante différence structurelle et fonctionnelle des glycoprotéines de l'enveloppe de sous-type CRF01_AE permet un avancement de connaissance important. Cette étude a permis de démontrer que les glycoprotéines d'enveloppe de virus du clade CRF-AE sont fonctionnelles malgré la présence d'un plus grand acide aminé dans la cavité Phe43. Nous avons montré que cette fonctionnalité peut être maintenue grâce à des mutations complémentaires présentes au niveau des couches topologiques du domaine interne de la gp120 qui permettent de soutenir la liaison au récepteur CD4. Le virus semble avoir pris une autre voie évolutive, permettant la conservation d'un acide aminé de taille supérieure au niveau de la cavité phe43 tout en restant fonctionnel. Ces études soutiennent aussi l'idée que les couches topologiques sont importantes dans les multiples changements conformationnels qui permettent une liaison à CD4, lors de l'entrée virale. En somme, les travaux présentés dans cet ouvrage permettent d'avancer les connaissances sur les différentes particularités des glycoprotéines de l'enveloppe qui pourraient être exploitées pour le développement des différentes approches vaccinales.

Bibliographie

1. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
2. **Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
3. **HIV/AIDS UNPo.** 2016. Global AIDS update Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Geneva, Switzerland.
4. **Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S.** 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* **20**:W13-23.
5. **Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J, Isolation W-UNfH, Characterization.** 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:184-190.
6. **Gayle HD, Hill GL.** 2001. Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. *Clin Microbiol Rev* **14**:327-335.
7. **Dixon S, McDonald S, Roberts J.** 2002. The impact of HIV and AIDS on Africa's economic development. *BMJ* **324**:232-234.
8. **van de Walle E.** 1990. The social impact of AIDS in Sub-Saharan Africa. *Milbank Q* **68 Suppl 1**:10-32.
9. **F L.** 2002. Labour market and employment implications of HIV/AIDS Geneva.
10. **J V.** 2002. The Relationship between Labor Market Dynamics and HIV/AIDS Perspective: A Literature Review, Cape Town.
11. **Arts EJ, Hazuda DJ.** 2012. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a007161.
12. **Chesney MA, Morin M, Sherr L.** 2000. Adherence to HIV combination therapy. *Soc Sci Med* **50**:1599-1605.

13. **Services DoHaH.** 2016. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents.,
14. **Gale HB, Gitterman SR, Hoffman HJ, Gordin FM, Benator DA, Labriola AM, Kan VL.** 2013. Is frequent CD4+ T-lymphocyte count monitoring necessary for persons with counts ≥ 300 cells/ μ L and HIV-1 suppression? *Clin Infect Dis* **56**:1340-1343.
15. **Costiniuk CT, Fergusson DA, Doucette S, Angel JB.** 2011. Discontinuation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis with CD4 count < 200 cells/ μ L and virologic suppression: a systematic review. *PLoS One* **6**:e28570.
16. **Thiebaut R, Morlat P, Jacqmin-Gadda H, Neau D, Mercie P, Dabis F, Chene G.** 2000. Clinical progression of HIV-1 infection according to the viral response during the first year of antiretroviral treatment. Groupe d'Epidemiologie du SIDA en Aquitaine (GECSA). *AIDS* **14**:971-978.
17. **Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J.** 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**:112-116.
18. **Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED, Schmidt DK, Brecht BM, Jacobson MA, McCune JM.** 1998. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* **4**:953-956.
19. **Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H.** 1998. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* **178**:70-79.
20. **Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF.** 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**:1295-1300.
21. **Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF.** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a

mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* **5**:512-517.

22. **Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Karnasuta C, Sutthent R, Liao HX, DeVico AL, Lewis GK, Williams C, Pinter A, Fong Y, Janes H, DeCamp A, Huang Y, Rao M, Billings E, Karasavvas N, Robb ML, Ngauy V, de Souza MS, Paris R, Ferrari G, Bailer RT, Soderberg KA, Andrews C, Berman PW, Frahm N, De Rosa SC, Alpert MD, Yates NL, Shen X, Koup RA, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Michael NL, Kim JH.** 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* **366**:1275-1286.
23. **Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH, Investigators M-T.** 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**:2209-2220.
24. **Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD.** 2007. HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res* **17**:1186-1194.
25. **Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-529.
26. **Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O'Doherty U, Bushman F.** 2009. HIV integration site distributions in resting and activated CD4⁺ T cells infected in culture. *AIDS* **23**:1461-1471.
27. **Sherrill-Mix S, Lewinski MK, Famiglietti M, Bosque A, Malani N, Ocwieja KE, Berry CC, Looney D, Shan L, Agosto LM, Pace MJ, Siliciano RF, O'Doherty U, Guatelli J, Planelles V, Bushman FD.** 2013. HIV latency and integration site placement in five cell-based models. *Retrovirology* **10**:90.

28. **Marini B, Kertesz-Farkas A, Ali H, Lucic B, Lisek K, Manganaro L, Pongor S, Luzzati R, Recchia A, Mavilio F, Giacca M, Lusic M.** 2015. Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature* **521**:227-231.
29. **Vogt PK.** 1997. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. *In* Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
30. **Vogt VM.** 1997. Retroviral Virions and Genomes. *In* Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY).
31. **Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* **397**:436-441.
32. **Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S.** 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**:356-359.
33. **Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**:389-392.
34. **Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R.** 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* **2**:461-471.
35. **Sharp PM, Hahn BH.** 2010. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:2487-2494.
36. **Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptue L, Ndembi N, Gurtler L, Devare S, Brennan CA.** 2011. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* **85**:1403-1407.
37. **D'Arc M, Ayouba A, Esteban A, Learn GH, Boue V, Liegeois F, Etienne L, Tagg N, Leendertz FH, Boesch C, Madinda NF, Robbins MM, Gray M, Cournil A, Ooms M, Letko M, Simon VA, Sharp PM, Hahn BH, Delaporte E, Mpoudi Ngole E, Peeters M.** 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E1343-1352.
38. **Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358-361.

39. **Braaten D, Luban J.** 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J* **20**:1300-1309.
40. **Franke EK, Yuan HE, Luban J.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-362.
41. **Milman G, Sharma O.** 1994. Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1305-1312.
42. **Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW.** 1992. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *N Engl J Med* **327**:1246-1247.
43. **John GC, Kreiss J.** 1996. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Epidemiol Rev* **18**:149-157.
44. **Chesebro B, Buller R, Portis J, Wehrly K.** 1990. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J Virol* **64**:215-221.
45. **Clapham PR, Blanc D, Weiss RA.** 1991. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology* **181**:703-715.
46. **Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.
47. **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.
48. **Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-666.
49. **Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:1149-1158.

50. **Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.
51. **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+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**:667-673.
52. **Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179-183.
53. **Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**:184-187.
54. **Sattentau QJ, Moore JP.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* **174**:407-415.
55. **Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J.** 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* **67**:3978-3988.
56. **Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
57. **Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
58. **Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
59. **Lu M, Blacklow SC, Kim PS.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**:1075-1082.

60. **Hu WS, Hughes SH.** 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
61. **Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE.** 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* **3**:469-478.
62. **Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM.** 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2525-2529.
63. **Li Y, Flanagan PM, Tschochner H, Kornberg RD.** 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**:805-807.
64. **Nabel G, Baltimore D.** 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**:711-713.
65. **Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmerman LA, Kaneshima H, Nolan GP.** 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* **6**:235-244.
66. **Berkhout B, Jeang KT.** 1992. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* **66**:139-149.
67. **Karn J, Stoltzfus CM.** 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**:a006916.
68. **Malim MH, Cullen BR.** 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**:241-248.
69. **Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M.** 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**:767-775.
70. **Farjot G, Sergeant A, Mikaelian I.** 1999. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* **274**:17309-17317.
71. **Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J.** 1998. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* **273**:33414-33422.

72. **Fornerod M, van Deursen J, van Baal S, Reynolds A, Davis D, Murti KG, Fransen J, Grosveld G.** 1997. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J* **16**:807-816.
73. **Nigg EA.** 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**:779-787.
74. **Finzi D, Dieffenbach CW, Basavappa R.** 2007. Defining and solving the essential protein-protein interactions in HIV infection. *J Struct Biol* **158**:148-155.
75. **Hermida-Matsumoto L, Resh MD.** 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* **74**:8670-8679.
76. **Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen EA.** 2007. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J Virol* **81**:7476-7490.
77. **Parkin NT, Chamorro M, Varmus HE.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* **66**:5147-5151.
78. **Jin YJ, Cai CY, Zhang X, Zhang HT, Hirst JA, Burakoff SJ.** 2005. HIV Nef-mediated CD4 down-regulation is adaptor protein complex 2 dependent. *J Immunol* **175**:3157-3164.
79. **Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, Bonifacino JS.** 2007. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol* **81**:3877-3890.
80. **Preusser A, Briese L, Baur AS, Willbold D.** 2001. Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *J Virol* **75**:3960-3964.
81. **Schwartz O, Dautry-Varsat A, Goud B, Marechal V, Subtil A, Heard JM, Danos O.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J Virol* **69**:528-533.

82. **Ren X, Park SY, Bonifacino JS, Hurley JH.** 2014. How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *Elife* **3**:e01754.
83. **Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J.** 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J* **16**:6964-6976.
84. **Lama J, Mangasarian A, Trono D.** 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* **9**:622-631.
85. **Ross TM, Oran AE, Cullen BR.** 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* **9**:613-621.
86. **Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, Benaroch P.** 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12144-12149.
87. **Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL.** 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **167**:903-913.
88. **Singh RK, Lau D, Noviello CM, Ghosh P, Guatelli JC.** 2009. An MHC-I cytoplasmic domain/HIV-1 Nef fusion protein binds directly to the mu subunit of the AP-1 endosomal coat complex. *PLoS One* **4**:e8364.
89. **Courgnaud V, Salemi M, Pourrut X, Mpoudi-Ngole E, Abela B, Auzel P, Bibollet-Ruche F, Hahn B, Vandamme AM, Delaporte E, Peeters M.** 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**:8298-8309.
90. **Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orłowski M, Strebel K, Yewdell JW.** 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* **72**:2280-2288.
91. **Fujita K, Omura S, Silver J.** 1997. Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors. *J Gen Virol* **78 (Pt 3)**:619-625.

92. **Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS.** 2010. Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS Pathog* **6**:e1000869.
93. **Meusser B, Sommer T.** 2004. Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation. *Mol Cell* **14**:247-258.
94. **Binette J, Dube M, Mercier J, Halawani D, Latterich M, Cohen EA.** 2007. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology* **4**:75.
95. **Chen MY, Maldarelli F, Karczewski MK, Willey RL, Strebel K.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J Virol* **67**:3877-3884.
96. **Schubert U, Strebel K.** 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J Virol* **68**:2260-2271.
97. **Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, Cohen EA.** 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog* **6**:e1000856.
98. **Andrew AJ, Miyagi E, Strebel K.** 2011. Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 Vpu on the stability of BST-2/tetherin. *J Virol* **85**:2611-2619.
99. **Lau D, Kwan W, Guatelli J.** 2011. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. *J Virol* **85**:9834-9846.
100. **Dube M, Paquay C, Roy BB, Bego MG, Mercier J, Cohen EA.** 2011. HIV-1 Vpu antagonizes BST-2 by interfering mainly with the trafficking of newly synthesized BST-2 to the cell surface. *Traffic* **12**:1714-1729.
101. **Dube M, Bego MG, Paquay C, Cohen EA.** 2010. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* **7**:114.

102. **Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC.** 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog* **5**:e1000450.
103. **Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F.** 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**:888-893.
104. **Madani N, Kabat D.** 1998. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol* **72**:10251-10255.
105. **Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, Sodroski J.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* **66**:6489-6495.
106. **Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
107. **Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-1407.
108. **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. *Mol Cell* **12**:591-601.
109. **Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH.** 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**:803-809.
110. **Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
111. **Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-98.

112. **Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF.** 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**:1056-1060.
113. **Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D.** 2004. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**:7792-7798.
114. **Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-7315.
115. **Lu YL, Spearman P, Ratner L.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* **67**:6542-6550.
116. **Subbramanian RA, Yao XJ, Dilhuydy H, Rougeau N, Bergeron D, Robitaille Y, Cohen EA.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity. *J Mol Biol* **278**:13-30.
117. **Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, Iijima S, Yoneda Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Aida Y.** 2007. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol* **81**:5284-5293.
118. **Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* **64**:3097-3099.
119. **Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Ishimoto A, Adachi A.** 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J Virol* **63**:4110-4114.
120. **Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**:6304-6313.
121. **He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**:6705-6711.

122. **Andersen JL, Zimmerman ES, DeHart JL, Murala S, Ardon O, Blackett J, Chen J, Planelles V.** 2005. ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **12**:326-334.
123. **Andersen JL, DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, Jacquot G, Benichou S, Planelles V.** 2006. HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. *PLoS Pathog* **2**:e127.
124. **Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B.** 2013. *Fields virology*, Sixth edition ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
125. **Coffin J, Swanstrom R.** 2013. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**:a012526.
126. **McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS.** 1996. HIV-1 genetic diversity. *AIDS* **10 Suppl 3**:S13-20.
127. **Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**:10209-10219.
128. **Ward MJ, Lycett SJ, Kalish ML, Rambaut A, Leigh Brown AJ.** 2013. Estimating the rate of intersubtype recombination in early HIV-1 group M strains. *J Virol* **87**:1967-1973.
129. **Motomura K, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM, Thwe M, Oo KY, Lwin S, Kyaw O, Zaw M, Nagai Y, Takebe Y.** 2000. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1831-1843.
130. **Menu E, Truong TX, Lafon ME, Nguyen TH, Muller-Trutwin MC, Nguyen TT, Deslandres A, Chaouat G, Duong QT, Ha BK, Fleury HJ, Barre-Sinoussi F.** 1996. HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:629-633.
131. **Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, Sanders-Buell E, Liu W, Chen J, Wagner R, Wolf H, Shao Y, Lai S, Beyrer C, Yu XF.** 2000. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly

- homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol* **74**:11286-11295.
132. **Montavon C, Toure-Kane C, Liegeois F, Mpoudi E, Bourgeois A, Vergne L, Perret JL, Boumah A, Saman E, Mboup S, Delaporte E, Peeters M.** 2000. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**:363-374.
 133. **McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, Robbins KE, Gashau W, Nasidi A, Janssens W, Kalish ML.** 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* **254**:226-234.
 134. **Saksena NK, Lau KA, Dwyer DE, Wang B.** 2011. HIV Recombination and Pathogenesis – Biological and Epidemiological Implications, HIV and AIDS - Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies. InTech doi:10.5772/23819.
 135. **Hu WS, Temin HM.** 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-1233.
 136. **Temin HM.** 1991. Sex and recombination in retroviruses. *Trends Genet* **7**:71-74.
 137. **Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**:55-56.
 138. **Carr JK, Foley B, Leitner T, Salminen M, Korber B, McCutchan F.** 1998. Reference Sequences Representing the Principal Genetic Diversity of HIV-1 in the Pandemic, Los Alamos, NM.
 139. **Laboratory LAN.** 2016 2016. HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs). <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF01>.
 140. **Li X, Li W, Zhong P, Fang K, Zhu K, Musa TH, Song Y, Du G, Gao R, Guo Y, Yan W, Xuan Y, Wei P.** 2016. Nationwide Trends in Molecular Epidemiology of HIV-1 in China. *AIDS Res Hum Retroviruses* doi:10.1089/AID.2016.0029.
 141. **Zhong P, Pan Q, Ning Z, Xue Y, Gong J, Zhen X, Zhou L, Sheng F, Zhang W, Gai J, Cheng H, Yue Q, Xing H, Zhuang M, Lu W, Shao Y, Kang L.** 2007. Genetic

- diversity and drug resistance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains circulating in Shanghai. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**:847-856.
142. **He X, Xing H, Ruan Y, Hong K, Cheng C, Hu Y, Xin R, Wei J, Feng Y, Hsi JH, Takebe Y, Shao Y, Group for HIVMES.** 2012. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey. *PLoS One* **7**:e47289.
143. **Carr JK, Salminen MO, Koch C, Gotte D, Artenstein AW, Hegerich PA, St Louis D, Burke DS, McCutchan FE.** 1996. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* **70**:5935-5943.
144. **Hu DJ, Vanichseni S, Mastro TD, Raktham S, Young NL, Mock PA, Subbarao S, Parekh BS, Srisuwanvilai L, Sutthent R, Wasi C, Heneine W, Choopanya K.** 2001. Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *AIDS* **15**:683-691.
145. **Rangsin R, Piyaraj P, Sirisanthana T, Sirisopana N, Short O, Nelson KE.** 2007. The natural history of HIV-1 subtype E infection in young men in Thailand with up to 14 years of follow-up. *AIDS* **21 Suppl 6**:S39-46.
146. **Rangsin R, Chiu J, Khamboonruang C, Sirisopana N, Eiumtrakul S, Brown AE, Robb M, Beyrer C, Ruangyuttikarn C, Markowitz LE, Nelson KE.** 2004. The natural history of HIV-1 infection in young Thai men after seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* **36**:622-629.
147. **Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout B.** 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* **74**:3740-3751.
148. **Kozaczynska K, Cornelissen M, Reiss P, Zorgdrager F, van der Kuyl AC.** 2007. HIV-1 sequence evolution in vivo after superinfection with three viral strains. *Retrovirology* **4**:59.
149. **Hunter E, Swanstrom R.** 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**:187-253.
150. **Freed EO, Martin MA.** 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* **270**:23883-23886.

151. **Haffar OK, Dowbenko DJ, Berman PW.** 1988. Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J Cell Biol* **107**:1677-1687.
152. **Berman PW, Nunes WM, Haffar OK.** 1988. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 in vitro and in continuous cell lines. *J Virol* **62**:3135-3142.
153. **Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J.** 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* **263**:11760-11767.
154. **Mizuochi T, Matthews TJ, Kato M, Hamako J, Titani K, Solomon J, Feizi T.** 1990. Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem* **265**:8519-8524.
155. **Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB.** 2000. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* **39**:11194-11204.
156. **Go EP, Irungu J, Zhang Y, Dalpathado DS, Liao HX, Sutherland LL, Alam SM, Haynes BF, Desaire H.** 2008. Glycosylation site-specific analysis of HIV envelope proteins (JR-FL and CON-S) reveals major differences in glycosylation site occupancy, glycoform profiles, and antigenic epitopes' accessibility. *J Proteome Res* **7**:1660-1674.
157. **Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B.** 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* **76**:7863-7867.
158. **Helseth E, Olshevsky U, Furman C, Sodroski J.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**:2119-2123.
159. **Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong PD, Sodroski J.** 2010. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell* **37**:656-667.

160. **Yang X, Mahony E, Holm GH, Kassa A, Sodroski J.** 2003. Role of the gp120 inner domain beta-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits. *Virology* **313**:117-125.
161. **Checkley MA, Luttge BG, Freed EO.** 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* **410**:582-608.
162. **Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.
163. **Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Carragher B, Wilson IA, Ward AB.** 2013. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1484-1490.
164. **von Bredow B, Arias JF, Heyer LN, Gardner MR, Farzan M, Rakasz EG, Evans DT.** 2015. Envelope Glycoprotein Internalization Protects Human and Simian Immunodeficiency Virus Infected Cells from Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01911-15.
165. **Bultmann A, Muranyi W, Seed B, Haas J.** 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J Virol* **75**:5263-5276.
166. **Boge M, Wyss S, Bonifacino JS, Thali M.** 1998. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* **273**:15773-15778.
167. **Colman PM, Lawrence MC.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:309-319.
168. **Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
169. **Xiang SH, Kwong PD, Gupta R, Rizzuto CD, Casper DJ, Wyatt R, Wang L, Hendrickson WA, Doyle ML, Sodroski J.** 2002. Mutagenic stabilization and/or disruption of a CD4-bound state reveals distinct conformations of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* **76**:9888-9899.

170. **Desormeaux A, Coutu M, Medjahed H, Pacheco B, Herschhorn A, Gu C, Xiang SH, Mao Y, Sodroski J, Finzi A.** 2013. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *J Virol* **87**:2549-2562.
171. **Finzi A, Pacheco B, Xiang SH, Pancera M, Herschhorn A, Wang L, Zeng X, Desormeaux A, Kwong PD, Sodroski J.** 2012. Lineage-specific differences between human and simian immunodeficiency virus regulation of gp120 trimer association and CD4 binding. *J Virol* **86**:8974-8986.
172. **Li H, Wang S, Kong R, Ding W, Lee FH, Parker Z, Kim E, Learn GH, Hahn P, Policicchio B, Brocca-Cofano E, Deleage C, Hao X, Chuang GY, Gorman J, Gardner M, Lewis MG, Hatzioannou T, Santra S, Apetrei C, Pandrea I, Alam SM, Liao HX, Shen X, Tomaras GD, Farzan M, Chertova E, Keele BF, Estes JD, Lifson JD, Doms RW, Montefiori DC, Haynes BF, Sodroski JG, Kwong PD, Hahn BH, Shaw GM.** 2016. Envelope residue 375 substitutions in simian-human immunodeficiency viruses enhance CD4 binding and replication in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E3413-3422.
173. **Ding S, Medjahed H, Prevost J, Coutu M, Xiang SH, Finzi A.** 2016. Lineage-specific differences in the gp120 Inner Domain Layer 3 of Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01215-16.
174. **Overbaugh J, Rudensey LM.** 1992. Alterations in potential sites for glycosylation predominate during evolution of the simian immunodeficiency virus envelope gene in macaques. *J Virol* **66**:5937-5948.
175. **Chackerian B, Rudensey LM, Overbaugh J.** 1997. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* **71**:7719-7727.
176. **Herrera C, Spenlehauer C, Fung MS, Burton DR, Beddows S, Moore JP.** 2003. Nonneutralizing antibodies to the CD4-binding site on the gp120 subunit of human immunodeficiency virus type 1 do not interfere with the activity of a neutralizing antibody against the same site. *J Virol* **77**:1084-1091.

177. **Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ.** 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4144-4149.
178. **Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.
179. **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. *J Virol* **82**:7932-7941.
180. **Srivastava IK, Stamatatos L, Kan E, Vajdy M, Lian Y, Hilt S, Martin L, Vita C, Zhu P, Roux KH, Vojtech L, D CM, Donnelly J, Ulmer JB, Barnett SW.** 2003. Purification, characterization, and immunogenicity of a soluble trimeric envelope protein containing a partial deletion of the V2 loop derived from SF162, an R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* **77**:11244-11259.
181. **Barnett SW, Lu S, Srivastava I, Cherpelis S, Gettie A, Blanchard J, Wang S, Mboudjeka I, Leung L, Lian Y, Fong A, Buckner C, Ly A, Hilt S, Ulmer J, Wild CT, Mascola JR, Stamatatos L.** 2001. The ability of an oligomeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope antigen to elicit neutralizing antibodies against primary HIV-1 isolates is improved following partial deletion of the second hypervariable region. *J Virol* **75**:5526-5540.
182. **Veillette M, Désormeaux A, Medjahed H, Gharsallah N-E, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH.** 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of virology* **88**:2633-2644.
183. **Veillette M, Coutu M, Richard J, Batraverse LA, Dagher O, Bernard N, Tremblay C, Kaufmann DE, Roger M, Finzi A.** 2015. The HIV-1 gp120 CD4-bound conformation is preferentially targeted by antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies in sera from HIV-1-infected individuals. *J Virol* **89**:545-551.
184. **Richard J, Veillette M, Brassard N, Iyer SS, Roger M, Martin L, Pazgier M, Schon A, Freire E, Routy JP, Smith AB, 3rd, Park J, Jones DM, Courter JR, Melillo BN,**

- Kaufmann DE, Hahn BH, Permar SR, Haynes BF, Madani N, Sodroski JG, Finzi A.** 2015. CD4 mimetics sensitize HIV-1-infected cells to ADCC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E2687-2694.
185. **Corey L, Gilbert PB, Tomaras GD, Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS.** 2015. Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. *Sci Transl Med* **7**:310rv317.
186. **Zhu P, Liu J, Bess J, Jr., Chertova E, Lifson JD, Grise H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH.** 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**:847-852.
187. **Yuste E, Reeves JD, Doms RW, Desrosiers RC.** 2004. Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. *J Virol* **78**:6775-6785.
188. **Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N.** 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* **115**:3265-3275.
189. **Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC.** 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **12**:1365-1371.
190. **Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M.** 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* **31**:429-434.
191. **Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, Streeck H, Johnston MN, Staller KD, Zaman MT, Yu XG, Lichterfeld M, Basgoz N, Rosenberg ES, Altfeld M.** 2005. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* **106**:3366-3369.
192. **Smed-Sorensen A, Lore K.** 2011. Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* **6**:405-410.

193. **Chang CC, Crane M, Zhou J, Mina M, Post JJ, Cameron BA, Lloyd AR, Jaworowski A, French MA, Lewin SR.** 2013. HIV and co-infections. *Immunol Rev* **254**:114-142.
194. **Sun JC, Williams MA, Bevan MJ.** 2004. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol* **5**:927-933.
195. **Gray ES, Moore PL, Choge IA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Li H, Leseka N, Treurnicht F, Mlisana K, Shaw GM, Karim SS, Williamson C, Morris L, Team CS.** 2007. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* **81**:6187-6196.
196. **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 HX, Self SG, Landucci G, Forthal DN, Weinhold KJ, Keele BF, Hahn BH, Greenberg ML, Morris L, Karim SS, 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. *J Virol* **82**:12449-12463.
197. **Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrin T, Simek MD, Fling S, Mitcham JL, Lehrman JK, Priddy FH, Olsen OA, Frey SM, Hammond PW, Protocol GPI, Kaminsky S, Zamb T, Moyle M, Koff WC, Poignard P, Burton DR.** 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**:285-289.
198. **Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL, et al.** 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**:1024-1027.
199. **Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Sodroski J, Wyatt R, Nabel GJ, Kwong PD.** 2007. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* **445**:732-737.

200. **Zhou T, Zhu J, Wu X, Moquin S, Zhang B, Acharya P, Georgiev IS, Altae-Tran HR, Chuang GY, Joyce MG, Kwon YD, Longo NS, Louder MK, Luongo T, McKee K, Schramm CA, Skinner J, Yang Y, Yang Z, Zhang Z, Zheng A, Bonsignori M, Haynes BF, Scheid JF, Nussenzweig MC, Simek M, Burton DR, Koff WC, Program NCS, Mullikin JC, Connors M, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD.** 2013. Multidonor analysis reveals structural elements, genetic determinants, and maturation pathway for HIV-1 neutralization by VRC01-class antibodies. *Immunity* **39**:245-258.
201. **Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, Pietzsch J, Fenyo D, Abadir A, Velinzon K, Hurley A, Myung S, Boulad F, Poignard P, Burton DR, Pereyra F, Ho DD, Walker BD, Seaman MS, Bjorkman PJ, Chait BT, Nussenzweig MC.** 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**:1633-1637.
202. **Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, 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* **329**:811-817.
203. **Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD, Wu L, Xu L, Longo NS, McKee K, O'Dell S, Louder MK, Wycuff DL, Feng Y, Nason M, Doria-Rose N, Connors M, Kwong PD, Roederer M, Wyatt RT, Nabel GJ, Mascola JR.** 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**:856-861.
204. **Liao HX, Lynch R, Zhou T, Gao F, Alam SM, Boyd SD, Fire AZ, Roskin KM, Schramm CA, Zhang Z, Zhu J, Shapiro L, Program NCS, Mullikin JC, Gnanakaran S, Hraber P, Wiehe K, Kelsoe G, Yang G, Xia SM, Montefiori DC, Parks R, Lloyd KE, Scarce RM, Soderberg KA, Cohen M, Kamanga G, Louder MK, Tran LM, Chen Y, Cai F, Chen S, Moquin S, Du X, Joyce MG, Srivatsan S, Zhang B, Zheng A, Shaw GM, Hahn BH, Kepler TB, Korber BT, Kwong PD, Mascola JR, Haynes BF.** 2013. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* **496**:469-476.
205. **Pejchal R, Walker LM, Stanfield RL, Phogat SK, Koff WC, Poignard P, Burton DR, Wilson IA.** 2010. Structure and function of broadly reactive antibody PG16 reveal

- an H3 subdomain that mediates potent neutralization of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:11483-11488.
206. **McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien JP, Khayat R, Louder R, Pejchal R, Sastry M, Dai K, O'Dell S, Patel N, Shahzad-ul-Hussan S, Yang Y, Zhang B, Zhou T, Zhu J, Boyington JC, Chuang GY, Diwanji D, Georgiev I, Kwon YD, Lee D, Louder MK, Moquin S, Schmidt SD, Yang ZY, Bonsignori M, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Haynes BF, Burton DR, Koff WC, Walker LM, Phogat S, Wyatt R, Orwenyo J, Wang LX, Arthos J, Bewley CA, Mascola JR, Nabel GJ, Schief WR, Ward AB, Wilson IA, Kwong PD.** 2011. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* **480**:336-343.
207. **Pancera M, Shahzad-Ul-Hussan S, Doria-Rose NA, McLellan JS, Bailer RT, Dai K, Loesgen S, Louder MK, Staupe RP, Yang Y, Zhang B, Parks R, Eudailey J, Lloyd KE, Blinn J, Alam SM, Haynes BF, Amin MN, Wang LX, Burton DR, Koff WC, Nabel GJ, Mascola JR, Bewley CA, Kwong PD.** 2013. Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1-V2-directed antibody PG16. *Nat Struct Mol Biol* **20**:804-813.
208. **Julien JP, Lee JH, Cupo A, Murin CD, Derking R, Hoffenberg S, Caulfield MJ, King CR, Marozsan AJ, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP, Wilson IA, Ward AB.** 2013. Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:4351-4356.
209. **Pancera M, McLellan JS, Wu X, Zhu J, Changela A, Schmidt SD, Yang Y, Zhou T, Phogat S, Mascola JR, Kwong PD.** 2010. Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J Virol* **84**:8098-8110.
210. **Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Protocol GPI, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P.** 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**:466-470.
211. **Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF, 3rd, Burton DR, Ho DD, et al.** 1995. Cross-clade neutralization of primary

- isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* **69**:6609-6617.
212. **Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA.** 2003. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**:2065-2071.
213. **Mouquet H, Warncke M, Scheid JF, Seaman MS, Nussenzweig MC.** 2012. Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:875-880.
214. **Julien JP, Sok D, Khayat R, Lee JH, Doores KJ, Walker LM, Ramos A, Diwanji DC, Pejchal R, Cupo A, Katpally U, Depetris RS, Stanfield RL, McBride R, Marozsan AJ, Paulson JC, Sanders RW, Moore JP, Burton DR, Pognard P, Ward AB, Wilson IA.** 2013. Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog* **9**:e1003342.
215. **Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, Stanfield RL, Julien JP, Ramos A, Crispin M, Depetris R, Katpally U, Marozsan A, Cupo A, Malveste S, Liu Y, McBride R, Ito Y, Sanders RW, Ogohara C, Paulson JC, Feizi T, Scanlan CN, Wong CH, Moore JP, Olson WC, Ward AB, Pognard P, Schief WR, Burton DR, Wilson IA.** 2011. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* **334**:1097-1103.
216. **Kong L, Lee JH, Doores KJ, Murin CD, Julien JP, McBride R, Liu Y, Marozsan A, Cupo A, Klasse PJ, Hoffenberg S, Caulfield M, King CR, Hua Y, Le KM, Khayat R, Deller MC, Clayton T, Tien H, Feizi T, Sanders RW, Paulson JC, Moore JP, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA.** 2013. Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nat Struct Mol Biol* **20**:796-803.
217. **Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H.** 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:6642-6647.

218. **Ofek G, Tang M, Sambor A, Katinger H, Mascola JR, Wyatt R, Kwong PD.** 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* **78**:10724-10737.
219. **Cardoso RM, Zwick MB, Stanfield RL, Kunert R, Binley JM, Katinger H, Burton DR, Wilson IA.** 2005. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity* **22**:163-173.
220. **Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, Imamichi H, Bailer RT, Chakrabarti B, Sharma SK, Alam SM, Wang T, Yang Y, Zhang B, Migueles SA, Wyatt R, Haynes BF, Kwong PD, Mascola JR, Connors M.** 2012. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**:406-412.
221. **Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spennleauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW.** 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**:10892-10905.
222. **Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ.** 2013. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol* **13**:693-701.
223. **Excler JL, Ake J, Robb ML, Kim JH, Plotkin SA.** 2014. Nonneutralizing functional antibodies: a new "old" paradigm for HIV vaccines. *Clin Vaccine Immunol* **21**:1023-1036.
224. **Ferrari G, Pollara J, Kozink D, Harms T, Drinker M, Freel S, Moody MA, Alam SM, Tomaras GD, Ochsenbauer C, Kappes JC, Shaw GM, Hoxie JA, Robinson JE, Haynes BF.** 2011. An HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1 conformational epitope mediates potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum. *J Virol* **85**:7029-7036.
225. **Guan Y, Pazgier M, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Al-Darmarki S, Flinko R, Lovo E, Wu X, Robinson JE, Seaman MS, Fouts TR, Gallo RC, DeVico AL, Lewis GK.** 2013. Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1

- envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:E69-78.
226. **Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang KK, Gilbert PB, Huang Y, Gurley TC, Kozink DM, Marshall DJ, Whitesides JF, Tsao CY, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Rerks-Ngarm S, Kim JH, Michael NL, Tomaras GD, Montefiori DC, Lewis GK, Devico A, Evans DT, Ferrari G, Liao HX, Haynes BF.** 2012. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *J Virol* **86**:11521-11532.
227. **Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH, Haynes BF, Robinson JE, Kaufmann DE, Bonsignori M, Sodroski J, Finzi A.** 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* **88**:2633-2644.
228. **Acharya P, Tolbert WD, Gohain N, Wu X, Yu L, Liu T, Huang W, Huang CC, Kwon YD, Louder RK, Luongo TS, McLellan JS, Pancera M, Yang Y, Zhang B, Flinko R, Foulke JS, Jr., Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Robinson JE, Martin L, Kwong PD, Guan Y, DeVico AL, Lewis GK, Pazgier M.** 2014. Structural definition of an antibody-dependent cellular cytotoxicity response implicated in reduced risk for HIV-1 infection. *J Virol* **88**:12895-12906.
229. **Merz B.** 1987. HIV vaccine approved for clinical trials. *JAMA* **258**:1433-1434.
230. **Cohen YZ, Dolin R.** 2013. Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective. *Ther Adv Vaccines* **1**:99-112.
231. **Shaw GM, Hunter E.** 2012. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
232. **Parrish NF, Gao F, Li H, Giorgi EE, Barbian HJ, Parrish EH, Zajic L, Iyer SS, Decker JM, Kumar A, Hora B, Berg A, Cai F, Hopper J, Denny TN, Ding H, Ochsenbauer C, Kappes JC, Galimidi RP, West AP, Jr., Bjorkman PJ, Wilen CB, Doms RW, O'Brien M, Bhardwaj N, Borrow P, Haynes BF, Muldoon M, Theiler JP, Korber B, Shaw GM, Hahn BH.** 2013. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:6626-6633.

233. **Thongcharoen P, Suriyanon V, Paris RM, Khamboonruang C, de Souza MS, Ratto-Kim S, Karnasuta C, Polonis VR, Baglyos L, Habib RE, Gurunathan S, Barnett S, Brown AE, Birx DL, McNeil JG, Kim JH, Thai AVEG.** 2007. A phase 1/2 comparative vaccine trial of the safety and immunogenicity of a CRF01_AE (subtype E) candidate vaccine: ALVAC-HIV (vCP1521) prime with oligomeric gp160 (92TH023/LAI-DID) or bivalent gp120 (CM235/SF2) boost. *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**:48-55.
234. **Marovich MA.** 2004. ALVAC-HIV vaccines: clinical trial experience focusing on progress in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **3**:S99-104.
235. **Tartaglia J, Excler JL, El Habib R, Limbach K, Meignier B, Plotkin S, Klein M.** 1998. Canarypox virus-based vaccines: prime-boost strategies to induce cell-mediated and humoral immunity against HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 3**:S291-298.
236. **Cooney EL, McElrath MJ, Corey L, Hu SL, Collier AC, Arditti D, Hoffman M, Coombs RW, Smith GE, Greenberg PD.** 1993. Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1882-1886.
237. **Graham BS, Matthews TJ, Belshe RB, Clements ML, Dolin R, Wright PF, Gorse GJ, Schwartz DH, Keefer MC, Bolognesi DP, et al.** 1993. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody by priming with gp160 recombinant vaccinia and boosting with rgp160 in vaccinia-naive adults. The NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J Infect Dis* **167**:533-537.
238. **Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K, Bangkok Vaccine Evaluation G.** 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* **194**:1661-1671.
239. **Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF, rgp HIVVSG.** 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* **191**:654-665.

240. **Chung AW, Ghebremichael M, Robinson H, Brown E, Choi I, Lane S, Dugast AS, Schoen MK, Rolland M, Suscovich TJ, Mahan AE, Liao L, Streeck H, Andrews C, Rerks-Ngarm S, Nitayaphan S, de Souza MS, Kaewkungwal J, Pitisuttithum P, Francis D, Michael NL, Kim JH, Bailey-Kellogg C, Ackerman ME, Alter G.** 2014. Polyfunctional Fc-Effector Profiles Mediated by IgG Subclass Selection Distinguish RV144 and VAX003 Vaccines. *Sci Transl Med* **6**:228ra238.
241. **Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T.** 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* **5**:520.
242. **Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS.** 2015. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* **67**:171-182.
243. **Patterson S, Papagatsias T, Benlahrech A.** 2009. Use of adenovirus in vaccines for HIV. *Handb Exp Pharmacol* doi:10.1007/978-3-540-71029-5_13:275-293.
244. **Priddy FH, Brown D, Kublin J, Monahan K, Wright DP, Lalezari J, Santiago S, Marmor M, Lally M, Novak RM, Brown SJ, Kulkarni P, Dubey SA, Kierstead LS, Casimiro DR, Mogg R, DiNubile MJ, Shiver JW, Leavitt RY, Robertson MN, Mehrotra DV, Quirk E, Merck VSG.** 2008. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* **46**:1769-1781.
245. **Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, Del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN.** 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **372**:1881-1893.
246. **Gray G, Buchbinder S, Duerr A.** 2010. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. *Curr Opin HIV AIDS* **5**:357-361.
247. **Benlahrech A, Harris J, Meiser A, Papagatsias T, Hornig J, Hayes P, Lieber A, Athanasopoulos T, Bachy V, Csomor E, Daniels R, Fisher K, Gotch F, Seymour L, Logan K, Barbagallo R, Klavinskis L, Dickson G, Patterson S.** 2009. Adenovirus

- vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:19940-19945.
248. **Pinter A, Honnen WJ, Kayman SC, Trochev O, Wu Z.** 1998. Potent neutralization of primary HIV-1 isolates by antibodies directed against epitopes present in the V1/V2 domain of HIV-1 gp120. *Vaccine* **16**:1803-1811.
249. **Montefiori DC, Karnasuta C, Huang Y, Ahmed H, Gilbert P, de Souza MS, McLinden R, Tovanabutra S, Laurence-Chenine A, Sanders-Buell E, Moody MA, Bonsignori M, Ochsenbauer C, Kappes J, Tang H, Greene K, Gao H, LaBranche CC, Andrews C, Polonis VR, Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Self SG, Berman PW, Francis D, Sinangil F, Lee C, Tartaglia J, Robb ML, Haynes BF, Michael NL, Kim JH.** 2012. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis* **206**:431-441.
250. **Gottardo R, Bailer RT, Korber BT, Gnanakaran S, Phillips J, Shen X, Tomaras GD, Turk E, Imholte G, Eckler L, Wenschuh H, Zerweck J, Greene K, Gao H, Berman PW, Francis D, Sinangil F, Lee C, Nitayaphan S, Rerks-Ngarm S, Kaewkungwal J, Pitisuttithum P, Tartaglia J, Robb ML, Michael NL, Kim JH, Zolla-Pazner S, Haynes BF, Mascola JR, Self S, Gilbert P, Montefiori DC.** 2013. Plasma IgG to linear epitopes in the V2 and V3 regions of HIV-1 gp120 correlate with a reduced risk of infection in the RV144 vaccine efficacy trial. *PLoS One* **8**:e75665.
251. **Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, Alam SM, Liao HX, Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Fong Y, Chen X, Poling B, Nicholson CO, Zhang R, Lu X, Parks R, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Rerks-Ngarm S, Gilbert PB, Kim JH, Michael NL, Montefiori DC, Haynes BF.** 2013. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:9019-9024.
252. **Stanley SK, Ostrowski MA, Justement JS, Gantt K, Hedayati S, Mannix M, Roche K, Schwartzenruber DJ, Fox CH, Fauci AS.** 1996. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* **334**:1222-1230.

253. **Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, Ranasinghe S, Lindqvist M, Davis I, Lane K, Rychert J, Rosenberg ES, Piechocka-Trocha A, Brass AL, Brenchley JM, Walker BD, Streeck H.** 2012. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med* **4**:123ra125.
254. **Gilbert PB, Peterson ML, Follmann D, Hudgens MG, Francis DP, Gurwith M, Heyward WL, Jobes DV, Popovic V, Self SG, Sinangil F, Burke D, Berman PW.** 2005. Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J Infect Dis* **191**:666-677.
255. **Gallo RC.** 2005. The end or the beginning of the drive to an HIV-preventive vaccine: a view from over 20 years. *Lancet* **366**:1894-1898.
256. **Gray GE, Allen M, Moodie Z, Churchyard G, Bekker LG, Nchabeleng M, Mlisana K, Metch B, de Bruyn G, Latka MH, Roux S, Mathebula M, Naicker N, Ducar C, Carter DK, Puren A, Eaton N, McElrath MJ, Robertson M, Corey L, Kublin JG, team HPs.** 2011. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *Lancet Infect Dis* **11**:507-515.
257. **Konings FA, Burda ST, Urbanski MM, Zhong P, Nadas A, Nyambi PN.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. *J Med Virol* **78**:523-534.
258. **Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, Eller LA, Eller M, Makumbi F, Birx D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Sewankambo NK, Quinn TC, Wawer M, Gray R.** 2008. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* **197**:707-713.
259. **Kouri V, Khouri R, Aleman Y, Abrahantes Y, Vercauteren J, Pineda-Pena AC, Theys K, Megens S, Moutschen M, Pfeifer N, Van Weyenbergh J, Perez AB, Perez J, Perez L, Van Laethem K, Vandamme AM.** 2015. CRF19_cpx is an Evolutionary

- fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine* **2**:244-254.
260. **Li Y, Han Y, Xie J, Gu L, Li W, Wang H, Lv W, Song X, Li Y, Routy JP, Ishida T, Iwamoto A, Li T, group C.** 2014. CRF01_AE subtype is associated with X4 tropism and fast HIV progression in Chinese patients infected through sexual transmission. *AIDS* **28**:521-530.
261. **Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M.** 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* **118**:681-688.
262. **Wilkin TJ, Su Z, Kuritzkes DR, Hughes M, Flexner C, Gross R, Coakley E, Greaves W, Godfrey C, Skolnik PR, Timpone J, Rodriguez B, Gulick RM.** 2007. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin Infect Dis* **44**:591-595.
263. **Zhuang K, Finzi A, Tasca S, Shakirzyanova M, Knight H, Westmoreland S, Sodroski J, Cheng-Mayer C.** 2011. Adoption of an "open" envelope conformation facilitating CD4 binding and structural remodeling precedes coreceptor switch in R5 SHIV-infected macaques. *PLoS One* **6**:e21350.
264. **Zhuang K, Finzi A, Toma J, Frantzell A, Huang W, Sodroski J, Cheng-Mayer C.** 2012. Identification of interdependent variables that influence coreceptor switch in R5 SHIV(SF162P3N)-infected macaques. *Retrovirology* **9**:106.
265. **Mori K, Rosenzweig M, Desrosiers RC.** 2000. Mechanisms for adaptation of simian immunodeficiency virus to replication in alveolar macrophages. *J Virol* **74**:10852-10859.
266. **Marcon L, Choe H, Martin KA, Farzan M, Ponath PD, Wu L, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1997. Utilization of C-C chemokine receptor 5 by the envelope glycoproteins of a pathogenic simian immunodeficiency virus, SIVmac239. *J Virol* **71**:2522-2527.
267. **Marcon L, Sodroski J.** 1997. High degree of sensitivity of the simian immunodeficiency virus (SIVmac) envelope glycoprotein subunit association to amino

- acid changes in the glycoprotein 41 ectodomain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:441-447.
268. **Richard J, Veillette M, Batraverse LA, Coutu M, Chapleau JP, Bonsignori M, Bernard N, Tremblay C, Roger M, Kaufmann DE, Finzi A.** 2014. Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *J Virol Methods* **208**:107-114.
269. **Pollara J, Hart L, Brewer F, Pickeral J, Packard BZ, Hoxie JA, Komoriya A, Ochsenbauer C, Kappes JC, Roederer M, Huang Y, Weinhold KJ, Tomaras GD, Haynes BF, Montefiori DC, Ferrari G.** 2011. High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses. *Cytometry A* **79**:603-612.
270. **Gomez-Roman VR, Florese RH, Patterson LJ, Peng B, Venzon D, Aldrich K, Robert-Guroff M.** 2006. A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* **308**:53-67.
271. **Orlandi C, Flinko R, Lewis GK.** 2016. A new cell line for high throughput HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and cell-to-cell virus transmission studies. *J Immunol Methods* **433**:51-58.
272. **Kantakamalakul W, Pattanapanyasat K, Jongrakthaitae S, Assawadarachai V, Ampol S, Sutthent R.** 2006. A novel EGFP-CEM-NKr flow cytometric method for measuring antibody dependent cell mediated-cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-1 infected individuals. *J Immunol Methods* **315**:1-10.

Annexe I : Figures supplémentaires

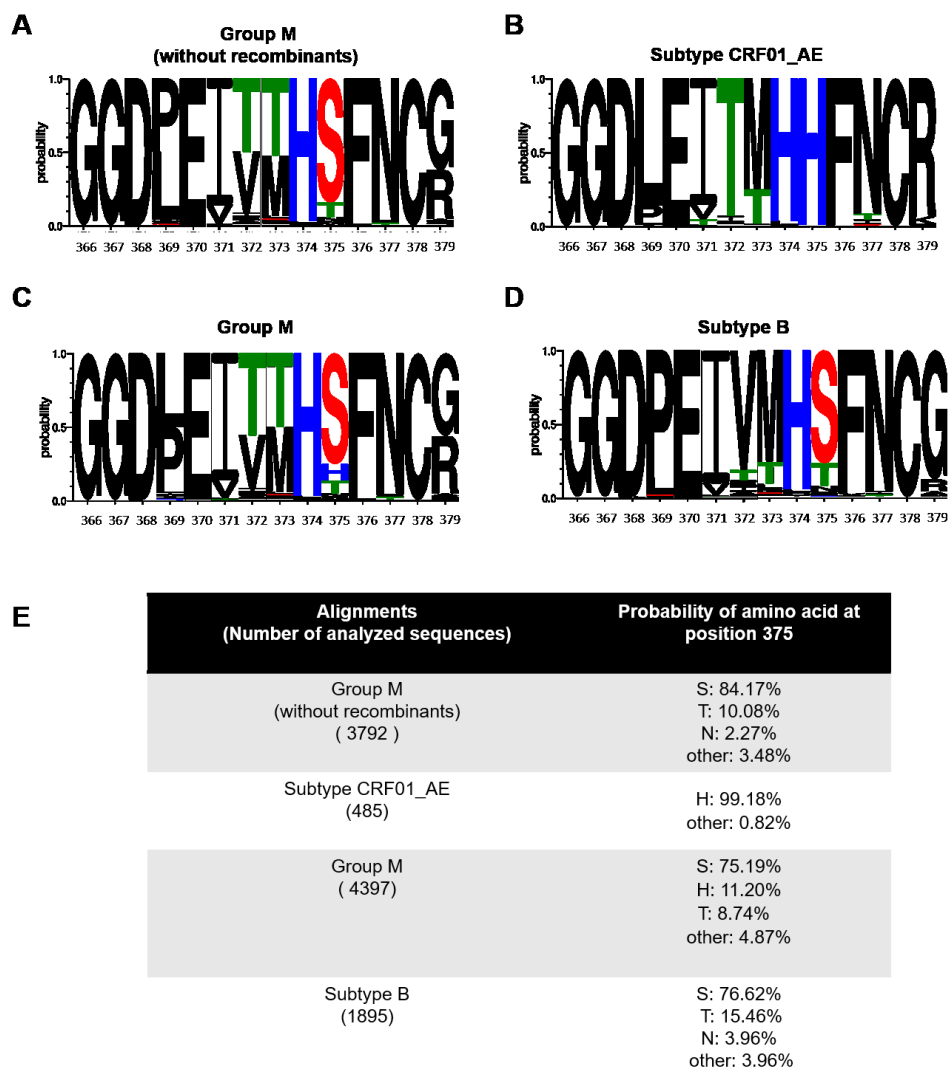


Figure 9 Différences au niveau de l'acide aminé en position 375 de la cavité phe43 de différents alignements.

Les panneaux **A** à **D** (Logos) présentent la probabilité des acides aminés de la position 366 à 379 correspondant à la cavité phe43. Les alignements de chaque groupe ont été obtenus dans la base de données du NIH (NIH AIDS Los Alamos Database). En **E**, un tableau décrit la fréquence des acides aminés les plus communs à la position 375 pour chaque groupe.

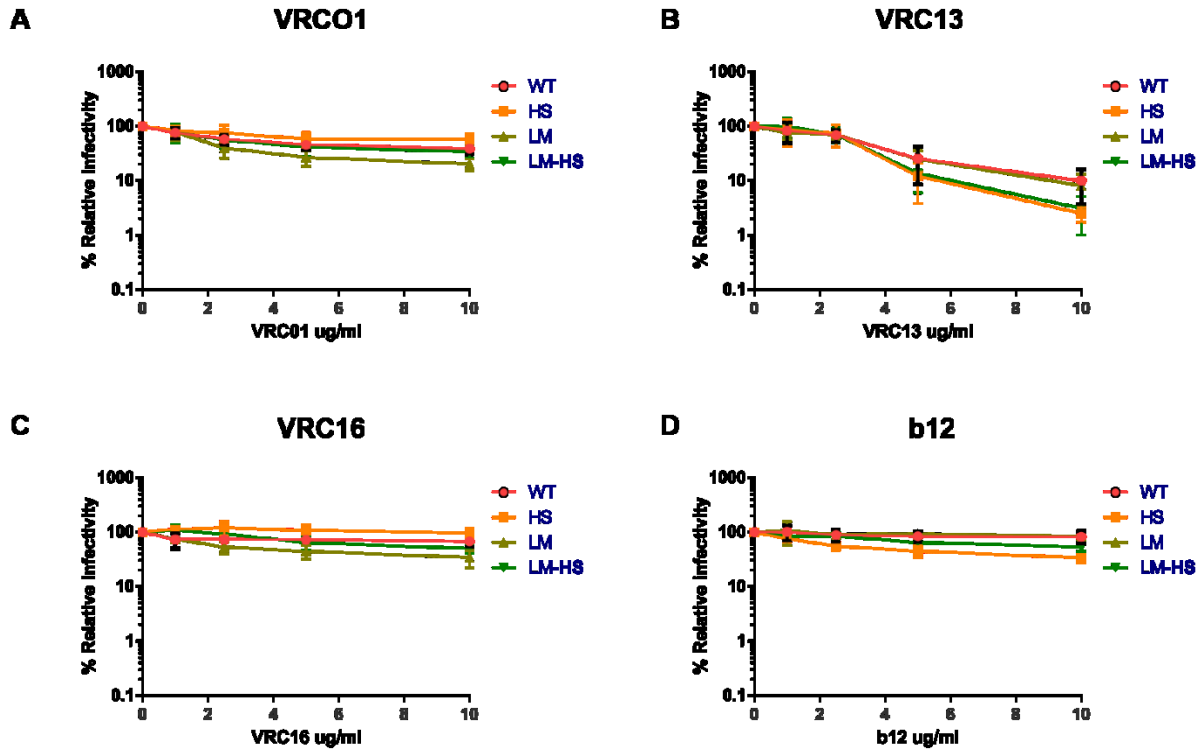


Figure 10 Neutralisation des variantes de CRF01_AE par des anticorps neutralisants à large spectre.

Des quantités normalisées de virions recombinants pNL4.3 exprimant la luciférase et exprimant l'enveloppe sauvage ou mutante de CRF01_AE 92TH023 ont été incubées avec des dilutions croissantes de différents anticorps neutralisants à large spectre : (A) VRC01, (B) VRC13, (C) VRC16 et (D) b12 pendant 1 h à 37°C avant d'infecter les cellules CCR5 Cf2Th-CD4. L'activité luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires pour déterminer l'infectivité. L'infectivité a été normalisée à 100% en l'absence du ligand. Les données présentées sont le résultat d'au moins trois expériences indépendantes, réalisées en quatre exemplaires.

(Expérience entièrement réalisée par Daria Zoubchenok)

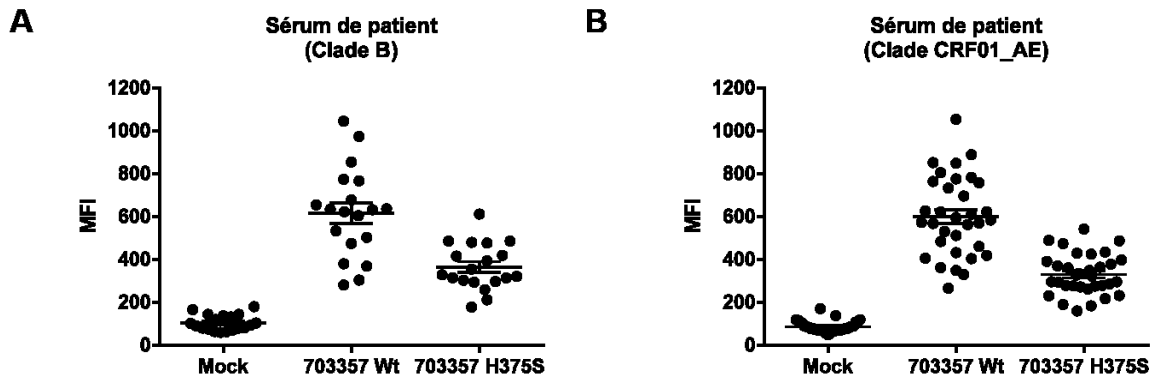


Figure 11 Modulation de la reconnaissance du virus CRF01_AE 703357 avec du sérum d'individus infectés par le VIH-1.

Des cellules CD4 primaires isolés de patients sains (VIH négatifs) ont été infectées avec un virus CRF01_AE 703357 sauvage ou présentant un Env muté en position 375 (H375S). 48 heures post-infection, la reconnaissance par le sérum d'individus infectés par le VIH-1 de clade B (**A**) ou clade CRF01_AE (**B**) a été mesurée par marquage de surface. Les données présentées sont le résultat d'au moins trois expériences indépendantes, réalisées en quatre exemplaires.

(Expérience réalisée par Jérémy Prévost, dans le laboratoire du Dr Andrés Finzi.)

