

Université de Montréal

Détection innée des cellules infectées au VIH-1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes :
Étude du rôle régulateur de la protéine Vpu de souches pandémiques et non pandémiques

Par

Alexandre Laliberté

Département de Microbiologie, Immunologie et Infectiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

En Immunologie et Microbiologie

Mai 2020

© Alexandre Laliberté, 2020

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie,
Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Détection innée des cellules infectées au VIH-1 par les cellules dendritiques plasmacytoïdes :
Étude du rôle régulateur de la protéine Vpu de souches pandémiques et non pandémiques**

Présenté par
Alexandre Laliberté

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Carolina Alfieri
Présidente-rapportrice

Dr Éric A. Cohen
Directeur de recherche

Dr Jimmy Dikeakos
Membre du jury

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), a touché environ 70 millions d'individus, dont environ la moitié en sont morts. Bien qu'il existe aujourd'hui des traitements efficaces pour prévenir la progression du SIDA, il n'y a actuellement ni vaccin, ni traitement qui ne guérissent complètement.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) permettent de limiter l'établissement de l'infection en sécrétant des quantités importantes d'interféron de type I (IFN-I) en réponse à la détection du VIH. L'IFN-I permet non seulement d'établir un environnement antiviral, mais aussi d'amorcer la réponse immunitaire innée. Cette réponse des pDCs est régulée notamment par le récepteur *immunoglobulin-like transcript 7* (ILT7) dont l'activation par son ligand, *bone marrow stromal antigen 2* (BST2), réprime la production d'IFN. BST2 est par ailleurs un facteur de restriction du VIH-1 qui agit en retenant les particules virales à la surface des cellules infectées, limitant ainsi la dissémination du virus. La protéine accessoire Vpu du VIH-1 contrecarre l'action de BST2 sur la relâche virale par une régulation négative des niveaux de surface et par un déplacement hors des sites d'assemblages viraux. Ce déplacement, qui permet l'activation d'ILT7 par BST2, a un rôle double, soit d'augmenter la relâche virale par les cellules infectées, mais aussi de limiter la production d'IFN-I par les pDCs. Par une analyse de variants de Vpu provenant de souches pandémiques et non pandémiques du VIH-1, cette étude indique que cette fonction de Vpu est majoritairement associée au groupe pandémique M avec l'exception notable du sous-groupe C, responsable d'environ la moitié des infections mondiales. Ce phénotype des variants du sous-groupe C est associé à une incapacité à déplacer BST2 dans des cellules T infectées. Des analyses fonctionnelles où des cellules infectées détectées par des pDCs révèlent cependant que les protéines Vpu incapables d'augmenter l'activation d'ILT7 médiée par BST2 ont possiblement développé d'autres mécanismes pour limiter la production d'IFN-I par les pDCs, par exemple la limitation des contacts entre les cellules infectées et les pDCs afin de réduire la détection.

Mots clefs : VIH/SIDA, immunité innée, cellules dendritiques plasmacytoïdes, interféron, facteurs de restriction, BST2, protéines accessoires, Vpu.

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV), which is responsible for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) has infected over 70 million people, approximately half of which have died from the illness. While there are treatments today that can prevent progression towards AIDS, there is currently no vaccine and no treatment that would completely cure people living with HIV.

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) limit the establishment of the infection by producing large amounts of type-I IFN (IFN-I) after sensing HIV. IFN-I not only establishes an antiviral environment, but also initiates the innate immune response. This pDC response is regulated, in part, by the pDC-specific receptor immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7), which inhibits IFN-I production, upon engagement of its ligand, bone marrow stromal antigen 2 (BST2). BST2 is also an HIV host restriction factor that tethers budding virions at the surface of the infected cell, to limit spread. The HIV-1 accessory protein Vpu counteracts BST2's restriction through downregulation at the cell surface and displacement away from viral assembly sites. This displacement, which enables ILT7 activation, has a double role: relieving the restriction by BST2 on viral release and repressing IFN-I by pDCs.

We screened Vpu variants from pandemic and non-pandemic HIV-1 strains, and found that this function is mostly present in the pandemic group M, although not in variants from clade C which are responsible for half of the global infections. This phenotype in the clade C variants tested was associated with an inability to efficiently displace BST2 in infected T cells. Functional analyses in sensing assays, however, reveal that Vpu variants unable to enhance BST2-mediated ILT7 activation may have evolved compensatory mechanisms to dampen IFN-I production by pDCs, for example, limitation of contacts between infected cells and pDCs to reduce sensing.

Keywords : HIV/AIDS, innate immunity, plasmacytoid dendritic cells, interferon, restriction factors, BST2, accessory proteins, Vpu.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | v |
| Abstract..... | vii |
| Table des matières..... | ix |
| Liste des figures..... | xi |
| Liste des sigles et abréviations..... | xiii |
| Contexte de rédaction..... | xix |
| Remerciements..... | xxi |
| Chapitre 1 – Introduction..... | 1 |
| Virus de l’immunodéficience humaine..... | 1 |
| Traitements et défis de la médecine actuelle..... | 2 |
| Origines simiennes et divisions du VIH..... | 5 |
| Structure et cycle viral du VIH-1..... | 7 |
| Facteurs de restrictions et protéines accessoires..... | 12 |
| Vpu et BST2..... | 15 |
| Cellules dendritiques plasmacytoïdes..... | 22 |
| Chapitre 2 – Hypothèse et Objectifs..... | 27 |
| Hypothèse..... | 27 |
| Objectifs..... | 27 |
| Chapitre 3 – Article..... | 29 |
| Résumé en français..... | 29 |
| Abstract..... | 31 |
| Introduction..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Results | 34 |
| Discussion | 42 |
| Materials and Methods | 46 |
| Supplementary data | 50 |
| Acknowledgements | 53 |
| Author Contributions | 53 |
| Competing Interests statement | 53 |
| References | 54 |
| Chapitre 4 – Autres éléments de discussion | 59 |
| Modulation de la signalisation BST2-ILT7 chez les VIS..... | 59 |
| Autres mécanismes de contrôle médiés par Vpu | 60 |
| Antagonisme de l'isoforme court de BST2..... | 61 |
| Chapitre 5 – Conclusion..... | 63 |
| Chapitre 6 – Autres contributions..... | 65 |
| Congrès scientifiques | 65 |
| Publications scientifiques..... | 65 |
| Références bibliographiques..... | 67 |

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 1. | Groupes et sous-groupes du VIH et de leurs précurseurs simiens. | 6 |
| Figure 2. | Organisation génomique du VIH-1 | 7 |
| Figure 3. | Structure du VIH-1. | 9 |
| Figure 4. | Cycle réplcatif du VIH et principaux facteurs de restriction..... | 11 |
| Figure 5. | Structure du dimère de BST2..... | 15 |
| Figure 6. | Modèle schématique de l’ancrage de particules virales par BST2..... | 16 |
| Figure 7. | Séquence et structure de Vpu. | 18 |
| Figure 8. | Modèle de l’antagonisme de BST2 par Vpu. | 20 |

Chapite 3. Article

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 1. | Characterization of a displacement-defective NL4.3 virus and its effect on IFN production | 35 |
| Figure 2. | Screening of Vpu variants from group M for BST2-mediated ILT7 activation | 37 |
| Figure 3. | Effect of non-pandemic Vpu variants on BST2-mediated ILT7 activation..... | 39 |
| Figure 4. | Impact of primary Vpu variants on the localisation of BST2 at the cell-surface of infected cells..... | 41 |
| Figure 5. | Effect of primary Vpu variants on the sensing of infected cells by pDCs..... | 43 |
| Figure S1. | Identification of ILT7+ pDCs from freshly isolated PBMCs used for sensing of infected MT4 cells..... | 50 |
| Figure S2. | Downregulation and enhancement of ILT7 activation are functionally and structurally distinct activities..... | 51 |

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

APOBEC : Enzyme éditant l'ARNm de l'Apolipoprotéine B similaire au polypeptide catalytique (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNsb : Acide ribonucléique simple-brin

BDCA-2 : Antigène sanguin de cellules dendritiques 2 (*Blood dendritic cell antigen 2*)

BST2 : Antigène stromal de la moelle osseuse 2, ou tétherine (*Bone marrow stromal antigen 2*)

cART : Association antirétrovirale (*Combination antiretroviral therapy*)

CCR5 : Récepteur de chimiokine C-C 5 (*C-C Chemokine receptor 5*)

CCR7 : Récepteur de chimiokine C-C 7 (*C-C Chemokine receptor 7*)

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

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

CTD : Domaine C-terminal (*C-terminal domain*)

CXCR4 : Récepteur de chimiokine C-X-C 4 (*C-X-C Chemokine receptor 4*)

DC : Cellule dendritique (*Dendritic cell*)

dNTP : Désoxyribonucléotide

dNTPase : Désoxyribonucléotide hydrolase

Env : Enveloppe

Gag : Antigène groupe-spécifique (*Group specific antigen*)

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HAART : Thérapie antirétrovirale hautement active (*Highly active antiretroviral therapy*)

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire 1 (*Intercellular adhesion molecule 1*)

IFN : Interféron

IFNAR : Récepteur de l'interféron alpha (*Interferon- α receptor*)

ILT7 : Récepteur Immunoglobuline-like 7 (*Immunoglobuline-like receptor 7*)

ISG : Gène stimulé par l'interféron (*Interferon stimulated gene*)

ITAM : Motif d'activation d'immunorécepteurs basé sur la tyrosine (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

LTR : Séquence terminale longue répétée (*Long terminal repeats*)

NC : Nucléocapside

Nef : Facteur de régulation négative (*Negative regulatory factor*)

NF-kB : Facteur nucléaire de l'amplificateur de la chaîne légère kappa des cellules B activées (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK : Tueuse naturelle (*Natural Killer*)

NTB-A : Antigène des NK, T et B (*NK T B antigen*)

PBMC : Cellules mononucléées de sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*)

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde (*Plasmacytoid dendritic cell*)

Pol : Polymerase

pTEFb : Facteur de l'élongation de la transcription positive (*Positive transcription elongation factor*)

PVLV : Personne vivant avec le VIH

RE : Réticulum endoplasmique

Rev : Régulateur de virions (*Regulator of virions*)

RRE : Élément réactif à Rev (*Rev-responsive element*)

RT : Transcriptase inverse (*Reverse transcriptase*)

SAMHD1 : Motif alpha Sterile et protéine du domaine HD 1 (*Sterile alpha motif and HD domain protein 1*)

SERINC5 : Incorporateur sérine 5 (*Serine incorporator 5*)

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SLE : Lupus systémique érythémateux (*Systemic lupus erythematosus*)

T/F : Virus fondateur-transmis (*Transmitted-founder*)

Tat : Transactivateur de la transcription (*Transactivator of transcription*)

TGN : Réseau trans-Golgi (*Trans-Golgi network*)

TIM-3 : Immunoglobuline des cellules T et domaine contenant la mucine 3 (*T-cell immunoglobulin and mucin--3*)

TLR : Récepteur toll-like (*Toll-like receptor*)

TM : Transmembranaire

TRIM5 : Protéine contenant le motif tripartite 5 (*Tripartite motif-containing protein 5*)

Vif : Facteur viral d'infectiosité (*Viral infectivity factor*)

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIS : Virus de l'immunodéficience simienne

Vpr : Protéine virale R (*Viral protein R*)

Vpu : Protéine virale U (*Viral protein U*)

Vpx : Protéine virale X (*Viral protein X*)

*À tous ceux qui ont su que j'étais capable,
À ceux qui m'ont amené jusqu'ici,
Et à celui qui m'a montré l'aspect humain du VIH,
Ce côté qu'on n'apprend pas en laboratoire.*

Contexte de rédaction

Chers membres du jury,

Comme vous le savez sans aucun doute, le monde fait actuellement face à une situation hors du commun. Un nouveau coronavirus (SARS-CoV2), responsable de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), a acquis la capacité de se transmettre entre humains et cause des atteintes respiratoires importantes qui requièrent une hospitalisation dans de nombreux cas, ce qui exerce une pression importante même sur les systèmes de santé les plus développés. Le 11 mars 2020, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a déclaré que la COVID-19 était une pandémie et les pays prennent des mesures sans précédent pour tenter d'enrayer la propagation de la maladie. Ces restrictions impactent aujourd'hui tous les aspects de nos vies. Ni le Canada ni le Québec n'échappent à ces mesures qui incluent des consignes strictes de distanciation sociale incluant la fermeture de toute entreprise et tout lieu public jugés non essentiels. L'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) où se situe le laboratoire dans lequel j'effectue mon projet de recherche a dû fermer ses portes le 19 mars 2020, limitant ainsi toute activité de recherche non essentielle, et ce, pour une durée indéterminée.

C'est donc dans ce contexte extraordinaire que je complète la rédaction de mon mémoire. Avec deux jours de préavis, nous avons dû mettre fin à nos expériences pour nous consacrer uniquement au télétravail. Il est pour l'instant impossible de savoir à quel moment l'IRCM pourra reprendre ses activités normales. Afin de ne pas retarder mes projets d'études supérieures à l'étranger et de rester dans les temps pour la rédaction de mon mémoire, j'ai pris la décision, de concert avec mon Directeur de recherche, de compléter mon mémoire avec les données obtenues jusqu'à présent. Il y a donc, dans ce mémoire, certaines expériences qui ne sont pas complètement finalisées. Compte tenu de la situation, je demande au jury d'être compréhensif et de considérer cet aspect lors de la correction. Ces expériences seront complétées lorsque le contexte le permettra pour la soumission du manuscrit inclus dans ce mémoire.

Si la situation actuelle est sans précédent, elle permet néanmoins de comprendre l'importance de la recherche fondamentale en virologie.

Remerciements

C'est deux ans plus tard que je me rends compte du chemin que j'ai fait : les succès, les faux-pas, les résultats imprévus, mais aussi les meilleurs. Le parcours n'est pas de tout repos et j'aimerais particulièrement remercier tous ceux qui ont cru en moi, même à un moment où je n'y croyais plus.

J'ai été entouré d'une équipe formidable et beaucoup des membres du laboratoire m'ont aidé à un moment où un autre, à leur façon. Plus particulièrement, je dois beaucoup à Mariana Bego qui a initié ce projet et qui m'a enseigné une grande partie de ce que j'ai appris durant ces deux dernières années, tant au niveau technique que scientifique. De la même manière, Tram Pham, surtout après le départ de Mariana, m'a aidé à analyser et planifier certaines de mes expériences. J'aimerais évidemment remercier mon directeur de recherche, Éric Cohen qui m'a toujours poussé à me dépasser et m'a permis de me rendre où je suis actuellement.

Les heures à discuter de statistiques ou de contrôles négatifs le vendredi soir m'ont parfois fait oublier les gens qui m'entourent à l'extérieur du laboratoire et pour qui la forme de ma *gate* de cytométrie n'a aucune importance. C'est dans cette optique que j'aimerais remercier tous ceux qui m'ont aidé à passer à travers ces deux dernières années et qui m'ont vu à mon meilleur et à mon pire. Mes colocs et amis, Gaël, Julián et Xavier avec qui j'ai partagé une bière ou deux sur le balcon en philosophant sur tout et n'importe quoi le temps d'une soirée. Mon amie Audrée qui était toujours disponible lorsque je devais démêler mes idées et mes pensées. Mon amie Alexie qui m'a appris que parfois, il valait mieux prendre un peu de recul et partir à l'autre bout du monde durant les vacances. Ma collègue et partenaire d'escalade, Mélanie, sans qui je n'aurais, sans doute, pas pu terminer. J'aimerais aussi remercier ma famille qui a toujours été derrière moi.

Enfin, j'aimerais évidemment remercier les organismes de financement qui m'ont permis de réaliser mes projets : la fondation Gabriel-Marquis, Manuvie pour sa généreuse contribution au Challenge IRCM, la faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, CanCURE et les Instituts de recherche en santé du Canada.

Chapitre 1 – Introduction

Virus de l'immunodéficience humaine

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). La transmission du virus se fait majoritairement par des rapports sexuels, mais aussi par des contacts directs avec du sang provenant d'un individu séropositif, ou encore par transmission mère-enfant à la naissance. Sans traitement, l'infection mène lentement à une dysfonction quasi complète du système immunitaire, notamment caractérisé par le déclin marqué des lymphocytes T CD4⁺. En 5 à 10 ans, on parle alors de SIDA, lorsque les niveaux de T CD4⁺ sont inférieurs à 200 cellules par microlitre de sang. À ce stade, le patient peut succomber à des infections qui, autrement, auraient été facilement combattues par le système immunitaire. On estime que depuis le début de la pandémie, plus de 70 millions d'individus ont été touchés et la moitié en sont morts (1). Malgré l'existence de traitements qui peuvent empêcher la progression vers le stade SIDA, sans toutefois éradiquer le virus, on estime qu'environ 14 millions d'individus sur 38 millions n'y ont actuellement pas accès. Par ailleurs, en 2018, on a recensé 1,7 million de nouvelles infections à travers le monde (1).

Historique

Le VIH a été décrit pour la première fois en 1983 (2, 3) alors qu'une épidémie de SIDA, causant des sarcomes de Kaposi et des cas de pneumonie, fait rage aux États-Unis, notamment chez les individus homosexuels (4). Les analyses permettent de rapidement identifier un nouveau virus de la famille des rétrovirus. Aux États-Unis, le SIDA se classe parmi les premières causes de décès en 1991 chez les personnes âgées de 25 à 44 ans (5). Les efforts concertés de différents groupes et pays mènent en 1997 au premier traitement efficace, la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART), appelée maintenant thérapie antirétrovirale combinée (cART) qui viendra renverser la tendance. Depuis, une trentaine de médicaments antirétroviraux ont été développés et la mortalité liée au SIDA a nettement diminué, bien qu'il existe toujours de fortes disparités géographiques et socioéconomiques quant à l'accessibilité de ces traitements.

Traitements et défis de la médecine actuelle

Traitements antirétroviraux

La thérapie antirétrovirale utilisée aujourd'hui permet aux personnes vivant avec le VIH (PVLV) de vivre une vie relativement normale avec une espérance de vie proche de celle des individus séronégatifs. Les traitements antirétroviraux combinent une série de médicaments qui interviennent à différentes étapes du cycle viral pour bloquer la réplication. Parmi les différentes classes de médicaments, on retrouve les inhibiteurs nucléosidiques ou non nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de la protéase, les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs de fusion et les antagonistes de CD4 et CCR5. Ces traitements permettent d'arrêter la réplication du virus et de réduire la charge virale à des niveaux indétectables où le patient ne peut plus transmettre le virus. Ces traitements ne guérissent cependant pas et ils requièrent une prise quotidienne de médicaments, sans quoi il peut y avoir un rebond viral. De plus, la prise de ces médicaments reste associée à de nombreux effets secondaires à long terme qui peuvent néanmoins réduire la qualité de vie des patients. La présence du virus dans le système nerveux central est par ailleurs associée à des troubles neurologiques qui se développent malgré les traitements (6). Ces effets, combinés à une accessibilité inégale et à des coûts parfois élevés des traitements, expliquent pourquoi il est toujours nécessaire de développer de nouvelles approches pour guérir les PVLVs.

Réservoirs latents

Un des obstacles majeurs à une thérapie complète et stérilisante, qui éliminerait la nécessité de prendre des médicaments, est l'établissement de réservoirs latents très tôt dans l'infection. Ces réservoirs sont constitués de cellules infectées, mais qui n'expriment pas de protéines virales, donc qui ne sont pas ciblés par les traitements antirétroviraux ou la réponse immunitaire de l'hôte. Dans ces cellules, le virus est intégré au génome et peut se réactiver à tout moment, par différents signaux, expliquant le rebond viral observé lors de l'interruption de traitement. Ces cellules ayant une durée de vie très longue, la durée de vie du réservoir s'étend au-delà de l'espérance de vie du patient. Si les cellules T CD4⁺ mémoires semblent constituer une partie

importante du réservoir latent, il est possible que les macrophages, les cellules dendritiques, les microglies et d'autres cellules immunitaires composent, elles aussi, le réservoir (7, 8).

Patients de Berlin et de Londres

Uniquement deux patients, à ce jour, ont été complètement guéris du VIH (9, 10). Ces individus ne requièrent plus de thérapie antirétrovirale et aucun rebond viral n'a été détecté. Un traitement similaire de greffe de moelle osseuse a été appliqué dans les deux cas à des fins de traitement de cancer, mais ce type d'intervention demeure dangereux et inaccessible, et n'est pas envisagé pour une utilisation à grande échelle. En effet, le traitement comporte de nombreux risques et un taux de mortalité élevé dû notamment à la maladie du greffon contre l'hôte. Les patients étaient atteints d'une leucémie qui ne répondait à aucun traitement conventionnel et, en dernier recours, les médecins ont envisagé une transplantation de moelle osseuse après une irradiation totale des patients pour éliminer leurs cellules hématopoïétiques. Ces patients étaient compatibles avec des donneurs de moelle osseuse portant la mutation homozygote $\Delta 32/\Delta 32$ sur le gène CCR5 qui agit en tant que corécepteur du virus. Cette mutation sur le corécepteur du VIH empêche son entrée dans les cellules cibles, rendant les porteurs résistants à l'infection au VIH (11, 12). La combinaison du conditionnement, de la réaction de greffon contre l'hôte pour éliminer les cellules infectées résiduelles et la mutation pour empêcher l'infection des cellules issues du donneur ont contribué à la rémission de ces patients. L'utilisation de donneurs portant la mutation $\Delta 32$ n'est cependant pas sans faille, étant donné que le virus peut changer de tropisme et utiliser CXCR4 comme corécepteur. Ce changement de tropisme a déjà mené à l'échec de stratégies curatives similaires (13). Un rebond viral a aussi été observé lors de stratégies similaires en utilisant des donneurs n'ayant pas la mutation homozygote $\Delta 32/\Delta 32$ (14).

Approches de « Shock-and-Kill »

Parmi les nouvelles approches à l'étude pour une guérison du VIH, on retrouve l'approche de « Shock-and-Kill » qui consiste en l'utilisation d'agents anti-latence afin de réactiver les cellules latentes, tout en conservant le traitement antirétroviral. Cette approche vise à induire l'expression de protéines virales chez les cellules latentes afin qu'elles soient exposées aux autres cellules immunitaires qui pourront les tuer et ainsi réduire la taille du réservoir. Différentes

classes de molécules existent comme agents anti-latence dont les agonistes de récepteurs Toll-like, les agonistes de la voie NF- κ B et les activateurs du récepteur des cellules T, menant toutes à des signaux pour activer la transcription du génome viral (15). Ces traitements visant à réactiver le VIH sont accompagnés d'une étape d'élimination de cellules infectées. Parmi les méthodes utilisées, on retrouve des agents qui ciblent des inhibiteurs de l'apoptose, exprimés dans les cellules infectées ou des agents qui augmentent de manière non spécifique la fonction des cellules T cytotoxiques (15). L'utilisation d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant des épitopes hautement conservés de l'enveloppe du VIH est également à l'essai, pour aider les autres cellules immunitaires à la reconnaissance et à l'élimination des cellules infectées (16).

Thérapies fonctionnelles de type « Block-and-Lock »

À l'opposé des approches de « Shock-and-Kill », on retrouve des approches qui ne guérissent pas à proprement parler, comme elles n'éliminent pas le virus complètement, mais empêchent plutôt sa réactivation en induisant une « latence profonde ». Ces approches ciblent les facteurs impliqués dans la transcription du virus. Celles-ci peuvent non seulement bloquer la production de particules virales, mais aussi empêcher la production de protéines virales qui peuvent contribuer à l'activation chronique du système immunitaire, malgré les traitements antirétroviraux (17).

Stigmatisation et discrimination

La séropositivité des individus entraîne souvent, en plus de problèmes de santé, un lourd fardeau de stigmatisation et de discrimination à leur égard. En effet, il peut être par exemple difficile pour certains individus d'obtenir une aide médicale ou encore une couverture d'assurance. En 2012, environ 45 pays dans le monde émettaient des restrictions sur les entrées au pays des PVLVs, dont 21 qui refusaient également l'entrée au pays pour de courtes périodes de temps ou encore expulsent les individus dont le statut est positif (18). Il n'existe cependant aucune preuve que ces restrictions sont une mesure de santé publique efficace. Ces restrictions, combinées à la marginalisation par la famille ou les proches des individus, mènent au contraire à davantage de pratiques sexuelles à risque et une peur du dépistage (19). Par ailleurs, la non-divulgence du statut lors d'un rapport sexuel non protégé, malgré la prise de médicaments qui rendent nulle la

possibilité de transmission, est criminelle au Canada et passible d'emprisonnement, même sans la transmission du virus (20).

Origines simiennes et divisions du VIH

Origines du VIH et virus de l'immunodéficience simienne

Il semblerait que c'est au début du XX^e siècle à Léopoldville (Congo belge), aujourd'hui Kinshasa (République démocratique du Congo), que débute l'épidémie du VIH qui est aujourd'hui présente à travers le monde (21-23). La transmission d'un virus apparenté, le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), des singes à l'Homme a causé la pandémie actuelle de VIH. Les contacts des populations humaines locales avec des populations simiennes sont assez fréquents, comme ils partagent des territoires communs. Par ailleurs, les singes, incluant les chimpanzés, y sont chassés pour la consommation (24), ce qui est propice aux contacts avec du sang contaminé. Une étude rapporte que dans les marchés publics à Yaoundé (Cameroun) et dans les villages des alentours, parmi les singes vendus pour la consommation, entre 18% et 24% sont infectés par un VIS et parmi ceux gardés comme animaux de compagnie, entre 12% et 14% sont infectés par un VIS (25). De plus, dans certaines populations simiennes sauvages en Afrique, la prévalence du VIS peut atteindre plus de 50% (26, 27). Il est intéressant de noter cependant que, chez les singes, à l'exception des chimpanzés, l'infection n'évolue pas vers le SIDA, malgré une virémie élevée. En effet, pour la majorité des SIV, l'infection de l'hôte naturel ne se traduit pas par une activation chronique du système immunitaire ni une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ (28). Il semble y avoir eu une coévolution dans certains cas entre ces animaux et les virus.

S'il est probable que les cas de transmission de VIS vers les humains se produisent depuis beaucoup plus longtemps, ces évènements n'ont visiblement pas mené à des épidémies. Il semble, cependant, que pendant la période de décolonisation du Congo durant la première moitié du XX^e siècle, la densification des villes, les mouvements de populations et l'augmentation de l'activité sexuelle entre les individus aient contribué à la propagation après un évènement de transmission initial (29). Il est par ailleurs possible de retracer les origines de la pandémie par les déplacements des populations via les réseaux ferroviaires reliant Kinshasa à d'autres villes en

Afrique (30). Ces changements importants, combinés à une transmission où le virus a efficacement pu s'adapter à l'humain, expliquent probablement comment le virus a pu se transmettre aussi rapidement. On recense à l'heure actuelle douze cas de transmission inter espèces dont chaque évènement est responsable d'un groupe différent du VIH.

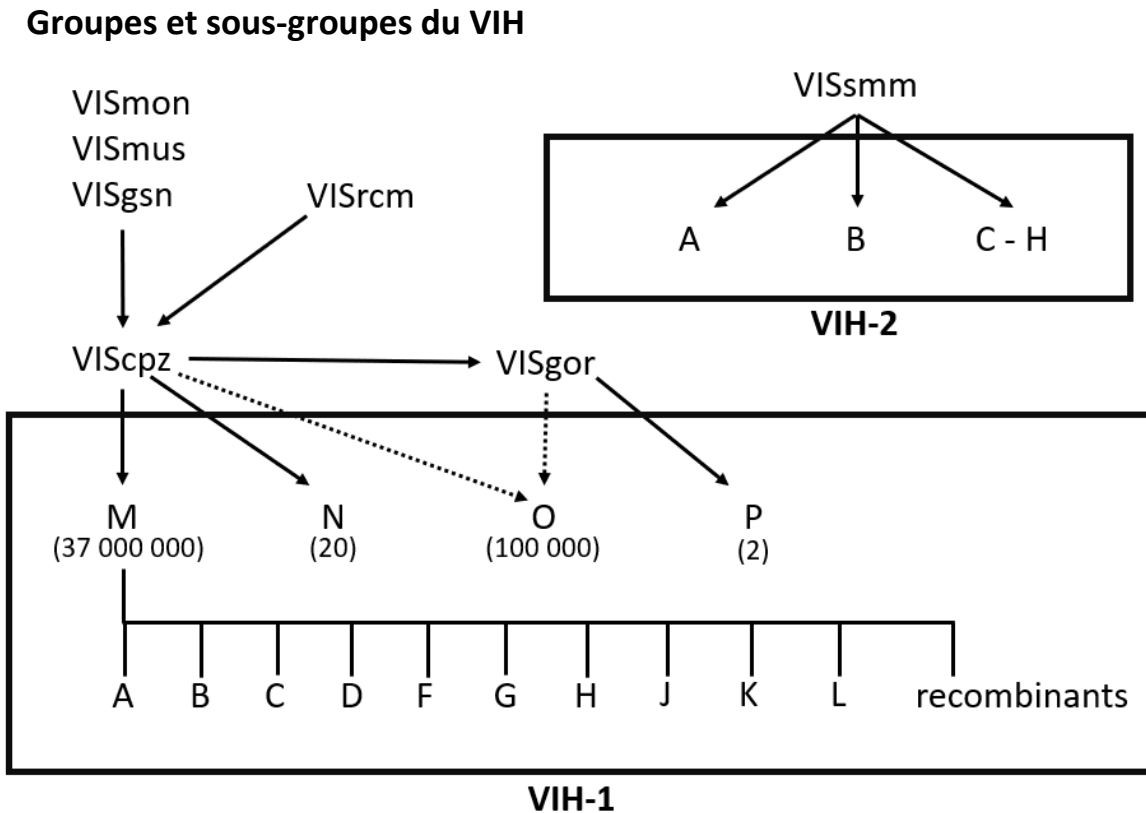


Figure 1. Groupes et sous-groupes du VIH et de leurs précurseurs simiens. Les deux encadrés représentent le VIH-1 et le VIH-2 comprenant leurs groupes et sous-groupes respectifs. Les flèches pleines indiquent un évènement de transmission inter-espèce, tandis que les flèches pointillées indiquent un évènement potentiel de transmission inter-espèce.

Le VIH comprend deux virus différents, soit le VIH-1 et le VIH-2. Les analyses génétiques démontrent que le VIH-2 est le résultat de 8 cas de transmission inter espèces à partir du VIS infectant les mangabeys enfumés (VISsmm) (31) menant aux groupes A à H. Bien que les groupes C à H semblent être des infections en cul-de-sac, n'ayant pas pu se propager dans la population humaine après l'évènement initial de transmission (32-35), les groupes A et B sont responsables d'une épidémie localisée en Afrique de l'Ouest touchant un peu plus de 2 millions d'individus. Généralement, lorsqu'on fait référence à la pandémie mondiale du VIH, il est cependant question

du VIH-1 qui est marqué par des taux de déplétion des cellules T CD4⁺ plus rapide et qui se propage plus facilement. Le VIH-2 reste malgré tout une infection importante dans les régions où il est endémique.

Le VIH-1, relié au VIS infectant les chimpanzés (VIScpz) (36, 37), est composé des quatre groupes M (pour *Main*), O (pour *Outlier*), N (pour *Non-M, non-O*) et P (pour *Pending identification of other cases*), résultant de quatre événements de transmissions indépendants (27, 38). Le groupe M est responsable de la pandémie mondiale du VIH touchant plus de 37 millions d'individus et le groupe O est responsable d'une épidémie localisée en Afrique de l'Ouest touchant environ 100 000 individus. Les groupes rares N et P sont responsables de, respectivement, 20 et 2 cas identifiés. Les groupes O, N et P sont d'une importance cruciale en recherche fondamentale comme les différences biologiques entre ces virus et ceux du groupe M peuvent être des indices quant à la capacité importante du groupe M à se propager.

Le VIScpz, infectant les chimpanzés, semble quant à lui être une recombinaison de VIS provenant de la lignée infectant le cercopithèque mona (VISmon), le cercopithèque moustac (VISmus) et le cercopithèque hocheur (VISgsn), ainsi que de la lignée infectant le cercocèbe à collier blanc (VISrcm). Par ailleurs, il n'est pas encore clair si les groupes O et P proviennent directement du VIScpz ou s'ils y sont indirectement reliés via le VISgor infectant les gorilles.

Structure et cycle viral du VIH-1

Organisation génomique et structure

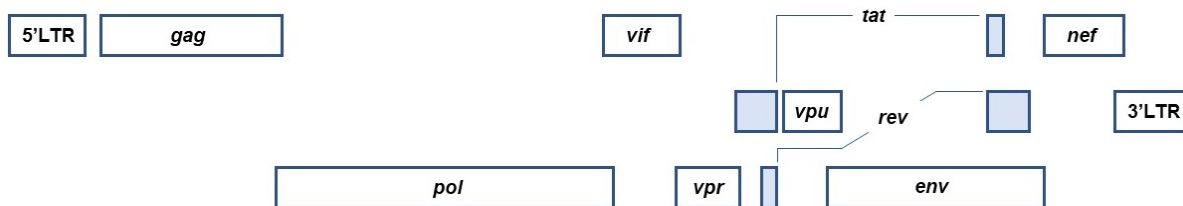


Figure 2. Organisation génomique du VIH-1. Les différents encadrés indiquent les différents gènes, en italique, et les deux LTR aux extrémités. Les trois niveaux indiquent le cadre de lecture 1, 2 ou 3 du génome qui comporte des gènes qui se chevauchent dans différents cadres de lecture.

Le VIH-1 est un virus enveloppé à ARN simple-brin (ARNsb) linéaire de polarité positif. Le génome viral a une taille d'un peu plus de 9,5 kb (Figure 2). Il fait partie de la famille des rétrovirus et possède une structure similaire aux autres rétrovirus avec un cœur dense contenant deux copies du génome ARN (Figure 3). Parmi les gènes du VIH-1, on retrouve les trois gènes retrouvés dans tous les rétrovirus (*gag*, *pol*, *env*), deux éléments de régulation (*tat*, *rev*) et quatre protéines dites « accessoires » (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*).

Gag

Le gène *group-specific antigen (gag)* est responsable de la synthèse des éléments de structure composant la matrice (p17), la nucléocapside (NC) et la capsid virale (p24). Les protéines matures sont formées lors de la maturation des particules virales (Figure 4) à partir d'un précurseur polyprotéique Gag ou d'un précurseur polyprotéique Gag-Pro-Pol après un clivage par la protéase virale contenue dans le précurseur Gag-Pro-Pol. Le précurseur Gag-Pro-Pol est formé par un changement de cadre de lecture de -1, ce qui empêche la lecture du codon de terminaison de Gag dans environ 5% à 10% des cas. La lecture se poursuit et mène au précurseur polyprotéique contenant Gag et Pol (39). La conservation du ratio de protéines Gag contre Gag-Pro-Pol d'environ 20 pour 1 est importante à la réplication du virus (40).

Pol

Le gène *pol* est responsable de la synthèse des enzymes nécessaires à la réplication du virus, soit la protéase, transcriptase inverse et l'intégrase. Pol est traduite dans la polyprotéine Gag-Pro-Pol. La protéase virale est responsable du clivage des précurseurs polyprotéiques menant aux différentes protéines virales matures. La transcriptase inverse est responsable de la transcription inverse de l'ARN viral en ADN, avant l'intégration ou la transcription pour l'expression de protéines virales. Elle ne possède aucun mécanisme de correction et a un taux d'erreur de l'ordre de 1,4 sur 10 000 (41), ce qui explique en partie pourquoi le génome du VIH évolue à un rythme d'environ un million de fois plus élevé que le génome humain (42). Cela permet notamment la mutation des épitopes ciblés par les anticorps. Ce taux d'erreur élevé, combinés à d'autres facteurs cellulaires, est donc aussi responsable de la haute variabilité

génétique du VIH. L'intégrase est l'enzyme qui permet l'incorporation du génome viral au génome de la cellule infectée.

Env

Le gène *env* est responsable de la synthèse des glycoprotéines de l'enveloppe. L'enveloppe se trouve sous forme de trimères hautement glycosylés et est composée des sous-unités gp120 et gp41 clivées par une enzyme cellulaire, la furine (43), à partir d'un précurseur Env gp160. Env est responsable de l'attachement à la cellule via le récepteur d'entrée CD4 et sa séquence dicte son tropisme pour le co-récepteur CCR5 et/ou CXCR4.

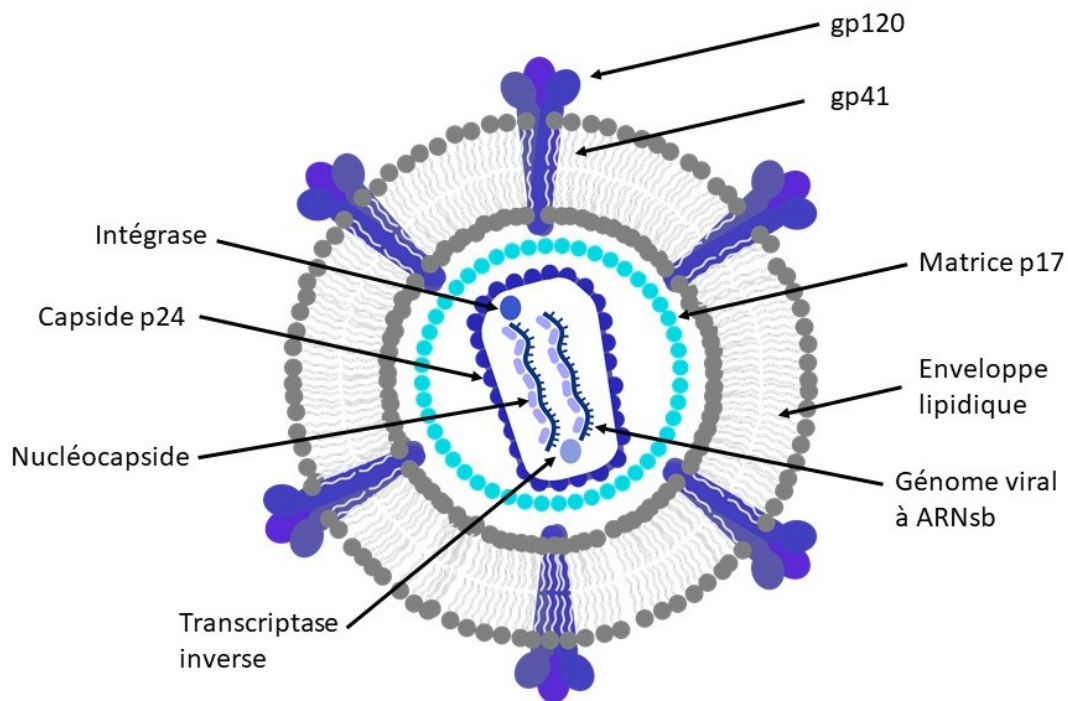


Figure 3. Structure du VIH-1. La particule virale est composée d'un noyau compact qui renferme le matériel génétique. Cette capsid est enveloppée par une bicouche lipidique dans laquelle se trouvent trimères de la glycoprotéine qui se lient au récepteur CD4.

Tat

Transactivator of transcription (Tat) est une protéine qui active principalement l'élongation des transcrits du virus en se liant à une structure dans l'ARN produite à partir du LTR, la *transactivating response element* (TAR), puis en recrutant la cycline T et cdk9 (complexe pTEFb) pour hyperphosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II cellulaire afin d'assurer la

transcription efficace et d'éviter les arrêts prématurés (44). Tat est aussi sécrété par la cellule infectée (45) ce qui a des conséquences importantes sur les cellules non infectées. Tat peut, par exemple, agir en tant que chimioattractant (46) ou encore être endocyté et induire de l'inflammation ou même l'apoptose de cellules non infectées (47).

Rev

Regulator of virions (Rev) est aussi un élément important dans la régulation de l'épissage et de l'exportation des ARNs messagers du virus (48). Rev transite entre le cytoplasme et le noyau, et est impliqué dans l'export des ARNs messagers viraux non épissés ou monoépissés vers le cytoplasme en se liant à une séquence dans l'ARNm, le *rev responsive element* (RRE). La présence de rev permet l'expression tardive des protéines de structures (Gag, Gag-Pol et Env) et de plusieurs protéines accessoires (Vif, Vpr et Vpu).

LTR

Les deux *long terminal repeats* (LTR) sont des régions identiques d'environ 650 bases de part et d'autre du génome et contiennent différents éléments de régulation, notamment le promoteur contrôlant l'initiation de la transcription ainsi que les régions où viennent se fixer des facteurs de transcription cellulaires modulant positivement ou négativement la transcription virale selon le contexte cellulaire.

Vif, Vpr, Vpu et Nef

En plus de ces gènes communs aux rétrovirus, on retrouve les gènes *nef*, *vif*, *vpu* et *vpr*, dont les fonctions sont détaillées dans les prochaines sections. Ces gènes ne sont pas essentiels au cycle viral *in vitro*, mais contribuent de manière significative à la progression de l'infection et à la pathogenèse *in vivo*.

Cycle répliatif du VIH-1

Le cycle répliatif du VIH-1 suit le modèle des autres rétrovirus (Figure 4). L'attachement du virus à la cellule requiert la présence du récepteur du VIH, CD4, et de son corécepteur, CCR5 ou CXCR4, dépendant du tropisme du virus, dicté par la séquence de son enveloppe qui lie ces récepteurs. Le type cellulaire principalement ciblé par le VIH est donc le lymphocyte T CD4⁺, bien que les

macrophages et les cellules dendritiques puissent aussi être infectés. Après la fusion de la particule virale à la cellule, le matériel génétique est ensuite relâché dans le cytoplasme via la décapsulation et la transcriptase inverse transcrit le génome viral en ADN. L'intégrase permet ensuite l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte. À ce stade, il peut y avoir une répression transcriptionnelle et la cellule entre alors en latence. Elle n'exprime pas de protéine virale et ne peut être détectée par le système immunitaire jusqu'à une réactivation stochastique ultérieure. Au contraire, si la cellule entre dans la phase d'infection productive, le génome viral est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire, activé par l'élément de régulation Tat et les protéines virales sont synthétisées. On retrouve les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pro-Pol et la protéine de l'enveloppe qui s'assemblent au niveau des radeaux lipidiques. À l'étape de la maturation, la protéase effectue un autoclivage du précurseur Gag-Pro-Pol et clive ensuite les précurseurs Gag en produits matures, p24, p17 et NC. La machinerie cellulaire ESCRT est recrutée à la membrane aux sites de bourgeonnements, ce qui facilite la scission de la membrane et la relâche des particules virales (49-51).

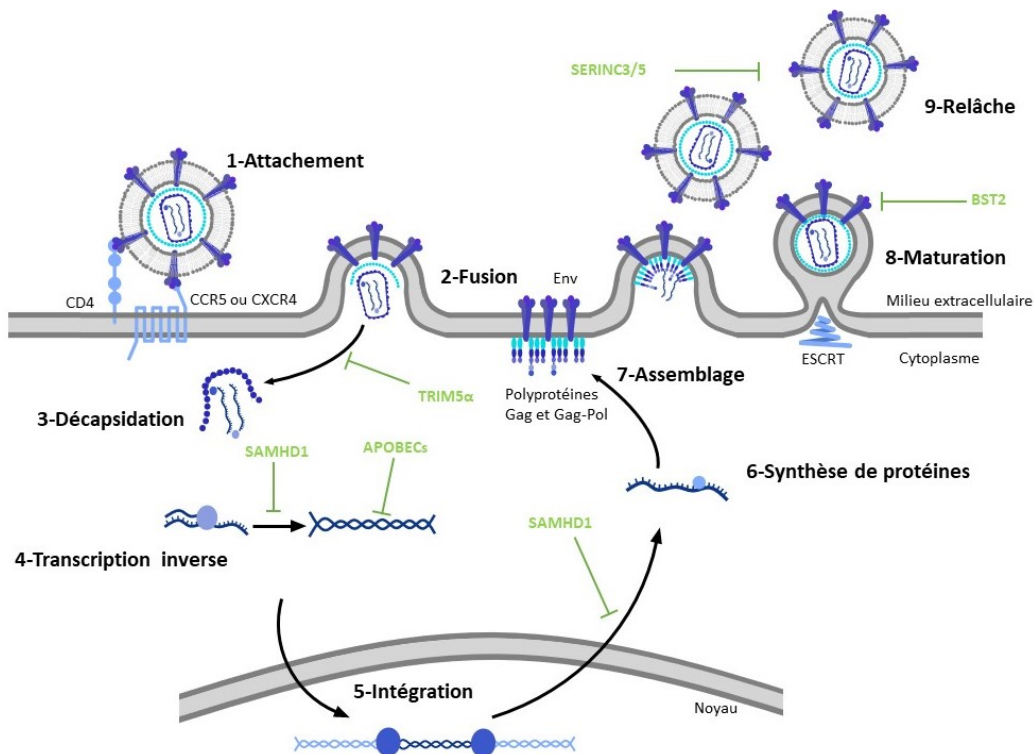


Figure 4. Cycle réplcatif du VIH et principaux facteurs de restriction. Les étapes numérotées de 1 à 9 indiquent les étapes principales du cycle viral du VIH-1. En vert, on retrouve les principaux facteurs de restrictions aux étapes auxquelles ils interviennent.

Facteurs de restrictions et protéines accessoires

La cellule est un environnement hostile et peu propice à l'infection. Ainsi, malgré des contacts fréquents entre les populations humaines locales et les singes, le virus n'a pu se transmettre aux humains qu'à douze occasions connues (VIH-1 et VIH-2). L'explication du nombre très faible de transmissions inter espèces se trouve, en grande partie, dans l'existence de facteurs de restrictions. Ces mécanismes de défense intrinsèques empêchent la réplication des virus par différents moyens et interviennent à différentes étapes du cycle répliatif (Figure 4, en vert) pour bloquer l'infection ou l'infectivité des particules virales. Les lentivirus de primates ont donc développé des moyens pour surmonter ces défenses, en partie via les protéines accessoires. La grande spécificité des protéines accessoires pour les facteurs de restriction de leur espèce hôte explique ainsi le faible taux de transmission inter espèces.

Lors de la transmission qui a mené au groupe pandémique M du VIH-1, il semble que le virus ait évolué suffisamment pour pouvoir contrecarrer parfaitement l'action de ces facteurs de restriction humains qui représente une barrière à la transmission inter espèces. En plus des gènes de structure et des éléments de régulation, dans le génome du VIH-1 on retrouve aussi les protéines accessoires Nef, Vpu, Vpr et Vif. On retrouve les mêmes protéines accessoires dans les précurseurs du VIH-1, VIScpz et VISgor, ainsi que dans les VIS de la lignée VISmon/VISmus/VISgsn (Figure 1). Dans le VIH-2 et dans certains VIS dont VISrcm et SIVsm on retrouve Nef, Vpr et Vif, ainsi qu'une autre protéine accessoire, Vpx. Ces protéines accessoires ne sont pas indispensables au cycle répliatif du virus *in vitro*, mais contribuent de manière significative à l'infection et à la pathogenèse *in vivo*. Elles n'ont cependant aucune activité enzymatique connue et jouent davantage le rôle d'adaptateurs entre des protéines de l'hôte pour induire leur séquestration intracellulaire, leur localisation erronée ou leur dégradation.

Vif et APOBEC3

APOBEC3G est une enzyme de la famille des *apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide* (APOBEC) avec une activité de cytidine déaminase qui déamine des cytidines (C) pour les convertir en Uracile (U) durant la synthèse du 1^{er} brin d'ADN à la transcription inverse ce qui cause une mutation de Guanine (G) vers Adénine (A) dans l'ADN viral (52, 53). Ces hypermutations

mènent à des provirus défectueux qui ne peuvent établir une infection. *Viral infectivity factor* (Vif) est une protéine de 23kDa (54, 55) exprimée par le VIH et les VIS et qui contrecarre l'action d'APOBEC3G (56). En l'absence de Vif, APOBEC3G est incorporée dans les virions (57, 58) ce qui augmente son activité antivirale. Vif lie APOBEC3G et recrute une ubiquitine ligase E3, Cullin5-SCF, qui ubiquitine APOBEC3G pour induire sa dégradation protéasomale (58-60).

TRIM5

Tripartite motif-containing protein 5 (TRIM5) est un facteur de restriction qui bloque notamment l'infection expérimentale des singes par le VIH-1 (61, 62). TRIM5 reconnaît la capsid virale et accélère la décapsidation tout en bloquant la transcription inverse (63). Les monomères de TRIM5 s'assemblent en un réseau sur la capsid virale et ce complexe est notamment impliqué dans la détection de l'infection via une signalisation qui mène à l'activation de NF- κ B (64). Bien que les études initiales montrent que le VIH-1 est peu sensible au TRIM5 humain, ces études étaient majoritairement faites avec des souches adaptées en laboratoire. Des études avec des capsides provenant d'isolats de patients montrent que le virus est sensible à TRIM5 et que cette sensibilité dépend de la séquence de la capsid (65, 66).

Vpr

Viral protein R (Vpr) est une protéine d'environ 15 kDa qui est incorporée dans les virions matures du VIH-1 (67). Comme les autres protéines accessoires, elle agit aussi en tant qu'adaptateur en liant l'ubiquitine ligase E3 Cullin4 DDB1-DCAF1 pour induire la dégradation de ses cibles. Son incorporation au niveau des virions suggère par ailleurs un rôle tôt dans l'infection. Un des rôles marqués de Vpr au niveau des cellules T CD4⁺ est sans doute l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (68, 69). Cet arrêt semble par ailleurs être lié aux copies de Vpr incorporées dans les virions (70). La phase G2 du cycle est propice à la réplication du VIH (71) et cet arrêt peut donc augmenter la production virale. En outre, il semble que l'arrêt du cycle cellulaire contribue aussi à la mort par apoptose des cellules infectées.

Par ailleurs, Vpr est impliquée dans le transport du complexe de préintégration au noyau. De plus, Vpr interagit avec différentes protéines cellulaires impliquées dans la transcription et la réparation d'ADN et peut aussi réguler la transcription du virus. Bien que Vpr ne soit pas

essentielle dans l'infection des cellules T CD4⁺, l'infection des macrophages et des cellules dendritiques requiert sa présence (72, 73).

Vpx et SAMHD1

Sterile alpha motif and HD domain protein 1 (SAMHD1) est un facteur de restriction spécifique aux cellules dendritiques et myéloïdes. Des études montrent aussi que SAMHD1 bloque l'infection dans les cellules T CD4⁺ naïves qui sont peu permissives à l'infection, contrairement aux cellules T CD4⁺ activées (74). Via son activité désoxyribonucléotide triphosphate triphosphohydrolase (dNTPase), SAMHD1 déplete les niveaux de dNTPs requis pour la transcription inverse (75-77). *Viral protein X* (Vpx) est une protéine de 12 à 16 kDa exprimée par le VIH-2 et les VIS (78). Elle contrecarre l'action de SAMHD1 (79) en liant l'ubiquitine ligase E3 Cullin4 DDB1-DCAF1 pour induire sa dégradation (79, 80). Ainsi Vpx permet la réplication dans ces types cellulaires où SAMHD1 limite l'infection. Le VIH-1 ne possède pas de gène codant pour Vpx et sa réplication dans les cellules dendritiques et myéloïdes en est affectée. L'idée que les macrophages sont, en partie, permissifs à l'infection au VIH-1, mais pas aux VIS où le gène *vpx* a été retiré, indique cependant que le RT du VIH-1 a évolué afin de pouvoir fonctionner à des niveaux de dNTPs plus bas (81). On peut cependant rendre ces cellules expérimentalement plus permissives à l'infection par le VIH-1 en exprimant Vpx dans ces cellules en *trans*. Vpx est par ailleurs un paralogue de Vpr dérivé d'un gène commun dans un lentivirus précurseur (82).

Nef, SERINC3/5 et CD4

Negative regulatory factor (Nef) est une protéine de 27 à 35 kDa (83-86) rapidement transcrite après l'infection et incorporée dans les virions (87-89). Des études avec des cohortes de patients infectés par des virus déficients pour la protéine Nef ont démontré son rôle dans la pathogénicité du VIH (90-92). Nef est impliquée dans la régulation négative de nombreuses protéines de surface qui ont un rôle immunomodulateur. Nef augmente par ailleurs l'infectiosité des virions (93) en contrecarrant l'action du facteur de restriction *serine incorporator 3/5* (SERINC3/5) en l'excluant des virions matures (94, 95).

Un des effets les plus marqués de Nef est sans doute la régulation négative des niveaux de CD4 (96-98). Cette fonction de Nef permet d'une part de limiter la surinfection des cellules T CD4⁺ (99)

et d'autre part d'augmenter l'infectiosité des particules virales via une réduction des interactions CD4-gp160 ou CD4-gp120 (100, 101). Par ailleurs, l'interaction entre CD4 et gp120 à la surface des cellules induit une conformation de gp120 qui la rend vulnérable aux anticorps impliqués dans la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (102-105), un phénomène contrecarré par l'action de Nef sur CD4.

Vpu et BST2

Structure de BST2

Bone marrow stromal antigen 2 (BST2) (aussi appelée tétherine) est une protéine de surface composée d'une portion N-terminale cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire (TM) à une hélice, d'un ectodomaine en hélice et d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). BST2 est retrouvée sous forme de dimères, où la moitié C-terminale de l'ectodomaine est arrangée en hélices surenroulées (Figure 5) (106, 107). Le gène humain comprend deux codons d'initiations dont le premier est flanqué d'une séquence Kozak faible. Ainsi, lors du balayage, le ribosome peut sauter le premier codon d'initiation, menant à la synthèse de deux isoformes de BST2 en ratios équimolaires, où l'une des isoformes est écourtée des 12 premiers acides aminés composant la portion cytoplasmique de la protéine (108). Les dimères formés par BST2 peuvent être des homodimères court-court, long-long ou des hétérodimères court-long (Figure 5). Par son ancre GPI, BST2 est localisé en grande partie dans les radeaux lipidiques, riches en cholestérol.

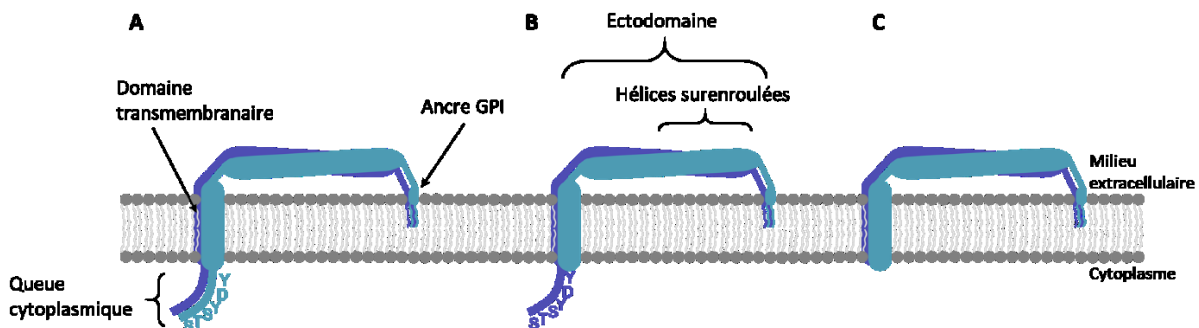


Figure 5. Structure du dimère de BST2. A. Structure de l'homodimère long-long. B. Structure de l'hétérodimère long-court. C. Structure de l'homodimère court-court. Le motif impliqué dans la signalisation NF- κ B (YxY) et les résidus ubiquitinés lors de l'antagonisme par Vpu (STS) sont indiqués dans la portion cytoplasmique de la forme longue de BST2.

Rôles de BST2

Rétention de particules virales

Le rôle principal de BST2, et sans doute le plus décrit, est d'agir en tant que facteur immunitaire intrinsèque en limitant la dissémination de virus enveloppés grâce à sa structure particulière qui lui permet d'ancrer les particules virales à la membrane cellulaire (109, 110). En effet, comme BST2 est localisé dans les radeaux lipidiques qui agissent aussi en tant que plateformes d'assemblage du VIH et d'autres virus enveloppés, BST2 peut, d'une extrémité, rester ancrée à la membrane et de l'autre, ancrer le virus (Figure 6). Dans sa forme la plus courante, c'est le domaine TM qui reste ancré à la membrane cellulaire, tandis que l'ancre GPI est incorporée dans les particules virales (Figure 6A, à gauche). Lorsque de nombreuses particules sont retenues par BST2, elles s'assemblent en large réseau de particules à la surface de la cellule (Figure 6B). La restriction de BST2 a un large spectre et son rôle a été décrit pour de nombreux virus enveloppés dont le VIH (109, 110), le virus de l'influenza (111), les virus de Lassa et de Marburg (112), le virus du sarcome de Kaposi (113), de l'Ebola (114) et le SARS-CoV-1 (115).

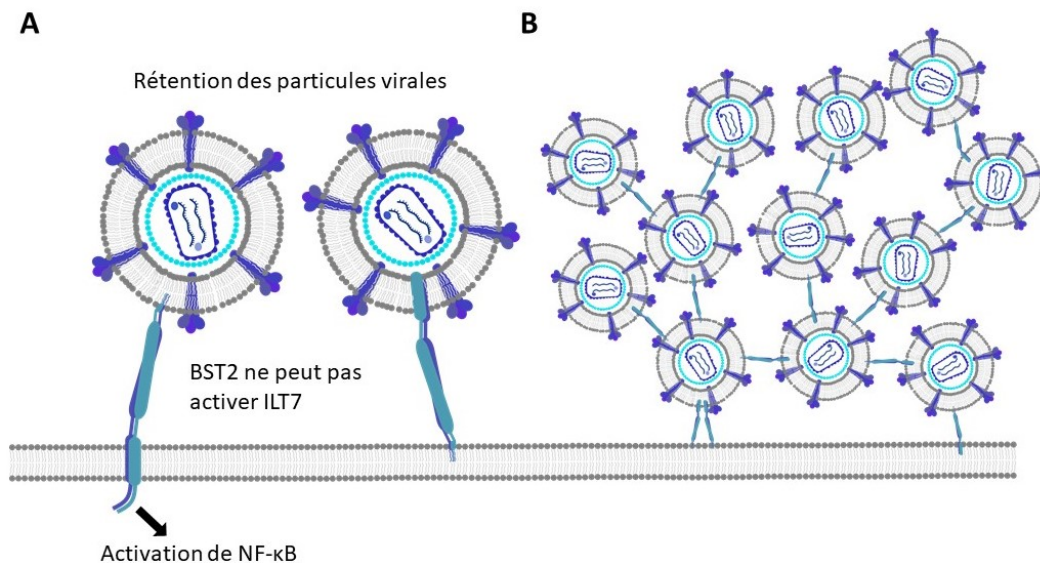


Figure 6. Modèle schématique de l'ancrage de particules virales par BST2. A. Les particules virales sont retenues par BST2 qui agit comme une ancre en s'insérant d'une part dans la membrane cellulaire et d'autre part dans l'enveloppe lipidique du virus. B. Aux sites d'assemblage viraux, riches en BST2, les différentes particules s'assemblent les unes aux autres et à la membranes, reliées entre elles par les molécules de BST2, formant ainsi une grappe de particules virales en amas localisés sur la membrane plasmique.

La rétention de particules virales par BST2 diminue la quantité de virus relâchée et la transmission de l'infection d'une cellule à l'autre via la nette réduction de particules libres. Cependant, des études démontrent que la transmission via des contacts cellules-cellules est facilitée par cette rétention (116), bien que toutes ne s'accordent pas à ce sujet (117).

Par ailleurs, la rétention de particules virales a des impacts indirects sur différents processus immunitaires. En présence de BST2, les cellules infectées ont une grande quantité de virus à leur surface et une grande quantité d'épitopes exposés accessibles à des anticorps. Ce phénomène permet notamment d'augmenter la sensibilité des cellules à la cytotoxicité médiée par des anticorps (102, 118, 119) et une approche de traitement pourrait être développée en utilisant des anticorps neutralisants à large spectre pour marquer les cellules pour l'ADCC (120).

Activation de la voie NF- κ B

BST2 agit aussi en tant que détecteur de l'infection pour activer la voie inflammatoire NF- κ B. En effet, des études démontrent que lorsque surexprimé dans des cellules HEK293, BST2 induit l'activation de NF- κ B (121). Lorsque BST2 retient de particules, la signalisation induite active davantage NF- κ B. Cet effet est observé uniquement en l'absence de Vpu qui contrecarre l'action de BST2 sur la rétention. Les déterminants structuraux de cette fonction se retrouvent dans la séquence primaire de portion cytoplasmique de la forme longue de BST2 où on retrouve le motif Y_6X_8 , directement impliqué dans cette signalisation (Figure 5). (122, 123). Ainsi, si les deux isoformes de BST2 ont la même capacité à retenir les particules virales, seule la forme longue de BST2 peut signaler via NF- κ B. Il est ainsi proposé que l'organisation de BST2 au niveau des radeaux lipidiques pourrait agir en tant que plateformes de signalisation (124, 125).

Activation du ligand ILT7

BST2 a également une fonction autre qu'antivirale, en agissant comme ligand du récepteur inhibiteur ILT7 exprimé spécifiquement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) (126). L'activation de ce récepteur inhibe la production d'IFN-I par les pDCs via une signalisation qui est développée plus tard dans ce chapitre. Selon le modèle que nous avons proposé, l'interaction des deux monomères du dimère de BST2 avec deux monomères d'ILT7 permet la stabilisation du dimère ILT7 et induit la signalisation (127). Cette activation dépend d'une part de l'interaction

directe via les résidus exposés de BST2, D₁₂₉ et R₁₃₆, dans l'hélice surenroulée de l'ectodomaine et d'autre part, d'une certaine flexibilité et d'une instabilité dynamique (127).

L'activation d'ILT7 n'est cependant possible que lorsque BST2 est retrouvée à la surface de cellules sans retenir de particules virales (128, 129). L'explication exacte de ce phénomène n'est pas encore connue, cependant, la rétention de BST2 induit un stress physique dans la structure surenroulée de BST2 (130). On pourrait spéculer que cette tension réduit notamment la flexibilité nécessaire à l'activation d'ILT7.

Protéine virale U

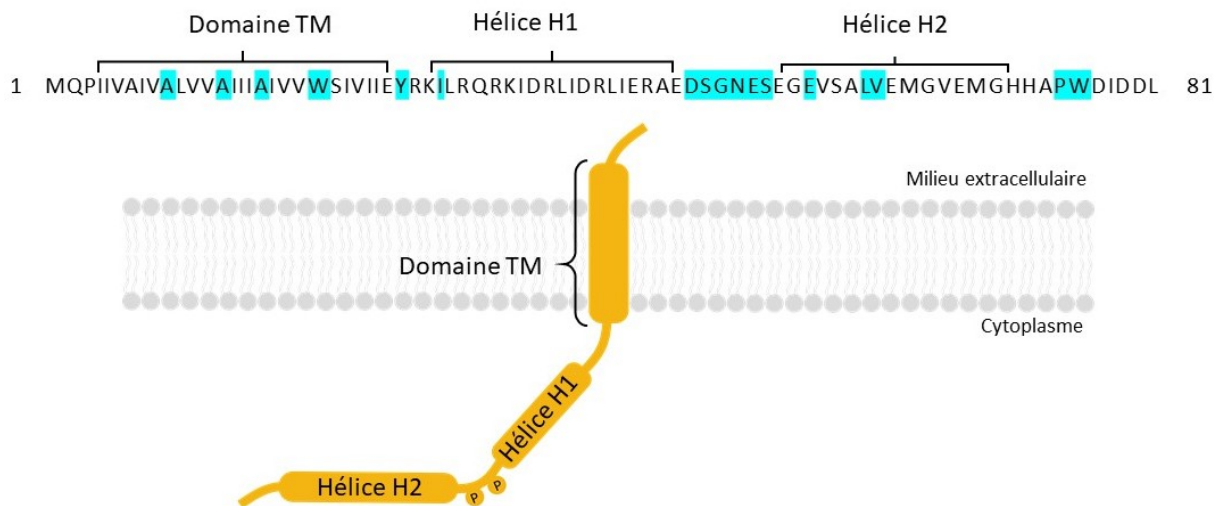


Figure 7. Séquence et structure de Vpu. Les principaux domaines sont indiqués par des crochets et les principaux motifs fonctionnels décrits ici sont indiqués en bleu dans la séquence de la protéine Vpu du virus NL4.3. En orange, on retrouve la structure schématique de Vpu, insérée dans la membrane plasmique.

Viral protein U (Vpu) est une protéine de 16 kDa (131, 132) composée d'un domaine TM et de deux hélices, H1 et H2 (Figure 7). Elle est présente dans le génome de VIH-1 ainsi que dans celui du VIScpz et des VISmon, VIS mus et VISgsn. Similairement à Nef, elle est impliquée dans le remodelage des protéines de surface (133) et partage d'ailleurs plusieurs cibles avec Nef dont CD4 (134-137), et certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) (137, 138). Parmi les autres protéines visées par Vpu pour la réduction de leurs niveaux de surface, on retrouve notamment CCR7 (139), NTB-A (140), ICAM-1 (141) et TIM-3 (142). La

régulation négative de NTB-A protège par exemple les cellules infectées à la lyse médiée par les cellules NK (143), tandis que la régulation négative TIM-3 pourrait contrecarrer un effet inhibiteur sur la relâche des particules virales (142, 144). Contrairement à Nef qui est encapsidé et exprimé tôt lors du cycle de l'infection, Vpu est exprimée tardivement dans le cycle de l'infection et dépend de Rev. Vpu est exprimé à partir de l'ARNm bicistronique *vpu-env* où les cadres de lecture de *vpu* et *env* se chevauchent (145). Le ribosome peut sauter le codon d'initiation de *vpu* pour aller traduire le gène *env*, sur un cadre de lecture différent. Le rôle de Vpu sans doute le plus étudié est de surmonter la restriction imposée par BST2 sur la relâche virale.

Antagonisme de BST2

La protéine Vpu du virus adapté au laboratoire NL4.3 contrecarre l'action de BST2 via différents mécanismes (Figure 8). D'abord, l'antagonisme de BST2 par Vpu requiert une interaction directe entre les deux domaines transmembranaires (146-148). Chez Vpu, cette interaction dépend du motif A₁₀XXXA₁₄XXXA₁₈XXXW₂₂ de l'interface hydrophobe du domaine transmembranaire (Figure 7), tandis que chez BST2, cette interaction dépend des résidus hydrophobes I₃₄, L₃₇, L₄₁ et T₄₅ (149). Vpu intercepte BST2 dans le réseau trans-Golgi (TGN) d'où elle peut retenir BST2 dans ces compartiments ou encore induire sa dégradation, afin de réduire les niveaux de surface de BST2.

Via son motif disérine DSGxxS (Figure 7) où les sérines S₅₂ et S₅₆ sont phosphorylées, Vpu recrute β-TrCP qui représente le récepteur de substrat du complexe de l'ubiquitine ligase E3 Skp1-Cullin 1-Fbox (150). Ce complexe induit la polyubiquitination sur la queue cytoplasmique de BST2 aux résidus sérines et thréonine de la séquence STS cytoplasmique (Figure 5) menant à la dégradation protéasomale (151-153) ou lysosomale (154, 155). Ainsi, comme l'isoforme courte de BST2 ne comporte pas cette séquence (Figure 5), elle ne peut être marquée pour la dégradation.

Vpu intervient aussi dans le transport de BST2 pour induire sa séquestration dans le TGN et dans les compartiments endosomaux (156-160). Ce mécanisme de trafic altéré dépend de l'interaction de BST2 avec les complexes de clathrines AP-1 et AP-2 qui affectent ainsi la localisation cellulaire du complexe Vpu/BST2. AP-1 est impliquée dans le trafic entre le TGN et les endosomes, tandis que AP-2 est impliquée dans le trafic entre les endosomes et la membrane cellulaire (161).

L'interaction de Vpu avec les complexes des clathrines dépend de différents motifs dont la dileucine ExxxLV présente dans l'hélice H2 (Figure 7) (162-164).

La protéine Vpu du sous-type B est retrouvée préférentiellement au niveau des membranes des compartiments internes telles que le réticulum endoplasmique (RE) et le TGN (162, 165, 166). La protéine Vpu du sous-type C semble être la seule du groupe M qui soit localisée à la membrane cellulaire (167). Cette localisation de Vpu du groupe C a été liée à un autre motif dileucine ExxxLV dans la portion cytoplasmique à proximité de la membrane qui chevauche un motif de triage de clathrines YxxΦ (168).

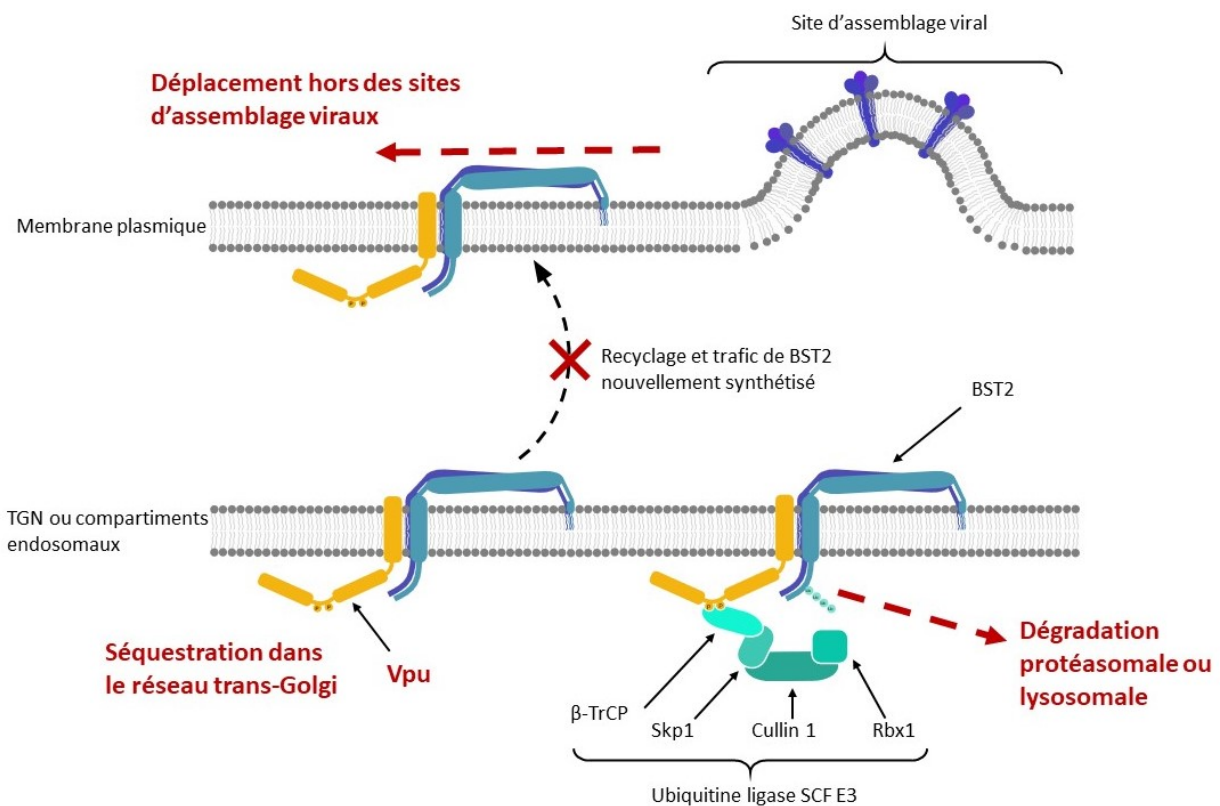


Figure 8. Modèle de l'antagonisme de BST2 par Vpu. En rouge, on retrouve les trois modes principaux d'antagonisme de BST2 par Vpu pour exclure BST2 des sites d'assemblages viraux ou de la membrane plasmique. En vert, le complexe d'ubiquitine ligase recruté par Vpu pour marquer BST2 vers sa dégradation.

Ces deux mécanismes permettent ainsi de réduire les niveaux de surface de BST2 pour augmenter la relâche virale. Cette régulation négative des niveaux de surface de BST2 n'est cependant pas absolument nécessaire à l'augmentation de la relâche. En effet, il est possible de voir un effet de

Vpu sur la relâche, en l'absence de régulation négative de BST2 (169). En effet, Vpu peut aussi déplacer BST2 à l'extérieur des sites d'assemblage viraux (160, 170-173) sans réduire les niveaux de surface. Cela permet donc d'augmenter la relâche virale, notamment en contrecarrant l'action de la forme courte de BST2 qui ne possède pas la portion cytoplasmique et qui ne peut donc être ubiquitinée. Le mécanisme exact du déplacement de BST2 hors des sites d'assemblage viraux est toujours inconnu. Cependant, l'hélice H2 et son motif dileucine ExxLV et le recrutement de la protéine adaptatrice de clathrines AP-2 semblent être impliqués dans ce processus (170). De plus, il semble y avoir un autre motif dans la portion C-terminale de Vpu qui est impliqué dans ce processus, soit le résidu tryptophane W₇₆ dans le sous-groupe B (Figure 7) (171, 174) ou le motif L₈₀L₈₁ dans le cas du sous-groupe C (172).

BST2 comme barrière à la transmission inter espèces

Si la protéine Nef du VIScpz est très efficace pour contrecarrer l'action du BST2 des chimpanzés, elle n'a aucun effet sur le BST2 humain (175). En effet, le BST2 humain possède une délétion de cinq acides aminés dans sa portion cytoplasmique, où Nef lie le BST2 des chimpanzés. Cette délétion est considérée comme une des marques de la pression sélective des lentivirus sur l'humain au cours de l'évolution (176). Ceci explique en partie pourquoi le VIScpz ne peut pas se répliquer chez l'humain et, par extension, le nombre très limité de transmissions inter espèces.

BST2 comme barrière à la propagation du VIH

L'absence d'antagonisme de BST2 par les groupes endémique (O) et rares (N et P) du VIH-1 (177, 178) a été proposée comme un facteur limitant pour la propagation de ces souches de VIH dans la population humaine. Cependant, des études plus récentes démontrent que le groupe endémique O peut, via sa protéine virale Nef, diminuer les niveaux de surface de BST2 et augmenter la relâche virale en retenant BST2 dans le réseau trans-Golgi (179, 180). De la même manière, certains isolats du groupe rare N (179) et même un isolat du groupe O (181) peuvent diminuer les niveaux de surface de BST2 via leur protéine Vpu, mais leur niveau d'antagonisme reste généralement inférieur à celui exercé par les protéines Vpu appartenant au VIH-1 du groupe M. BST2 semble donc exercer une pression sélective importante sur ces protéines (182). Dans le

cas du VIH-2, le virus a adapté sa protéine d'enveloppe pour pouvoir contrecarrer l'action de BST2 (183, 184).

L'action de Vpu sur BST2 visant à augmenter la production virale, ne peut donc pas, à elle seule, expliquer la capacité unique du groupe M à causer une importante pandémie, bien que l'efficacité de cet antagonisme joue probablement un rôle. Dans le cas du groupe N, il semble que si les protéines Vpu ont dans certains cas acquis la capacité de réduire les niveaux de surface de BST2, elles ont perdu la capacité de réduire les niveaux de surface de CD4 (182) ce qui peut en partie expliquer l'efficacité moindre des virus du groupe N à se propager.

Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont des cellules représentant moins de 1% des cellules mononuclées du sang périphérique (PMBC) et qui composent les principales cellules productrices d'interféron de type I (IFN-I) (185, 186). Leur nom « plasmacytoïde » fait référence à leur morphologie comme elles ont, au repos, un grand cytoplasme et un grand réticulum endoplasmique, rappelant la morphologie des cellules plasmiques. Activées, elles prennent plutôt une morphologie similaire à celle des cellules dendritiques conventionnelles et des cellules présentatrices d'antigènes (187). Elles peuvent être identifiées par leurs marqueurs spécifiques ILT7, BDCA-2 et CD123, mais elles expriment aussi CD4, CXCR4, CCR5 et CMH-II (188). Après leur activation, elles produisent des quantités importantes d'IFN-I, mais aussi d'IFN-III et d'autres cytokines pro-inflammatoires (189), et contribuent à ce titre à limiter l'établissement de l'infection. En plus de leur rôle majeur au niveau de la production d'IFN, elles produisent des chimiokines pour recruter des cellules NK et des cellules T (190) et peuvent présenter des antigènes et activer des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺.

Interféron

L'interféron (IFN) est une famille de cytokines qui comprend l'IFN-I, l'IFN-II et l'IFN-III et qui a une importante activité antivirale. Son récepteur, composé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées (191). L'activation de ces récepteurs mène à la régulation positive de nombreux gènes stimulés par l'interféron (ISG) (192). Dans les pDCs,

l'IFN-I mène à une signalisation autocrine qui amplifie le signal de production d'IFN-I (193). L'IFN-I permet une réponse rapide et locale permettant aux cellules près de la source de se protéger contre l'infection via les ISGs, tout en induisant l'apoptose des cellules infectées (194). Parmi les ISGs, on retrouve différents gènes impliqués dans des mécanismes antiviraux d'immunité intrinsèque, notamment des facteurs de restrictions tels que SAMHD1, APOBEC3G et BST2.

Par ailleurs, l'IFN-I a aussi un effet sur différents types cellulaires. L'IFN-I induit la maturation des cellules dendritiques (DC) qui expriment davantage leurs récepteurs effecteurs tels que les complexes majeurs d'histocompatibilité (CHM) I et II pour faciliter l'activation des cellules T (195), ainsi que CCR7 pour faciliter la migration des DC vers les ganglions lymphatiques (196). Ainsi, par leurs effets sur différentes populations de cellules via leur production d'IFN et par leur capacité à activer directement les cellules T, les pDCs jouent en quelque sorte le rôle de lien entre les éléments du système immunitaire inné et ceux du système immunitaire adaptatif.

pDCs lors de l'infection

Comme les pDCs expriment CD4, CXCR4 et CCR5, elles peuvent être infectées par le VIH, mais elles sont peu permissives à l'infection productive (197) en raison de l'expression du facteur de restriction SAMHD1, hautement exprimé dans les cellules dendritiques (198). Elles peuvent cependant transmettre des particules virales à des cellules T CD4⁺, malgré de faibles niveaux de réplication virale (199). Lors de l'infection, les pDCs sont rapidement déplétées dans le sang. Si plusieurs études suggèrent que cette déplétion est associée à une relocalisation des pDCs au niveau des ganglions lymphatiques et de l'intestin (200, 201), d'autres suggèrent cependant que les pDCs sont aussi déplétées au niveau des ganglions (202, 203). Par ailleurs, l'analyse *ex vivo* de pDCs provenant d'individus infectés montre la présence de défauts au niveau de la production d'IFN-I (204, 205).

Après l'entrée du VIH, les pDCs détectent le VIH via les récepteurs Toll-like (TLR) 7 et 9 qui reconnaissent l'ARN simple brin et les motifs CpGs non méthylés, respectivement (206) dans les endosomes. La détection se fait préférentiellement au niveau des endosomes précoces, menant à une réponse d'IFN-I (207). Par ailleurs, les pDCs détectent plus facilement les cellules infectées que les virions libres (208, 209) via des contacts directs de plus longue durée avec les cellules

infectées. Ces contacts prolongés s'expliquent entre autres par la régulation positive de certaines molécules d'adhésion, dont ICAM-1, par les cellules infectées. Les pDCs et les cellules infectées forment alors des complexes et des synapses interférogènes (210). Il est probable qu'en formant ces complexes avec les cellules infectées, les récepteurs des pDCs peuvent interagir efficacement avec différents récepteurs, notamment pour induire la signalisation BST2-ILT7.

Le rôle des pDCs et de leur production d'IFN-I dans le contrôle de l'infection au VIH ou au VIS a été démontré à plusieurs reprises *in vivo* (211-213) et chez des patients atteints du VIH (214), où la présence des pDCs est inversement corrélée à la charge virale. L'IFN-I a cependant un rôle paradoxal dans l'infection au VIH-1 (212). En effet, si l'IFN peut efficacement amorcer une réponse antivirale, il est aussi associé à l'inflammation persistante durant l'infection chronique et induit notamment la mort des cellules T CD4 (212, 215).

Mécanismes de contrôle de l'IFN

Comme la production soutenue d'IFN-I est délétère pour l'organisme et que l'activation aberrante des pDCs est notamment mise en cause dans certaines pathologies auto-immunes (216), il existe des systèmes de contrôle afin de limiter la production d'IFN-I. En effet, les réponses d'IFN-I se doivent d'être localisées et de courtes durées. Parmi ces points de contrôle, on retrouve les récepteurs inhibiteurs ILT7 et BDCA-2 (217, 218).

Immunoglobulin-like receptor 7 (ILT7) est un récepteur de la superfamille des récepteurs *Immunoglobulin-like* et est exprimé spécifiquement par les pDCs (219-221). ILT7 est associé à un complexe protéique contenant un motif d'activation des récepteurs immunitaires basé sur la tyrosine (ITAM), FcεR1γ. L'activation d'ILT7 mène à une signalisation ITAM qui passe par la phosphorylation des kinases de la famille Src et de la famille Syk. Cette signalisation inhibe la réponse de TLR7/9 qui mène à la production d'IFN-I et d'autres cytokines (222, 223). Le ligand naturel d'ILT7 qui médie son activation est BST2 (126, 206). Par ailleurs, l'activation des pDCs via les TLR7/9 cause la régulation négative d'ILT7 (218, 221).

Contrôle de l'IFN par le VIH

L'IFN est un obstacle majeur à l'établissement de l'infection. Si les virus fondateurs transmis (T/F) sont souvent résistants à l'IFN, comme il a été précédemment montré par l'ajout d'IFN exogène *in vitro* (224), le VIH intervient à différentes étapes pour limiter les effets de l'IFN. Par exemple, en plus de bloquer directement les effets de certains ISGs comme les facteurs de restrictions, le VIH peut aussi bloquer la signalisation en aval des récepteurs de l'IFN, notamment en bloquant la phosphorylation de STAT1 dans la signalisation JAK/STAT (225). De plus, le VIH emploie différents mécanismes pour directement bloquer la production d'IFN, notamment en exploitant les signalisations d'ILT7 et de BDCA-2 sur les pDCs.

Contrôle via la signalisation BST2-ILT7

Précédemment, des recherches au laboratoire ont démontré que la protéine Vpu du virus adapté au laboratoire NL4.3 avait non seulement la capacité d'augmenter la relâche virale, mais aussi de contrôler la production d'IFN-I par les pDCs lors de la détection de cellules infectées via la signalisation BST2-ILT7 (128). À l'opposé, la protéine Nef du groupe O du VIH-1 ne peut qu'augmenter la relâche virale en réduisant les niveaux de surface de BST2, sans toutefois exploiter cette signalisation (129). En effet, selon le modèle proposé, en déplaçant BST2 hors des sites d'assemblage viraux, la protéine Vpu favorise l'interaction entre BST2 et ILT7. Comme la protéine Nef du groupe O, ne peut pas exclure BST2 des sites d'assemblages viraux, les molécules de BST2 résiduelles à la surface, retenant des particules virales, ne peuvent activer ILT7. Sachant que la production d'IFN-I par les pDCs a un impact considérable sur la progression de l'infection, cette différence de mode d'antagonisme et de contrôle de la réponse immunitaire pourrait expliquer en partie la propagation limitée du groupe endémique O.

Contrôle via la signalisation BDCA-2

Similairement à la signalisation BST2-ILT7, l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH avec BDCA-2 réprime la production d'IFN médiée par l'activation de TLR9 (226). Cette répression semble par ailleurs avoir un effet sur la fonction des cellules NK et des cellules B (227).

PDCs et autres pathologies

Cancer

Le rôle des pDCs est apparent dans différentes maladies n'impliquant pas d'infection, notamment dans certains cancers. L'infiltration des pDCs dans la tumeur indique parfois un mauvais pronostic, comme elles semblent acquérir un phénotype tolérogène, notamment dans les mélanomes (228), le cancer du sein (229) et des ovaires (230). On pourrait croire que la régulation positive de BST2 observée dans certains cancers du sein (231) permet aux cellules cancéreuses d'exploiter la signalisation BST2-ILT7 pour diminuer la production d'IFN-I et contribuer à ce phénotype.

Maladies auto-immunes

Par leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN et d'autres cytokines, les pDCs sont aussi impliquées dans diverses pathologies auto-immunes (232), notamment dans le lupus systémique érythémateux (SLE) (233, 234) et le psoriasis (235). Le recrutement de différentes cellules effectrices, telles que les neutrophiles, au site d'inflammation joue ainsi un rôle dans les lésions cutanées (236). Il y a par ailleurs une étude clinique de phase I en cours pour évaluer l'efficacité d'un anticorps anti-ILT7 pour le traitement du SLE (237).

Chapitre 2 – Hypothèse et Objectifs

Hypothèse

L'hypothèse de cette étude est que le mode principal d'antagonisme de BST2, c'est-à-dire de déplacement ou de régulation négative à la surface cellulaire, détermine si Vpu peut moduler l'activation d'ILT7 par BST2 et contrôler la réponse d'interféron des pDCs.

Objectifs

Les objectifs de recherche spécifiques sont

1. De caractériser le mécanisme de contrôle de l'IFN via l'antagonisme de BST2 par Vpu et particulièrement le rôle du déplacement de BST2 hors des sites d'assemblage viraux;
2. De caractériser la conservation de la modulation de la signalisation BST2-ILT7 par des variants de Vpu provenant de groupes pandémiques et non-pandémique du VIH-1 et;
3. De caractériser la conservation de la répression d'IFN par cette signalisation dans un contexte plus physiologique d'infection et de co-culture avec des pDCs.

Chapitre 3 – Article

Résumé en français

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sécrètent des quantités importantes d'interféron de type I (IFN-I) et d'autres cytokines cruciales au contrôle *in vivo* de l'infection au VIH-1. La production d'IFN est médiée en partie par le facteur de restriction BST2 qui réprime la production d'IFN dans les pDC via son engagement avec le récepteur ILT7 spécifique aux pDCs. La protéine Vpu du VIH-1 antagonise BST2 par différents mécanismes incluant la régulation négative des niveaux de surface, la dégradation intracellulaire et le déplacement hors des sites d'assemblages viraux, un phénomène qui permet d'augmenter la signalisation BST2-ILT7. Ici, nous approfondissons nos connaissances sur le déplacement de BST2 médié par Vpu et son impact sur la production d'IFN. Par ailleurs, par un criblage de variants de Vpu provenant de souches pandémiques et non pandémiques du VIH-1, nous montrons que cette fonction est conservée dans plusieurs sous-types du groupe pandémique M, bien qu'elle ne soit pas conservée au niveau du sous-groupe prédominant C. Nos données suggèrent que l'incapacité de Vpu du sous-groupe C à moduler cette signalisation est liée à son mode d'antagonisme de BST2 prédominant de régulation négative des niveaux de surface, plutôt que de déplacement. Enfin, par un essai fonctionnel, nous démontrons que les variants du sous-groupe C et de groupes non pandémiques ont potentiellement acquis des mécanismes compensatoires pour limiter la production d'IFN par les pDCs. Cette étude souligne le rôle important de la signalisation BST2-ILT7 dans l'infection au VIH-1 et comment le virus exploite cet axe à l'aide de sa protéine Vpu. En effet, cet axe BST2-ILT7 pourrait représenter une cible intéressante afin de limiter l'établissement de l'infection au VIH.

Comparative analysis of the control of the BST2-ILT7 axis and of pDC IFN-I production by Vpu from pandemic and non-pandemic HIV-1

Alexandre Laliberté¹, Mariana G. Bego¹, Sabelo Lukhele², Mélanie Laporte¹, Daniel Sauter³,
Frank Kirchhoff³ and Éric A. Cohen^{1,4*}

¹Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7

²Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, QC H3A 1A3 Canada

³Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

⁴Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

Contact information:

Alexandre Laliberté: alexandre.laliberte@ircm.qc.ca

Mariana G. Bego: mariana.bego@ircm.qc.ca

Sabelo Lukhele: sabelo.lukhele@mail.mcgill.ca

Mélanie Laporte: melanie.laporte@ircm.qc.ca

Daniel Sauter: daniel.sauter@uni-ulm.de

Frank Kirchhoff: frank.kirchhoff@uni-ulm.de

*Correspondence: Éric A. Cohen

Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110, Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7.

Phone: (514) 987-5804 / Fax: (514) 987-5691

E-mail address: eric.cohen@ircm.qc.ca

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) secrete large amounts of type I IFN (IFN-I) and other cytokines that are important for *in vivo* control of HIV-1 infection. This IFN production is mediated in part by the host restriction factor BST2, which suppresses IFN production in pDCs through engagement of the pDC-specific receptor ILT7. The HIV-1 Vpu protein antagonises BST2 through various mechanisms, including cell-surface downregulation, intracellular degradation and BST2 displacement from viral assembly sites, a condition that enhances BST2-ILT7 signaling. Here, we provide further mechanistic insights on this Vpu-mediated BST2 displacement and the resulting abrogation of IFN production. Moreover, by screening a panel of Vpu variants from pandemic and non-pandemic HIV-1 strains, we show that this Vpu function is conserved in various clades of the pandemic group M, although not in the predominant HIV subtype C. Our data suggest that the inability of Vpu clade C to target this BST2-ILT7 signaling is linked to its predominant mode of antagonism through downregulation rather than displacement. Lastly, using a functional assay, we show that Clade C Vpus and Vpus from non-pandemic groups might have evolved other compensatory mechanisms to repress pDC sensing of infected cells. Altogether, this study highlights the important role played by the BST2-ILT7 axis in HIV infection and how the virus exploits this axis through its Vpu protein. Indeed, this BST2-ILT7 axis represents an attractive target in efforts aimed at curtailing early HIV infection.

Introduction

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are key immune effector cells involved in the control of various pathogens. Upon sensing of single-stranded RNA (ssRNA) and unmethylated CpG motifs in DNA by Toll-like receptors (TLR) 7 and 9 respectively, pDCs produce large amounts of type I interferon (IFN-I) and other cytokines (1). A direct contact between a pDC and an infected cell is required for sensing, consistent with the finding that infected cells are more efficiently sensed than cell-free virions (2, 3). Infected cells upregulate adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) to strengthen or increase the frequency of these contacts (4). pDC-induced IFN-I not only creates an antiviral environment by upregulating IFN-stimulated genes (ISGs), including restriction factors, but also bridges the innate and adaptive immune responses (1). We recently reported that *in vivo* expansion of pDCs with Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) decreases HIV viremia in humanized mice through an early IFN-I response, highlighting the importance of this subset of immune cells (5).

While IFN-I can readily protect the host against viral infections by driving early immune activation, sustained and aberrant IFN-I production by pDCs over the course of infection is deleterious, as it leads to chronic immune activation (6). Previous *in vivo* work has highlighted this paradoxical role by showing the protective role of pDCs in HIV-1 and SIV infection, but also their contribution to immunopathogenesis (7, 8). Hence, under normal conditions, IFN-I production is tightly regulated by pDC inhibitory surface receptors, such as blood-derived dendritic cell antigen 2 (BDCA2) and immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7) (9). Activation of ILT7 by its ligand, Bone marrow stromal antigen 2 (BST2, also known as tetherin or CD317), suppresses TLR7/9-induced IFN production by pDCs (9-11).

BST2 is an IFN-inducible membrane protein ubiquitously expressed on all cell types and widely described as a host restriction factor for enveloped viruses such as HIV (12, 13). BST2 has a unique topology with a short N-terminal cytoplasmic tail followed by a transmembrane domain, an ectodomain comprising a coiled-coil formed by BST2 dimers and a C-terminal glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (14, 15). Given its preferential localization in lipid rafts, which are platforms for HIV assembly (16-18), BST2 retains budding virions at the cell surface,

limiting cell-free virus transmission (12, 13) and promoting various immune processes, such as NF- κ B activation (19, 20) and antibody-dependent cell cytotoxicity (21-23). Through a leaky scanning mechanism, BST2 is also present as a short isoform lacking the cytoplasmic tail, equally able to form dimers and retain virions, but unable to mediate NF- κ B signaling (24).

The HIV-1 Vpu accessory protein antagonizes BST2 (12, 13) through several mechanisms that all involve a direct binding to BST2 through their respective transmembrane (TM) domains. First, Vpu was shown to sequester BST2 in the trans-Golgi network and endosomal compartments, thus preventing its normal trafficking to the plasma membrane (25, 26). In addition, Vpu targets BST2 for proteasomal or lysosomal degradation by recruiting the SCF β -TrCP E3-ubiquitin ligase via a di-serine motif present in the protein cytoplasmic tail (27, 28). These processes likely contribute to BST2 downregulation from the surface of infected cells. Vpu was also found to displace BST2 away from viral assembly sites, promoting release of virions without downregulation of surface BST2 (29-31).

We previously reported evidence indicating that Vpu exploits the BST2-ILT7 axis to suppress IFN-I production by pDCs (32). Upon infection, IFN-I upregulates BST2 which in turn suppresses pDC-induced IFN-I production in a negative feedback manner. In the absence of Vpu, we showed that entrapping of virions by BST2 interfered with its ability to bind and activate ILT7, resulting in sustained IFN-I production upon sensing of infected cells. In contrast, antagonism of BST2 by Vpu was found to enhance BST2-mediated ILT7 activation, presumably through displacement of BST2 from HIV budding sites, as this process favored the presence of “free” BST2 molecules capable of engaging ILT7.

HIV-1 is marked by great genetic variation and divided into four groups (M, N, O and P), each arising from a single event of cross-species transmission (33). While group M has efficiently spread in the human population with over 70 million cases worldwide since the initial cross-species transmission, the endemic group O and the rare groups N and P have shown limited dissemination with about 100,000 cases, fewer than 20 cases and only 2 cases identified, respectively (34-36). HIV-1 group M's unique ability to rapidly spread has been linked to its efficient ability to antagonise BST2 and increase viral particle release (37, 38). However, with

reports showing that HIV-1 groups O and N can to some extent counteract BST2-mediated restriction of viral particle release through their Nef or Vpu protein, respectively (39-41), enhanced HIV release *per se* cannot be the only contributing factor to the pandemic properties of group M. In line with this, we have previously shown that despite downregulating BST2 and enhancing viral particle release, Nef proteins from group O could not modulate BST2-mediated activation of ILT7 nor control IFN-I production because Nef does not displace BST2 away from viral assembly sites (42).

In this study, we investigated whether Vpu-mediated modulation of the BST2-ILT7 signaling is conserved across Vpu variants from pandemic and non-pandemic HIV-1. In addition to emphasizing the relevance of BST2 displacement for IFN-I production, we used an ILT7 activation reporter assay to test the conservation of this function by Vpu from pandemic and non-pandemic HIV-1 strains. We show that this function is mostly conserved in Vpu variants from the pandemic group M although the predominant clade C lacked this activity presumably because of its inefficient displacement of BST2 away from viral assembly sites. Importantly, we extended our analysis to assess the impact of differential ILT7 activation by various Vpus on the sensing of infected cells by pDCs. Overall, this study underlines that the BST2-ILT7 signaling represents a pathway by which HIV-1 Vpu can evade sensing by pDCs, but the results with Vpus lacking the activity towards ILT7 activation suggest that there might be other mechanisms mediated by Vpu to evade sensing.

Results

A displacement-defective Vpu mutant is impaired in its ability to modulate BST2-mediated repression of IFN production by pDCs.

Previously, we showed that Nef proteins from group O failed to control IFN production by pDCs and that this was correlated with their inability to displace BST2 away from viral assembly sites (42). To further support this notion, we introduced a W to L substitution mutation at residue 76 in the NL4.3 Vpu, previously reported to be critical for Vpu-mediated BST2 displacement but not downregulation (30). To assess the effect of the W76L mutation on BST2 antagonism, HeLa cells

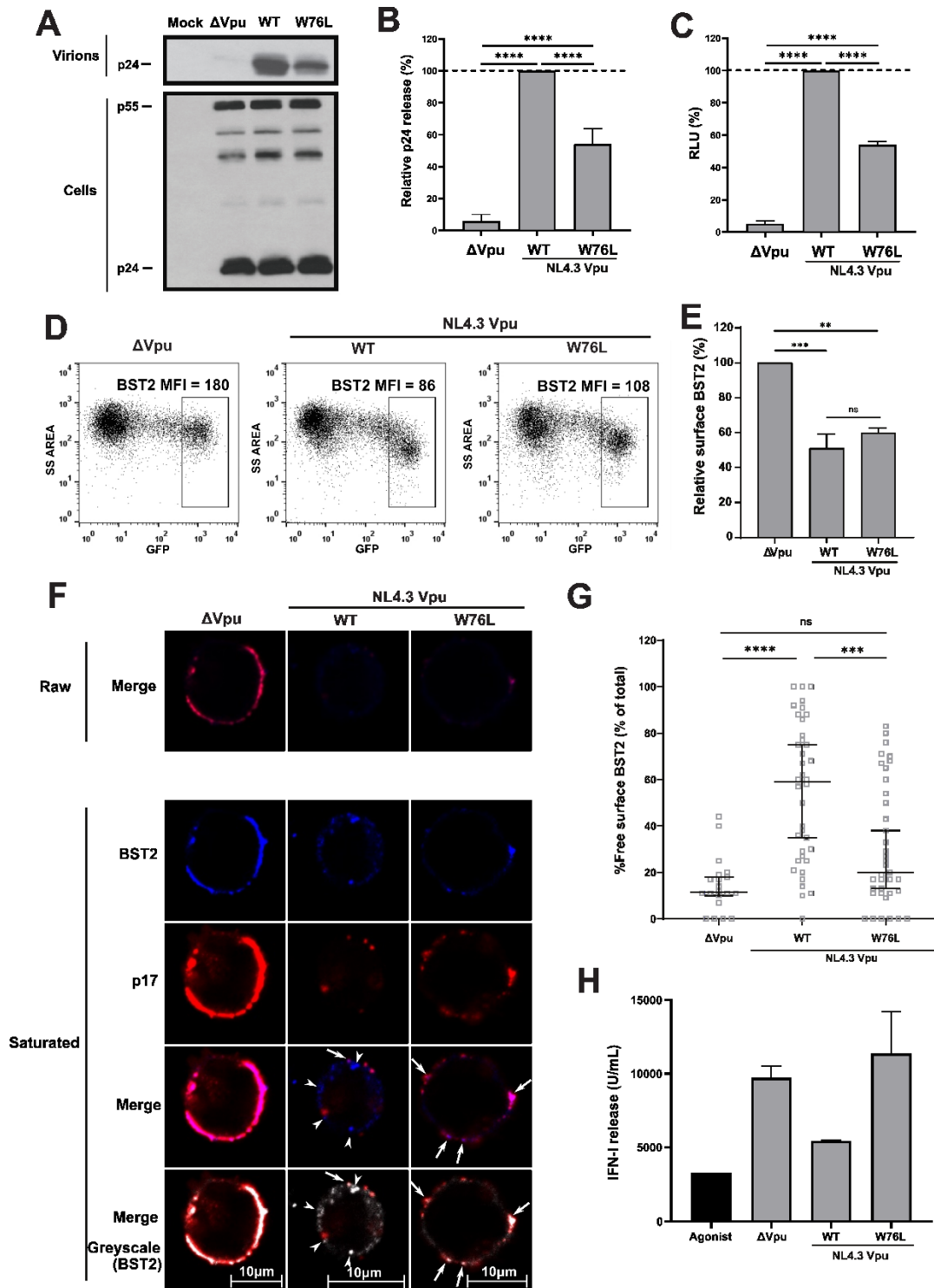


Figure 1. Characterization of a displacement-defective NL4.3 virus and its effect on IFN production **A** Western blot analysis of cell- and virion-associated Gag from lysates of HeLa cells transfected with the indicated provirus. **B**. Quantification of A as described in Materials and Methods (N=3). **C**. Infectious virus yield produced by HeLa cells transfected with the indicated proviral constructs (N=3). **D**. Flow cytometry analysis of MT4 cells infected for 2 days with the indicated NL4.3 viruses and stained for surface expression of BST2. **E**. BST2 surface levels relative to Δ Vpu, which is set at

100% (N=3). **F.** Confocal microscopy analysis of MT4 cells infected with the indicated NL4.3 viruses and stained for surface BST2 (blue) and intracellular Gag p17 (red). Arrow heads indicate free BST2 while arrows depict BST2 at viral assembly sites (p17) **G.** Quantification of free surface BST2, as described in Materials and Methods. Each data point represents the relative free BST2 value for one cell and bars indicate median \pm 95% confidence interval **H.** Absolute amounts of IFN-I released from PBMCs isolated from one donor in co-culture with MT4 cells infected with the indicated virus or treated with the TLR 7 agonist, Gardiquimod. Unless otherwise indicated, histograms show mean \pm SD.

were transfected with NL4.3 provirus (pNL4.3) GFP constructs encoding Vpu WT, Vpu W76L or lacking Vpu (Δ Vpu). Analysis of cell- and virion-associated Gag by Western Blot (Figure 1 A-B) or infectious viral yield measurement in HeLa Tzmb1 reporter cells (Figure 1 C) revealed that the W76L mutation impaired viral release by 50%. Consistent with previous observations (30), BST2 downregulation on infected MT4 cells was only slightly, but consistently, affected by the mutation (Figure 1 D-E). The colocalization of BST2 with HIV assembling particles was then assessed by confocal microscopy using Gag p17 as a marker of viral budding particles. In agreement with previous observations with the W76G mutation (30), our findings demonstrate that Vpu W76L had a greatly reduced ability to displace BST2 from viral assembly sites (Figure 1 F-G). Indeed, cells infected with WT viruses displayed more clusters of "free" BST2 not colocalizing with assembling particles than their counterparts infected with the virus encoding W76L Vpu. Using this mutant, we next assessed the impact of Vpu-mediated displacement of BST2 on IFN-I production by pDCs. To this end, infected MT4 cells were co-cultured for 24h with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) freshly isolated from a healthy donor, as previously described (32). Donor cells were stained for CD14, CD3 and ILT7 to ensure the presence of ILT7⁺ pDCs (Figure S1A). After 24 hours of co-culture, IFN-I levels were measured using HEK-Blue reporter cells. As shown in Figure 1H, IFN-I production by pDCs was attenuated in a Vpu-dependent manner. Interestingly, in the case of the W76L Vpu, IFN-I levels were comparable to those detected with Δ Vpu, indicating that the repressive function of Vpu is impaired by this mutation. Altogether, these results support the notion that Vpu-mediated exclusion of BST2 from viral assembly sites dampens IFN-I production following sensing of infected cells by pDCs.

Effect of group M Vpu variants on BST2-mediated ILT7 activation

To test whether this modulation of BST2-mediated ILT7 activation is preserved across Vpu variants from HIV-1 primary isolates, we used a transfection-based reporter assay to screen a

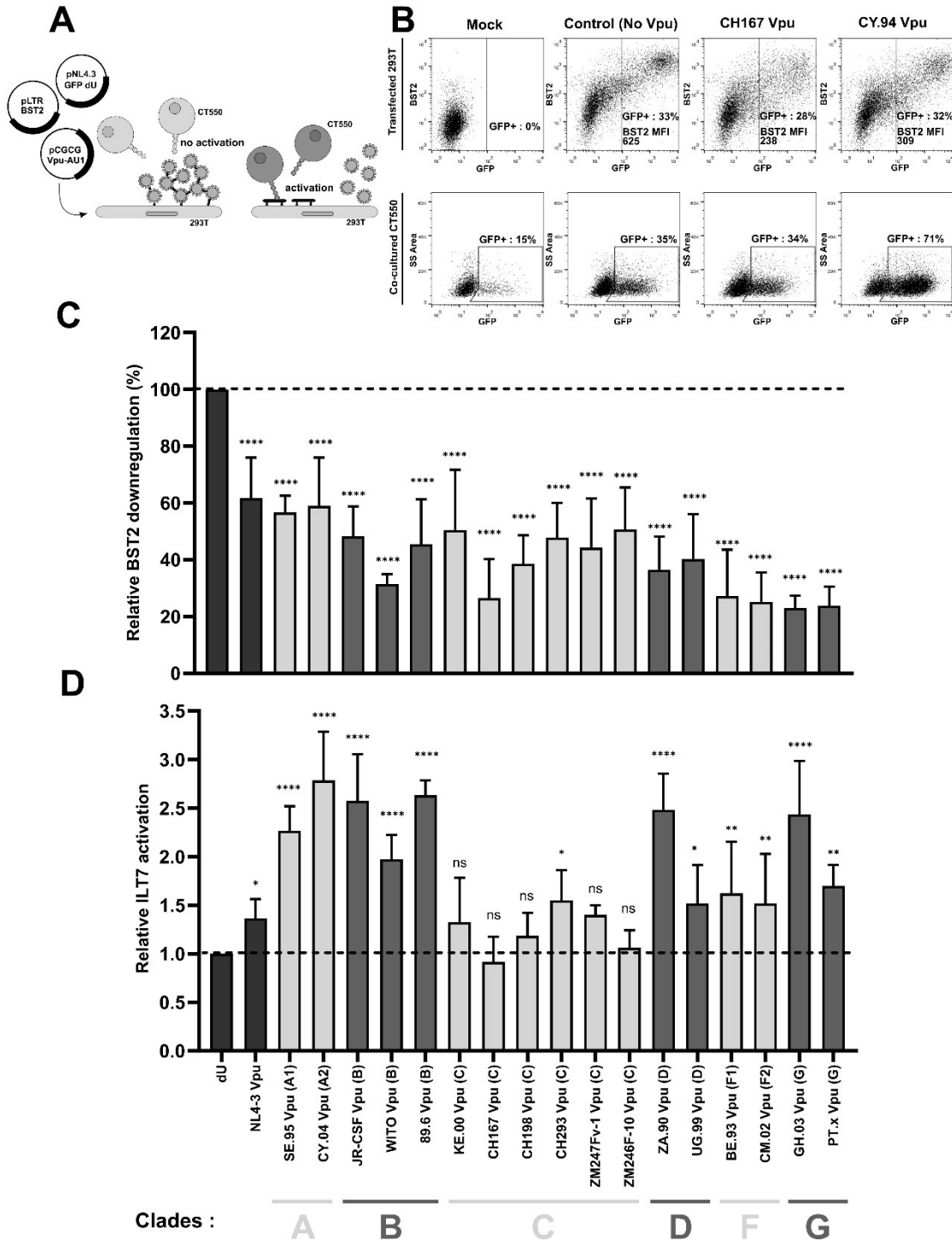


Figure 2. Screening of Vpu variants from group M for BST2-mediated ILT7 activation **A.** Schematic description of the reporter assay used to assess ILT7 activation. Vpu displaces BST2 from viral assembly sites. Free BST2 molecules at the surface of the cells promote ILT7 activation in the reporter CT550 cells. Thus, the presence of Vpu increases ILT7 activation in the reporter CT550 cells. **B.** Representative example of the ILT7 reporter assay in the absence or presence of Vpu showing differential effect on ILT7 activation; CT550 cells co-cultured with untransfected HEK-293T served as a control. Shown are two examples of Vpu either promoting ILT7 activation (CY.94) or not promoting ILT7 activation (CH167) **C.** Relative BST2 cell-surface levels in transfectants expressing Vpu variants

from different clades of group M ($N \geq 3$). Values were calculated relative to the condition in the absence of Vpu, which was set at 100%. **D.** Relative levels of ILT7 activation. The percentage of GFP-positive CT550 cells after co-culture with transfectants described in B was normalized to the background activation from the control co-culture (transfectants with no Vpu), which was set at 1.0 ($N \geq 3$). Histograms show mean \pm SD.

panel of Vpus from different HIV-1 M clades. HEK-293T cells were co-transfected with pNL4.3 GFP Δ Vpu, a HIV-1 LTR-regulated BST2 expressor and an AU1-tagged Vpu expressor or a control vector. ILT7 activation was assessed by co-culturing transfected cells with a previously described reporter cell line (CT550) (9, 11) co-expressing human ILT7, a mouse Fc ϵ R1 γ chain and a NFAT-regulated GFP reporter gene such that GFP expression is stimulated upon ILT7 activation (Figure 2A). BST2 expression in HEK-293T cells is measured by flow cytometry. The proportion of GFP-positive CT550 cells indicates the level of ILT7 activation (Figure 2B). As shown in Figure 2C, all group M Vpu variants tested downregulated BST2, albeit to various degrees. While most Vpu variants, notably those from clades A and B, were more potent at promoting BST2-mediated ILT7 activation than the NL4.3 Vpu lab-adapted strain, those from the predominant clade C were significantly less efficient at enhancing ILT7 activation by BST2 (Figure 2D). Interestingly, BST2 downregulation and ILT7 activation showed no correlation (Figure S2A), supporting previous evidence that these two processes are independent of each other, most likely occurring through distinct functional motifs (30, 31). Altogether, these results suggest that efficient modulation of BST2-mediated activation of ILT7 is a conserved feature of primary Vpu variants of group M, with the notable exception of Vpus from clade C, which might have evolved differently given their minimal detectable activity.

Effect of Vpu variants from non-pandemic HIV-1 on BST2-mediated ILT7 activation

Recent evidence indicates that Vpu variants from group N and that at least one group O Vpu variant (RBF206) have evolved to antagonize BST2 (39, 41). We therefore asked if Vpu variants from non-pandemic groups (N, O and P) were able to promote BST2-mediated ILT7 activation. Vpu variants from groups O and P that do not antagonize BST2 (HJ100 and 06CMU14788) have no effect on ILT7 activation, consistent with the idea that BST2 antagonism drives ILT7 activation (Figure 3). Noticeably, Vpu variants from groups that do antagonize BST2 through efficient

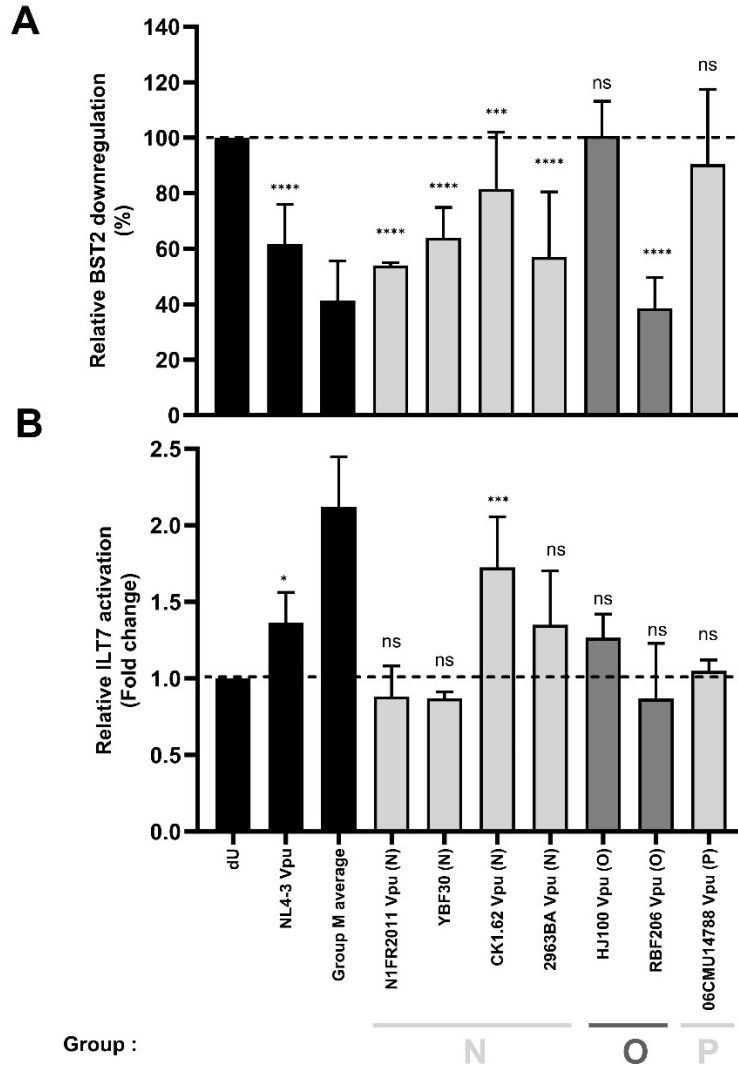


Figure 3. Effect of non-pandemic Vpu variants on BST2-mediated ILT7 activation **A.** Relative surface BST2 levels as described in Figure 2 legend for Vpu variants from groups M, N, O and P. **B.** Relative ILT7 activation was determined as described for Figure 2. The group M average was determined using the average of each clade in figure 2, excluding the clade C that did not enhance ILT7 activation. Histograms show mean \pm SD.

downregulation (N1.FR.2011, YBF30, 2963BA and RBF206), were also found to be unable to mediate the ILT7 activation. Interestingly, the group N Vpu CK1.62, which only had a modest effect on surface BST2 expression levels, mediated ILT7 activation although to a lesser extent than its group M counterparts, which strongly enhanced ILT7 activation, despite a significant reduction in the surface levels of BST2. Altogether, these results suggest that while specific variants from the rare group N have gained some ILT7-activating activity, Vpu variants from non-pandemic HIV-1 have mostly not evolved to efficiently drive BST2-mediated ILT7 activation.

Displacement of BST2 by primary Vpu variants

To characterize the effect of various primary Vpu variants on the displacement of BST2 away from viral assembly sites, we selected *vpu* alleles that differentially promoted BST2-mediated ILT7 activation, namely CH167 (Clade C), CH293 (Clade C), ZA.90 (Clade D) and N1FR2011 (Group N), despite their ability to downregulate cell-surface BST2 (Figure 2-3). Selected alleles were cloned in place of the *vpu* gene in a NL4.3 *vpu* IRES *env* construct where the overlap between the *vpu* and *env* genes was deleted to prevent alterations to the envelope caused by substitution of *vpu* (38). MT4 cells were infected with the different viruses and analyzed for surface BST2 and colocalization of BST2 and p17, as described in Figure 1. As shown in Figure 4A-B, all Vpu-expressing viruses downregulated BST2 to a similar extent. Consistent with the results obtained in the transfection-based reporter assay, cells infected with viruses expressing NL4.3 Vpu and ZA.90 Vpu which were competent for efficient BST2-mediated ILT7 activation, displayed levels of free BST2 clusters that were significantly higher than those detected with the Δ Vpu virus (Figure 4C-D). Indeed, ZA90 Vpu was the most efficient at inducing ILT7 activation and at displacing BST2. In contrast, Vpu variants from clade C (CH167) and group N (N1.FR.2011) showed no significant effect on BST2 displacement (Figure 4C-D) and as such were unable to efficiently mediate ILT7 activation (Figure 2-3). Similarly, the clade C Vpu CH293 did not show significant effect of BST2 displacement (Figure 4C-D). This Vpu had some activity towards ILT7 activation, but the extent of ILT7 was much lower than its counterparts from other clades. While BST2 displacement was previously reported with a clade C di-serine motif-Vpu mutant (31), we were unable to detect a significant effect in the context of a fully functional clade C Vpu proteins. Presumably, in our assay, the strong downregulation of BST2, which is impaired in the context of a di-serine mutant, prevents the detection of a displacement effect. This suggests that the primary mode of BST2 antagonism by these clade C Vpus is through downregulation of cell surface BST2. Altogether, these results further link the notion of ILT7 activation (Figures 2-3) to displacement of BST2 away from viral assembly sites by Vpu variants from primary HIV-1 isolates.

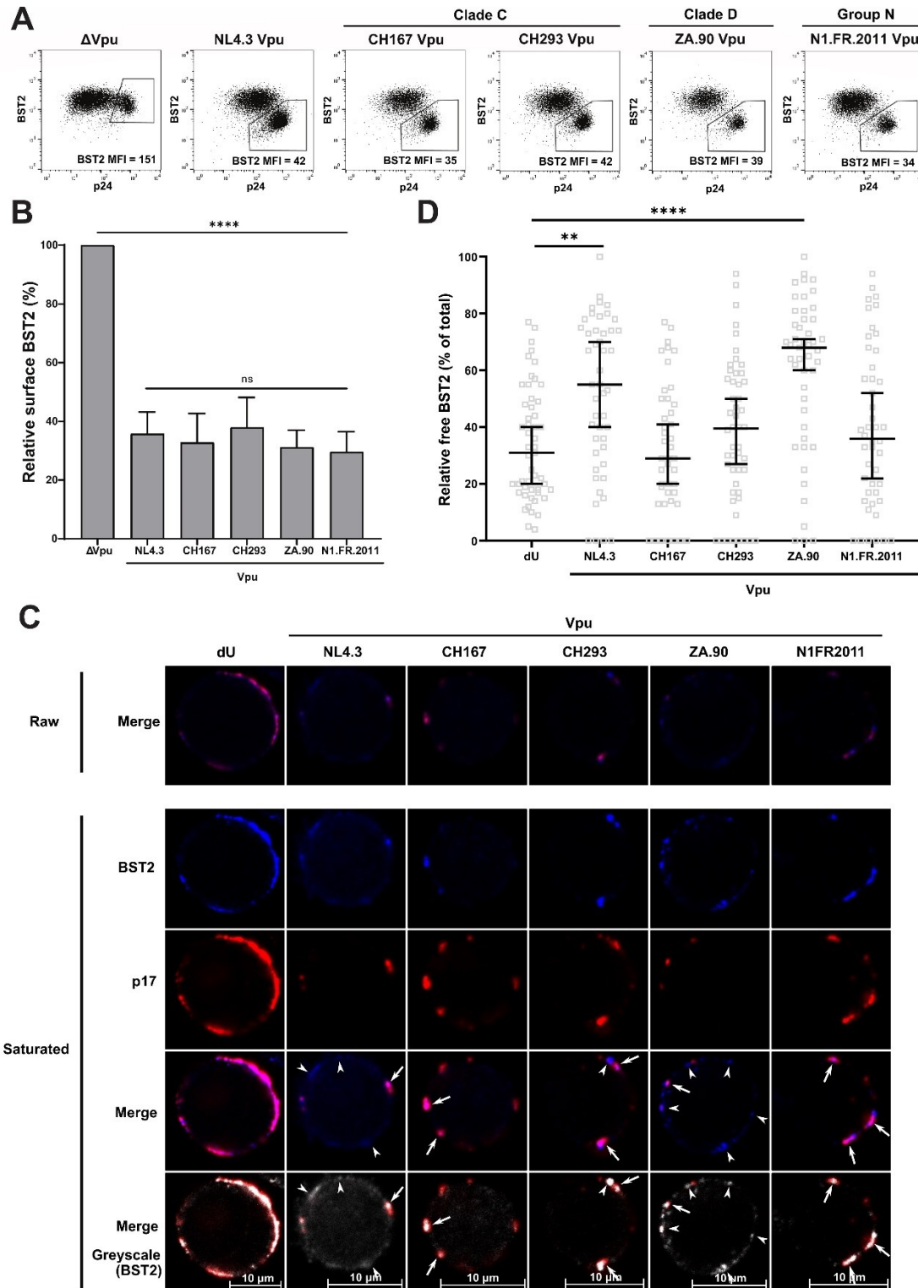


Figure 4. Impact of primary Vpu variants on the localisation of BST2 at the cell-surface of infected cells **A.** MT4 cells were infected with the NL4.3 *vpu* IRES *env* virus expressing the indicated *vpu* allele and analyzed for surface BST2 expression levels and intracellular p24 by flow cytometry. **B.** Relative expression of BST2 on infected MT4 cells, normalized to the no *vpu* control, which was

set at 100% (N=3). **C.** Confocal microscopy analysis of MT4 cells infected with the indicated NL4.3-based viruses and stained for surface BST2 (blue) and intracellular p17 (red), as a marker of virus assembly. Arrow heads indicate free BST2 while arrows depict BST2 at viral assembly sites. **D.** Quantification of free surface BST2, as described in the Materials and Methods. Each data point represents the relative free BST2 value for one cell and bars indicate median \pm 95% Confidence Interval.

Effect of primary Vpu variants on the sensing of infected cells by pDCs.

To validate the results obtained in the transfection-based reporter assay in a more physiological system, we analyzed the effect of the Vpu primary variants described above on IFN-I production by pDCs upon sensing of infected cells. To this end, infected MT4 cells were co-cultured with PBMCs, as described for Figure 1. Cells infected with virus expressing the ZA.90 Vpu variant that greatly activated ILT7 and showed a high degree of BST2 displacement, strongly repressed IFN-I production as compared to their counterparts expressing NL4.3, CH167 or N1.FR.2011 Vpu variants (Figure 5). Surprisingly, cells infected with the virus expressing CH293 Vpu or N1.FR.2011 Vpu, either of which had marginal detectable effect on ILT7 activation (Figures 2-3) or displacement of BST2 (Figure 4), repressed IFN production by pDCs at levels comparable to the ZA.90 Vpu variant or the NL4-3 Vpu variant, respectively. These findings suggest that Vpu variants that inefficiently displace BST2 at the cell surface might have evolved compensatory mechanisms that abrogate sensing of infected cells by pDCs. Nevertheless, the findings obtained with ZA.90 and NL4-3 Vpu suggest that BST2 displacement at the cell surface and activation of ILT7 by free BST2 represent one mechanism through which Vpu mediates a repression of IFN production upon sensing of infected cells by pDCs.

Discussion

The effect of Vpu on various host plasma membrane proteins not only promotes virus production and infectivity, but also has an impact on interactions between the infected cell and other immune cell subsets, including pDCs (43). Vpu antagonizes BST2 through different mechanisms, including displacement of BST2 away from viral assembly sites. This function is crucial not only to enhance viral particle release (29-31), but also to repress IFN production by pDCs through the BST2-ILT7 axis (32). Using a Vpu W76L mutant that is unable to displace BST2 away from viral assembly sites, we provide here further evidence that Vpu-mediated displacement of BST2

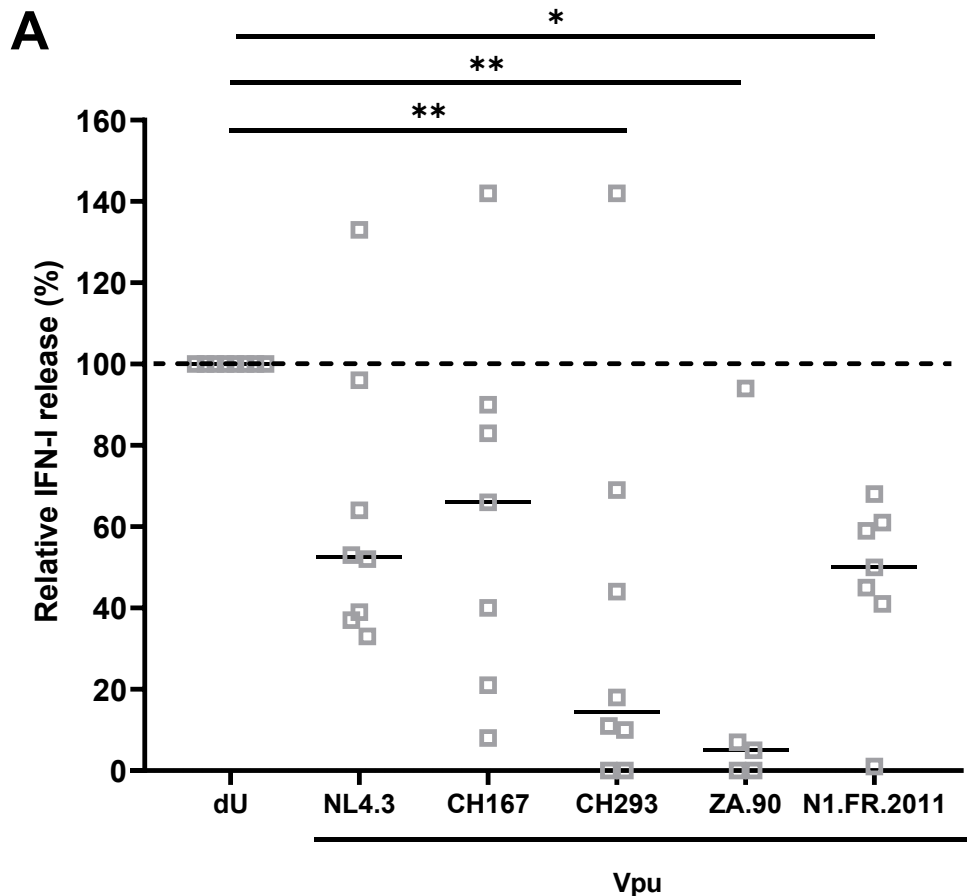


Figure 5. Effect of primary Vpu variants on the sensing of infected cells by pDCs A. Relative IFN-I collected in the supernatant of co-cultured PBMCs with MT4 cells infected with the indicated NL4.3 vpu IRES env virus. Each data point represents one donor and is normalized to the IFN-I levels obtained with the no Vpu control, which was arbitrarily set at 100%. Horizontal line indicates median; dotted line indicates the level of IFN-I induced by cells infected with the Vpu-defected virus.

regulates sensing of infected cells by pDCs (Figure 1). Our results also demonstrate the importance of the tryptophan residue at position 76 towards Vpu-mediated BST2 antagonism in line with previous reports (30). Thus, BST2 displacement has a dual role: counteracting virion tethering by residual surface BST2 and controlling IFN-production through the BST2-ILT7 axis. It is still unclear, however, why retained virions prevent BST2-mediated ILT7 activation. We have previously proposed that BST2-mediated ILT7 activation requires not only binding to ILT7, but also a structural flexibility of BST2 to enable post-binding events (11). Conceivably, the physical stress and bending of the coiled coil when viral particles are retained (44) might induce a conformational change in the BST2 structure that prevents engagement and activation of ILT7.

Since the control of IFN-I production by pDCs through the BST2-ILT7 axis was only previously described for lab-adapted strains and clade B Vpus, we extended our analysis to Vpu variants from different group M clades, including the predominant clade C (Figure 2) and those from non-pandemic strains (Figure 3). In line with observations that the lab-adapted NL4.3 Vpu is less efficient than Vpu variants from primary isolates towards BST2 antagonism (45), NL4.3 Vpu was much less efficient towards ILT7 than its counterparts from primary HIV-1 isolates. Vpu variants from clade C, which represent over half of the infections worldwide, were also much less efficient for ILT7 activation. This surprising result suggests that viruses from this clade might have gained other compensatory mechanisms that relieved the evolutionary pressure on Vpu to conserve this ILT7-activating function. This claim is supported by the fact that despite the low ILT7 activation by the CH293 Vpu when compared to the ZA.90 Vpu (Figure 2D), both repressed IFN to a similar extent (Figure 5). The group N Vpu N1.FR.2011 might represent a similar case since there was also a certain repression of IFN-I comparable to NL4-3 Vpu, despite no detectable activity towards ILT7 activation. In the transfection-based reporter assay, ILT7 activation depends only on the levels of BST2, and most importantly, the amount of “free” BST2 which can trigger this activation. In the sensing assay, many factors in addition to the BST2-ILT7 signaling, can influence the production of IFN-I by pDCs since the latter depends on signalling pathways involved in the sensing of infected cells. While these results could indicate that low-level BST2 displacement by CH293 or N1.FR.2011 might be sufficient to repress IFN-I production through the BST2-ILT7 axis in a more physiological context, careful comparison of the phenotypes between NL4-3 Vpu and CH293 Vpu or N1.FR.2011 Vpu makes this possibility unlikely since NL4.3 Vpu was clearly more efficient at displacing of BST2 from the virus assembly sites (Figure 4).

Alternative or additive mechanisms mediated by Vpu could also have an impact on the IFN-I production by pDCs. The sensing of infected cells depends on contacts between pDCs and infected cells through the expression of adhesion molecules. In one study, silencing of ICAM-1 in infected cells reduced IFN-I production by co-cultured pDCs (4). Conceivably, the downregulation of ICAM-1 by Vpu (46) may reduce the frequency or affinity of these contacts, thus reducing the IFN-I response. Moreover, the lower particle density at the surface of infected cells due to less retention might reduce Env fusion in pDCs, which is also required for sensing.

The striking results obtained with clade D Vpu (ZA.90) support the notion that displacement of BST2 away from viral assembly sites and ILT7 activation represents a mechanism through which Vpu attenuates IFN-I production by pDCs, but does not exclude the possibility that this Vpu might also have additive mechanisms to abrogate IFN-I production. Moreover, the results in the ILT7 reporter assay (Figures 2-3) indicate that group M-Vpus are more efficient than non-pandemic Vpu towards enhancement of BST2-mediated ILT7 activation. However, the observation that at least one group N Vpu, CK1.62, shows some potency towards activating ILT7 supports the idea that N-Vpus are under evolutionary pressure (41) and pDCs might contribute to this pressure.

Previous studies have shown different structural requirements for the displacement phenotype, including the ExxxLV motif (29), W76 (30), or the LL in Vpu's C-terminal domain (CTD) (31). While we did not observe significant displacement of BST2 in two of the clade C Vpus tested, despite them harboring the LL motif, there might be a low-level displacement that is not detected due to the strong downregulation in our assay (Figure 4). Interestingly, in our reporter system for ILT7 activation, clade A Vpus strongly mediated ILT7 activation despite having neither the LL motif nor the W76 in the CTD (Supplementary Figure 2B). Since activation of ILT7 is linked to displacement of BST2, this would point to another motif involved in the displacement mechanism.

In summary, in this study, we extended our understanding of Vpu-mediated control of sensing of infected cells by pDC through the BST2-ILT7 axis. We provided evidence that displacement of BST2 away from viral budding sites drives ILT7 activation and, in so doing, controls sensing of infected cells by pDCs, as measured by IFN-I production. Our analysis of Vpu variants from primary isolates indicate that while group M is most efficient at this process, there is inter-clade variability not only in the extent of activation, but also in the sequence determinants involved in this mechanism, underlying the importance of this process. Importantly, we show that clade C Vpus and a group N Vpu may not promote efficient BST2-mediated ILT7 activation yet are still able to control IFN-I production by pDCs. Indeed, our data point to multiple ways through which Vpu can regulate IFN-I production by pDCs, beyond just the BST2-ILT7 activation axis.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal anti-BST2 and mouse anti-p17 antibodies used for flow cytometry and immunofluorescence microscopy were previously described (25, 47, 48). Secondary antibodies, goat anti-rabbit Alexa-Fluor 647 and donkey anti-mouse Alexa-Fluor 594 were purchased from Life Technologies. Anti-ILT7 Alexa-Fluor 647, anti-p24 PE, anti-CD14 PE-TxRed, anti-CD3 Pacific Blue were purchased from BioLegend. Human recombinant interferon alpha 2a was purchased from PBL.

Plasmids

The pNL4.3 GFP IRES Nef proviral constructs that are either Vpu-defective (Δ Vpu) or proficient for Vpu expression (WT) were described previously (32, 49). The W76L mutation was introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. AU1-tagged Vpu expressing plasmids pCGCG-Vpu(AU1)-IRES-eGFP were previously described (38). The pBR-NL4.3 Vpu IRES Env, where the overlap between the *vpu* and *env* genes was removed and *env* expression re-established with an internal ribosomal entry site was previously described (38). In this construct, the *vpu* gene was substituted with that of various primary *vpu* alleles using overlapping PCR using the primers listed in Table S1 and cloned with unique SacII and NheI restriction sites. The pLTR-BST2 plasmid was generated first by subcloning the HIV-1 LTR in place of the EF-1 α /HTLV promoter in p-Select-Zeo-SEAP (Invivogen) using PvuI and NcoI. Then, a DNA fragment encoding *BST2*, including its weak kozak sequence flanking the first ATG, was inserted in place of SEAP using NcoI and NheI restriction sites blunted with Mung bean nuclease. All mutations and plasmid constructs were confirmed by automated sequencing.

Cell lines and tissue culture

MT4 and HeLa-TZmb1 cells were obtained from the NIH AIDS Reagent Program, HeLa and HEK293T cells were obtained from the ATCC and HEK-blue human IFN reporter cell lines were purchased from InvivoGen. CT550 cells were a generous gift from Dr. Yong-Jun Liu. MT4 and CT550 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)

(RPMI-10). HeLa, HeLa-TZMbl and HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent) supplemented with 10% FBS (DMEM-10).

Virus production

All NL4.3-based virus preparations were produced by calcium phosphate transfection of HEK 293T as previously described (50). Culture supernatant was collected at 60 h post-transfection and clarified by centrifugation and filtration through a 45 µm filter. Virus was concentrated by ultracentrifugation over a 20% sucrose cushion and titrated in MT4 cells.

PBMC isolation and staining of ILT7+ pDCs

Peripheral blood samples were obtained from healthy adult donors who gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocols approved by the research ethics review board of the IRCM. PBMCs were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare) density centrifugation and cultured in RPMI-10 medium as previously described (42). PBMCs were incubated in a Fc-block solution consisting of 2% FBS (Wisent), 2% rabbit serum (Sigma), 2% goat serum (Sigma) and 500 µg/mL human IgG (Sigma) for 10 min at room temperature, washed and incubated with anti-ILT7 Alexa-fluor 647, anti-CD3 Pacific Blue and CD14 PE-txRed for 15 min at room temperature. The stained PBMCs were washed in PBS and analysed by flow cytometry.

Screening of primary Vpu variants

HEK293T cells were plated in 24-well plates at a density of 90,000 cells per well. The next day, cells were transfected with 25 ng of pLTR-BST2, 500 ng of pNL4.3-GFP-dU and 100 ng of pCGCG-Vpu-IRES-eGFP plasmid expressing AU1-tagged *vpu* alleles or a control vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Two days post-transfection, part of the cells was stained for surface BST2 expression and analyzed by flow cytometry. CT550 reporter cells were added to the remaining cells at a density of 90,000 cells per well and centrifuged for 3min at 120g. The following day, CT550 cells were collected, stained for ILT7 and analyzed for GFP expression by flow cytometry.

Flow cytometry

All flow cytometry analyses were performed on a CyAn ADP flow cytometer and analyzed with the FlowJo software version 10.

Viral particle release assay

Viral particle release assays performed by Western blotting were done as previously described (25). The intensity of Gag signal was measured by scanning densitometry analyses using the ImageJ software. The ratio of virion-associated Gag (p24) signal relative to total Gag-related products (virion-associated p24 plus cell-associated Gag (p24 and p55)) was indicative of the viral particle release efficiency. Infectious viral yields were assessed by infecting HeLa-Tzmb1 cells with supernatants of the transfected HeLa cells. HeLa-Tzmb1 cells were investigated for luciferase production 48 h later using a luciferase assay system kit (Promega).

Staining for microscopy

Infected cells were stained with anti-BST2 antibody (rabbit; 1:500) in PBS for 45 min at 4°C and washed with PBS. Cells were plated at a density of 300,000 cells per mL in μ -Slide 8 Well (IBIDI) pre-coated with 0.01% poly-L-lysine and left to settle at room temperature for 30 min. Samples were fixed in 4% PFA for 30 min and permeabilized in Triton 0,2% for 5 min at room temperature. Samples were stained with anti-p17 antibody (mouse; 1:10) in 5% milk PBS for 2h at 37°C and washed in PBS. Samples were incubated with anti-mouse Alexa fluor 594 and anti-rabbit Alexa fluor 647 (1:500) in PBS for 30 min at room temperature and mounted with Mowiol mounting media containing DABCO.

Confocal microscopy and analysis

All analyses were conducted using a 63 \times Plan Aplanachromat oil immersion objective with an aperture of 1.4 on an LSM710 Observer Z1 laser scanning confocal microscope coupled with a Kr-Ar laser (Zeiss). The percentage of “Free BST2” was calculated as the ratio of non-colocalizing BST2 clusters on the total number of BST2 clusters (including the clusters colocalizing with p17 clusters), as assessed by the Imaris software.

PBMC-based co-culture IFN assay

Co-cultures of infected MT4 cells and freshly isolated PBMCs were done as previously described (32). Briefly, MT4 cells were infected with NL4.3-based viruses to obtain 10-20% infection efficiency and co-cultured at day 2 post-infection with freshly isolated human PBMCs at a ratio of 1 MT4 cell to 3 PBMCs. Sixteen to twenty-four hours later, the co-cultures were centrifuged at 400g for 3 minutes and IFN-I in the supernatants was quantified with HEK-Blue reporter cells (Invivogen), as described previously (51). Absolute amounts of IFN-I were derived from the linear range of a standard curve generated using known concentrations of human recombinant interferon 2a.

Protein sequence alignment

Sequence alignment was performed using the amino-acid sequence of the various primary Vpu variants and the Clustal Omega bioinformatics tool at www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo (52).

Statistical analysis

Statistical analyses were done by mixed-effect analysis with Dunnett's correction for multiple comparison analysis (ns for $p \geq 0.05$, * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$ and **** for $p < 0.0001$).

Supplementary data

A

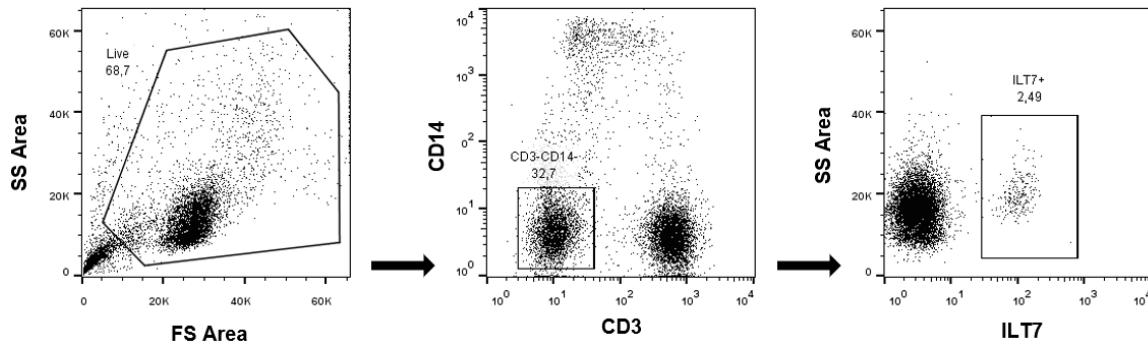
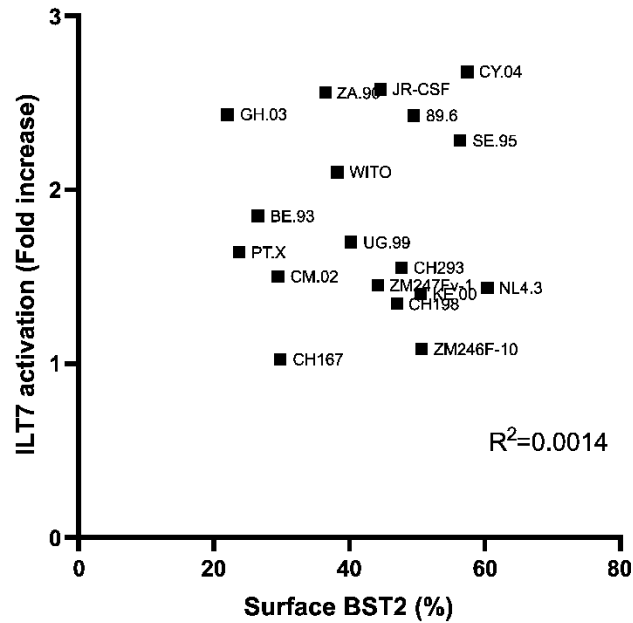


Figure S1. Identification of ILT7⁺ pDCs from freshly isolated PBMCs used for sensing of infected MT4 cells A. Flow cytometry analysis of PBMCs stained for pDCs which are identified as an ILT7⁺ population in a CD3⁻CD14⁻ population, pregated on live cells. The numbers indicate the frequency of the indicated gate on the active population in percentage. Related to Figure 1.

A



B

| | Transmembrane domain | Helix H1 | P | P | Helix H2 |
|---------------------|--|----------|--------|--------|-----------------|
| HIV-1_M_A_SE.95 | ----MTPLEIWAIVGLVVSIIAIVVVTIVGIEYKLLKQKIDRLIRISERAE | DSGNES | DGDTDE | LAKLV | EMGNLYDLDGNNNL |
| HIV-1_M_A_CY.94 | ----MLPLVILAIVGLVVALIILAIIVVVTIVFIEYKIKKQKIDWLKIRISERAE | DSGNES | DGDTDE | ELSA | VERGHLDGFDVNVV |
| HIV-1_M_B_JR-CSF | ----MQPLQILAIIVALVVAIGIITAIIVVTSIVLIEYRKILRQKIDRLIDKIRERAE | DSGNES | EGDQE | ELSA | VERGHLPWDINDL |
| HIV-1_M_B_89.6 | ----MLSLQILAIIVALVVAIIITAIIVVTSIVFIEYRKILRQKIDRLIDRIREREE | DSGNES | EGDQE | EELAA | -LARGHLAPWDDDL |
| HIV-1_M_B_WITO | ----MQPLEILAVVALVVALIILAIIVVVTIVVIEYRKIQKQKIDRLIDRIRERAE | DSGNES | DGDTDE | ELSA | VERGHHPWVDNDE |
| HIV-1_M_C_KE.00 | MLDLLARVDYRLGVGALVVALIITAIIVVTVIYIEYRKLRLRQKIDWLIERIRERAE | DSGNES | EGDTE | EELATM | VDMGHLRLLDVNDL |
| HIV-1_M_C_ZM247Fv-1 | ----MLELDYKIAIAALIVLIIITAIIVVTVIYIEYRKLVRQKIDWLKIRERERAE | DSGNES | DGDTDE | EELSTM | VDMGHIRLLGAILD |
| HIV-1_M_C_ZM246F-10 | MVLLAKVDYRLGVGALVVALIITAIIVVTVIYIEYRKLRLRQKIDWLKIRERERAE | DSGNES | DGDTDE | EELSTM | VDMGHIRLFDL-- |
| HIV-1_M_C_CH198 | MLAFLARVDYRLGVGALVVAIGIITAIIVVTVIYIEYRKLRLRQKIDWLKIRERERAE | DSGNES | EGDTE | EELSTM | VDMGHLRLLDNNL |
| HIV-1_M_C_CH167 | MFDFIARVDYRVGVVALVVALIITAIIVVTSIVYIEYRKLRLRQKIDWLKIRERERAE | DSGNES | DGEIE | EELSTM | VDMGHLRLLDL-- |
| HIV-1_M_C_CH293 | MLSWIEKADYRLGVGALVVALIITAIIVVTVIYIEYRKLRLRQKIDWLKIRERERAE | DSGNES | DGDVE | EELAV | VDMGHLRLLDNAL |
| HIV-1_M_D_ZA.90 | ----MQPLVILAIIVALVVALIILAIIVVVTIVFIEYRRIRKQKIDYLDIRIRERAE | DSGNES | EGDGE | ELSKLV | EMGYDAPWVDDL |
| HIV-1_M_D_UG.99 | ----MQPLEIGAIIVALVVALIITAIIVVVTIVFIEYRVRQKIDWLIDRISERAE | DSGNES | DGDKEL | ELSTLM | EMGHHPWVNDMM |
| HIV-1_M_F_BE.93 | ----MSYLLAIGIAALIVLIIITAIIVVTVIYIEYKLVQRKINKLYKRIRERAE | DSGNES | EGDAE | EELAA | LGMGPFIPGDINNL |
| HIV-1_M_F_CM.02 | ----MSYLIIIVIVAFIVALIAAIIIVVTVIYIEYKQLRQKIRINLYERIRERAE | DSGNES | EGDAE | EELAA | LGEVGLFIPGNINNL |
| HIV-1_M_G_GH.03 | ----MQSLEISAIVGLVVALISIAAIIIVVTSIVFIEYRRIRKQKIEKLDIRIRERAE | DSGNES | EGDTE | EELAA | LVEMGDFPWPVGDNL |
| HIV-1_M_G_PT.X | ----MQSLGIFAIVGLVVALIGIAAIIIVVTVIYIQYKIRKQKIQKILDRIRERAE | DSGNES | EGDTE | EELAT | LVEMGDFPWPVGDNL |

Figure S2. Downregulation and enhancement of ILT7 activation are functionally and structurally distinct activities **A.** Correlation between downregulation of BST2 and activation of ILT7 for each primary Vpu variant plotted as the mean level of activation vs. the mean surface BST2 levels. R^2 indicates the coefficient of determination. **B.** Alignment of the protein sequence of group M Vpus used in this study. Highlighted are motifs previously identified as required for cell-surface BST2 displacement or down-regulation. In blue, transmembrane domain motifs involved in binding to BST2. In green, motifs involved in E3 ubiquitine ligase recruitment and in yellow, motifs involved in displacement. Related to figure 2.

Table S1. Primers used for cloning

| | |
|-----------------|---|
| UIE-CH167-F | TACATGTACCGCGGATATGTTTGATTTTCATTGCAAGAG |
| UIE-CH167-2R | CCGGGATCCGCCATGGCTATAAGTCATCCAAAAGCCT |
| UIE-CH167-3F | AGGCTTTTGGATGACTTATAGCCATGGCGGATCCCGG |
| UIE-CH293-2F | TACATGTACCGCGGATATGTTAAGTTGGATAGAAAAAG |
| UIE-CH293-2R | CCGGGATCCGCCATGGTTACAAAGCATTATCATCAA |
| UIE-CH293-3F | TTGGATGATAATGCTTTGTAACCATGGCGGATCCCGG |
| UIE-ZA90-F | TACATGTACCGCGGATATGCAACCTTTAGTGATATTAG |
| UIE-ZA90-2R | CCGGGATCCGCCATGGCTACAGATCATCAACATTCCA |
| UIE-ZA90-3F | TGGAATGTTGATGATCTGTAGCCATGGCGGATCCCGG |
| UIE-N1FR2011-F | TACATGTACCGCGGATATGCTGTTATTGGGGTTCATAG |
| UIE-N1FR2011-2R | CCGGGATCCGCCATGGCTAGACCCAATTACCTTGATC |
| UIE-N1FR2011-3F | GATCAAGGTAATTGGGTCTAGCCATGGCGGATCCCGG |
| UIE-NheI-3R | CTCTTAATTTGCTAGCTATCTG |

Acknowledgements

We thank Tram N. Q. Pham and Robert Lodge for helpful discussions; E. Massicotte and J. Lord-Grignon for assistance with flow cytometry; D. Filion for assistance with confocal microscopy; the IRCM clinic staff, and all volunteers for providing blood samples. The ILT7 reporter cell lines were a generous gift from Dr. Y-J Liu.

Author Contributions

AL, MGB, SL and EAC designed the experiments. AL performed and analyzed all the experiments except the release experiments performed by SL. ML provided technical assistance with some experiments, PBMC isolation and cloning. DS and FK provided the panel of Vpu-expressing plasmids and the proviral Vpu IRES Env construct. AL wrote the manuscript with assistance from SL and EAC.

Competing Interests statement

The authors declare no competing interests.

References

1. Swiecki M, Colonna M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15:471-85.
2. 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* 115:3265-75.
3. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, Chaperot L, Plumas J, Randall RE, Si-Tahar M, Mammano F, Albert ML, Schwartz O. 2011. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog* 7:e1001284.
4. Assil S, Coleon S, Dong C, Decembre E, Sherry L, Allatif O, Webster B, Dreux M. 2019. Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* 25:730-745 e6.
5. Pham TNQ, Meziane O, Miah MA, Volodina O, Colas C, Beland K, Li Y, Dallaire F, Keler T, Guimond JV, Lesage S, Cheong C, Haddad E, Cohen EA. 2019. Flt3L-Mediated Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells Suppresses HIV Infection in Humanized Mice. *Cell Rep* 29:2770-2782 e5.
6. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. 2013. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 762:71-107.
7. Li G, Cheng M, Nunoya J-I, Cheng L, Guo H, Yu H, Liu Y-J, Su L, Zhang L. 2014. Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS pathogens* 10:e1004291-e1004291.
8. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, Levin D, Wijeyesinghe S, Makamdop KN, del Prete GQ, Hill BJ, Timmer JK, Reiss E, Yarden G, Darko S, Contijoch E, Todd JP, Silvestri G, Nason M, Norgren RB, Jr., Keele BF, Rao S, Langer JA, Lifson JD, Schreiber G, Douek DC. 2014. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511:601-5.
9. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL, Liu YJ. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 203:1399-405.
10. Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang YH, Shaw JL, Du Q, Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu YJ. 2009. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 206:1603-14.

11. Bego MG, Miguet N, Laliberte A, Aschman N, Gerard F, Merakos AA, Weissenhorn W, Cohen EA. 2019. Activation of the ILT7 receptor and plasmacytoid dendritic cell responses are governed by structurally-distinct BST2 determinants. *J Biol Chem* 294:10503-10518.
12. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245-52.
13. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-30.
14. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 4:694-709.
15. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD. 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139:499-511.
16. Lindwasser OW, Resh MD. 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* 75:7913-24.
17. Nguyen DH, Hildreth JE. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74:3264-72.
18. Ono A, Freed EO. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13925-30.
19. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22:3307-18.
20. Galao RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ. 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* 12:633-44.
21. Pham TN, Lukhele S, Dallaire F, Perron G, Cohen EA. 2016. Enhancing Virion Tethering by BST2 Sensitizes Productively and Latently HIV-infected T cells to ADCC Mediated by Broadly Neutralizing Antibodies. *Sci Rep* 6:37225.

22. Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen EA. 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11:15.
23. Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, Rakasz EG, Evans DT. 2014. Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6425-30.
24. Cocka LJ, Bates P. 2012. Identification of alternatively translated Tetherin isoforms with differing antiviral and signaling activities. *PLoS pathogens* 8:e1002931-e1002931.
25. 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.
26. Schmidt S, Fritz JV, Bitzegeio J, Fackler OT, Keppler OT. 2011. HIV-1 Vpu blocks recycling and biosynthetic transport of the intrinsic immunity factor CD317/tetherin to overcome the virion release restriction. *mBio* 2:e00036-11.
27. Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, Rupp D, Oberbremer L, Kern C, Tibroni N, Welsch S, Krijnse-Locker J, Banting G, Krausslich HG, Fackler OT, Keppler OT. 2009. HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe* 5:285-97.
28. 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.
29. McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD. 2013. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog* 9:e1003299.
30. Lewinski MK, Jafari M, Zhang H, Opella SJ, Guatelli J. 2015. Membrane Anchoring by a C-terminal Tryptophan Enables HIV-1 Vpu to Displace Bone Marrow Stromal Antigen 2 (BST2) from Sites of Viral Assembly. *J Biol Chem* 290:10919-33.
31. Sharma S, Jafari M, Bangar A, William K, Guatelli J, Lewinski MK. 2019. The C-Terminal End of HIV-1 Vpu Has a Clade-Specific Determinant That Antagonizes BST-2 and Facilitates Virion Release. *J Virol* 93.

32. Bego MG, Cote E, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen EA. 2015. Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 11:e1005024.
33. Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006841.
34. Mourez T, Simon F, Plantier JC. 2013. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev* 26:448-61.
35. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15:871-2.
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* 85:1403-7.
37. Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad E, Cohen EA. 2013. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10:128.
38. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409-21.
39. Mack K, Starz K, Sauter D, Langer S, Bibollet-Ruche F, Learn GH, Sturzel CM, Leoz M, Plantier JC, Geyer M, Hahn BH, Kirchhoff F. 2017. Efficient Vpu-Mediated Tetherin Antagonism by an HIV-1 Group O Strain. *J Virol* 91.
40. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH, Usmani SM, Sauter D, Joas S, Hotter D, Bibollet-Ruche F, Plenderleith LJ, Peeters M, Geyer M, Sharp PM, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2014. Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe* 16:639-50.
41. Sauter D, Unterweger D, Vogl M, Usmani SM, Heigele A, Kluge SF, Hermkes E, Moll M, Barker E, Peeters M, Learn GH, Bibollet-Ruche F, Fritz JV, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2012. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. *PLoS Pathog* 8:e1003093.

42. Bego MG, Cong L, Mack K, Kirchhoff F, Cohen EA. 2016. Differential Control of BST2 Restriction and Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Response by Antagonists Encoded by HIV-1 Group M and O Strains. *J Virol* 90:10236-10246.
43. Sugden SM, Bego MG, Pham TN, Cohen EA. 2016. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses* 8:67.
44. Ozcan KA, Berndsen CE. 2017. Bending of the BST-2 coiled-coil during viral budding. *Proteins* 85:2081-2087.
45. Pickering S, Hue S, Kim EY, Reddy S, Wolinsky SM, Neil SJ. 2014. Preservation of tetherin and CD4 counter-activities in circulating Vpu alleles despite extensive sequence variation within HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog* 10:e1003895.
46. Sugden SM, Pham TNQ, Cohen EA. 2017. HIV-1 Vpu Downmodulates ICAM-1 Expression, Resulting in Decreased Killing of Infected CD4(+) T Cells by NK Cells. *J Virol* 91.
47. 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* 12:1714-29.
48. Bego MG, Dube M, Mercier J, Cohen EA. 2009. Effect of calcium-modulating cyclophilin ligand on human immunodeficiency virus type 1 particle release and cell surface expression of tetherin. *J Virol* 83:13032-6.
49. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661-71.
50. Dave VP, Hajjar F, Dieng MM, Haddad É, Cohen ÉA. 2013. Efficient BST2 antagonism by Vpu is critical for early HIV-1 dissemination in humanized mice. *Retrovirology* 10:128-128.
51. Bego MG, Mercier J, Cohen EA. 2012. Virus-activated interferon regulatory factor 7 upregulates expression of the interferon-regulated BST2 gene independently of interferon signaling. *J Virol* 86:3513-27.
52. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:W636-W641.

Chapitre 4 – Autres éléments de discussion

Modulation de la signalisation BST2-ILT7 chez les VIS

Les résultats du criblage au précédent chapitre suggèrent que l'activité de modulation de la signalisation BST2-ILT7 par Vpu serait présente dans au moins un variant du groupe N, CK1.62, en plus des variants du groupe M. Considérant que le précurseur commun entre les virus du groupe N et ceux du groupe M se trouve dans un VIS (23), on peut poser deux hypothèses par rapport à ce résultat. La première serait que cette fonction préexistait le transfert des VIS vers les humains et qu'on pourrait retrouver une activité similaire en utilisant des variants de Vpu provenant de VIS. Dans une étude en rédaction, nous démontrons que la signalisation BST2-ILT7 est présente chez les singes. En effet, les protéines BST2 provenant de différents singes sont efficaces pour réprimer la production d'IFN par des pDCs humains ou par des pDCs de macaques et nous détectons, par ailleurs, la présence d'ILT7 sur les pDCs de macaques. Dans ce contexte, si on détectait de l'activité de modulation de la signalisation BST2-ILT7 par des variants Vpu provenant de VIS, on pourrait en déduire que les VIS utilisent des stratégies similaires pour limiter les effets de l'IFN lors de l'établissement de l'infection chez leur hôte naturel.

À l'opposé, si l'analyse de variants de Vpu provenant de VIS indiquaient que ceux-ci n'ont pas cette fonction, ces résultats viendraient souligner l'importance de ce mécanisme chez le VIH-1. En effet, cela indiquerait que l'adaptation des protéines Vpu du groupe M et du groupe N aux cellules humaines est menée par une évolution convergente. La même pression sélective qui aurait mené les protéines Vpu du groupe M à s'adapter pour limiter la production d'IFN par les pDCs aurait un effet similaire sur les protéines du groupe N.

Les précurseurs directs du VIH-1, soit le VIScpz et le VISgor, utilisent leur protéine Nef pour antagoniser BST2 de leur hôte respectif (175). La protéine Vpu contenue dans leur génome et retransmise au VIH-1 provient de précurseurs VIS de la lignée VISmus/VISmon/VISgsn qui utilisent leurs protéines Vpu pour antagoniser BST2 (175). Il serait donc intéressant de tester la capacité de variants Vpu de ces virus à moduler la signalisation BST2-ILT7. Si le système de criblage utilisé dans cette étude peut être intéressant pour étendre cette étude aux SIV, il comporte cependant

une limitation importante. En effet, nos analyses démontrent que les cellules rapportrices CT550, qui expriment ILT7 humain, ne peuvent être activées que par BST2 humain ou de grands singes, comme les chimpanzés et les gorilles, dont la séquence est presque identique au BST2 humain (données non-publiées). Le BST2 provenant des hôtes naturels des VIS d'intérêt n'ont aucun effet sur l'activité d'ILT7 dans le système utilisé. L'analyse de variants Vpu en utilisant des BST2 de singes n'est donc pas envisageable dans ce système. Des études récentes indiquent cependant qu'au moins un variant de Vpu provenant du SIVgsn antagonise efficacement le BST2 humain, notamment à travers la régulation négative des niveaux de surface (238, 239), ce que nous avons confirmé (Données non-présentées). Ce Vpu, CM71, et d'autres candidats potentiels qui auraient une activité vis-à-vis le BST2 humain, pourraient donc être testés dans le système de cellules rapportrices CT550, pour leur capacité à moduler la signalisation BST2-ILT7.

Autres mécanismes de contrôle médiés par Vpu

Les résultats obtenus avec les variants Vpu du sous-groupe C et du variant N1.FR.2011 du groupe N offrent une perspective intéressante de l'effet de Vpu sur la production d'IFN-I par les pDCs. En effet, ces variants modulent peu l'activation d'ILT7 (Article, Figures 1-2) en raison de leur déplacement inefficace de BST2 hors des sites d'assemblage viraux, mais CH293 (sous-groupe C), et N1.FR.2011 (Groupe N) semblent réprimer efficacement la production d'IFN-I par les pDCs (Article, Figure 5). Si l'effet de CH293 pourrait être en partie attribuable à une faible activation d'ILT7 observée dans le système rapporteur (Article, Figure 1D), le niveau de répression d'IFN-I, similaire à celui de ZA.90 (sous-groupe D), ne peut être expliqué uniquement par ce facteur. Les résultats obtenus avec les variants Vpu CH293 et N1.FR.2011 semblent donc indiquer qu'il existe d'autres facteurs responsables de la répression d'IFN-I. Il est par ailleurs probable que l'effet de Vpu soit multiple, combinant divers mécanismes ayant des effets additifs, plutôt qu'un seul.

La reconnaissance du VIH-1 par les pDCs passe par un contact direct entre les cellules infectées et les pDCs, ainsi que par la fusion médiée par l'enveloppe (208-210). Le virus pourrait utiliser divers mécanismes médiés par Vpu pour manipuler ces paramètres dans la reconnaissance. Bien que des confirmations doivent être faites quant à l'infectiosité des particules virales provenant des différentes constructions, le système utilisé dans l'article à la figure 5 exclue la possibilité que

des différences au niveau de la séquence de l'enveloppe affectent la reconnaissance. En effet, la même enveloppe NL4.3 est exprimée dans ces constructions et l'élimination du chevauchement entre les gènes *vpu* et *env* empêche l'altération de l'enveloppe due à la substitution de *vpu* (179). Cependant, la réduction des niveaux de surface de BST2 entraîne une réduction de la densité des particules virales à la surface des cellules. De la même manière que la rétention de particules virales facilite la transmission cellule-cellule (116), la rétention pourrait faciliter la transmission de particules aux pDCs et faciliter la détection, via l'augmentation de la fréquence de fusion de l'enveloppe. Il est probable, cependant, que l'ampleur de cet effet soit limitée. En effet, la protéine Nef du groupe O n'a aucun effet sur la production d'IFN-I, malgré une diminution des niveaux de surface et de la densité des particules virales (129). De la même manière, si la répression d'IFN-I par Vpu CH293 est claire, Vpu CH167, qui régule négativement tout aussi efficacement les niveaux de surface de BST2, ne semble pas réprimer l'IFN-I de manière efficace, bien que ces résultats doivent être confirmés, étant donné l'écart important entre les donneurs.

Vpu pourrait aussi limiter la production d'IFN-I par les pDCs en limitant les contacts inter-cellules impliqués dans la reconnaissance. Tel que décrit dans le chapitre précédent, les contacts entre les pDCs et les cellules infectées dépendent de la présence d'ICAM-1 à la surface des cellules infectées (210). Ainsi, la réduction des niveaux de surface d'ICAM-1 par Vpu pourrait contribuer à limiter ces contacts et réduire la détection. Ainsi, il serait intéressant de vérifier l'hypothèse que les cellules infectées par des virus n'exprimant pas Vpu forment davantage de conjugués avec les pDCs, comme il a déjà été démontré pour les conjugués de T CD4⁺ infectés avec des cellules NK (141).

Antagonisme de l'isoforme court de BST2

Comme mentionné au Chapitre 1, BST2 est retrouvé sous deux formes, longue et courte, où la forme courte est tronquée de ses 14 premiers acides aminés. Ces formes sont générées par un mécanisme traductionnel où le premier codon d'initiation est sauté par le ribosome au moment du balayage en raison d'une séquence Kozak faible (108). La forme courte de BST2, où la queue cytoplasmique est absente, ne peut être marquée pour sa dégradation par l'interaction entre Vpu et son ubiquitine ligase E3. Ainsi la régulation négative de cette forme est beaucoup moins

marquée, bien qu'il soit possible que cette forme soit retenue dans le TGN. L'antagonisme de la forme courte de BST2 par déplacement est cependant très efficace (129). Comme Vpu dégrade efficacement la forme longue de BST2, il est probable que les sites où on retrouve BST2 à la surface, en dehors des sites d'assemblages viraux, soient majoritairement constituées de la forme courte de BST2.

L'antagonisme de la forme courte de BST2 est évidemment important pour la relâche, comme les deux formes ont la même capacité de rétention des particules virales. Dans le groupe O, on retrouve au moins un isolat (RBF206) où Vpu contrecarre l'action des deux formes de BST2 via une régulation négative efficace des niveaux de surface (181). Il semble cependant, pour l'instant, que cet isolat présente un cas isolé, comme il s'agit du seul cas rapporté d'antagonisme de la forme courte de BST2 via une régulation négative aussi importante. Ce mode d'antagonisme ne permet pas, selon le criblage effectué au chapitre 3, de médier l'activation d'ILT7. La pression sélective de BST2 sur les Vpu et Nef force ces protéines à s'adapter (179, 182), notamment à la forme courte de BST2. On pourrait aussi croire que la présence de pDCs exerce aussi une pression sélective qui favorise le déplacement de BST2 comme mécanisme d'antagonisme plutôt que la régulation négative de la forme courte. Ce mécanisme permet en effet, non seulement d'augmenter la relâche virale, mais aussi de réprimer la production d'IFN-I par les pDCs.

Chapitre 5 – Conclusion

Le remodelage des protéines à la surface des cellules infectées par la protéine Vpu du VIH-1 permet non seulement d'établir un environnement propice à la réplication virale, mais aussi de moduler les interactions de la cellule infectée avec d'autres sous-types immunitaires. L'antagonisme de BST2 par la protéine Vpu en est un exemple parfait. En effet, en déplaçant le facteur de restriction BST2 en dehors des sites d'assemblages viraux, Vpu augmente la relâche virale et exploite la signalisation BST2-ILT7 pour limiter la production d'IFN-I par les pDCs. Les pDCs font partie de la première ligne de défense immunitaire et sécrètent des quantités importantes d'IFN-I et d'autres cytokines en réponse à la détection de pathogènes, ce qui crée un environnement antiviral qui limite l'établissement de l'infection.

Cette étude offre pour la première fois un regard sur la conservation de cette fonction dans les différents groupes et sous-groupes du VIH-1, en plus de mettre en relief l'importance du mécanisme de déplacement de BST2 dans le contexte du contrôle de la signalisation BST2-ILT7. Compte tenu que le sous-groupe C, qui compose plus de la moitié des infections à l'échelle mondiale, ne semble pas exploiter la signalisation BST2-ILT7 comme les protéines des autres sous-groupes du groupe pandémique M, il est intéressant de considérer d'autres mécanismes médiés par Vpu qui pourraient limiter la production d'IFN-I par les pDCs. En effet, plutôt que d'inhiber la signalisation en aval de la reconnaissance des pathogènes, Vpu pourrait, par exemple limiter la reconnaissance directement.

En somme, cette étude vient souligner le rôle complexe de Vpu en tant qu'immunomodulateur de la reconnaissance du VIH-1.

Chapitre 6 – Autres contributions

Congrès scientifiques

Une partie des résultats présentés ici et d'autres données générées durant ce projet ont été présentées sous forme de présentation par affiche à la réunion internationale *Cold Spring Harbor Retroviruses 2019* qui s'est tenu à Cold Spring Harbor aux États-Unis du 20 mai 2019 au 25 mai 2019.

Publications scientifiques

Outre l'étude présentée dans ce mémoire qui est en préparation pour une soumission au journal *mBio*, des travaux menés en parallèle durant les deux dernières années sont compilés dans une autre publication en préparation pour la soumission au journal *Journal of Biological Chemistry* :

Laliberté, A, Bego, MG *et al.* Functional comparison of innate immune control by BST2-ILT7 signaling in primates. [En préparation]

Références bibliographiques

1. UNAIDS. 2019. Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. www.unaids.org/en/resources/fact-sheet.
2. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet 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* 220:868-71.
4. Centers for Disease C. 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 30:305-308.
5. CDC. 1991. Mortality attributable to HIV infection/AIDS. United States
6. Clifford DB, Ances BM. 2013. HIV-associated neurocognitive disorder. *The Lancet Infectious diseases* 13:976-986.
7. Wallet C, De Rovere M, Van Assche J, Daouad F, De Wit S, Gautier V, Mallon PWG, Marcello A, Van Lint C, Rohr O, Schwartz C. 2019. Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Front Cell Infect Microbiol* 9:362.
8. Marcello A. 2006. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology* 3:7-7.
9. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360:692-8.
10. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppia D, Salgado M, Martinez-Picado J, Nijhuis M, Wensing AMJ, Lee H, Grant P, Nastouli E, Lambert J, Pace M, Salasc F, Monit C, Innes AJ, Muir L, Waters L, Frater J, Lever AML, Edwards SG, Gabriel IH, Olavarria E. 2019. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 568:244-248.
11. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-77.
12. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. 1996.

- Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-5.
13. Kordelas L, Verheyen J, Beelen DW, Horn PA, Heinold A, Kaiser R, Trensche R, Schadendorf D, Dittmer U, Esser S, Essen HIVAG. 2014. Shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 Delta32 mutation. *N Engl J Med* 371:880-2.
 14. Henrich TJ, Hanhauser E, Marty FM, Sirignano MN, Keating S, Lee TH, Robles YP, Davis BT, Li JZ, Heisey A, Hill AL, Busch MP, Armand P, Soiffer RJ, Altfeld M, Kuritzkes DR. 2014. Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases. *Ann Intern Med* 161:319-27.
 15. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. 2018. Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell host & microbe* 23:14-26.
 16. Abner E, Jordan A. 2019. HIV "shock and kill" therapy: In need of revision. *Antiviral Res* 166:19-34.
 17. Vansant G, Bruggemans A, Janssens J, Debyser Z. 2020. Block-And-Lock Strategies to Cure HIV Infection. *Viruses* 12.
 18. UNAIDS. 2012. HIV-related restrictions on entry, stay and residence. team Hral,
 19. Mahajan AP, Sayles JN, Patel VA, Remien RH, Sawires SR, Ortiz DJ, Szekeres G, Coates TJ. 2008. Stigma in the HIV/AIDS epidemic: a review of the literature and recommendations for the way forward. *AIDS* 22 Suppl 2:S67-79.
 20. Housefather A. 2019. The criminalization of HIV-non disclosure in Canada.
 21. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, Gilbert MT, Wolinsky SM. 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455:661-4.
 22. 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* 288:1789-96.
 23. Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006841.
 24. Asibey EOA. 1974. Wildlife as a source of protein in Africa South of the Sahara. *Biological Conservation* 6:32-39.
 25. Peeters M, Courgnaud V, Abela B, Auzel P, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, Loul S, Liegeois F, Butel C, Koulagna D, Mpoudi-Ngole E, Shaw GM, Hahn BH, Delaporte E. 2002. Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis* 8:451-7.
 26. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Fruteau C, Noe R, Peeters M, Brookfield JF, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 2005. Simian immunodeficiency virus

- infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 79:12515-27.
27. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-14.
 28. Paiardini M, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. 2009. Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annu Rev Med* 60:485-95.
 29. Chitnis A, Rawls D, Moore J. 2000. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:5-8.
 30. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, Tatem AJ, Sousa JD, Arinaminpathy N, Pepin J, Posada D, Peeters M, Pybus OG, Lemey P. 2014. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346:56-61.
 31. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339:389-92.
 32. Chen Z, Luckay A, Sodora DL, Telfer P, Reed P, Gettie A, Kanu JM, Sadek RF, Yee J, Ho DD, Zhang L, Marx PA. 1997. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* 71:3953-60.
 33. Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F. 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:666-72.
 34. Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358:495-9.
 35. Yamaguchi J, Devare SG, Brennan CA. 2000. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:925-30.
 36. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345:356-9.
 37. 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 troglodytes*. *Nature* 397:436-41.
 38. Van Heuverswyn F, Peeters M. 2007. The origins of HIV and implications for the global epidemic. *Curr Infect Dis Rep* 9:338-46.
 39. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331:280-3.

40. Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *Journal of virology* 75:1834-1841.
41. 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. *Journal of virology* 84:9864-9878.
42. Li WH, Tanimura M, Sharp PM. 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 5:313-30.
43. Moulard M, Decroly E. 2000. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 1469:121-32.
44. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. 2012. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13:355-63.
45. Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. 1990. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345:84-6.
46. Albin A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. 1998. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13153-8.
47. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268:429-31.
48. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321:412-7.
49. Freed EO. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology* 13:484-496.
50. Lusic M, Siliciano RF. 2017. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nature Reviews Microbiology* 15:69-82.
51. Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, G. Göttlinger H. 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society Transactions* 37:181-184.
52. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112.
53. 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.
54. 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* 237:888-93.

55. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA. 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328:728-30.
56. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-50.
57. Svarovskaia ES, Xu H, Mbisa JL, Barr R, Gorelick RJ, Ono A, Freed EO, Hu WS, Pathak VK. 2004. Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279:35822-8.
58. Zennou V, Perez-Caballero D, Gottlinger H, Bieniasz PD. 2004. APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 78:12058-61.
59. 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* 302:1056-60.
60. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. 2004. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* 18:2861-6.
61. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848-53.
62. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430:569-73.
63. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J. 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:5514.
64. Pertel T, Hausmann S, Morger D, Züger S, Guerra J, Lascano J, Reinhard C, Santoni FA, Uchil PD, Chatel L, Bisiaux A, Albert ML, Strambio-De-Castillia C, Mothes W, Pizzato M, Grütter MG, Luban J. 2011. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472:361-365.
65. Battivelli E, Lecossier D, Matsuoka S, Migraine J, Clavel F, Hance AJ. 2010. Strain-specific differences in the impact of human TRIM5 α , different TRIM5 α alleles, and the inhibition of capsid-cyclophilin A interactions on the infectivity of HIV-1. *Journal of virology* 84:11010-11019.
66. Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Yeni P, Clavel F, Hance AJ. 2011. Gag cytotoxic T lymphocyte escape mutations can increase sensitivity of HIV-1 to human TRIM5 α , linking intrinsic and acquired immunity. *Journal of virology* 85:11846-11854.
67. Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3:11-8.

68. Bartz SR, Rogel ME, Emerman M. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol* 70:2324-31.
69. 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. *Journal of virology* 69:6304-6313.
70. Hrimech M, Yao XJ, Bachand F, Rougeau N, Cohen EA. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J Virol* 73:4101-9.
71. Lewis P, Hensel M, Emerman M. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 11:3053-8.
72. Balliet JW, Kolson DL, Eiger G, Kim FM, McGann KA, Srinivasan A, Collman R. 1994. Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology* 200:623-31.
73. Eckstein DA, Sherman MP, Penn ML, Chin PS, De Noronha CM, Greene WC, Goldsmith MA. 2001. HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells. *J Exp Med* 194:1407-19.
74. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, Schenkova K, Ambiel I, Wabnitz G, Gramberg T, Panitz S, Flory E, Landau NR, Sertel S, Rutsch F, Lasitschka F, Kim B, Konig R, Fackler OT, Keppler OT. 2012. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* 18:1682-7.
75. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E, Walker PA, Kelly G, Haire LF, Yap MW, de Carvalho LP, Stoye JP, Crow YJ, Taylor IA, Webb M. 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480:379-82.
76. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, Bloch N, Maudet C, Bertrand M, Gramberg T, Pancino G, Priet S, Canard B, Laguette N, Benkirane M, Transy C, Landau NR, Kim B, Margottin-Goguet F. 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13:223-228.
77. Powell RD, Holland PJ, Hollis T, Perrino FW. 2011. Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase. *J Biol Chem* 286:43596-600.
78. Yu XF, Yu QC, Essex M, Lee TH. 1991. The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage. *J Virol* 65:5088-91.

79. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474:654-7.
80. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474:658-61.
81. Plitnik T, Sharkey ME, Mahboubi B, Kim B, Stevenson M. 2018. Incomplete Suppression of HIV-1 by SAMHD1 Permits Efficient Macrophage Infection. *Pathogens & immunity* 3:197-223.
82. Lim ES, Fregoso OI, McCoy CO, Matsen FA, Malik HS, Emerman M. 2012. The ability of primate lentiviruses to degrade the monocyte restriction factor SAMHD1 preceded the birth of the viral accessory protein Vpx. *Cell Host Microbe* 11:194-204.
83. Ahmad N, Venkatesan S. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241:1481-5.
84. Hammes SR, Dixon EP, Malim MH, Cullen BR, Greene WC. 1989. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9549-53.
85. Kim S, Ikeuchi K, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9544-8.
86. Franchini G, Robert-Guroff M, Wong-Staal F, Ghayeb J, Kato I, Chang TW, Chang NT. 1986. Expression of the protein encoded by the 3' open reading frame of human T-cell lymphotropic virus type III in bacteria: demonstration of its immunoreactivity with human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5282-5.
87. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC. 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 70:4283-90.
88. Welker R, Harris M, Cardel B, Krausslich HG. 1998. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J Virol* 72:8833-40.
89. Bukovsky AA, Dorfman T, Weimann A, Gottlinger HG. 1997. Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J Virol* 71:1013-8.
90. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270:988-91.

91. Gorry PR, McPhee DA, Verity E, Dyer WB, Wesselingh SL, Learmont J, Sullivan JS, Roche M, Zaunders JJ, Gabuzda D, Crowe SM, Mills J, Lewin SR, Brew BJ, Cunningham AL, Churchill MJ. 2007. Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* 4:66.
92. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 332:228-32.
93. Chowes MY, Spina CA, Kwoh TJ, Fitch NJ, Richman DD, Guatelli JC. 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 68:2906-14.
94. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M. 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526:212-7.
95. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526:218-23.
96. Garcia JV, Miller AD. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350:508-11.
97. Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Le Peuch C, Dott K, Girard M, Montagnier L, Lecocq JP. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 330:266-9.
98. Mariani R, Skowronski J. 1993. CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5549-53.
99. Wildum S, Schindler M, Munch J, Kirchhoff F. 2006. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol* 80:8047-59.
100. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66:226-34.
101. 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* 9:622-31.
102. Pham TN, Lukhele S, Hajjar F, Routy JP, Cohen EA. 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4+ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11:15.
103. Veillette M, Coutu M, Richard J, Batrville 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* 89:545-51.
104. 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:E2687-94.
 105. Richard J, Ding S, Finzi A. 2017. Unlocking HIV-1 Env: implications for antibody attack. *AIDS Res Ther* 14:42.
 106. Kupzig S, Korolchuk V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic* 4:694-709.
 107. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD. 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139:499-511.
 108. Cocka LJ, Bates P. 2012. Identification of alternatively translated Tetherin isoforms with differing antiviral and signaling activities. *PLoS Pathog* 8:e1002931.
 109. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-30.
 110. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245-52.
 111. Hu S, Yin L, Mei S, Li J, Xu F, Sun H, Liu X, Cen S, Liang C, Li A, Guo F. 2017. BST-2 restricts IAV release and is countered by the viral M2 protein. *Biochem J* 474:715-730.
 112. Sakuma T, Noda T, Urata S, Kawaoka Y, Yasuda J. 2009. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol* 83:2382-5.
 113. Mansouri M, Viswanathan K, Douglas JL, Hines J, Gustin J, Moses AV, Fruh K. 2009. Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 83:9672-81.
 114. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y, McNatt M, Hatzioannou T, Bieniasz PD. 2009. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol* 83:1837-44.
 115. Taylor JK, Coleman CM, Postel S, Sisk JM, Bernbaum JG, Venkataraman T, Sundberg EJ, Frieman MB. 2015. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF7a Inhibits Bone Marrow Stromal Antigen 2 Virion Tethering through a Novel Mechanism of Glycosylation Interference. *Journal of virology* 89:11820-11833.
 116. Jolly C, Booth NJ, Neil SJ. 2010. Cell-cell spread of human immunodeficiency virus type 1 overcomes tetherin/BST-2-mediated restriction in T cells. *J Virol* 84:12185-99.

117. Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A, Marcelin AG, Guatelli J, Schwartz O. 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog* 6:e1000955.
118. Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, Rakasz EG, Evans DT. 2014. Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6425-30.
119. Alvarez RA, Hamlin RE, Monroe A, Moldt B, Hotta MT, Rodriguez Caprio G, Fierer DS, Simon V, Chen BK. 2014. HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells. *J Virol* 88:6031-46.
120. Pham TN, Lukhele S, Dallaire F, Perron G, Cohen EA. 2016. Enhancing Virion Tethering by BST2 Sensitizes Productively and Latently HIV-infected T cells to ADCC Mediated by Broadly Neutralizing Antibodies. *Sci Rep* 6:37225.
121. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22:3307-18.
122. Galao RP, Le Tortorec A, Pickering S, Kueck T, Neil SJ. 2012. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFkappaB-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* 12:633-44.
123. Tokarev A, Suarez M, Kwan W, Fitzpatrick K, Singh R, Guatelli J. 2013. Stimulation of NF-kappaB activity by the HIV restriction factor BST2. *J Virol* 87:2046-57.
124. Hotter D, Sauter D, Kirchhoff F. 2013. Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. *J Mol Biol* 425:4956-64.
125. Billcliff PG, Rollason R, Prior I, Owen DM, Gaus K, Banting G. 2013. CD317/tetherin is an organiser of membrane microdomains. *J Cell Sci* 126:1553-64.
126. Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang YH, Shaw JL, Du Q, Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu YJ. 2009. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 206:1603-14.
127. Bego MG, Miguet N, Laliberte A, Aschman N, Gerard F, Merakos AA, Weissenhorn W, Cohen EA. 2019. Activation of the ILT7 receptor and plasmacytoid dendritic cell responses are governed by structurally-distinct BST2 determinants. *J Biol Chem* 294:10503-10518.
128. Bego MG, Cote E, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen EA. 2015. Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 11:e1005024.
129. Bego MG, Cong L, Mack K, Kirchhoff F, Cohen EA. 2016. Differential Control of BST2 Restriction and Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Response by Antagonists Encoded by HIV-1 Group M and O Strains. *J Virol* 90:10236-10246.

130. Ozcan KA, Berndsen CE. 2017. Bending of the BST-2 coiled-coil during viral budding. *Proteins* 85:2081-2087.
131. Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* 334:532-4.
132. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241:1221-3.
133. Sugden SM, Bego MG, Pham TN, Cohen EA. 2016. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses* 8:67.
134. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66:7193-200.
135. 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.
136. 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.
137. Barker E, Evans DT. 2016. HLA-C Downmodulation by HIV-1 Vpu. *Cell Host Microbe* 19:570-1.
138. Apps R, Del Prete GQ, Chatterjee P, Lara A, Brumme ZL, Brockman MA, Neil S, Pickering S, Schneider DK, Piechocka-Trocha A, Walker BD, Thomas R, Shaw GM, Hahn BH, Keele BF, Lifson JD, Carrington M. 2016. HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation. *Cell Host Microbe* 19:686-95.
139. Ramirez PW, Famiglietti M, Sowrirajan B, DePaula-Silva AB, Rodesch C, Barker E, Bosque A, Planelles V. 2014. Downmodulation of CCR7 by HIV-1 Vpu results in impaired migration and chemotactic signaling within CD4(+) T cells. *Cell Rep* 7:2019-30.
140. Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, Barker E. 2010. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe* 8:397-409.
141. Sugden SM, Pham TNQ, Cohen EA. 2017. HIV-1 Vpu Downmodulates ICAM-1 Expression, Resulting in Decreased Killing of Infected CD4(+) T Cells by NK Cells. *J Virol* 91.
142. Prevost J, Edgar CR, Richard J, Trothen SM, Jacob RA, Mumby MJ, Pickering S, Dube M, Kaufmann DE, Kirchhoff F, Neil SJD, Finzi A, Dikeakos JD. 2020. HIV-1 Vpu Downregulates Tim-3 from the Surface of Infected CD4(+) T Cells. *J Virol* 94.
143. Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, Barker E. 2010. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell host & microbe* 8:397-409.

144. Li M, Ablan SD, Miao C, Zheng Y-M, Fuller MS, Rennert PD, Maury W, Johnson MC, Freed EO, Liu S-L. 2014. TIM-family proteins inhibit HIV-1 release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:E3699.
145. Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN. 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* 64:5448-56.
146. Rong L, Zhang J, Lu J, Pan Q, Lorgeoux RP, Aloysius C, Guo F, Liu SL, Wainberg MA, Liang C. 2009. The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu. *J Virol* 83:7536-46.
147. Vigan R, Neil SJ. 2010. Determinants of tetherin antagonism in the transmembrane domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J Virol* 84:12958-70.
148. Skasko M, Wang Y, Tian Y, Tokarev A, Munguia J, Ruiz A, Stephens EB, Opella SJ, Guatelli J. 2012. HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions. *J Biol Chem* 287:58-67.
149. Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, Koyanagi Y. 2011. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J Virol* 85:932-45.
150. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1:565-74.
151. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog* 5:e1000574.
152. Gupta RK, Hue S, Schaller T, Verschoor E, Pillay D, Towers GJ. 2009. Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog* 5:e1000443.
153. Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, Rupp D, Oberbremer L, Kern C, Tibroni N, Welsch S, Krijnse-Locker J, Banting G, Krausslich HG, Fackler OT, Keppler OT. 2009. HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe* 5:285-97.
154. 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.
155. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Fruh K, Moses AV. 2009. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *J Virol* 83:7931-47.

156. 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.
157. Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli JC, Cannon PM. 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology* 7:51.
158. 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* 12:1714-29.
159. Schmidt S, Fritz JV, Bitzegeio J, Fackler OT, Keppler OT. 2011. HIV-1 Vpu blocks recycling and biosynthetic transport of the intrinsic immunity factor CD317/tetherin to overcome the virion release restriction. *mBio* 2:e00036-11.
160. Kueck T, Neil SJ. 2012. A cytoplasmic tail determinant in HIV-1 Vpu mediates targeting of tetherin for endosomal degradation and counteracts interferon-induced restriction. *PLoS Pathog* 8:e1002609.
161. Canagarajah BJ, Ren X, Bonifacino JS, Hurley JH. 2013. The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Sci* 22:517-29.
162. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Mercier J, Binette J, Leung G, Cohen EA. 2009. Suppression of Tetherin-restricting activity upon human immunodeficiency virus type 1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J Virol* 83:4574-90.
163. Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J, Xiong Y. 2014. Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *Elife* 3:e02362.
164. Kueck T, Foster TL, Weinelt J, Sumner JC, Pickering S, Neil SJ. 2015. Serine Phosphorylation of HIV-1 Vpu and Its Binding to Tetherin Regulates Interaction with Clathrin Adaptors. *PLoS Pathog* 11:e1005141.
165. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64:621-9.
166. Varthakavi V, Smith RM, Martin KL, Derdowski A, Lapierre LA, Goldenring JR, Spearman P. 2006. The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release. *Traffic* 7:298-307.
167. Pacyniak E, Gomez ML, Gomez LM, Mulcahy ER, Jackson M, Hout DR, Wisdom BJ, Stephens EB. 2005. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention

- in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:379-94.
168. Ruiz A, Hill MS, Schmitt K, Guatelli J, Stephens EB. 2008. Requirements of the membrane proximal tyrosine and dileucine-based sorting signals for efficient transport of the subtype C Vpu protein to the plasma membrane and in virus release. *Virology* 378:58-68.
 169. Miyagi E, Andrew AJ, Kao S, Strebel K. 2009. Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2868-73.
 170. McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD. 2013. Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog* 9:e1003299.
 171. Lewinski MK, Jafari M, Zhang H, Opella SJ, Guatelli J. 2015. Membrane Anchoring by a C-terminal Tryptophan Enables HIV-1 Vpu to Displace Bone Marrow Stromal Antigen 2 (BST2) from Sites of Viral Assembly. *J Biol Chem* 290:10919-33.
 172. Sharma S, Jafari M, Bangar A, William K, Guatelli J, Lewinski MK. 2019. The C-Terminal End of HIV-1 Vpu Has a Clade-Specific Determinant That Antagonizes BST-2 and Facilitates Virion Release. *J Virol* 93.
 173. Pujol FM, Laketa V, Schmidt F, Mukenhirn M, Muller B, Boulant S, Grimm D, Keppler OT, Fackler OT. 2016. HIV-1 Vpu Antagonizes CD317/Tetherin by Adaptor Protein-1-Mediated Exclusion from Virus Assembly Sites. *J Virol* 90:6709-6723.
 174. Jafari M, Guatelli J, Lewinski MK. 2014. Activities of transmitted/founder and chronic clade B HIV-1 Vpu and a C-terminal polymorphism specifically affecting virion release. *J Virol* 88:5062-78.
 175. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim K-A, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell host & microbe* 6:409-421.
 176. Sauter D, Vogl M, Kirchhoff F. 2011. Ancient origin of a deletion in human BST2/Tetherin that confers protection against viral zoonoses. *Hum Mutat* 32:1243-5.
 177. Sauter D, Hue S, Petit SJ, Plantier JC, Towers GJ, Kirchhoff F, Gupta RK. 2011. HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef. *Retrovirology* 8:103.
 178. Yang SJ, Lopez LA, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM. 2011. Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 group O and P. *Retrovirology* 8:78.
 179. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Munch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff

- F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6:409-21.
180. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH, Usmani SM, Sauter D, Joas S, Hotter D, Bibollet-Ruche F, Plenderleith LJ, Peeters M, Geyer M, Sharp PM, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2014. Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin. *Cell Host Microbe* 16:639-50.
181. Mack K, Starz K, Sauter D, Langer S, Bibollet-Ruche F, Learn GH, Sturzel CM, Leoz M, Plantier JC, Geyer M, Hahn BH, Kirchhoff F. 2017. Efficient Vpu-Mediated Tetherin Antagonism by an HIV-1 Group O Strain. *J Virol* 91.
182. Sauter D, Unterweger D, Vogl M, Usmani SM, Heigele A, Kluge SF, Hermkes E, Moll M, Barker E, Peeters M, Learn GH, Bibollet-Ruche F, Fritz JV, Fackler OT, Hahn BH, Kirchhoff F. 2012. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. *PLoS Pathog* 8:e1003093.
183. Bour S, Strebel K. 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* 70:8285-300.
184. Le Tortorec A, Neil SJ. 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J Virol* 83:11966-78.
185. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-7.
186. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. 2006. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 107:2423-31.
187. Aiello A, Giannesi F, Percario ZA, Affabris E. 2018. The involvement of plasmacytoid cells in HIV infection and pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 40:77-89.
188. Vollenweider R, Lennert K. 1983. Plasmacytoid T-cell clusters in non-specific lymphadenitis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 44:1-14.
189. Yin Z, Dai J, Deng J, Sheikh F, Natalia M, Shih T, Lewis-Antes A, Amrute SB, Garrigues U, Doyle S, Donnelly RP, Kotenko SV, Fitzgerald-Bocarsly P. 2012. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 189:2735-45.
190. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. 2004. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 75:504-14.
191. Schreiber G. 2017. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem* 292:7285-7294.

192. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15623-8.
193. Kumagai Y, Kumar H, Koyama S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. 2009. Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 182:3960-4.
194. Swiecki M, Colonna M. 2010. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 234:142-62.
195. Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, Giammarioli AM, Malorni W, Fais S, Belardelli F. 2001. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98:3022-9.
196. Ito T, Amakawa R, Inaba M, Ikehara S, Inaba K, Fukuhara S. 2001. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166:2961-9.
197. Wu L, KewalRamani VN. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews Immunology* 6:859-868.
198. Bloch N, O'Brien M, Norton TD, Polsky SB, Bhardwaj N, Landau NR. 2014. HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS research and human retroviruses* 30:195-203.
199. Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG. 2002. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *Journal of virology* 76:11033-11041.
200. Reeves RK, Evans TI, Gillis J, Wong FE, Kang G, Li Q, Johnson RP. 2012. SIV infection induces accumulation of plasmacytoid dendritic cells in the gut mucosa. *J Infect Dis* 206:1462-8.
201. Malleret B, Maneglier B, Karlsson I, Lebon P, Nascimbeni M, Perie L, Brochard P, Delache B, Calvo J, Andrieu T, Spreux-Varoquaux O, Hosmalin A, Le Grand R, Vaslin B. 2008. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 112:4598-608.
202. Barratt-Boyes SM, Wijewardana V, Brown KN. 2010. In acute pathogenic SIV infection plasmacytoid dendritic cells are depleted from blood and lymph nodes despite mobilization. *J Med Primatol* 39:235-42.
203. Biancotto A, Grivel JC, Iglehart SJ, Vanpouille C, Lisco A, Sieg SF, Debernardo R, Garate K, Rodriguez B, Margolis LB, Lederman MM. 2007. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* 109:4272-9.

204. Lopez C, Fitzgerald PA, Siegal FP. 1983. Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections. *J Infect Dis* 148:962-6.
205. Howell DM, Feldman SB, Kloser P, Fitzgerald-Bocarsly P. 1994. Decreased frequency of functional natural interferon-producing cells in peripheral blood of patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 71:223-30.
206. Swiecki M, Colonna M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15:471-85.
207. O'Brien M, Manches O, Sabado RL, Baranda SJ, Wang Y, Marie I, Rolnitzky L, Markowitz M, Margolis DM, Levy D, Bhardwaj N. 2011. Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *The Journal of clinical investigation* 121:1088-1101.
208. 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* 115:3265-75.
209. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, Chaperot L, Plumas J, Randall RE, Si-Tahar M, Mammano F, Albert ML, Schwartz O. 2011. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog* 7:e1001284.
210. Assil S, Coleon S, Dong C, Decembre E, Sherry L, Allatif O, Webster B, Dreux M. 2019. Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* 25:730-745 e6.
211. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, Levin D, Wijeyesinghe S, Makamdop KN, del Prete GQ, Hill BJ, Timmer JK, Reiss E, Yarden G, Darko S, Contijoch E, Todd JP, Silvestri G, Nason M, Norgren RB, Jr., Keele BF, Rao S, Langer JA, Lifson JD, Schreiber G, Douek DC. 2014. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511:601-5.
212. Li G, Cheng M, Nunoya J, Cheng L, Guo H, Yu H, Liu YJ, Su L, Zhang L. 2014. Plasmacytoid dendritic cells suppress HIV-1 replication but contribute to HIV-1 induced immunopathogenesis in humanized mice. *PLoS Pathog* 10:e1004291.
213. Pham TNQ, Meziane O, Miah MA, Volodina O, Colas C, Beland K, Li Y, Dallaire F, Keler T, Guimond JV, Lesage S, Cheong C, Haddad E, Cohen EA. 2019. Flt3L-Mediated Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells Suppresses HIV Infection in Humanized Mice. *Cell Rep* 29:2770-2782 e5.
214. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, Patterson S. 2001. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98:2574-6.
215. Su L. 2019. Pathogenic Role of Type I Interferons in HIV-Induced Immune Impairments in Humanized Mice. *Curr HIV/AIDS Rep* 16:224-229.

216. Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA. 2017. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 44:20-25.
217. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194:1823-34.
218. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL, Liu YJ. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 203:1399-405.
219. Young NT, Canavez F, Uhrberg M, Shum BP, Parham P. 2001. Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 53:270-8.
220. Rissoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F, Bates EE. 2002. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100:3295-303.
221. Ju XS, Hacker C, Scherer B, Redecke V, Berger T, Schuler G, Wagner H, Lipford GB, Zenke M. 2004. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene* 331:159-64.
222. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL, Liu Y-J. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *The Journal of experimental medicine* 203:1399-1405.
223. Cao W, Bover L. 2010. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunological reviews* 234:163-176.
224. Fenton-May AE, Dibben O, Emmerich T, Ding H, Pfafferott K, Aasa-Chapman MM, Pellegrino P, Williams I, Cohen MS, Gao F, Shaw GM, Hahn BH, Ochsenbauer C, Kappes JC, Borrow P. 2013. Relative resistance of HIV-1 founder viruses to control by interferon-alpha. *Retrovirology* 10:146.
225. Nguyen NV, Tran JT, Sanchez DJ. 2018. HIV blocks Type I IFN signaling through disruption of STAT1 phosphorylation. *Innate immunity* 24:490-500.
226. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, Fauci AS. 2007. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3396-401.

227. Chung NP, Matthews K, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP. 2012. HIV-1 gp120 impairs the induction of B cell responses by TLR9-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 189:5257-65.
228. Gerlini G, Urso C, Mariotti G, Di Gennaro P, Palli D, Brandani P, Salvadori A, Pimpinelli N, Reali UM, Borgognoni L. 2007. Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol* 125:184-93.
229. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S. 2004. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:7466-74.
230. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselini I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ. 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7:1339-46.
231. Cai D, Cao J, Li Z, Zheng X, Yao Y, Li W, Yuan Z. 2009. Up-regulation of bone marrow stromal protein 2 (BST2) in breast cancer with bone metastasis. *BMC Cancer* 9:102.
232. Alculumbre S, Raieli S, Hoffmann C, Chelbi R, Danlos FX, Soumelis V. 2019. Plasmacytoid pre-dendritic cells (pDC): from molecular pathways to function and disease association. *Semin Cell Dev Biol* 86:24-35.
233. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, Ronnblom L. 2000. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* 9:664-71.
234. Ronnblom L, Alm GV. 2001. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 194:F59-63.
235. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. 2009. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *Journal of Experimental Medicine* 206:1983-1994.
236. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M. 2011. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3:73ra19.
237. Anonymous. A Study to Evaluate VIB7734 in Participants With Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Cutaneous Lupus Erythematosus (CLE), Sjogren's Syndrome, Systemic Sclerosis, Polymyositis, and Dermatomyositis.
238. Yang SJ, Lopez LA, Hauser H, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM. 2010. Anti-tetherin activities in Vpu-expressing primate lentiviruses. *Retrovirology* 7:13.

239. Yao W, Yoshida T, Hashimoto S, Takeuchi H, Strebel K, Yamaoka S. 2020. Vpu of a Simian Immunodeficiency Virus Isolated from Greater Spot-Nosed Monkey Antagonizes Human BST-2 via Two AxxxxxxW Motifs. 94:e01669-19.