

**Université Paris Cité**

**École doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité**

**Laboratoire Institut Cochin (UMR\_S 1016 / CNRS UMR8104)**

**Équipe Entrée muqueuse du VIH et Immunité Muqueuse**

# **Compréhension des mécanismes de la protection des muqueuses contre les infections virales : cas du VIH-1 et du SARS-CoV-2**

**Par Andréa COTTIGNIES-CALAMARTE**

**Thèse de doctorat de Microbiologie**

**Dirigée par Dr Morgane BOMSEL**

**Et co-dirigée par Dr Daniela TUDOR**

**Présentée et soutenue publiquement le 18/12/2023**

Devant un jury composé de :

**Mireia PELEGRIN, DR – CHU Saint Eloi – Rapporteur**

**Stéphane PAUL, PUPH – CHU Saint Etienne – Rapporteur**

**Jerome ESTAQUIER, DR – CHU Laval – Examineur**

**Lisa CHAKRABARTI, DR – Institut Pasteur Paris – Examinatrice**

**Loredana SAVEANU, CR– Centre de Recherche sur l’Inflammation – Membre invitée**

**Morgane BOMSEL, DR – Institut Cochin/CNRS – Directrice de thèse**

**Daniela TUDOR, Senior Scientist – Institut Cochin/Université Paris Cité – Co-directrice de thèse**

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci au Dr Lisa Chakabarti d'avoir accepté de présider ce jury. Au Dr Mireia Pelegrin, au Pr Stéphane Paul, au Dr Jérôme Estaquier et au Dr Loredana Saveanu pour votre investissement temporel, ainsi qu'au pour leur œil attentif au cours de vos relectures du manuscrit, recevez nos plus sincères remerciements.

A mes directrices de thèse, Dr Morgane Bomsel et Daniela Tudor, un immense merci de vos encouragements et votre soutien inconditionnel sur tous les projets que nous avons pu aborder ensemble (et pas que pour la Science!). Daniela merci pour ton sourire, ta gentillesse et ta disponibilité au quotidien. Morgane, merci pour toutes ces discussions animées qu'on a pu avoir, elles sont la base de ma prise de recul et de patience que je saurais mettre à profit.

Un immense merci à Rémi Cheynier, sans qui je n'aurais assurément pas fait cette thèse. Merci de ta mise en contact et bonne retraite !

Un immense merci au Laboratoire d'Immunité Muqueuse et Entrée du VIH-1. Merci Yonatan pour ces discussions scientifiques rigoureuses et justes. A Jammy, Ines, Hugo et Feifan, hold on tight, the end is close! I am sure you have what it takes to make the best for your future life!

A Cecilia y Gabriela, no hemos hablado mucho (culpa mía, lo siento), pero estoy seguro de que aquí os sentiréis como en casa.

A Emmanuel et Maxime, la période sans les boyz s'est sentie pour moi et j'ai toujours su trouver cette émulation humaine et scientifique avec vous. Merci d'avoir été là

A Maxence sans qui au moins 50% du projet n'aurait pas vu le jour. Ton travail minutieux et tous les échanges qu'on a pu avoir ont vraiment fait la différence.

Un immense merci à nos collaborateurs, Benoit et Sylvain, toujours disponibles pour répondre à mes questions et m'aider quand j'en ai eu besoin. Ça a été un plaisir de travailler avec vous !

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale d'avoir financé mes 4 années de thèse, mais aussi à l'ANRS et à Sidaction pour leur soutien sur nos divers projets.

Merci évidemment aux gestionnaires, surtout Maryline, qui a toujours su trouver le temps pour répondre à mes questions (un peu cruche parfois). Tu rends chaque interaction facile et c'est toujours un plaisir de venir te voir.

Comment ne pas remercier toute la team UJC2022 ?! Cet assemblage de scientifiques, de tous domaines et expertises a été une expérience humaine et scientifique que je ne peux que recommander.

Pour ton travail de qualité dans une ambiance toujours joyeuse, merci Flora. Ça a été une super expérience de pouvoir t'encadrer et je n'ai aucun doute sur ce que tu arriveras à faire par la suite, tu es pleine de ressources.

Un immense merci à l'équipe Margottin, avec laquelle partager les repas de midi a toujours été un bon moment, pour prendre du recul et recentrer sur ce qui est important.

Evidemment, je ne peux pas oublier la cohabitation heureuse avec nos voisins du fond du couloir avec lesquels, enfin lesquelles, on a pu toujours échanger quand ça n'allait pas, mais aussi emprunter du matériel quand y'en a pas (merci pour les lamelles et le matériel d'électrophorèse).

Merci à tous ceux que j'ai pu croiser, plus ou moins longtemps, pour discuter de la science et de la vie mais surtout de la science : merci Marie, Théo, Nikaïa, Sen, Lionel, Sebastien, Manon, Suzanne, Jacques, Bénédicte, Suzanne, Lucas et probablement d'autres que j'oublie encore. Un immense merci à tous.

Parce que la thèse c'est aussi survivre sans perdre ses amis, alors je dois remercier tous ceux qui ont été là pour m'aider à voir au-delà, à m'échapper un instant. Merci Remi, Nobod, Abou, Bertrand, Boris, Kilian, Thomas (et Zozo of course). J'espère qu'on rattrapera tout ce temps où on n'a pas pu se voir autant qu'on l'aurait tous voulu !

Il me faut ne pas oublier ceux qui aussi, et surtout ces derniers mois, se sont beaucoup préoccupés de savoir si j'allais bien et avec lesquels j'ai pu forger une nouvelle amitié : merci pour

vosre gentillesse les copaines Essia, Mathis, Anaïs, Thomas, Celia, Vincent, Juliette, Matthieu, Oxana et Jocelin.

Je ne pourrais pas oublier de dire merci à ma mère et Olivier, sans qui je ne serais pas arrivé jusque-là. Merci de m'avoir soutenu même si parfois ça devait être objectivement du charabia pour vous. Le plus important c'est que c'est bon, j'ai fini !!! Merci pour votre temps et votre amour. A ma famille plus largement, merci à tous. Vous avez toujours su comprendre que ce n'était pas par plaisir que je ne pouvais pas toujours être avec vous.

Enfin, je ne peux pas oublier la personne qui a été le pilier de cette thèse, voire même les piliers. Justine, je ne pourrais jamais assez te remercier mon chat pour ton temps, ta patience, ton écoute et tout ce que tu as pu faire pour qu'on reste nous. Merci. Je t'aime.

Je voudrais dédicacer ma thèse à mes grands-parents, merci pour votre gentillesse.

## RESUME

### Titre : Compréhension des mécanismes de la protection des muqueuses contre les infections virales: cas du VIH-1 et du SARS-CoV-2

#### Résumé :

Les muqueuses sont des épithéliums formant une surface d'interaction avec le milieu extérieur et protègent l'organisme des infections qui découlent de cette interaction. Nous avons développé des approches antivirales en ciblant le virus ou l'hôte, respectivement contre le VIH-1 et contre le SARS-CoV-2.

Plusieurs études rapportent que les anticorps neutralisant à large spectre (bNAbs) injectés chez les macaques peuvent induire une protection contre l'infection SIV/SHIV qui ne dépend que de la réponse T CD8<sup>+</sup> dirigée contre le SIV/SHIV. Ceci semble indiquer un rôle de la signalisation par les FcR dans l'induction d'une réponse T CD8<sup>+</sup> dépendante des anticorps IgG. Cependant, aucune étude n'a documenté l'impact d'un bNAb au format IgA sur l'induction d'une protection à médiation T CD8<sup>+</sup>, alors que ces derniers prédominent dans les muqueuses.

Au début de cette étude nous avons démontré en utilisant comme modèle le bNAb de première génération spécifique de gp41 le 2F5, sous forme IgG (2F5-IgG) et IgA (2F5-IgA), que 2F5-IgA induit plus efficacement la phagocytose (ADCP) de cellules infectées par le VIH que sous isotype IgG. Nous avons formulé l'hypothèse que la phagocytose plus importante par les IgA anti-gp41 favoriserait la présentation d'antigènes viraux aux T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le même anticorps 2F5 (sous isotype IgG ou IgA) pour induire l'ADCP de T CD4<sup>+</sup> infectés par le VIH-1. Dans un modèle de coculture avec des T CD8<sup>+</sup> issus de patients infectés, nous avons pu montrer que seul 2F5-IgA augmente l'activation des T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1. La caractérisation précise du devenir du monocyte effecteur par des approches de RNA-seq et de cytométrie en flux nous a permis de mettre en avant que les fonctions induites par la partie Fc des IgA favorisent la différenciation des monocytes effecteurs en macrophages. Ceux-ci acquièrent un profil mixte, ce qui permet leur entraînement immunitaire. Par ailleurs, les chémokines sécrétées par les monocytes après ADCP, favorisent le recrutement de neutrophiles, monocytes et T CD8<sup>+</sup>, associés au contrôle de l'infection chez l'humain. Nos travaux

proposent un nouveau mécanisme de protection des anticorps par la phagocytose de cellules entières infectées comme source antigénique et activant le recrutement de cellules immunitaires protectrices. Ces résultats suggèrent notamment qu'une réponse IgA dirigée contre le VIH-1 pourrait conduire à la mise en place des mécanismes issus de la coopération entre les effecteurs de l'immunité innée et adaptative, renforçant l'immunité protectrice muqueuse. Ces résultats suggèrent que ce phénomène est également responsable de la protection des également que chez individus exposés aux VIH mais restant séronégatifs, qui présentent une réponse anticorps IgA muqueuse spécifique de gp41 et une réponse T CD8<sup>+</sup> spécifique du VIH-1 particulièrement active.

Le SARS-CoV-2 a émergé en 2019 et a été rapidement responsable d'une pandémie mondiale pour laquelle aucune approche thérapeutique n'a pu être mise en place efficacement. Le cycle viral se déroule en altérant le métabolisme des lipides en favorisant l'accumulation de gouttelettes lipidiques, mais aussi en parasitant la voie de l'autophagie par inhibition de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. L'activation de la protéine kinase activée par l'AMP, ou AMPK, est possible chimiquement et nous avons voulu déterminer le potentiel antiviral d'un agoniste spécifique, MK-8722. Nous avons montré in vitro que la drogue a un fort potentiel antiviral qui n'est pas associé à la mort des cellules infectées, ni à une altération de l'entrée virale, mais plutôt à une restauration du métabolisme lipidique et la complétion du flux autophagique. Cette inhibition est a été vérifiée après traitement post-infection et se traduit notamment par une restauration de la réponse interféron, essentielle au contrôle de la pathologie à SARS-CoV-2. Nos résultats permettent de proposer une nouvelle classe de molécules antivirales dans les infections virales dépendantes de l'altération du métabolisme lipidique et de l'autophagie, comme le seraient d'autres coronavirus émergents, ou les arbovirus comme le virus de Dengue ou celui de la Fièvre Jaune.

Mots clés :

IgA – ADCP – Lymphocyte T CD8 – HIV – SARS-CoV-2 – Antiviral – AMPK – lipides – autophagie

## ABSTRACT

### Title : Exploring the mechanisms of mucosal protection against viral infections: the cases of HIV-1 and SARS-CoV-2

#### Abstract :

The mucosae are epithelia that form a surface for interaction with the external environment and protect the organism from infections resulting from this interaction. We have developed antiviral approaches targeting the virus or the host, against HIV-1 and SARS-CoV-2 respectively.

Several studies have reported that broad-spectrum neutralizing antibodies (bNAbs) injected into macaques can induce protection against SIV/SHIV infection that depends solely on the CD8<sup>+</sup> T cell response directed against SIV/SHIV. This suggests a role for FcR signaling in the induction of an IgG-dependent CD8<sup>+</sup> T response. However, no study has documented the impact of IgA-formatted bNAbs on the induction of CD8<sup>+</sup> T-mediated protection, despite the fact that CD8<sup>+</sup> T-mediated protection predominates in mucosal cells.

At the start of this study we demonstrated, using the gp41-specific first-generation bNAbs 2F5 as a model, in IgG (2F5-IgG) and IgA (2F5-IgA) form, that 2F5-IgA was more effective in inducing phagocytosis (ADCP) of HIV-infected cells than IgG. We hypothesized that increased phagocytosis by anti-gp41 IgA would favor the presentation of viral antigens to HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells.

To test this hypothesis, we used the same 2F5 antibody (IgG or IgA isotype) to induce ADCP of HIV-1 infected CD4<sup>+</sup> T cells by monocytes. In a co-culture model with CD8<sup>+</sup> T cells from infected patients, we were able to show that only 2F5-IgA increased the activation of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Precise characterization of the fate of the effector monocyte using RNA-seq and flow cytometry enabled us to show that Fc-mediated functions of IgA promote the differentiation of effector monocytes into macrophages. The latter acquire a mixed profile, which enables them to undergo immune training. Furthermore, chemokines secreted by monocytes after ADCP promote the recruitment of neutrophils, monocytes and CD8<sup>+</sup> T cells, which are associated with infection control in humans. Our work proposes a new mechanism of antibody protection by phagocytosis of infected whole cells as an antigenic source and activating the recruitment of protective immune

cells. In particular, these results suggest that an IgA response directed against HIV-1 could lead to the implementation of mechanisms arising from cooperation between the effectors of innate and adaptive immunity, reinforcing mucosal protective immunity. These results also suggest the mechanism we describe here contributes to protection of HIV-1-exposed individuals that remain seronegative, which are protected by a mucosal IgA antibody response specific to gp41 and present highly active CD8<sup>+</sup> T cell response against HIV-1.

SARS-CoV-2 emerged in 2019 and was rapidly responsible for a global pandemic for which no therapeutic approach could be effectively implemented. The viral cycle takes place by altering lipid metabolism by promoting the accumulation of lipid droplets, but also by parasitising the autophagy pathway by inhibiting the fusion of autophagosomes with lysosomes. Activation of AMP-activated protein kinase, or AMPK, is chemically possible and we set out to determine the antiviral potential of a specific agonist, MK-8722. We showed in vitro that the drug has a strong antiviral potential that is not associated with the death of infected cells, nor with an alteration in viral entry, but rather with a restoration of lipid metabolism and the completion of autophagic flux. This inhibition was verified after post-infection treatment and resulted in a restoration of the interferon response, which is essential for controlling SARS-CoV-2 pathology. Our results suggest a new class of antiviral molecules for viral infections dependent on altered lipid metabolism and autophagy, such as other emerging coronaviruses, or arboviruses such as Dengue and Yellow Fever viruses.

Key words :

IgA – ADCP – CD8 T Lymphocyte – HIV – SARS-CoV-2 – Antiviral – AMPK – lipids – autophagy

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME .....	5
ABSTRACT .....	7
SOMMAIRE .....	9
TABLE DES TABLEAUX.....	15
LISTE DES ABREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION .....	19
Chapitre I : Les anticorps comme lien entre l'immunité innée et adaptative.....	20
I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 .....	20
(1) Epidémiologie.....	20
(2) La transmission du VIH-1.....	22
(3) Structure et organisation .....	23
1. Structure et génome .....	23
2. L'enveloppe du VIH-1.....	24
a) Le précurseur gp160 .....	24
b) gp120, au contact avec les récepteurs d'entrée.....	25
c) gp41, la sous-unité transmembranaire.....	26
(4) Cycle viral.....	26
1. L'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte .....	26
a) Les récepteurs et corécepteurs .....	26
(1) Le récepteur CD4.....	27
(2) Les récepteurs alternatifs .....	28
(3) Les corécepteurs au VIH-1 .....	28
b) La fusion à la membrane.....	30
2. La décapsidation et l'intégration .....	31
3. Expression du provirus.....	31
4. Bourgeonnement et transmission .....	32
a) L'assemblage des nouvelles particules virales.....	32
b) Transmission de l'infection : libre ou synapse virologique.....	33
(5) Pathogénèse et mécanismes de transmission .....	34
1. Les phases cliniques de l'infection.....	34
2. Réservoirs viraux et latence .....	36

<b>(6)</b>	<b>La réplication du VIH-1 dans les muqueuses</b> .....	38
<b>(7)</b>	<b>Les entonnoirs de transmission du VIH-1</b> .....	39
<b>II.</b>	<b>La réponse immunitaire anti-VIH-1</b> .....	40
<b>(1)</b>	<b>La réponse anticorps contre le VIH-1</b> .....	40
1.	Structure des anticorps.....	40
a)	Considérations générales.....	40
b)	Le Fab : liaison à l'antigène .....	41
c)	Le Fc : le fragment constant et la commutation de classe.....	42
d)	Isotypes et compartimentalisation immune.....	42
e)	Dichotomie : IgA et IgG .....	43
2.	Sécrétion muqueuse des anticorps.....	44
3.	Fonction de neutralisation des anticorps .....	45
a)	Neutralisation et inhibition de la transcytose.....	46
b)	Les anticorps neutralisants à large spectre.....	46
c)	Les différentes régions ciblées.....	48
(1)	Les bNAbs spécifiques de gp120.....	48
(2)	La région MPER de gp41 .....	48
(3)	Le peptide de fusion.....	50
d)	Applications thérapeutiques.....	50
(1)	Les anticorps neutralisants en thérapie.....	50
(2)	Induction par la vaccination.....	51
e)	Dichotomie bNAbs et anticorps non-neutralisants.....	54
4.	Engagement des fonctions effectrices.....	55
a)	Liaison anticorps-FcR en fonction des isotypes .....	55
b)	Le spectre d'expression des FcR dans l'organisme .....	58
c)	Signalisation induite par la liaison Fc-FcR dans les cellules myéloïdes.....	60
(1)	Les récepteurs de type I.....	60
(2)	Les FcR non-canoniques.....	62
d)	Les fonctions effectrices .....	66
(1)	Cytotoxicité dépendante du complément .....	66
(2)	Cytotoxicité dépendante des anticorps à médiation cellulaire (ADCC).....	67
(3)	Phagocytose cellulaire médiée par les anticorps (ADCP) et présentation antigénique croisée.....	68
(a)	La phagocytose médiée par les anticorps.....	68

(b)	La présentation antigénique de classe I.....	70
(c)	La présentation croisée d'antigènes .....	70
(4)	Production de ROS .....	72
(5)	Sécrétion de cytokines .....	73
(6)	Sécrétion de NETs .....	73
(7)	Trocytose.....	74
e)	Paramètres influant sur l'induction des fonction effectrices .....	74
(1)	Rôle de l'isotype.....	74
(2)	Polymorphisme du FcR.....	74
(3)	Glycosylation du Fc .....	75
(4)	Contexte cytokinique .....	75
f)	Méthodes d'étude des fonctions médiées par le Fc et leurs limites .....	76
(1)	Analyses <i>in vitro</i> .....	76
(2)	Modèles animaux.....	78
<b>(2)</b>	<b>Réponse T CD8 Cytotoxique</b> .....	78
1.	Présentation antigénique par les HLA-I protecteurs .....	79
2.	Particularités de la réponse cytotoxique associée au contrôle de la virémie .....	79
<b>(3)</b>	<b>Niveau d'activation des TCD4</b> .....	80
<b>(4)</b>	<b>Les cellules de l'immunité innée</b> .....	81
1.	Les cellules Natural-Killer .....	81
2.	Les Neutrophiles .....	81
3.	La généralisation du concept de <i>trained immunity</i> .....	82
<b>(5)</b>	<b>Cas des individus exposés au VIH mais non infectés</b> .....	84
1.	Aspects génétiques .....	84
2.	Population exposée par voie muqueuse et non-seroconvertie (ESN).....	84
a)	La réponse NK .....	85
b)	L'importance des anticorps muqueux anti-VIH-1 .....	85
c)	Rôle de la réponse T-CD8.....	86
d)	Rôle des chimiokines.....	86
<b>III.</b>	<b>Perspectives</b> .....	87
	<b>Chapitre 2 : Perturbation du métabolisme cellulaire par SARS-CoV-2</b> .....	88
<b>I.</b>	<b>Le Coronavirus 2 du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère</b> .....	88
<b>(1)</b>	<b>Émergence et taxonomie</b> .....	88

(2)	La pandémie et son contrôle .....	89
(3)	Structure de la particule virale .....	90
(4)	Organisation génomique.....	90
(5)	Emergence des variants viraux .....	91
(6)	Cycle viral.....	93
(7)	Arsenal thérapeutique .....	96
II.	Les voies de l'hôte détournées par le virus .....	97
(1)	Métabolisme des lipides .....	97
1.	Aspects généraux.....	97
2.	Rôles dans la réplication du SARS-CoV-2 .....	99
(2)	Autophagie dans les cellules infectées .....	101
1.	Présentation générale.....	101
2.	Rôles dans la réplication du SARS-CoV-2 .....	102
(3)	Echappement à la réponse interféron.....	104
III.	La piste thérapeutique de l'AMPK contre le SARS-CoV-2 .....	105
(1)	Protéine centrale de l'homéostasie énergétique.....	105
1.	Structure et fonction.....	105
2.	Ciblage pharmacologique .....	106
3.	Ciblage pharmacologique de l'AMPK contre les infections virales.....	107
IV.	Perspectives.....	109
	OBJECTIFS DE LA THESE .....	110
	RESULTATS.....	113
I.	L'ADCP de cellules infectées médiée par les IgA anti-VIH-1 conduit à la présentation croisée de l'antigène aux T CD8 <sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 et induit une immunité innée entraînée (Manuscrit 1) .....	114
(1)	Contexte .....	114
(2)	Objectifs.....	115
(3)	Résultats .....	115
II.	Mise au point d'un protocole de quantification du contenu infectieux d'échantillons infectés par le SARS-CoV-2 à l'échelle de la cellule unique (Manuscrit 2) .....	168
(1)	Contexte .....	168
(2)	Objectifs.....	168
(3)	Résultats .....	169
III.	Mécanisme antiviral de l'activation de l'AMPK contre le SARS-CoV-2 par redistribution des lipides, induction de l'autophagie et cohabitation avec la réponse T (Manuscrit 3) .....	191

(1) Contexte .....	191
(2) But de l'étude .....	192
(3) Résultats .....	192
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>246</b>
<b>I. Nouvelles propriétés antivirales dépendantes du Fc des IgA spécifiques de gp41 .....</b>	<b>248</b>
(1) Rationalisation de l'approche .....	248
(2) Mise en place d'une réponse TCD8 VIH-1 après ADCP médiée par les IgA.....	249
(3) Différenciation des monocytes en macrophages-APC après ADCP médiée par les IgA .....	250
(4) Extension du concept d'APC induite par les complexes immuns à la protection des muqueuses. .....	252
(5) L'ADCP médiée par les IgA promeut la sécrétion de chimiokines dont les fonctions chimiotactiques corrént avec la protection des individus.....	254
(6) Acquisition d'une mémoire immunitaire innée après ADCP médiée par les IgA.....	255
(7) Parallèles avec les paramètres des ESN.....	256
(8) Perspectives thérapeutiques : Ingénierie du Fc d'anticorps neutralisants d'ESN.....	257
<b>II. Caractérisation du mécanisme antiviral de l'activation de l'AMPK contre le SARS-CoV-2 par redistribution des lipides, induction de l'autophagie et promotion de la réponse T.....</b>	<b>258</b>
(1) Rationalisation de l'approche .....	258
(2) Mise au point d'un protocole de quantification du contenu infectieux d'échantillons infectés par le SARS-CoV-2 à l'échelle de la cellule unique (Article 2).....	260
(3) Application du FISH-Flow à l'étude du mécanisme antiviral de MK-8722 .....	262
(4) Etude du mécanisme d'action de MK-8722 contre le SARS-CoV-2.....	262
1. Activité antivirale de l'inhibition de la synthèse des lipides.....	262
2. Inhibition de l'infection par restauration de l'autophagie .....	263
3. Restauration de la faculté à produire de l'interféron de type I.....	264
(5) Interaction de MK-8722 et de la réponse T spécifique du virus .....	264
(6) Perspectives thérapeutiques .....	265
<b>III. Conclusion générale .....</b>	<b>267</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>269</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>309</b>
<b>Annexe 1 : Optimisation des fonctions de protections d' anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1 par génie génétique .....</b>	<b>310</b>
<b>Annexe 2 : Liste des publications réalisées au cours de la thèse .....</b>	<b>319</b>
<b>LISTE DES ELEMENTS SOUS DROIT .....</b>	<b>320</b>

## TABLE DES ILLUSTRATION

<i>Figure 1: Dispersion géographique des différents sous-types de VIH-1 et des CRF01_AE et CRF02_AG sur la surface du globe.</i>	21
<i>Figure 2: Présentation du VIH-1.</i>	24
<i>Figure 3: L'enveloppe du VIH et son précurseur gp160.</i>	25
<i>Figure 4: Le cycle viral met en jeu diverses étapes.</i>	27
<i>Figure 5 : Schéma du mécanisme impliquant l'intégrine <math>\alpha 4\beta 7</math> dans la transmission du VIH-1 d'une cellule infectée vers une cellule cible.</i>	29
<i>Figure 6 : La fusion est un processus multi-étapes suivant l'engagement de l'enveloppe avec le récepteur CD4 et corécepteur CXCR4/CCR5.</i>	30
<i>Figure 7: L'expression du provirus est l'étape clé de la production de nouveaux virions.</i>	32
<i>Figure 8 : Présentation de la synapse virologique du VIH-1.</i>	34
<i>Figure 9 : Présentation des différentes phases de l'infection par le VIH-1 chez les patients.</i>	36
<i>Figure 10 : Rôle des réservoirs viraux fonctionnels chez un individu infecté.</i>	37
<i>Figure 11: Vue générale des interactions immunologiques muqueuses au cours de l'infection par le VIH-1.</i>	39
<i>Figure 12 : Illustration des caractéristiques générales des Abs IgG et IgA.</i>	41
<i>Figure 13: Le Fab permet la liaison à l'antigène par l'exposition des boucles CDR lourdes et variables.</i>	42
<i>Figure 14: Présentation des différents sous-isotypes d'IgA et d'IgG.</i>	44
<i>Figure 15: Présentation du mécanisme de sécrétion des anticorps et leur rôle dans l'exclusion immune.</i>	45
<i>Figure 16: Identification des épitopes de l'enveloppe permettant la neutralisation cross-clade.</i>	47
<i>Figure 17 : Les bNAb seuls ni les agents de réversion de la latence seuls ne suffisent pas à diminuer le rebond chez les patients infectés.</i>	50
<i>Figure 18 : Présentation des FcR aux IgG et aux IgA.</i>	56
<i>Figure 19: Voies de signalisation des FcR.</i>	62
<i>Figure 20 : Schéma des activités antivirales induites par la liaison d'IC à TRIM21.</i>	63
<i>Figure 21 : Mécanisme de la présentation antigénique médiée par FcRn.</i>	64
<i>Figure 22 : Vue d'ensemble des fonctions effectrices induites par l'activation des FcR.</i>	67
<i>Figure 23 : Présentation des voies de chargement du CMH-I par les voies vacuolaires et du cytosol.</i>	71
<i>Figure 24 : Schéma de principe du fonctionnement de la Trained Immunity.</i>	83
<i>Figure 25 : Carte du nombre de morts de l'infection par SARS-CoV-2 par 100 000 personnes.</i>	89
<i>Figure 26 : Schéma de la structure du SARS-CoV-2.</i>	90
<i>Figure 27 : Organisation génomique du SARS-CoV-2.</i>	91
<i>Figure 28 : Représentation du cycle viral du SARS-CoV-2.</i>	94
<i>Figure 29: Représentation du métabolisme lipidique permettant la synthèse des FA et leur stockage sous forme de gouttelettes lipidiques.</i>	98
<i>Figure 30: Etapes clés du métabolisme du cholestérol dans une cellule hépatique.</i>	99
<i>Figure 31: Microscopie électronique (D) et confocale à fluorescence (D') de biopsies de patients décédés de COVID-19.</i>	100
<i>Figure 32: Représentation temporelle des étapes majeures de l'autophagie et des acteurs impliqués.</i>	102
<i>Figure 33 : Illustration des différentes étapes de l'autophagie détournées à la faveur de la réplication du SARS-CoV-2.</i>	103
<i>Figure 34 : Illustration de la mise en place de la réponse IFN-I et des protéines virales inhibitrices.</i>	104
<i>Figure 35 : Schéma de la structure de l'AMPK et des cibles en aval de son activation.</i>	106
<i>Figure 36: Présentation de MK-8722, l'activateur pan-AMPK développé par les laboratoires Merk.</i>	107

## TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Voie d'exposition et efficacité de contamination.</i>	<u>23</u>
<i>Tableau 2 : Présentation des essais vaccinaux humains contre le VIH-1.</i>	<u>52</u>
<i>Tableau 3 : Spectre d'expression des FcR dans les cellules circulantes et muqueuses.</i>	<u>59</u>
<i>Tableau 4 : Caractéristiques générales des différents VOC identifiés de 2019 à 2022.</i>	<u>92</u>

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ab : Anticorps ou *Antibody*  
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase  
ACE2 : Enzyme 2 de conversion de l'angiotensine ou *Angiotensin-Converting Enzyme 2*  
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des Abs (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)  
AMPK : Kinase active par l'AMP ou *AMPK-activated Kinase*  
APC : Cellule présentatrice de l'antigène ou *Antigen Presenting Cell*  
BCR : Récepteur des cellules B ou *B-Cell Receptor*  
bNAb : Anticorps neutralisant à large spectre ou *broadly Neutralizing Antibody*  
C1-C5 : Régions conservées 1 à 5 de gp120  
cART : Thérapie AntiRétrovirale combinée ou *combined AntiRetroviral Therapy*  
CD4bs : site de liaison à CD4 ou *CD4 binding site*  
CDR : Région déterminant la complémentarité ou *Complementarity Determining Region*  
CH : régions (de l'anticorps) constantes lourdes ou *Constant Heavy*  
CL : région (de l'anticorps) constante légère ou *Constant Light*  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
COVID-19 : Maladie du Coronavirus de 2019 ou *CoronaVirus Disease- 19*  
CPT1 : *Carnityl Palmitate Transporter 1*  
CRF : Formes Circulantes Recombinantes ou *Circulating Recombinant Forms*  
CTD : Domaine cytosolique terminal ou *Cytosolic Terminal Domain* de gp41  
CTL : Lymphocyte T cytotoxique ou *Cytotoxic T Lymphocyte*  
DAG : DiAcyl Glycérol  
DC : Cellule dendritiques ou *Dendritic Cells*  
DC-SIGN : *Dendritic Cell-specific ICAM-3 Grabbin Non-Integrin*  
DenV : Virus de la Dengue ou *Dengue Virus*  
dIgA : IgA dimérique ou *dimeric IgA*  
E : protéine d'enveloppe ou *Envelope*  
EC : Contrôleur élite ou *Elite Contoler*  
ED : Domaine extracellulaire ou *Extracellular Domain* de gp41  
ERGIC : Compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi ou *Endoplasmic Reticulum – Golgi Intermediate Compartment*  
ESN : (Individu) Exposé au VIH mais séronégatif ou *Exposed SeroNegative (individual)*  
FA : Acides Gras ou *Fatty Acids*  
Fab : fragment contenant le paratope liant l'antigène ou *Fragment of antigen binding*  
FASN : *Fatty-Acids SyNthase*  
Fc : Fragment cristallisable  
FcR : Récepteur de Fc ou *Fc-Receptor*  
FCRL : Récepteurs similaires aux FcR ou *FcR-Like*  
FISH : Hybridation *in situ* fluorescente ou *Fluorescent In Situ Hybridization*  
FR : régions charpente ou *Framework Region*  
GalCer : Galactosyl Céramide  
gp : Glycoprotéine d'enveloppe du VIH  
HMGR : 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl Coenzyme A Réductase

HR : Régions répétées d'hexades ou *Hexade Repeat*  
HTLV : Virus à Lymphome T Humain ou *Human T-cell Leukemia Virus*  
IC : Complexe Immun ou *Immune Complex*  
IFN : Interferon  
IN : Intégrase  
ISG : Gène stimulé par les IFN ou *IFN Stimulated Gene*  
IST : Infection Sexuellement Transmissible  
ITAM : Motif Immunorécepteur basé sur les Motifs Tyrosines Activateur ou *Immunorecepteur Tyrosine Activator Motif*  
ITAMi : ITAM inhibiteur  
ITIM : Motif Immunorécepteur basé sur les Motifs Tyrosines Inhibiteur ou *Immunorecepteur Tyrosine Inhibitor Motif*  
KIR : *Killer Immunoglobulin-like Receptor*  
LAMP : *Lysosomal Associated Membrane-Protein*  
LB : Lymphocyte B  
LC : Cellules de Langerhans ou *Langerhans Cells*  
LC3 : *microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3*  
LC3-B : LC3-Phosphatidyléthanolamine  
Leu : Leucine  
LPS : LipoPolySaccharide  
LTR : Répétitions longues terminales ou *Long Terminal Repeat*  
mAb : Ab monoclonal ou *monoclonal Ab*  
MadCAM : *Mucosal Addressin cell adhesion molecule*  
MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes ou *Mitogen Activated Protein Kinase*  
MAVS : *Mitochondrial AntiViral-Signaling protein*  
MERS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire du moyen orient ou *Middle Eastern Respiratory Syndrom Coronavirus*  
Met : Méthionine  
MIP : *Macrophage Inflammatory Protein*  
MPER : Région externe proximale à la membrane ou *Membrane Proximal External Region*  
MTORc : *Mammalian Target of Rapamycin complex*  
Mx1 : *Mx dynamin like GTPase*  
N : Protéine de nucléocapide ou *Nucleocapsid*  
N297 : Asparagine 297  
NAb : Anticorps neutralisant ou *Neutralizing Antibody*  
nAPC : neutrophil-APC  
NET: Piège extracellulaire neutrophilique ou *Neutrophil Extracellular Trap*  
NHP : Primate non-humain ou *Non-Human Primate*  
NK : (Cellule) *Natural Killer*  
NKR : *NK cell activation Receptor*  
NNAb : Anticorps non neutralisant ou *Non Neutralizing Ab*  
NSP : Protéine non structurale ou *Non-Structural Protein*  
OAS1 : *2'-5'-OligoAdenylate Synthetase 1*  
ONUSIDA : Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA

ORF : Phase Ouverte de lecture ou *Open Reading Frame*  
 pDC : DC plasmacytoïdes ou *plasmacytoid DC*  
 Phe : Phénylalanine  
 PI3K : : Phosphoinositide 3-kinase  
 pIgR : Récepteur des immunoglobulines polymériques ou *polymeric Ig-Receptor*  
 PL : PhosphoLipides  
 PLC $\gamma$  : PhosphoLipase C  $\gamma$   
 PrEP : Prophylaxie Pré-Exposition ou *Pre-Exposure Prophylaxis*  
 PRO : Protéase (du VIH)  
 PRR : Récepteur de reconnaissance de motif ou *Pattern Recognition Receptor*  
 RANTES *Regulated on Activation normal T-Cell Expressed and Secreted* (CCL5)  
 RBD : Domaine de liaison au récepteur ou *Receptor Binding Domain*  
 RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante ou *RNA-dependent RNA-polymerase*  
 RIG-I : *Retinoic acid-Induced Gene-1*  
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène ou *Reactive Oxygen Species*  
 RT : Transcriptase inverse ou *Reverse Transcriptase*  
 RT-qPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne précédée d'une transcription inverse ou *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*  
 S : protéine de spicule ou *Spike*  
 SARS-CoV-2 : Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère ou *Severe Acute Respiratory Syndrom CoronaVirus-2*  
 SC : Pièce sécrétoire ou *Secretory Component*  
 SDF-1 : *stromal derived factor-1*  
 SEVI : *Semen-mediated Enhancement of HIV Infection*  
 SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis  
 sIgA : IgA sécrétoire ou secretory IgA  
 Siglec-1 : *Sialic acid-binding Ig-like lectin-1*  
 T/F : (d'un virus) Transmis/fondateur ou *Transmitted/Founder*  
 TCD4 : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup>  
 TCD8 : Lymphocyte T CD8<sup>+</sup>  
 Th17 : TCD4 auxiliaire 17 ou T helper 17.  
 TMD : Domaine transmembranaire ou *TransMembrane Domain* de gp41  
 TMPRSS2 : Protéase à sérine 2 transmembranaire ou *Transmembrane Serine Protease 2*  
 Treg : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> régulateur  
 Tyr : Tyrosine  
 ULK1 : *Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1*  
 V1-V5 : Régions variables 1 à 5 de gp120  
 Val : Valine  
 VH : région (de l'anticorps) variable lourde ou *Variable Heavy*  
 VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine  
 VIS : Virus de l'immunodéficiency simienne  
 VL : région (de l'anticorps) variable légère ou *Variable Light*  
 VOC : Variants préoccupants ou *Variants Of Concern*  
 ZikV : Virus de Zika ou *Zika Virus*

## **INTRODUCTION**

## Chapitre I : Les anticorps comme lien entre l'immunité innée et adaptative

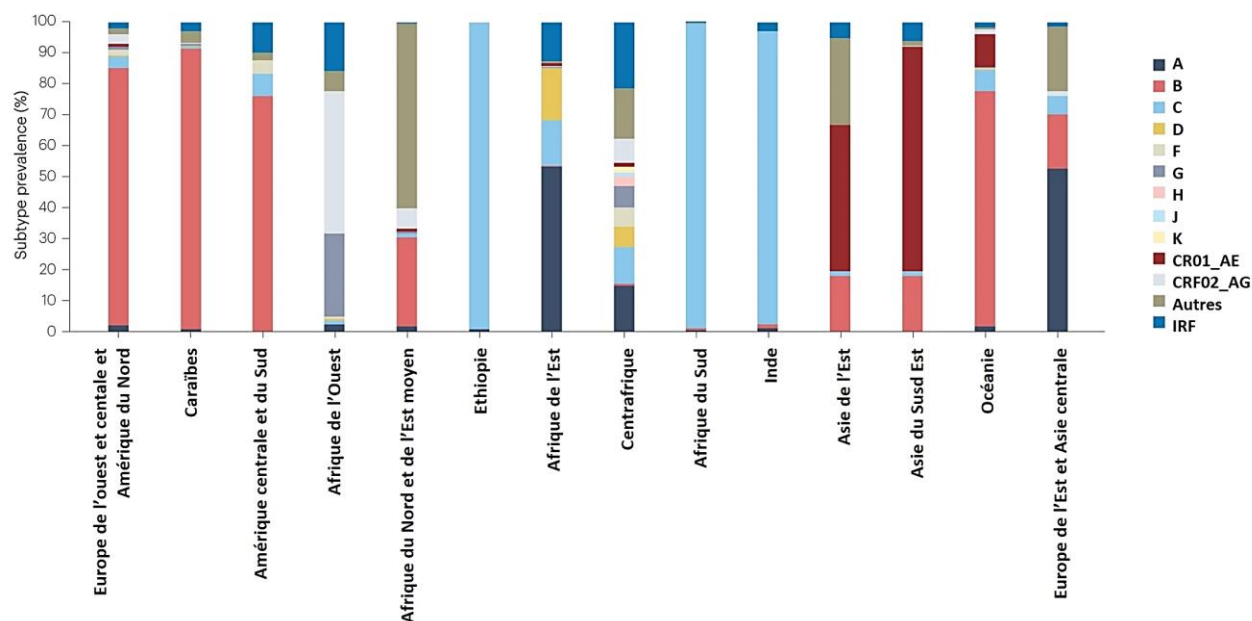
### I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1

#### (1) Epidémiologie

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est un rétrovirus du genre *lentivirus*, pour lequel les cas humains ont été premièrement décrits par les travaux de F. Barre-Sinoussi et L. Montagnier en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983), récompensés par le prix Nobel pour cette découverte en 2008. Le virus a été isolé à partir de culture des ganglions lymphatiques de patients homosexuels, contractants au cours du temps un Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise ou SIDA. Le SIDA est caractérisé par un nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (TCD4) inférieur à 350 par mm<sup>3</sup> de sang.

Initialement associé à la famille des Virus à Lymphome T Humain (*Human T-cell Leukemia Virus* ou HTLV), le VIH-1 appartient, comme l'ont montré des analyses phylogéniques, à un autre groupe de virus endémique d'Afrique, les Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) et a émergé avant les années 1960 (Faria et al., 2014; Fukasawa et al., 1988; Smith et al., 1988; Zhu et al., 1998). Le VIH-1 comprend de nombreux groupes de virus circulants à l'échelle mondiale comme présenté en **Figure 1**, originellement définis comme M, O, N et P, le groupe M étant responsable pour plus de 90% des cas mondiaux (Bekker et al., 2023). Le groupe M est lui-même divisé en clades : A, B, C, D, F, G, H, J, K et L. La répartition géographique des différents clades de VIH-1-M est hétérogène, avec le clade A le plus présent en Afrique de l'Ouest, où il est responsable de 12% des infections mondiales. En Europe, en Amérique et en Australie, c'est le VIH-1 de clade B qui circule le plus alors que le clade C est prédominant en Chine, en Inde et en Afrique et qui est responsable de 50% des cas mondiaux d'infection par le VIH (Bekker et al., 2023; Shaw and Hunter, 2012).

À cette forte diversité du groupe M, s'ajoute l'émergence de formes recombinantes (*Circulating Recombinant Forms* ou CRF) issues de la co-infection d'un individu par deux virus de deux clades différents qui recombinent lors de l'étape de transcription inverse. En effet, la reverse transcriptase du VIH-1 est connue pour faire des « sauts » sur l'ARN viral cible. Ces CRF représentent jusqu'à 20 % des cas d'infection en Asie du Sud-Est (Bekker et al., 2023; Shaw and Hunter, 2012).



**Figure 1: Dispersion géographique des différents sous-types de VIH-1 et des CRF01\_AE et CRF02\_AG sur la surface du globe.** On observe une large diversité génétique des clades circulants avec une large dominance du sous-groupe B en Europe de l'Ouest, centrale, aux caraïbes, en Amérique du Nord, centrale et du Sud. A l'inverse, l'Afrique du Sud, l'Ethiopie et l'Inde présente une majeure partie de virus de sous-groupe C alors que la CRF01\_AG prévaut en Asie de l'Est et du Sud-Est. Adapté de Bekker, 2023, Nature Reviews Disease Primers.

Le VIH est transmis principalement par voie sexuelle, le SIDA étant considéré comme une infection sexuellement transmissible (IST), mais le virus se transmet aussi par voie sanguine lors de transfusion ou de partage de matériel d'injection de drogues (Bekker et al., 2023; Centers for Disease Control (CDC), 1983). L'infection sexuelle par le VIH-1 reste un événement rare chez les individus séronégatifs avec environ 1/1000 rapport sexuel infectieux pour l'infection de l'homme et 1/200 pour la femme (Burger et al., 1986). Cette plus grande susceptibilité de l'infection des femmes se traduit par une plus grande proportion de femmes vivant avec le VIH qui représentent 63% des infections mondiales.

Une fois l'individu infecté et en absence de traitement, l'infection progresse en général vers le SIDA, bien que les traitements antirétroviraux apparus en 1985 aient changé le cours de la pandémie. Actuellement, la prise en charge des patients est largement améliorée par le développement de thérapies antirétrovirales combinées (*combined Anti-Retroviral Therapy* ou cART). Ces thérapies sont le plus souvent prescrites en combinaison trithérapique ciblant différentes étapes du cycle viral. La cART permet de contrôler la charge virale et de restaurer un nombre de TCD4 circulants chez la plupart des individus afin de rétablir un bon fonctionnement de

la réponse immune. Cependant, en dépit de trithérapies efficaces, ceux-ci ne permettent pas d'éradiquer le virus.

Ainsi, l'infection par le VIH-1 continue de progresser dans le monde. Selon le programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA), en 2022, on comptait plus de 39 millions d'individus vivants avec le VIH dans le monde, soit 1,3 million supplémentaire relativement à l'année précédente. Cette augmentation est principalement associée à la baisse des mesures préventives pendant la pandémie de COVID-19. Cependant, l'accès au traitement antirétroviral a augmenté passant de 23 millions en 2018 à plus de 29 millions d'individus traités en 2022, tout en restant inégal dans le monde. En particulier, en Afrique subsaharienne, seulement 50% des personnes vivant avec le VIH ont accès au traitement cART. Cette absence de traitement touche particulièrement les jeunes filles, lesquelles sont infectées jusqu'à 50% dans la tranche d'âge 15-25 ans (Abdool Karim et al., 2017).

Pour tenter de limiter les nouveaux cas d'infection dus à des pratiques à risque caractérisées, une prévention prophylactique préexposition (*Pre-Exposure Prophylaxis* ou PrEP) a été développée ces dernières années (Cohen et al., 2011). En France, le traitement repose en général sur la combinaison de ténofovir et d'emtricitabine (2 analogues nucléosidiques) permettant l'inhibition de la transcriptase inverse (*Reverse Transcriptase* ou RT) avant la mise en place du cycle viral. Le traitement est pris soit en continu, soit « à la demande » (2 comprimés entre 24h et 2h précédant l'acte sexuel, puis 1 comprimé 24h et un autre 48h après la première prise). Les essais cliniques tel qu'IPERGAY pour le traitement à la demande montre que la PrEP est un traitement préventif efficace en particulier pour les populations à risque (Molina et al., 2015).

## **(2) La transmission du VIH-1**

La transmission du VIH-1 est la conséquence d'un contact d'un individu à des fluides corporels d'un autre individu infecté par le VIH-1 comme le sang ou les sécrétions génitales. Même si la contamination peut avoir lieu suite à l'exposition accidentelle, à du sang contaminé dans le cas d'usagers de drogues injectables, les accidents de transfusions sont maintenant contrôlés depuis l'affaire du sang contaminé.

**Tableau 1 : Voie d'exposition et efficacité de contamination.** La contamination par accident d'exposition au sang d'un individu infecté est la voie la plus efficace, bien que quantitativement la moins importante de toutes. Adapté de Deeks, 2015, Nature Reviews.

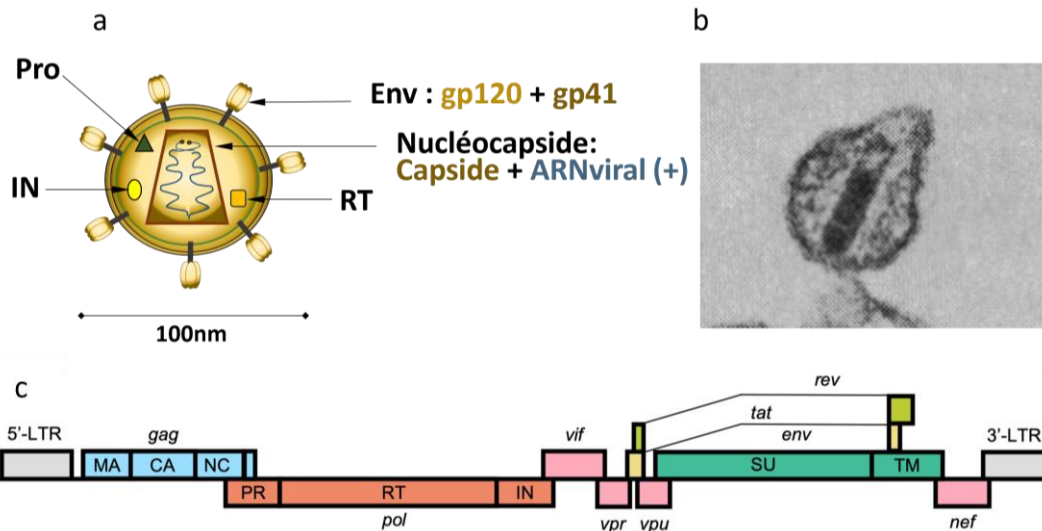
Voie d'exposition	Intervalle de confiance à 95% du nombre de contaminations par 10 000 contacts
Transfusion sanguine	8 900-9 610
Transmission au nouveau-né	41-92
Partage de matériel de drogues injectables	0-46
Sexe anal réceptif	102-186
Sexe anal insertif	4-28
Sexe vaginal réceptif	6-11
Sexe vaginal insertif	1-14
Sexe oral réceptif	0-4
Sexe oral insertif	0-4

La transmission du VIH-1 se fait principalement au niveau des muqueuses lors de rapports sexuels non protégés, la muqueuse anale/rectale étant la plus permissive (**tableau 1**). Les muqueuses péniennes et vaginales sont moins permissives à la transmission en revanche (Deeks et al., 2015). De plus, dans des régions à forte incidence comme en Afrique, en absence de traitement, la transmission mère-enfant n'est pas un cas isolée et peut avoir lieu pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement (Cardenas et al., 2023). Cependant la transmission verticale est proche de zéro quand le traitement antirétroviral a été mis en place avant la grossesse contrôlant la charge virale à < 50 copies/ml, de la conception à l'accouchement. La transmission verticale est aussi bien contrôlée par les traitements adaptés pris pendant un temps restreint avant l'accouchement et l'allaitement. La transmission verticale, bien que très pertinente pour l'épidémie à VIH-1, ne sera pas traitée ici.

### (3) Structure et organisation

#### 1. Structure et génome

Le VIH-1 appartient à la famille des *Retroviridae*, du genre *lentivirus*. Ce sont des virus enveloppés de forme sphérique de 80-120 nm de diamètre, comme présenté en **Figure 2a** et **2b**. La particule virale est recouverte d'une membrane lipidique issue de la cellule hôte. La particule virale mature contient une capsid conique qui renferme deux copies d'un génome ARN de polarité positive (+) (Bekker et al., 2023; Ramdas et al., 2020).



**Figure 2: Présentation du VIH-1.** Représentation schématique du VIH, présentant de rares tétramères d'enveloppe à sa surface, enveloppant une capsidie icosaédrique après clivage par la PRO et contenant 2 copies d'ARN (+). La particule virale contient également les enzymes virales IN, RT, nécessaires au bon déroulement de l'infection (a). Cliché de microscopie électronique à transmission issu de Gallo, 1983, Science et montrant une particule virale du VIH-1 bourgeonnant d'une cellule infectée (b). Schéma de l'organisation du génome intégré du VIH-1 (c, issu de Meissner 2022 Frontiers in Virology).

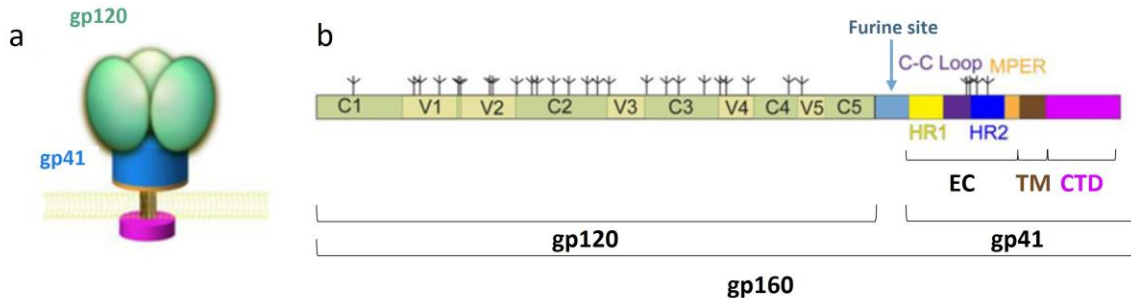
Le génome du VIH-1 est long de 9,2kb comme présenté en **Figure 2c**. De son extrémité 5' à l'extrémité 3', le génome est composé des phases ouvertes de lecture (*Open Reading Frame* ou ORF) codant les différentes protéines virales : Gag, Pol, Env, Nef, Tat, Rev, Vif et Vpr (Meissner et al., 2022). Les gènes *Gag* et *Env* codent les protéines structurales de matrice, capsidie et d'enveloppe, tandis que l'ORF *Pol* n'est source de protéine que lorsqu'un échappement du ribosome, ou *riboskip*, permet d'outrepasser le codon stop qui suit *Gag* pour produire un polypeptide Gag-Pol. La présence de Pol permet la production des protéines virales non-structurales mais encapsidées : la protéase (PRO), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Les autres gènes codent des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du génome viral et le détournement de la réponse immunitaire antivirale de l'hôte.

## 2. L'enveloppe du VIH-1

### a) Le précurseur gp160

La spicule d'enveloppe du VIH-1 est composée de trimères de dimères de la glycoprotéine d'enveloppe formée de deux sous-unités, gp120 et gp41 (**Figure 3a**), issues du précurseur gp160 (**Figure 3b**) (Chen, 2019). Gp160 est synthétisée suivant la voie sécrétoire au cours de laquelle elle subit un ensemble de modifications post-traductionnelles dont des glycosylations. Gp160 est clivée en gp120 et gp41 par une enzyme *furine-like* cellulaire à l'extrémité C-terminale du domaine

conservé C5 de gp120. Ce clivage est indispensable au pouvoir infectieux des futurs virions. Les deux sous-unités de l'enveloppe virale sont libérées puis s'associent de façon non-covalente en hétérodimères. Ceux-ci sont transportés à la membrane cellulaire où ils se regroupent en trimère d'hétérodimères pour former les spicules d'enveloppe.



**Figure 3: L'enveloppe du VIH et son précurseur gp160.** (a) L'enveloppe est composée de trimères de dimères de gp120 associée à l'extérieur du virus. (b) Le précurseur gp160 est une protéine transmembranaire, présentant de nombreux domaines fonctionnels et impliqués dans le processus de fusion médié par l'enveloppe entre les membranes virale et cellulaire. Un clivage par une furine-like cellulaire au cours du processus de sécrétion dans l'appareil de Golgi permet la séparation des sous-unités gp41 et gp120 pour former l'enveloppe. Adapté de Chen, 2019, Trends in Microbiology.

#### b) gp120, au contact avec les récepteurs d'entrée

Nommée d'après son poids moléculaire de 120kDa, la protéine de surface gp120 est la partie la plus externe de l'enveloppe virale. Elle se divise en cinq régions conservées (C1-C5) alternées par cinq régions hypervariables (V1-V5) (**Figure 3b**). Ces régions structurent la protéine en deux faces, l'une à l'extérieur, l'autre à l'intérieur permettant l'interaction avec gp41. Les domaines externe et interne sont reliés par un *bridging sheet* composé de quatre feuillets  $\beta$ , issu des boucles V1/V2 et de C4. Les régions constantes sont principalement situées sur la face interne alors que les régions variables sont situées sur la face externe (Q. Wang et al., 2020). Ainsi, gp120 peut lier CD4 par les régions C4 et C5. Ce domaine de liaison à CD4 est protégé des anticorps (Abs) grâce à des régions hautement variables situées sur les faces exposées, fortement glycosylées formant un « bouclier de glycanes ». En effet, la boucle V3 contient environ 25 sites de glycosylation, dont l'occupation peut représenter jusqu'à 50 % de la masse de gp120 (Chen, 2019; Q. Wang et al., 2020). L'organisation des régions hypervariables couplée au bouclier de glycanes diminue l'accessibilité du système immunitaire aux régions constantes, ce qui favorise l'échappement viral, notamment l'échappement aux Abs neutralisants l'infection. De plus, le bouclier de glycanes étant synthétisé par la cellule hôte, il est faiblement immunogène

(qualitativement comme quantitativement), ce qui augmente la capacité d'échappement au système immunitaire du VIH-1 (Chen, 2019; Q. Wang et al., 2020).

#### c) *gp41, la sous-unité transmembranaire*

Gp41 est la sous unité transmembranaire de l'enveloppe d'un poids moléculaire de 41kDa. La protéine contient quatre sites de glycosylation et sa séquence est très conservée entre les différents clades de virus (Liu et al., 2018; Valadés-Alcaraz et al., 2022). Cette glycoprotéine comporte trois domaines : l'ectodomaine (ED), le domaine transmembranaire (TMD) et le domaine cytoplasmique (CTD).

L'ED correspond au domaine extracellulaire de gp41. Comme présenté en **Figure 3b**, son extrémité N-terminale contient le peptide de fusion dont la séquence est très conservée (Liu et al., 2018; Valadés-Alcaraz et al., 2022). Le peptide de fusion est suivi de deux régions répétées d'hexades (*Hexade Repeat* ou HR) successives, HR1 et HR2, organisés en superhélice  $\alpha$  appelée N- et C-hélices. En aval du HR2, une région très hydrophobe de 24 acides aminés, riche en tryptophanes, nommée région externe proximale à la membrane (*Membrane Proximal External Region* ou MPER) (Liu et al., 2018) relie l'ED à la membrane virale. Cette région est la plus conservée au sein des différents clades du VIH-1. Les cinq résidus tryptophane de la MPER sont essentiels à la stabilisation de l'enveloppe (Liu et al., 2018) et à ses propriétés de fusion, notamment par l'insertion des cycles aromatiques des tryptophanes dans la membrane virale riche en cholestérol.

### (4) Cycle viral

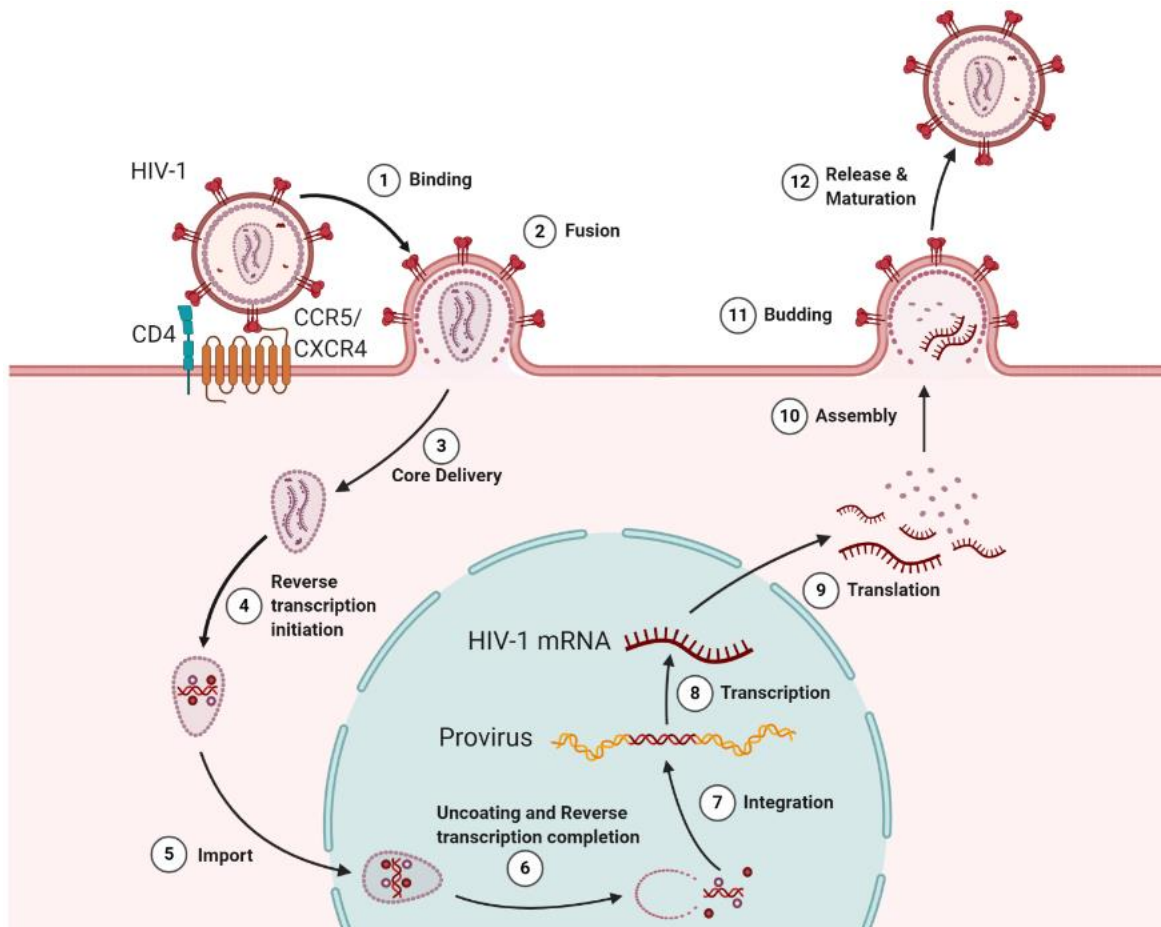
Comme présenté en **Figure 4**, le cycle viral est un processus complexe et impliquant plusieurs grandes étapes.

#### 1. L'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte

##### a) *Les récepteurs et corécepteurs*

La fusion des membranes virales et cellulaires est le processus initial du cycle viral. Ce processus découle de l'interaction de l'enveloppe avec le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4/CCR5. Les cellules ciblées par le virus sont les TCD4 activés en grande majorité, mais sont aussi les monocytes et les macrophages, les cellules de Langerhans (LC) et les cellules dendritiques

(DC). Cependant, le virus utilise aussi d'autres molécules que CD4 pour infecter ces cellules myéloïdes.



**Figure 4: Le cycle viral met en jeu diverses étapes.** Le cycle commence par la liaison du virion à son récepteur et co-récepteur (1) qui permet d'engager la fusion des membranes virale et cellulaire (2). La capside ainsi délivrée dans le cytoplasme de la cellule infectée (3) est déstabilisée pour permettre à la transcription inverse d'être initiée (4), pendant que l'ensemble capsidique, ARN viral, IN et RT est importé dans le noyau (5). La transcription s'achève dans le noyau quand la capsidique se désassemble complètement et libère un ADNdb viral, prêt à être intégré au génome de l'hôte, sous forme de provirus (7). Enfin le provirus exprime les ARNm et le génome correspondant (8) qui permettent, après leur traduction (9), l'assemblage des particules virales à la membrane plasmique (10). Les nouveaux virions bourgeonneront à la membrane pour être relargués dans le milieu extracellulaire, où la protéase virale incorporée permettra la maturation des particules virales et assure leur infectiosité. Issu de Ramdas, 2020, *Frontiers in Microbiology*.

### (1) Le récepteur CD4

CD4 est une glycoprotéine membranaire, exprimée par les TCD4, les macrophages, les monocytes, les DC et les LC. Physiologiquement, CD4 est impliqué dans la stabilisation du récepteur des cellules T (*T-Cell Receptor* ou TCR) avec le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) d'une cellule présentatrice d'antigène (*Antigen Presenting Cell* ou APC). Par sa liaison à gp120 et l'engagement du processus de fusion, CD4 est le récepteur primaire du VIH-1. Cette interaction se fait par les feuillets  $\beta$  situés entre C4 et C5 de gp120, nommé site de liaison à CD4 (*CD4 binding site* ou CD4bs).

## (2) Les récepteurs alternatifs

Le galactosyl céramide ou GalCer est un glycolipide qui peut aussi permettre l'entrée du virus dans différents tissus comme le cerveau, les intestins et certaines muqueuses génitales (Alfsen and Bomsel, 2002; Bomsel and Alfsen, 2003; Fantini et al., 1992; Yahi et al., 1994). La liaison du virus au GalCer permet au virus de traverser l'épithélium muqueux par transcytose sans infecter la cellule cible et d'être relargué dans le stroma conduisant à l'infection de cellules immunes (Alfsen and Bomsel, 2002; Bomsel, 1997).

Les lectines de type C sont des récepteurs pour le VIH en interagissant avec gp120 à la surface des DC et des LC. La lectine *Dendritic Cell-specific ICAM-3 Grabbin Non-Integrin* (DC-SIGN) est exprimée par les DC et la lectine langérine par les LC (Geijtenbeek et al., 2000; Nasr et al., 2014).

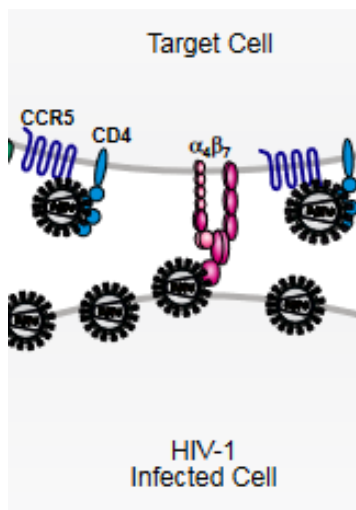
La *Sialic acid-binding Ig-like lectin-1* (Siglec-1), exprimée par les cellules myéloïdes comme les DC et les macrophages, peut aussi conduire à l'internalisation de la particule virale, indépendamment de gp120 mais plutôt dépendant de la présence de résidus de gangliosides contenant des sialyl-lactoses sur la boucle V3 (Izquierdo-Useros et al., 2012).

Enfin, l'enveloppe virale peut interagir avec les héparanes sulfates portés par des protéines d'échafaudages tels l'agrine (Alfsen et al., 2005), protéine également présente dans les synapses immunologiques, ou l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ( $\alpha 4\beta 7i$ ), dont le rôle n'est pas tout à fait clair à ce jour mais semble participer à l'efficacité d'infection (Patel 1993, Byrareddy 2014). En effet, l'expression de  $\alpha 4\beta 7i$  est augmentée dans les lymphocytes activés et destinés à élire résidence (ou faire du *homing*) au niveau muqueux.  $\alpha 4\beta 7i$  peut interagir avec l'adhésine muqueuse MadCAM (*Mucosal Addressin cell adhesion molecule*), exprimée par les cellules endothéliales intestinales. Gp120 serait un mime moléculaire de MadCAM et permettrait son interaction avec  $\alpha 4\beta 7i$  par la région V2 de gp120 (**Figure 5**) (Cicala et al., 2011). Les TCD4 muqueux et notamment les TCD4 intestinaux expriment fortement l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , ce qui favorise l'interaction avec les cellules cibles et l'internalisation du virus.

## (3) Les corécepteurs au VIH-1

CXCR4 et CCR5 sont des récepteurs couplés aux protéines G, ubiquitaires du système immunitaire et se lient aux chimiokines. CCR5 a comme ligand naturel la *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 $\alpha$ /CCL3, MIP- $\beta$ /CCL4, et le *Regulated on Activation normal T-Cell Expressed and*

*Secreted* (RANTES)/CCL5. Le ligand principal de CXCR4 est le *stromal derived factor-1* (SDF-1)/CXCL12. La liaison de gp120 à CXCR4 ou à CCR5 par la boucle V3 est la dernière étape précédant la fusion des membranes virale et cellulaire (Chen, 2019; Cicala et al., 2011).



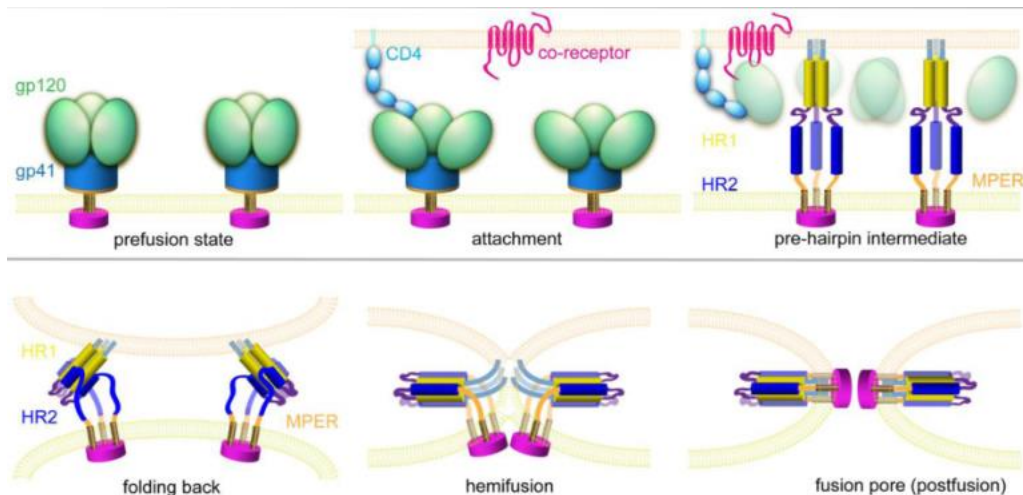
**Figure 5 :** Schéma du mécanisme impliquant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  dans la transmission du VIH-1 d'une cellule infectée vers une cellule cible. L'expression d' $\alpha 4\beta 7$  permet un relais plus efficace de virus infectieux d'une cellule infectée vers un TCD4 cible, qui peut ensuite interagir plus favorablement avec son récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4/CCR5. Adapté de Cicala, 201, *The Journal of Translational Medicine*.

Depuis la découverte des corécepteurs CXCR4 et CCR5, les virus utilisant CXCR4 sont dit X4-tropiques et ceux utilisant CCR5 sont appelés R5-tropiques (Bekker et al., 2023). Certains virus peuvent aussi présenter ce double tropisme et sont nommés dual-tropique ou X4/R5. Il est important de noter que ce sont principalement des virus R5 qui permettent la transmission sexuelle (Bekker et al., 2023). Au cours de l'infection de l'individu et en absence de traitement, l'évolution du nuage de quasi-espèces conduit à une évolution du tropisme du virus vers un tropisme X4/R5 ou X4 exclusif. Le gain de tropisme pour X4 est associé à une pathologie plus sévère (Bekker et al., 2023). Au niveau moléculaire, l'enveloppe des virus R5-tropiques conserve les résidus glycosylés 6 et 8 dans V3 et présente une charge diélectrique moins élevée que celle des virus X4-tropiques (Grivel et al., 2011).

Chacun des ligands naturels de CXCR4 et CCR5 inhibe de manière compétitive la liaison de l'enveloppe au corécepteur correspondant, ce qui bloque l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles et limite l'infection productive (Handen and Rosenberg, 1997; Jansson et al., 1996; Schols et al., 1997).

## b) La fusion à la membrane

La fusion du virus à la membrane plasmique est un processus multi-étape qui découle de l'interaction et l'adhésion de l'enveloppe aux récepteurs et co-récepteurs (**Figure 6**). Au cours de ce processus, l'enveloppe transitionne d'une conformation pré-fusion où gp41 est coiffée de gp120 à celle de *post-fusion* où gp41 et gp120 sont séparées (Chen, 2019). La liaison séquentielle de gp120 à CD4 puis au co-récepteur (CXCR4 ou CCR5 en fonction du tropisme) démasque le peptide de fusion de gp41. Ceci s'accompagne du déploiement des régions HR1 et HR2 vers la membrane de la cellule cible, permettant au peptide de fusion de s'insérer dans celle-ci (Chen, 2019). Les domaines HR1 et HR2 se rassemblent ensuite pour former un faisceau de six hélices torsadées qui permet de rapprocher les membranes virale et cellulaire, puis, après leur fusion, de former un pore stable. La fusion des membranes engage l'extension du pore et la libération de la capside dans le cytoplasme de la cellule cible.



**Figure 6 :** La fusion est un processus multi-étapes suivant l'engagement de l'enveloppe avec le récepteur CD4 et corécepteur CXCR4/CCR5. L'enveloppe se trouve initialement en état pré-fusion, où gp120 est coiffée de gp41, permettant la liaison à CD4, démasquant la région V3 de liaison au corécepteur et du peptide de fusion de gp41 et déployant HR1 et HR2 vers la membrane de la cellule cible. Les domaines HR1 et HR2 se rétractent ensuite pour s'assembler et permettre la fusion des membranes, atteinte lors de l'état post-fusion où les HR1 et HR2 forment un 6-helix bundle. Issu de Chen, 2019, Trends in microbiology.

Le processus de fusion, par changements de conformation séquentiels, permet l'exposition d'épitopes dits « neutralisants » qui pourront être ciblés par la réponse humorale. La caractérisation de ces épitopes « neutralisants » constitue un domaine d'étude particulièrement important pour le développement d'inhibiteurs de fusion pour la clinique.

## 2. La décapsidation et l'intégration

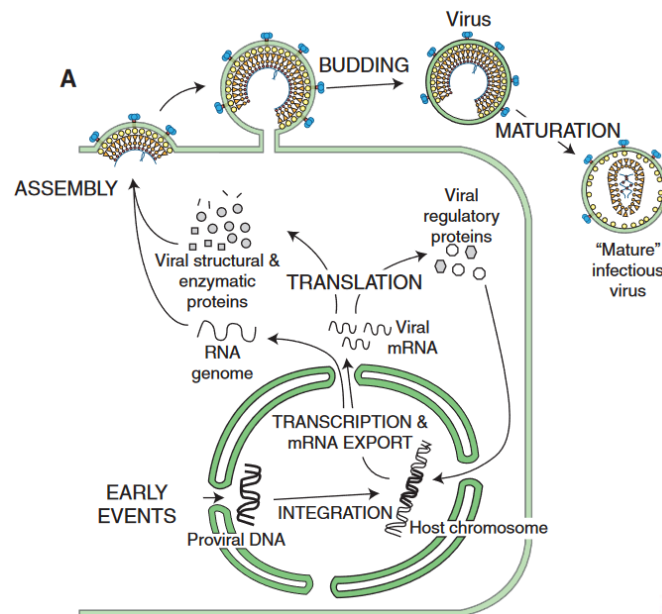
Le relargage de la capsidation dans le cytoplasme déstabilise la capsidation virale pour y permettre l'activation de la RT et l'entrée de nucléosides triphosphates. La RT génère un ADN double brin (ADNdb) à partir de l'ARN viral utilisée comme matrice et après initiation sur un ARNt. Cette étape est à l'origine de la forte diversité génétique du virus causée par les erreurs de polymérisation de la RT qui ne sont pas corrigées, mais surtout de la faculté de la RT de sauter d'un brin d'ARN à l'autre ou celui d'un autre virus infectant la cellule, générant ainsi des formes recombinantes (Bekker et al., 2023; Hu and Hughes, 2012). La RT est partielle et se termine lors de l'import nucléaire de la capsidation avec l'ADN viral naissant. Le maintien de l'interaction avec la capsidation pourrait notamment permettre d'éviter la reconnaissance par les protéines de l'immunité intrinsèques telle que cGAS et la mise dans un état antiviral sous-jacent (Shen et al., 2021). L'ADNdb, flanqué des répétitions longues terminales (*Long Terminal Repeat* ou LTR) est ensuite intégré dans le matériel génétique de la cellule hôte (Hu and Hughes, 2012). L'ADN viral intégré sera nommé provirus (Ramdas et al., 2020).

## 3. Expression du provirus

L'expression du provirus à partir du LTR 5' constitue l'unique promoteur viral (Ramdas et al., 2020). La transcription démarre à bas bruit dès l'intégration et donne tout d'abord naissance aux ARNm poly-épissés permettant la production des protéines Tat, Nef et Rev (Emery and Swanstrom, 2021; Ramdas et al., 2020). Tat est le transactivateur viral et interagit avec les acteurs nucléaires impliqués dans la transactivation du promoteur LTR, permettant d'augmenter le nombre d'ARNm viraux produits. Rev diminue leur épissage afin de produire les ARNm de gag, pol, env, vpr, vpu et vif qui ne sont pas produit autrement (Emery and Swanstrom, 2021).

Comme présenté en **Figure 7**, le précurseur de l'enveloppe virale gp160 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis adressé à la voie sécrétoire. Les protéines s'associent ensuite en trimères et sont transportées vers la membrane plasmique (Sundquist and Krausslich, 2012). Afin d'éviter l'interaction entre le CD4 exprimé à la surface de la cellule et des protéines d'enveloppe, les protéines Vpu et Nef interagissent avec la partie cytoplasmique de CD4. Ceci entraîne la diminution de l'expression de CD4 en surface, prévenant ainsi l'infection ultérieure de la cellule déjà infectée par d'autres virus (Bekker et al., 2023; Kwon et al., 2020). Au cours de la traduction

de Gag on observe un décalage du cadre de lecture (*ribosomal frameshift*), qui entraîne la production d'une polyprotéine Gag-Pro-Pol (Ramdas et al., 2020). Ce phénomène finement régulé permet la génération en quantité suffisante de la protéase virale, de la RT et de l'IN qui seront incorporées dans les particules virales néoformées. RT et IN ainsi synthétisées sont adressées à la membrane plasmique pour être encapsidées dans les particules virales qui bourgeonnent à la membrane (Sundquist and Krausslich, 2012).



**Figure 7: L'expression du provirus est l'étape clé de la production de nouveaux virions.** Les ARNm sont d'abord poly-épissés pour produire les ARN des protéines accessoires dont Rev, qui, une fois au noyau promeut l'épissage unique ou son absence afin de générer les ARNm de Gag et correspondant au génome viral. Les polyprotéines de Gag, les protéines accessoires encapsidées et l'ARN génomique se rassemblent afin de permettre le bourgeonnement des nouveaux virions. Issu de Sundquist and Krausslich, 2012, Cold Spring Harbor Perspective in Medicine.

#### 4. Bourgeonnement et transmission

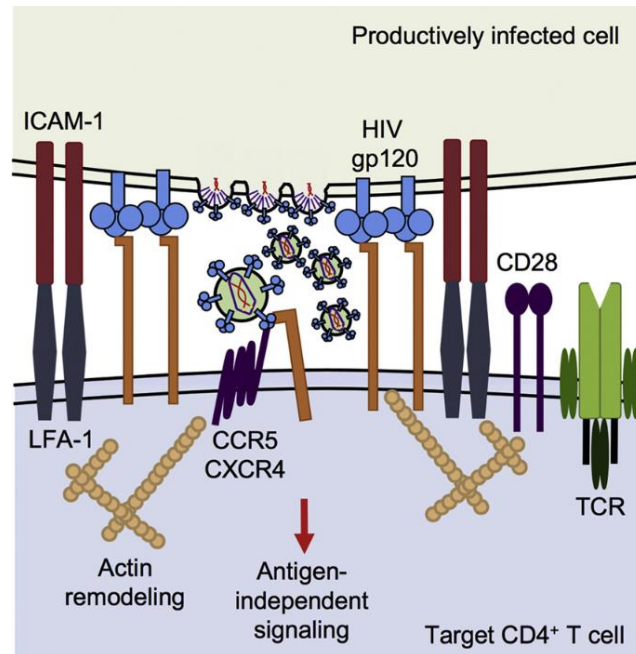
##### a) L'assemblage des nouvelles particules virales

Les ARN génomiques viraux s'associent à la capsidie dans le cytosol puis à l'enveloppe insérée dans la membrane plasmique de la cellule de hôte et aux autres protéines de cette membrane (Sundquist and Krausslich, 2012). Cette association ribonucléoprotéique force la courbure de la membrane et permet le bourgeonnement des nouveaux virions immatures dans le milieu extracellulaire (**Figure 7**). Pour être infectieux, les particules virales immatures néoformées doivent devenir matures suite au clivage protéolytique séquentiel par la protéase virale des polyprotéines Gag et Gag-Pol en domaines protéiques matures (Sundquist and Krausslich, 2012).

### b) *Transmission de l'infection : libre ou synapse virologique*

Comme pour celle de beaucoup de virus, la transmission du VIH-1 est initialement décrite pour l'infection de cellules cibles par des virus libres. Cependant, les expériences de multiples laboratoires ont montré depuis longtemps que le virus était beaucoup plus efficacement transmis si la cellule infectée pouvait établir un contact avec la cellule cible que par des virus libres (Shaw and Hunter, 2012). Cette efficacité a finalement été systématiquement décrite et le contact cellule infectée - cellule cible a été dénommé synapse virologique. *In vitro*, l'infection par la synapse virologique est alors 100 à 1000 fois plus efficace que par un virus libre et serait la voie principale d'infection *in vivo* (Alfsen et al., 2005; Hübner et al., 2009; Zhong et al., 2013). Les études sur la synapse virologique ont permis de mieux disséquer la transmission muqueuse, où, des cellules infectées sont systématiquement véhiculées par les fluides génitaux. Dans ce contexte de fluides génitaux, mais aussi lors de la production de virus *in vitro* dans le milieu de culture, la majorité des virus libres ne sont pas infectieux, ce qui rend l'étude des mécanismes de transmission de cellule à cellule particulièrement pertinent (Alfsen et al., 2005; Bomsel and Alfsen, 2003; Cicala et al., 2011; Hübner et al., 2009; Shaw and Hunter, 2012; Zhong et al., 2013). Parmi les modes de transmission de cellule à cellule, la synapse virologique est la plus efficace. Son appellation vient de l'analogie 1) avec la synapse neuro-musculaire, et 2) la synapse immunologique (**Figure 8**). Beaucoup des mécanismes d'interaction sont identiques entre les différentes synapses : intégrine, protéines d'échafaudage (agrin), *clusterisation* à la périphérie du contact, ce qui permet le bourgeonnement dans l'espace intra-synaptique (Alfsen et al., 2005; Ganor et al., 2010; Hübner et al., 2009; Jolly et al., 2004; Pedro et al., 2019; Fernando Real et al., 2018).

Les molécules d'adhésion de la cellule infectée interagissent avec celles de la cellule cible pour stabiliser l'interaction des deux cellules et engager le réarrangement du cytosquelette sous-jacent dans la cellule cible permettant au virus de polariser son bourgeonnement vers l'espace synaptique (Alfsen et al., 2005; Hübner et al., 2009; Jolly et al., 2004; Pedro et al., 2019). Le virus est libéré dans la synapse puis est ensuite internalisé et soit il infectera la cellule après fusion en intracellulaire après liaison de gp120/gp41, soit il traverse la cellule épithéliale par transcytose (sans infection) (Alfsen et al., 2005; Calado et al., 2023; Hübner et al., 2009; Jolly et al., 2004; Pedro et al., 2019; Zhong et al., 2013).



**Figure 8 : Présentation de la synapse virologique du VIH-1.** La cellule infectée exprime à sa membrane des protéines de l'enveloppe du VIH, permettant une interaction forte avec une cellule cible exprimant CD4, mais aussi CXCR4/CCR5. Cette proximité permet la génération d'une synapse virologique, structurée notamment par le jeu d'interaction LFA-1/ICAM-1 mais aussi le remodelage sous d'actine sous-corticale. Ces remodelages favorisent le bourgeonnement et la transmission du virus dans cet espace de forte proximité et favorable à l'infection. Issu de Pedro, 2019, *Virus Research*.

## (5) Pathogénèse et mécanismes de transmission

### 1. Les phases cliniques de l'infection

Au cours de l'infection, quatre phases sont observées chez les individus infectés par le VIH-1. Différents paramètres tels que la virémie (charge virale plasmatique), le nombre de TCD4 et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (TCD8) circulants et la présence d'Abs spécifiques du VIH-1 conditionnent l'efficacité de l'infection et reflètent son avancement (**Figure 9**). Les mêmes phases d'infection sont observée chez les individus sous cART, mais la cinétique d'infection n'est pas la même (Bekker et al., 2023; Deeks et al., 2015).

(i) La première phase dure environ 2 à 3 semaines et est définie comme l'éclipse virale. Le virus est indétectable en dépit d'une infection des cellules immunitaires sentinelles locales et des TCD4 muqueux suite à la transcytose du virus à travers les muqueuses génitales. Le virus se dissémine à bas bruit dans la circulation par les ganglions lymphatiques. Cette étape permet la mise en place des réservoirs viraux suite à l'infection de cellules mémoires résidentes et des macrophages des tissus muqueux (Ganor et al., 2019). Que l'infection soit muqueuse ou sanguine,

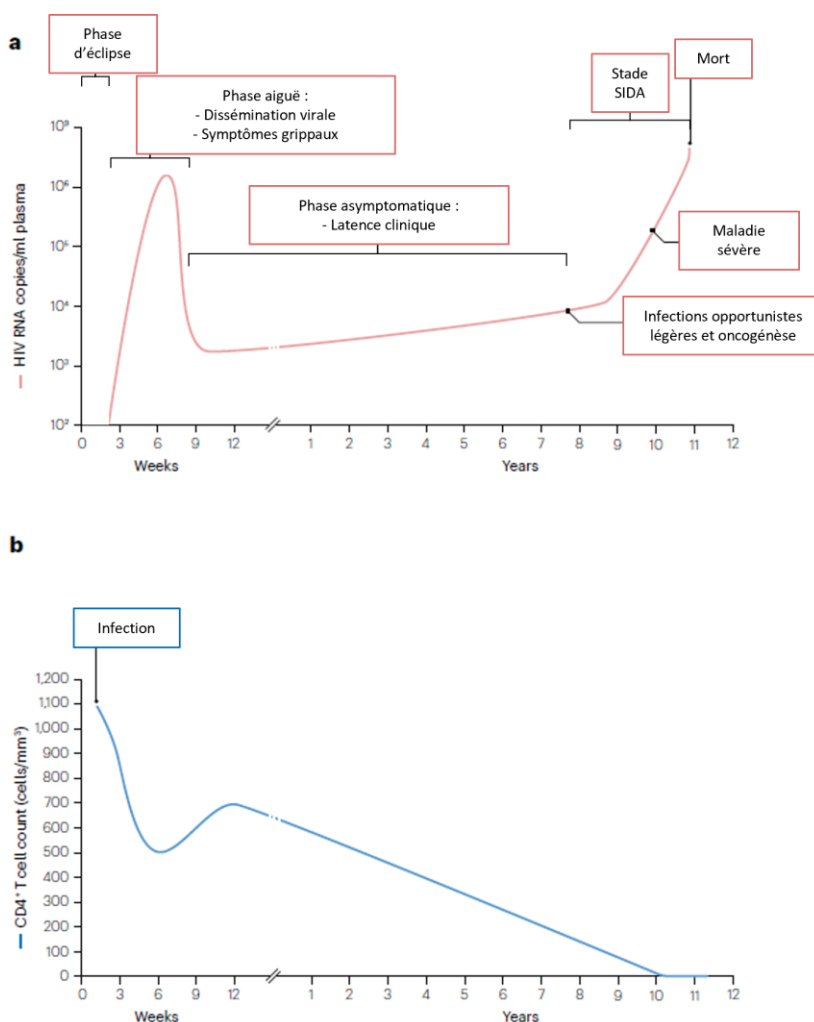
le virus établi aussi des réservoirs dans les TCD4 des tissus intestinaux, détectables après 3 semaines d'infection.

(ii) La phase aiguë suit la phase d'éclipse et dure 6 semaines. Elle se caractérise par un pic de virémie élevé avec des valeurs supérieures à  $10^7$  copies d'ARN viral par ml de sang. Les ganglions lymphoïdes drainant le site d'infection sont aussi gorgés de TCD4 infectés, issus de la circulation. Des symptômes grippaux (fièvre, courbatures, ... etc) dus à une forte activation immunitaire accompagnent la réplication virale et la production d'Abs anti-VIH-1. Cette séroconversion permet d'évaluer l'infection des individus. La séroconversion est détectable à partir d'environ 2 semaines après infection par les tests de cinquième génération alors que l'ARN viral est déjà détectable à partir de dix jours post-infection (Bekker et al., 2023). Les réponses TCD8 et TCD4 spécifiques du VIH-1 deviennent aussi détectables pendant la phase aiguë. Cependant, une forte activation immunitaire est favorable à l'infection des TCD4 par le VIH-1, car elle aboutit à une augmentation du nombre de cellules cibles disponibles et permissives à l'infection. La chute de la virémie et un amorçage de la diminution du nombre de TCD4 caractérisent la fin de cette phase. Cette phase est associée à un contrôle immunitaire plus efficace et le déclin du nombre de cibles disponibles et activées.

(iii) La phase suivante dite asymptomatique, ou phase chronique, dure plusieurs années (de 5 à 10 ans en l'absence de traitement). La virémie est stable au cours de cette phase, évoluant entre 1 et  $10^5$  copies d'ARN viral par ml de sang. En conséquence, le nombre de TCD4 circulant diminue progressivement alors que la réponse TCD8 persiste. Durant cette phase, chaque nouvelle infection due à un pathogène autre que le VIH et contractée par l'hôte entraînera l'activation des TCD4 mémoires infectés. Cette activation réactivera la réplication et la production de virus, ce qui participera à la persistance du virus, sa dissémination et la progression des individus vers le stade SIDA.

(iv) A l'issue de cette phase qui peut durer des années, l'individu entre dans la phase symptomatique ou SIDA, correspondant à la fois à un épuisement du système immunitaire et à un état pro-inflammatoire prolongé. Finalement, la diminution du nombre de TCD4 ayant atteint environ 200 par ml de sang se traduit par une immunodépression et l'incapacité des individus à combattre les futures infections, notamment opportunistes. Cette phase se caractérise par une

chute des Abs anti-VIH-1 et une augmentation constante de la virémie, jusqu'à la mort du patient causée par des infections opportunistes ou le développement de cancers.

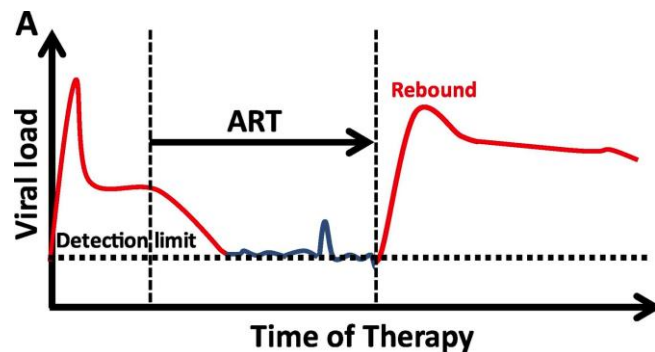


**Figure 9 : Présentation des différentes phases de l'infection par le VIH-1 chez les patients.** (a) Au cours de l'infection, la charge virale plasmatique est d'abord indétectable (éclipse), puis augmente pendant la phase symptomatique, et redescend. La charge virale augmente progressivement pendant la phase de latence et, lors de la phase SIDA, la charge virale augmente à nouveau. (b) Le nombre de TCD4 circulants diminue au cours du temps lors de la phase d'éclipse, correspondant à leur attraction dans les ganglions. Leur nombre augmente à nouveau durant la phase symptomatique mais ne retrouve pas le niveau initial. Le nombre de TCD4 chute à partir de ce moment jusqu'au décès du patient. Adapté de Bekker, 2023, Nature Reviews Disease Primers.

## 2. Réservoirs viraux et latence

Les réservoirs viraux sont formés dès les premiers jours d'infection, notamment par l'infection des cellules à longue durée de vie comme les TCD4 mémoires et les macrophages tissulaires (Bekker et al., 2023; Ganor et al., 2019). L'infection des TCD4 mémoires nécessite cependant que l'infection ait eu lieu lors de la transition d'un phénotype activé vers un phénotype mémoire durant laquelle l'ADN viral peut s'intégrer dans l'ADN cellulaire et initier la mise en place de la latence (Bekker et al., 2023; Ramdas et al., 2020). La notion de réservoirs viraux repose sur la

capacité du virus à persister dans la cellule hôte (phase de latence), c'est-à-dire de ne pas/ou peu exprimer de gènes viraux, bien que son génome soit intégré dans celui de la cellule hôte. Le traitement cART induit la latence dans les TCD4, alors que celle-ci se met en place dans les cellules myéloïdes infectées en absence de traitement (Bekker et al., 2023). Ces cellules infectées et latentes sont faiblement actives transcriptionnellement ce qui ne permet pas la production de nouvelles particules virales mais de quelques transcrits viraux, au moins dans les lymphocytes réservoirs (Elsheikh et al., 2019; Ramdas et al., 2020). Les macrophages réservoirs contiennent des particules virales infectieuses dans un compartiment intracellulaire appelé le compartiment contenant des virus (Ganor et al., 2019; Real et al., 2022). La dynamique du virus dans ces cellules myéloïdes réservoirs reste à étudier. Cette transcription à bas bruit permet d'éviter les effets cytopathiques de l'infection, et d'activer le système immunitaire tout en préservant le génome viral qui sera prêt à produire à nouveau du virus, en cas de réactivation par des agents inversant la latence ou en levant le traitement cART, comme présenté en **Figure 10** (Bekker et al., 2023; Deeks et al., 2015; Elsheikh et al., 2019). La réactivation des TCD4 mémoires ou des macrophages réservoirs se traduit par une augmentation de la concentration en nucléotides triphosphates cellulaires utiles à la transcription des gènes de la réponse immunitaire. Ces nucléotides permettent l'activation transcriptionnelle des gènes viraux, la génération d'ARNm correspondants et la formation de particules virales, ce qui entraîne un rebond de l'infection par le VIH-1 (Bekker et al., 2023; Elsheikh et al., 2019).



**Figure 10 : Rôle des réservoirs viraux fonctionnels chez un individu infecté.** Après la phase aiguë, le traitement cART est initié, généralement pendant la phase de latence. Le virus est contrôlé par les actions antivirales combinées et la charge virale est indétectable. Pendant ce temps les patients ne sont pas infectieux, mais, s'ils arrêtent le traitement cART, alors la réplication virale reprend et la charge virale devient détectable, c'est le rebond viral. Adapté de Elsheik, 2019, eBioMedecine.

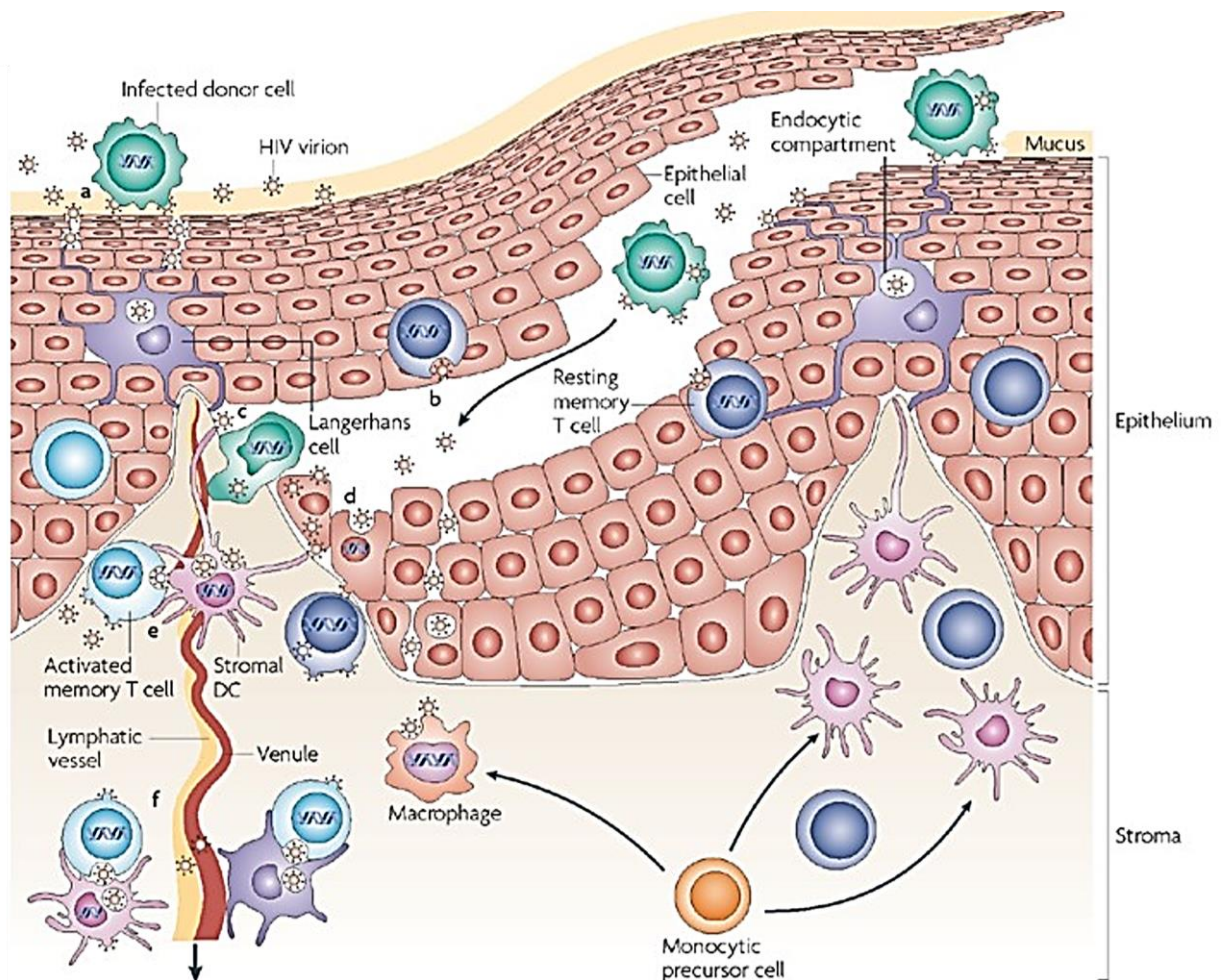
## (6) La réplication du VIH-1 dans les muqueuses

Les muqueuses génitales et rectales constituent la porte d'entrée principale du VIH-1 au cours de rapports sexuels non protégés. Cependant, la barrière physique, fonctionnelle et chimique que représentent l'épithélium muqueux et les sécrétions contenant des Abs et des facteurs de l'immunité innée permettent de prévenir l'infection par des pathogènes. Chacune de ces muqueuses est également différente quant à sa composition en cellules immunitaires. Ceci impacte le mécanisme d'entrée du VIH-1. Après la pénétration dans l'épithélium, le virus infecte les macrophages, les DC et les LC mais aussi les TCD4 activés et recrutés au site d'infection ainsi que les TCD4 Th17 mémoires et effecteurs résidents des sous-muqueuses (**Figure 11**) (Gonzalez et al., 2019, 2016; Veazey et al., 2001).

Dans les sécrétions génitales, le virus est présent sous forme libre ou dans des cellules infectées qui, en formant des synapses virologiques, permettent une transmission efficace à l'épithélium (Alfsen et al., 2005; Anderson et al., 2010; Gonzalez et al., 2019; Politch et al., 2014). Dans le sperme le virus est présent sous forme libre ou dans les cellules immunes infectées y compris chez les individus sous cART (Houzet et al., 2014; POLITCH et al., 2012). Bien que certains facteurs du semen, comme le *Semen-mediated Enhancement of HIV Infection* (SEVI), soient capables de faciliter l'infection le laboratoire a pu montrer que cette observation n'est pas généralisable et que le sperme de certains individus peut favoriser l'infection alors que d'autre l'inhiberont (Ganor et al., 2010).

Le mucus sécrété par les muqueuses vaginales peut aussi jouer un rôle antiviral dû à la présence de facteurs solubles comme les défensines ou les mucines, mais aussi par sa densité qui ralentit virus et cellules infectées dans leur trajet vers l'épithélium (Anderson et al., 2010; Gonzalez et al., 2019; Kumamoto and Iwasaki, 2012). Ce mécanisme de protection est particulièrement efficace contre le virus libre qui ne peut pas rester infectieux longtemps une fois sécrété.

Le virus libre ou les cellules infectées de l'inoculum peuvent accéder directement à la sous-muqueuse à travers une brèche quand la muqueuse est endommagée lors de rapports sexuels ou de manifestations cliniques d'IST mutilantes. Cependant, comme évoqué plus tôt, le VIH-1 peut traverser les épithéliums intacts par transcytose.



**Figure 11: Vue générale des interactions immunologiques muqueuses au cours de l'infection par le VIH-1.** Le virus peut être transmis au travers de l'épithélium via transcytose ou par les cellules myéloïdes sous-jacentes (LC/DC) qui vont pouvoir transmettre le virus aux TCD4 sous-jacents par trans-infection. Les LC/DC peuvent aussi migrer dans les ganglions pour infecter les TCD4 et les activer pour induire leur homing muqueux, favorisant la génération de réservoirs tissulaires. Enfin les cellules infectées transmises par les fluides génitaux peuvent aussi traverser les brèches de l'épithélium (autre IST mutilante, rapport sexuel) et infecter les cellules cibles de la même manière que précédemment. Adapté de Gonzalez, 2019, *Frontiers in Immunology*.

## (7) Les entonnoirs de transmission du VIH-1

Si la diversité virale au sein d'un individu infecté peut être très importante et ainsi être décrite comme un nuage de quasi-espèces, un très faible nombre de virus est responsable de l'infection d'un individu. Ces virus, appelés « transmis/fondateur » (*Transmitted/Founder* ou TF), sont sélectionnés en plusieurs étapes avant et au tout début de l'infection de l'individu receveur. Les mécanismes de sélection ne sont pas tous élucidés et l'impact d'une sélection aléatoire n'est pas mesurable (Deeks et al., 2015; Margolis and Shattock, 2006; Shaw and Hunter, 2012). Plus récemment, le rôle neutralisant de l'infection des souches X4 tropiques par la spermine du sperme a été montré *in vitro* (Harms et al., 2023).

## II. La réponse immunitaire anti-VIH-1

L'immunité innée et adaptative constituent les deux pans de la réponse contre le VIH-1. La réponse immunitaire spécifique qui permet le contrôle de la multiplication du virus est rapidement mise en place par la coordination entre les APC et les TCD4, TCD8 et lymphocytes B (LB) dès le début de l'infection mais n'éradique pas le virus et ne prévient pas l'évolution de l'infection. Le VIH-1 évolue rapidement et échappe constamment à la réponse immunitaire suppressive et finalement, l'infection affaiblit et détruit graduellement le système immunitaire.

L'ensemble de ces fonctions sont impliquées dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 et constituent des pistes de recherche thérapeutiques et vaccinales primordiales dans les stratégies antivirales. Pour la suite, nous nous concentrerons sur la réponse Abs et nous évoquerons les cas particuliers de réponses immunitaires protectrices ou associées à des statuts cliniques particuliers afin de faire ressortir les mécanismes thérapeutiques et vaccinaux potentiels.

### (1) La réponse anticorps contre le VIH-1

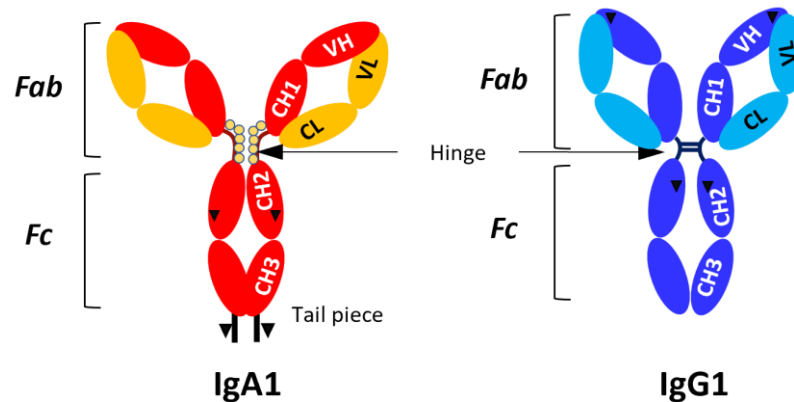
#### 1. Structure des anticorps

##### a) *Considérations générales*

Les Abs sont des glycoprotéines solubles sécrétées par les plasmocytes, issus de la différenciation des LB. La survie des LB mémoires au niveau des organes lymphoïdes permet une activation plus rapide de la réponse B lors d'une rencontre ultérieure avec le pathogène. Les plasmocytes quant à eux peuvent migrer soit dans la moelle osseuse soit dans la rate ou les ganglions lymphatiques pour permettre la sécrétion locale ou systémique des Abs de haute affinité pendant plusieurs mois en l'absence de toute division cellulaire ou de réexposition à l'antigène d'origine.

Ils présentent de manière générale une forme en « Y » et sont composés de deux chaînes lourdes de 50kDa et deux chaînes légères de 25kDa reliées par des ponts disulfures (Edelman, 1973; Porter, 1959). Les chaînes légères sont toujours composées d'une région variable légère ou VL en position N-terminale et d'une partie constante ou CL en position C-terminale qui peuvent être de

nature kappa ou lambda. Les chaînes lourdes peuvent être de 5 types,  $\alpha$ ,  $\Delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$  et leur nature définit 5 isotypes d'Ig : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les chaînes lourdes sont aussi définies par une région variable lourde (*Variable Heavy* ou VH) en N-terminale et trois régions constantes lourdes (*Constant Heavy* ou CH) de 1 à 3 en C-terminale.



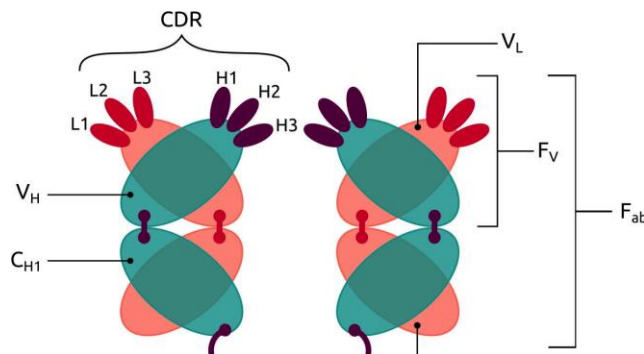
**Figure 12 : Illustration des caractéristiques générales des Abs IgG et IgA.** Les IgA et les IgG présentent la même organisation générale : Fab-hinge-Fc. Cependant, les IgA présentent des O-glycosylations dans la région hinge (cercles jaunes) et de rares N-glycosylations dans la partie C-terminale du CH2, alors que les IgG ne présentent que des N-glycosylations en N297. Les IgA présentent une queue C-terminale (tail piece), impliquée dans l'homodimérisation des IgA tête bêche pour générer les IgA dimériques, pré-sécrétoires. Adapté de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*

Comme présenté en **Figure 12**, les Abs sont divisés en deux parties fonctionnelles : i) le fragment contenant le paratope liant l'antigène (*Fragment of antigen binding* ou Fab) formé par l'appariement des régions VL et CL avec les régions VH et CH1 respectivement, et ii) le Fragment cristallisable (Fc) issu de l'arrangement homotypiques des régions CH2 et CH3 des deux chaînes lourdes. Le Fc se lie aux récepteurs aux Fc, les FcR, exprimés principalement sur les cellules immunitaires innées. Cette liaison est nécessaire à l'induction des fonctions effectrices, discutées plus loin. Le Fab et le Fc sont reliés par une région dite charnière (*hinge*) située entre les domaines CH1 et CH2, qui est variable entre les isotypes et au sein des isotypes bien qu'elle reste assez souple et riche en prolines et cystéines (Tonegawa, 1983).

### b) *Le Fab : liaison à l'antigène*

Le paratope est situé sur les extrémités N-terminales des Abs (extrémités « hautes » de la configuration en Y des Abs) et reconnaît l'épitope spécifique de l'Ab, que cet épitope soit linéaire ou conformationnel. Au niveau moléculaire, le paratope est constitué des régions déterminant la complémentarité (*Complementarity Determining Regions* ou CDR) de la chaîne légère et de la chaîne lourde respectivement CDRL1, CDRL2, CDRL3 et CDRH1 CDRH2 et CDRH3 (Roy et al., 2017).

La forte variabilité des régions CDR permet d'assurer la diversité du répertoire Abs. Cette région est soutenue par les régions charpente (*Framework Regions* ou FR) qui sont plus conservées et assurent la conformation correcte du paratope comme présenté en **Figure 13**.



**Figure 13:** Le Fab permet la liaison à l'antigène par l'exposition des boucles CDR lourdes et variables. Les boucles CDR des régions V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> sont situées vers l'extérieur des Abs en N-terminale et s'apparient entre la chaîne légère et la chaîne lourde. Cet assemblage des CDRH et CDRL constitue le paratope, responsable de la liaison à l'antigène. Adapté de Roy, 2017, *Methods*.

#### c) *Le Fc : le fragment constant et la commutation de classe*

La commutation de classe ou isotypique permettra aux plasmocytes de sécréter un isotype d'Ab différent de l'isotype IgM, acquis par défaut et peu spécifique. Le nouvel isotype de l'Ab est déterminé par la nature de la chaîne lourde utilisée pour la recombinaison  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  étant les principales. Les régions génétiques des chaînes lourdes peuvent être différentes, de C $\gamma$ 1 à C $\gamma$ 4 pour les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ou encore C $\alpha$ 1 et C $\alpha$ 2 pour les IgA1 et IgA2. Les IgD, IgE et IgM n'ont qu'une version respectivement C $\Delta$ , C $\epsilon$  et C $\mu$ . Les mécanismes d'orientation de la commutation de classe vers l'un ou l'autre des isotypes ne sont pas encore élucidés, mais il semble clair que le TGF $\beta$  et l'IL-10, très présents au niveau des muqueuses, sont impliqués dans la commutation isotypique à IgA (Stavnezer et al., 2008).

#### d) *Isotypes et compartimentalisation immune*

Chez l'Homme, les IgG et les IgA prédominent sur les trois autres isotypes d'Ab. Les IgG représentent plus de 80% des Abs circulants (les IgG1 étant les plus abondants) alors que les IgA (principalement les IgA1) constituent le deuxième isotype circulant le plus abondant avec une proportion de 15% (Heineke and Egmond, 2017). En revanche, au niveau des muqueuses, plus de 90% des Ab sont des IgA, le rapport entre les sous-types IgA1 et IgA2 variant selon le site muqueux (Heineke and Egmond, 2017). Cette différence de proportion d'isotype entre sang et sécrétion est principalement associée aux temps demi-vies différents *in situ*. En effet, les IgA ont une faible durée

de vie plasmatique contrairement aux IgG et à l'inverse les IgG sont très rapidement dégradées dans la lumière des muqueuses par les protéases bactériennes alors que les IgA, notamment les IgA2, y sont particulièrement résistantes.

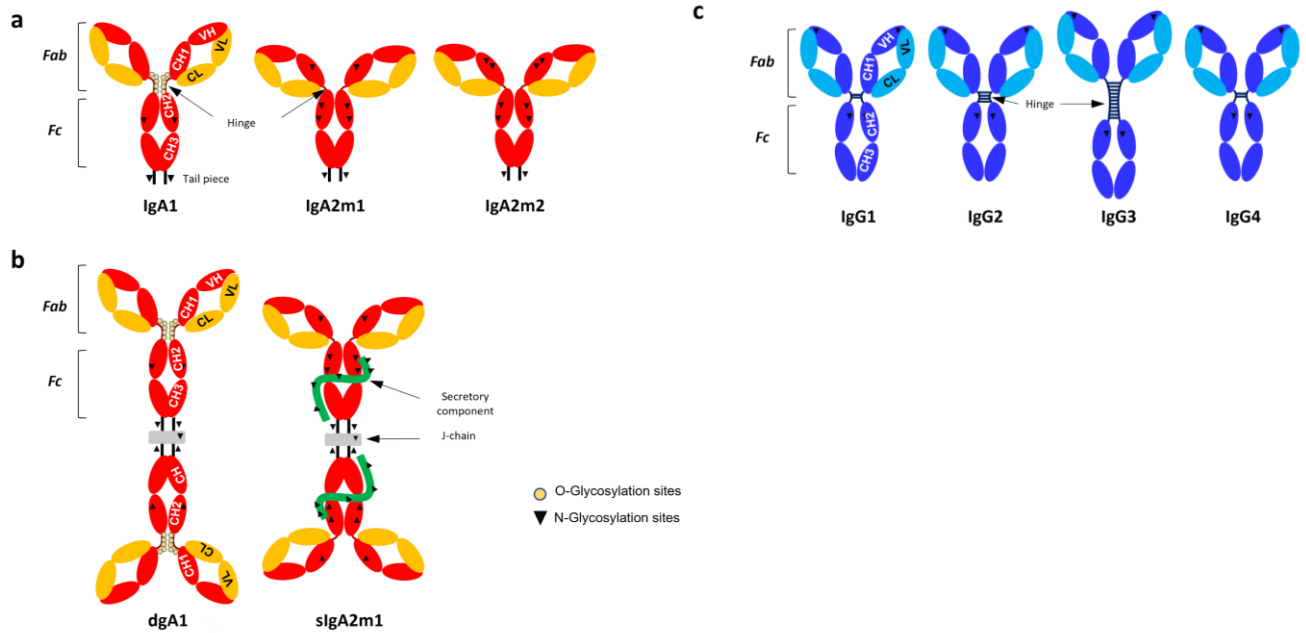
#### e) *Dichotomie : IgA et IgG*

Malgré l'étendue des connaissances actuelles sur les isotypes d'Ab en regard de leurs propriétés thérapeutiques, le développement actuel des Ab thérapeutiques se concentre principalement sur les IgG, notamment les IgG1. Cette prédominance résulte de divers facteurs techniques : (i) l'IgG est l'isotype le plus abondant dans le sang, plus facile à produire en grandes quantités. Par conséquent, les IgG sont largement étudiés contrairement aux autres isotypes; (ii) à l'inverse, les IgA, deuxième isotype le plus abondant dans le sérum et majoritaire au niveau des muqueuses, sont plus difficiles à échantillonner, à produire et à purifier; (iii) les IgG1 et IgG3 sont les sous-types d'IgG qui induisent le mieux les fonctions effectrices dépendantes des Fc; (iv) les IgG1 ont une demi-vie plus longue dans le sang que les IgG3 et les IgA; et (v) les IgG3, en raison d'une longue région charnière, comme en ont les IgA, et à cause d'un profil de glycosylation complexe, sont produites à un coût plus élevé que les IgG1 (Chintalacharuvu et al., 2007; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Li et al., 2010; Presta, 1992; Wurm, 2004). Ainsi, les IgG1 sont l'isotype préférentiellement utilisé pour la conception d'Abs thérapeutiques. Ce choix devrait être reconsidéré en raison des différences d'efficacité de chaque isotype dans les fonctions médiées par le Fc. En effet, celles-ci sont particulièrement robustes pour les IgA comme nous l'avons précédemment montré pour le bNAbs spécifique de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH, 2F5, sans se limiter à ce modèle (Brandsma et al., 2019; Duchemin et al., 2020, 2018a; Evers et al., 2021, 2020; Lohse et al., 2016; Treffers et al., 2020). Par la suite, nous nous concentrerons sur les IgG et IgA étant donné la proportion prépondérante de ces isotypes relativement aux autres. Les différentes IgG et IgA sont présentées dans la **Figure 14**.

Il est important de noter que les IgG et les IgA diffèrent notamment par deux aspects :

- Les IgA présentent une *tail piece* en C-terminale, nécessaire à la formation des IgA dimériques (dIgA). Leur présence favorise la dimérisation/multimérisation par liaison à la chaîne J (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Heineke and Egmond, 2017).

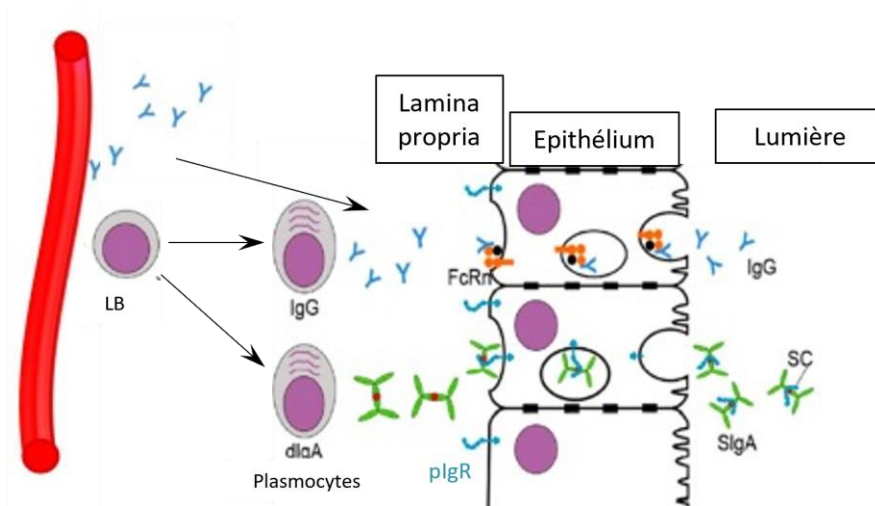
- Les IgG présentent des sites de N-glycosylation restreints au Fc, alors que les IgA présentent des sites de N- et de O-glycosylation principalement retrouvées au niveau de la région charnière pour les IgA1 et à l'extérieur de cette dernière pour les IgA2 (Mattu et al., 1998).



**Figure 14: Présentation des différents sous-isotypes d'IgA et d'IgG.** (a) Les IgA monomériques IgA1 présentent un format plus fermé que les IgA2, lié à la longueur de la région hinge et la différence de glycosylation de cette dernière et les IgA2 sont plus N-glycosylées que les IgA1. (b) Les IgA se dimérisent par la tail pièce C-terminale pour devenir dimériques (dIgA), et lors de la transcytose épithéliale, la partie extracellulaire du pIgR reste associée aux dIgA et devient le composant sécrétoire. (c) Les quatre classes d'IgG présentent un profil de glycosylation identique mais diffèrent notamment par leur région hinge et sa longueur, plus longue pour les IgG3. Issu de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*.

## 2. Sécrétion muqueuse des anticorps

Les IgA muqueux sont tout d'abord sécrétés par les plasmocytes de la lamina propria sous forme de dIgA. Leur liaison au récepteur des immunoglobulines polymériques (*polymeric Ig-Receptor* ou pIgR) exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales induit leur internalisation en direction du pôle apical de la cellule. Le complexe pIgR-dIgA y sera clivé à la face apicale des cellules épithéliales, libérant le dIgA toujours associé à la partie extracellulaire du pIgR, appelée alors pièce sécrétoire (*Secretory Component* ou SC, cf **Figure 14** et **15**). Ce complexe SC-dIgA est appelé IgA sécrétoire (slgA). Les slgA sont relargués dans la lumière formant ainsi la première ligne de défense muqueuse contre les pathogènes par exclusion (Joseph, 2022; Ruprecht et al., 2019). Si des virus venaient à être endocyté par une cellule épithéliale, ils pourraient former un complexe immun avec les dIgA qui transitent vers le pôle apical et constituent un mécanisme d'exclusion supplémentaire vers la lumière muqueuse (Bomsel et al., 1998).



**Figure 15: Présentation du mécanisme de sécrétion des anticorps et leur rôle dans l'exclusion immunitaire.** Les plasmocytes sortent de la circulation générale à destination de la lamina propria où sécrètent des Abs IgG ou IgA qui diffusent jusqu'aux EC, où ils seront endocytés afin d'être sécrétés au pôle apical. Les IgA sont endocytés d'une façon pIgR-dépendante, permettant leur adressage au pôle apical et de former les sIgA. Les IgG sécrétés par les plasmocytes sous-muqueux ou diffusant depuis la circulation générale sont endocytés de façon aspécifique en basal des EC, ils interagissent avec le FcRn dans les endosomes afin d'éviter leur dégradation et permettre leur sécrétion apicale. Adapté de Ruprecht, 2019, Vaccines (Basel).

Les IgG muqueux pourraient provenir en partie de la transsudation depuis la circulation générale et infiltrés les tissus par un processus mal caractérisé. Cependant les plasmocytes à IgG qui sont présents dans la lamina propria peuvent aussi être une source des IgG tissulaires. Les IgG tissulaires peuvent être transportés vers la lumière des muqueuses par transcytose comme présenté en **Figure 15**. Une fois endocytés de manière non spécifique dans les endosomes, les IgG s'associent par une liaison pH-dépendante au récepteur Fc néonatal (FcRn) qui protègent les IgG de leur dégradation dans les lysosomes. Puis le complexe FcRn-IgG poursuit son chemin vers la membrane apicale où il délivre l'IgG qui se dissocie à cause du changement de pH qui redevient neutre (Ruprecht et al., 2019; Vidarsson et al., 2014a). Si ce phénomène a été bien étudié dans l'intestin, il n'a pas été caractérisé au niveau des muqueuses génitales (Horton and Vidarsson 2013, Yodisha 2004).

### 3. Fonction de neutralisation des anticorps

La première démonstration *in vitro* du pouvoir neutralisant des Abs de sujets infectés par le VIH-1 a été faite en 1985 (Robert-Guroff et al., 1985). Depuis, l'action antivirale des Abs dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 a été abondamment étudiée. Cependant, comme évoqué précédemment, l'enveloppe virale présente une séquence très variable, ce qui rend la réponse humorale rarement efficace chez les individus infectés. De plus, la réponse humorale anti-VIH

pourrait souffrir de la faible densité des protéines d'enveloppe à la surface du virus, la forte variabilité du bouclier de glycanes, la présence de particules d'enveloppe défectueuses ou encore le masquage des épitopes par les glycanes ou à cause de la structure 3-D de l'enveloppe, ce qui réduit l'affinité et l'avidité des Abs ciblant l'enveloppe. Ainsi, les Abs qui ciblent les protéines d'enveloppe non-fonctionnelles sont inefficaces d'un point de vue antiviral. La connaissance de ces mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire sont essentiels au développement d'approches vaccinales et thérapeutiques basées sur les Abs.

#### *a) Neutralisation et inhibition de la transcytose*

La neutralisation de l'infection par liaison des Abs à l'enveloppe découle de leur attachement à des sites directement impliqués dans le processus d'entrée, ou de la génération d'un encombrement stérique qui empêchent les changements de conformations nécessaires (Gruell and Schommers, 2022; Haynes et al., 2019). Ils peuvent également inhiber l'interaction de l'enveloppe avec le récepteur CD4. Les Abs neutralisants (*Neutralizing Abs* ou NAbs) sont alors définis par leur faculté à inhiber l'infection virale. Ainsi, les NAbs peuvent inhiber l'infection par du virus libre et, dans une moindre mesure, l'infection par des cellules infectées au niveau de la synapse virologique (Malbec et al., 2013; Pancera et al., 2017). Par des mécanismes similaires, les NAbs sont aussi impliqués dans le blocage du transfert de virus de LC aux TCD4 comme démontré précédemment au laboratoire (Khamassi et al., 2020; D. Tudor et al., 2012).

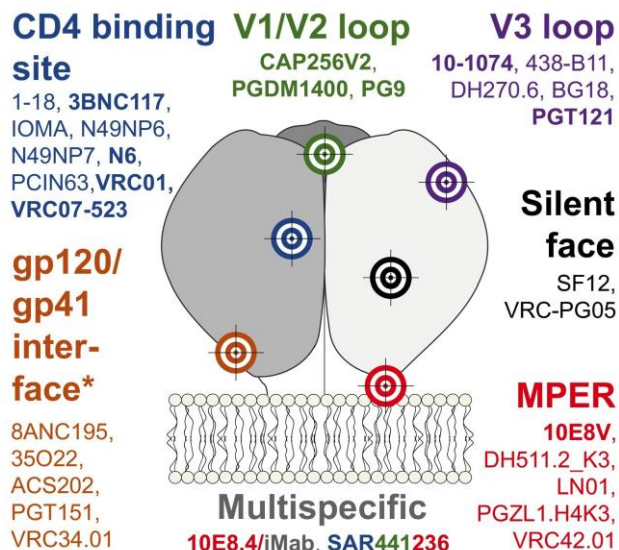
#### *b) Les anticorps neutralisants à large spectre*

La génération des Abs neutralisant à large spectre (*broadly Neutralizing Abs* ou bNAbs) nécessite qu'au sein d'un même individu, les virus servant de source antigénique soient suffisamment variables. Ce processus prend plusieurs années pour s'établir, chez seulement 10 à 25% des sujets infectés. Les bNAbs reconnaissent gp120 et/ou gp41 par leurs parties conservées (Haynes et al., 2019; Pancera et al., 2017). Cependant, l'apparition des bNAbs est observée seulement chez 2 à 4% des sujets infectés. Les individus sont alors appelés neutralisateurs élités (Landais and Moore, 2018). Leur bNAbs sont capables de neutraliser différents clades de VIH-1 à de très faibles concentrations. L'identification de cette faculté à neutraliser des virus différents sous-tend le ciblage de mécanismes ou de résidus qui sont conservés au cours de l'évolution virale. Comme illustré dans la **Figure 16**, les épitopes des bNAbs monoclonaux peuvent être des épitopes

classiques de l'enveloppe, dont V1/V2, V3, CD4bs, gp41 mais aussi moins conventionnels comme CD4i.

Ces Abs ont majoritairement été étudiés et isolés sous isotype IgG. De plus, ils présentent des caractéristiques particulières comme un CDRH3 particulièrement long, et environ une centaine d'acides aminés issus de mutations somatiques. Ceci témoigne d'une évolution conjointe des lignées d'Abs avec celle du VIH-1 circulant chez l'individu (Landais and Moore, 2018; Mascola and Haynes, 2013). Certains bNAb peuvent aussi être auto-réactifs et réagir contre l'hôte. La faible abondance des épitopes d'enveloppe à la surface des virus est actuellement proposée comme étant responsable de cet effet mais la redirection contre les lipides de l'enveloppe peut favoriser leur efficacité et assurer l'absence de sélection négative de ces plasmocytes reconnaissant le soi (Landais and Moore, 2018; Mascola and Haynes, 2013; Mouquet et al., 2010).

L'étude des bNAb d'isotype IgA souffre d'un manque de description, pourtant crucial dans la protection des individus. La génération d'hybridomes depuis des souris humanisées pour la production d'IgA1 monoclonaux anti MPER par l'équipe du Pr Paul a permis de montrer leur efficacité à prévenir *in vitro* l'infection par plusieurs clades de virus (Benjelloun et al., 2016). Ces bNAb IgA présentent des boucles CDRH3 plus courtes et sont moins auto réactifs que les bNAb 2F5, 4E10 ou 10E8 (Benjelloun et al., 2016; Tudor et al., 2009). Ces caractéristiques suggèrent qu'il serait avantageux de cibler cette région dans le cadre d'un vaccin.



**Figure 16: Identification des épitopes de l'enveloppe permettant la neutralisation cross-clade.** Les bNAb peuvent cibler 6 régions différentes de gp120 et de gp41, l'interface entre gp120 et gp41, le CD4bs, la boucle V1/V2, la boucle V3, la face silencieuse ou encore MPER de gp41. Enfin et plus récemment, des bNAb bi-spécifiques ont été développés, ciblant au moins 2 épitopes, afin d'augmenter leur avidité et donc leur efficacité thérapeutique potentielle, comme 10E8./iMab ciblant MPER et le récepteur CD4. Issu de Gruell, 2022, *Current Opinion in Virology*.

### c) Les différentes régions ciblées

#### (1) Les bNAbs spécifiques de gp120

Les bNAbs dirigés contre gp120 ciblent des régions particulières comme l'apex de gp120 par les boucles V1/V2, la boucle V3, le CD4bs ou encore le site d'interaction entre gp120 et gp41 (**Figure 16**) (Haynes et al., 2023; Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017). Ce sont les anticorps majoritairement évalués dans les différentes études.

#### (2) La région MPER de gp41

Les premiers Abs décrits sont les bNAbs 2F5 et 4E10 qui reconnaissent des épitopes conservés de l'enveloppe virale au niveau de la région externe de la gp41 proximale de la membrane virale exposée à la surface du virus (Haynes et al., 2023; Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017). L'épitope ciblé par 2F5 varie selon les auteurs et les techniques utilisées. Le premier épitope de l'IgG 2F5 (2F5-IgG) à avoir été caractérisé par l'équipe du Dr. Katinger est la séquence <sup>662</sup>ELDKWA<sup>667</sup>, épitope canonique localisé sur la région MPER. Mais 2F5-IgG pourrait reconnaître un épitope plus long du MPER <sup>656</sup>NEQELLELDKWASLWN<sup>671</sup> (Purtscher et al., 1994). De façon consensuelle, la reconnaissance de <sup>664</sup>DKW<sup>666</sup> est indispensable à son activité neutralisante (Chakrabarti et al., 2011). De plus, 2F5-IgG est capable de se lier aux MPER des virus des clades A et B, mais pas de reconnaître le MPER de clade C, à cause de la mutation du résidu <sup>666</sup>W (Purtscher et al., 1994). Plus récemment, les travaux effectués au laboratoire ont montré que la liaison 2F5 à gp41 dépend de la structure de la protéine ou du peptide couvrant le MPER, laissant présumer un épitope conformationnel (D. Tudor et al., 2012). En effet, l'IgG 2F5 lie avec une forte affinité une région recouvrant le MPER de 35 aminoacides sur la gp41 (650-685), appelé le peptide P1. Cette région est très conservée parmi les isolats du VIH-1 et est constituée de trois régions (Coutant et al., 2008) : (i) les résidus 650-661, qui forment une hélice chargée; (ii) les résidus 662-667, ELDKWA, épitope reconnu par les Abs qui neutralisent l'entrée du VIH-1 dans les cellules épithéliales et les cellules mononucléées CD4<sup>+</sup>; et (iii) les résidus 668-685, une séquence hydrophobe riche en tryptophanes qui stabilise la structure du site de liaison du galactose (Alfsen and Bomsel, 2002). Cette séquence permet au virus de se lier au GalCer, le récepteur du VIH-1 sur les cellules épithéliales et les cellules dendritiques (Alfsen and Bomsel, 2002; Magerus-Chatinet and Bomsel,

2004). Ces travaux ont également montré que le 2F5 bloque le transfert de l'infection des LC aux TCD4 autologues (D. Tudor et al., 2012).

L'épitope de l'IgG 4E10, <sup>669</sup>LWNWFDIT<sup>676</sup>, est situé en C-terminale de l'épitope canonique de l'IgG 2F5 (Haynes et al., 2023; Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017).

Ces deux bNAbs 2F5-IgG et 4E10-IgG pourraient aussi reconnaître des protéines du soi et certains lipides intracellulaires comme la cardiolipine. De plus les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes (Leu, Phe, Val, and Ile) localisés au sommet de la boucle CDRH3 de l'Ab pourraient s'insérer dans la membrane du virus. Cette liaison pourrait être nécessaire au processus de neutralisation a priori séquentiel, commençant par la liaison de l'Ab à la membrane puis au MPER du virus en formation *6-helix bundle* bloquant ainsi le processus de fusion (Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017).

Dans la seconde génération de bNAbs identifiés, 10E8-IgG est le seul qui soit dirigé contre gp41. Il reconnaît <sup>664</sup>DKWASLWNWFDITNWLWYIK<sup>683</sup>, un épitope localisé un peu plus en position C-terminale que celui de 4E10-IgG. 10E8-IgG ne semble pas être auto-réactif mais pourrait se lier aux membranes cellulaire ou virale, son CDRH3 contenant aussi un acide aminé hydrophobe, un W, au sommet de sa boucle. Cette interaction pourrait contribuer, comme pour 2F5-IgG, au processus de neutralisation (Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017; Rantalainen et al., 2020). Cette liaison impliquant des acides aminés hydrophobes non spécifiques de l'antigène viral a été exploitée rationnellement pour augmenter la capacité neutralisante de ces Abs en greffant des composants synthétiques hydrophobes sur l'Ab en dehors de la région de liaison spécifique à l'antigène (Rujas et al., 2020). Plus récemment en 2019, l'IgG LN01 a été identifié et apparaît comme un des plus puissants bNAbs spécifique de la gp41. Son auto-réactivité est moindre que tous les autres bNAbs dirigés contre MPER (Pinto et al., 2019). L'épitope de LN01-IgG engage à la fois MPER et la TM, qui forment ensemble une hélice continue dans le complexe avec LN01-IgG. L'orientation inclinée de la TM permet à LN01-IgG d'interagir simultanément avec le composant peptidique de l'épitope MPER et la membrane par l'intermédiaire de deux sites de liaison lipidique spécifiques du paratope de l'Abs.

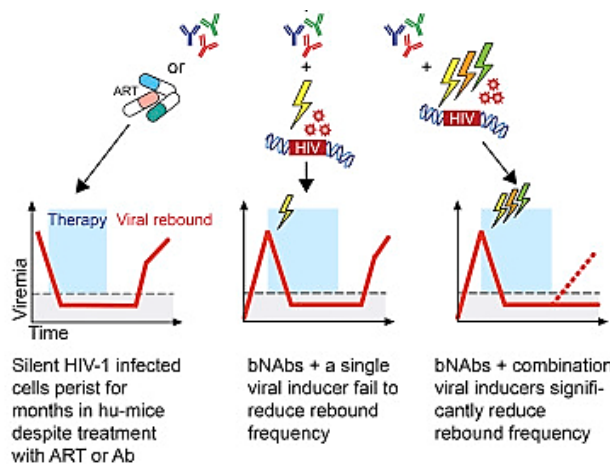
### (3) Le peptide de fusion

L'Ab VCR34.01-IgG, récemment identifié chez un patient chroniquement infecté, cible le peptide de fusion et bloque l'entrée du virus en inhibant les changements de conformation des sous-unités gp120 et gp41 de l'enveloppe virale nécessaires à l'entrée (Haynes et al., 2023, 2023; Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017). Cet IgG est le plus puissant des Abs de la famille VRC34.01 bien qu'il présente un faible nombre de mutations somatiques (Haynes et al., 2023; Mascola and Haynes, 2013; Pancera et al., 2017).

#### d) Applications thérapeutiques

##### (1) Les anticorps neutralisants en thérapie

Les propriétés cross-clade des Abs neutralisants ont permis de les utiliser comme Ab thérapeutiques chez les patients infectés par le VIH. Ce traitement permet un relai thérapeutique à la cART d'une durée pouvant aller jusqu'à 18 mois et pourrait également être utilisé en combinaison avec la stratégie *shock and kill* (**Figure 17**) (Gruell and Klein, 2018; Gruell and Schommers, 2022; Halper-Stromberg et al., 2014). Cependant, bien que le traitement soit très efficace temporairement, des virus résistants émergent suite à l'apparition de mutations d'échappement aux bNABs. Cette stratégie d'utilisation de bNABs à fort potentiel de neutralisation *in vitro*, ne pourra donc pas conduire seule à l'élimination de l'intégralité des réservoirs viraux.



**Figure 17 : Les bNABs seuls ni les agents de réversion de la latence seuls ne suffisent pas à diminuer le rebond chez les patients infectés.** La charge virale est diminuée le temps d'activité du bNAB mais des virus mutants émergent et sont responsables du rebond viral. La combinaison d'un traitement bNAB et de la stratégie *shock and kill* n'est pas plus efficace pour réduire le rebond viral mais il faudrait un traitement bNABs combiné à une série de traitement *Shock and Kill* afin de réduire le rebond viral post-traitement. Issu de Halper-Stromberg, 2014, Cell.

Pour empêcher l'apparition de mutations d'échappement, les approches actuelles évaluent des Abs multispécifiques construits par génie génétique (Ho et al., 2018; Kong et al., 2014; Kwon et al., 2016; Wagh et al., 2018; Wu et al., 2018; Xu et al., 2017). En combinant les régions variables de différents bNAbs en un seul Ab, le bNAb résultant peut cibler plusieurs domaines de l'enveloppe impliqués dans la fusion et maximiser son activité antivirale. C'est notamment le cas d'un bNAb trispécifique ciblant gp41 (10E8v4), l'apex de trimères de gp120 (PGDM1400) et CD4bs (Xu et al., 2017), pour lequel les essais précliniques montrent une diminution de l'échappement viral. D'autres constructions peuvent cibler directement à la fois l'enveloppe et un récepteur cellulaire de l'enveloppe, comme par exemple CD4, ciblé par l'ibalizumab (Gruell and Schommers, 2022).

## (2) Induction par la vaccination

Même si le spectre d'activité des bNAbs est important, il est nécessaire de comprendre comment ils sont générés *in vivo* pour pouvoir en tirer avantage dans le cadre de stratégies vaccinales (Gruell and Schommers, 2022; Haynes et al., 2023; Liu et al., 2018; Mascola and Haynes, 2013). En effet, l'induction de bNAbs chez des individus à risque pourrait les protéger contre l'infection. Cependant, et comme présenté dans le **Tableau 2**, aucun essai vaccinal humain n'a permis à ce jour d'induire une immunité stérilisante, même si des Abs neutralisants ont été induits. La première génération de vaccins testés en essais cliniques pour induire des Abs neutralisants avait utilisé comme antigène la sous-unité gp120 de l'enveloppe virale. Devant le manque de protection résultant de cette stratégie, des essais plus récents ont ensuite voulu coordonner l'induction d'une réponse TCD8 et la production d'Abs non-neutralisants (Haynes et al., 2023).

Sur les neuf essais cliniques évaluant l'efficacité de vaccins contre le VIH-1 réalisés à ce jour, l'essai RV144 est le seul essai qui ait montré une efficacité, bien que faible (31.2%) (Rerks-Ngarm et al., 2009). Cet essai a montré que des niveaux élevés d'Abs se liant à V2 du VIH-1 et de faibles niveaux d'IgA sériques spécifiques de la protéine d'enveloppe corrélaient avec une réduction de la transmission. Chez les individus protégés dans l'essai RV144, on observe une corrélation entre protection et l'induction d'IgG1 et IgG3 spécifiques de gp120. Ces IgG sont faiblement neutralisantes mais capables d'induire des fonctions effectrices dépendantes du Fc comme la lyse des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante des Abs (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* ou ADCC) (Haynes et al., 2012; Yates et al., 2014). Chez ces individus, la présence d'IgA anti-VIH

circulantes a été associé à une augmentation du risque par diminution de la capacité de liaison des IgG1 et IgG3 au virus et donc affectant le pouvoir neutralisant de ces IgG (Haynes et al., 2012; Tomaras et al., 2013), mais l'activité directe d'ADCC de ces IgA n'a pas été recherchée.

**Tableau 2 : Présentation des essais vaccinaux humains contre le VIH-1.** Différents essais vaccinaux ont eu lieu mais seul le RV144 a permis d'atteindre plus de 30% de protection à 42mois. Adapté de Haynes, 2023, Nature Reviews Immunology.

Essai	Dates	Vaccin	Zone géographique	Protection
Vax004	1999-2000	gp120 bivalent clade B avec alum	Europe, USA	Non
Vax003	1999-2000	gp120 bivalent CRF_01AE/B avec alum	Thaïlande	Non
HVTN 502	2004-2009	Adenovirus5 exprimant gag/pol/nef clade B	USA	Non, augmentation infection
HVTN 503	2006-2015	Adenovirus5 gag/pol/nef clade B	Afrique du Sud	Non, augmentation infection chez l'Homme
RV144	2005-2009	ALVAC gag/pol/nef bivalent CRF_01AE/B gp120 avec alum	Thaïlande	31,2% à 42 mois 60% à 12 mois
HVTN 505	2009-2017	ADN clade B gag/pol/nef avec ADN Env clades A, B, C, avec Adenovirus5 exprimant l'enveloppe des clades A, B, C	USA	Non
HVTN 703/ HPTN 081	2016-2021	Protection par infusion de bNAb VRC01 i.v	Afrique Sub-Saharienne	Non, à l'exception des souches sensibles
HVTN 704/ HPTN 085	2016-2020	Protection par infusion de bNAb VRC01 i.v	Amériques, Suisse	Non, à l'exception des souches sensibles
HVTN 702 Uhambo	2016-2021	ALVAC-C gag/pol/Env, gp120 bivalentes en MF59	Afrique du Sud	Non
HVTN 705 Imbokodo	2017-2021	Adénovirus26, gènes mosaïques pour les cellules T tétravalent, boost gp140 clade C	Afrique Sub-Saharienne	Non
HVTN 706 Mosaico	2019-2024 (estimé)	Adénovirus26, gènes mosaïques pour les cellules T tétravalent, boost gp140 clade C et gp140 mosaïque pour LB	USA, Espagne, Amérique centrale et du Sud	En cours

L'ensemble de ces résultats ont guidé la conception des essais cliniques ultérieurs, lesquels ont malheureusement tous échoués à ce jour. Il est clair que l'induction de bNAbs est un défi pour mettre en place une stratégie vaccinale efficace en raison des caractéristiques inhabituelles de ces Abs corrélées avec leur capacité de neutralisation *in vitro* (niveau élevée des mutations somatiques y compris dans la région FR, longue boucle CDRH3).

Cependant plusieurs remarques sont à formuler sur les approches actuelles :

- Au vu de l'absence de corrélation entre bNAbs et protection dans les essais cliniques, on peut se demander si la génération de bNAbs par vaccination est un réel critère de protection et s'il ne faudrait pas aussi envisager d'évaluer d'autres fonctions des Abs comme corrélats de protection, notamment celles médiées par les Fc (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Haynes et al., 2023; Vrignaud et al., 2023).
- Aucune des stratégies testées jusqu'à maintenant n'envisage d'approche vaccinale muqueuse, bien que les muqueuses soient le site d'entrée principal du VIH-1. Toutes les stratégies actuelles visent une immunisation systémique, même si les vecteurs vaccinaux varient. Le principal paramètre mesuré pour évaluer l'efficacité de vaccination est l'induction de bNAbs IgG, circulants. Cependant, la réponse IgA devrait aussi être mesurée mais cette stratégie souffre des obstacles évoqués plus tôt. L'avantage des Abs muqueux contribuant à l'induction de mécanismes de protection est conforté par des études sur des individus hautement exposés au VIH-1 mais qui restent séronégatifs (ESN). Chez ces individus, la présence d'IgA spécifiques de la gp41 dans les sécrétions génitales est un corrélat de protection majeur. De plus, ces IgA sont neutralisants vis-à-vis du VIH-1 et bloquent la transcytose du virus (Tudor et al., 2009). Leurs épitopes, utilisés comme antigènes vaccinaux, ont permis d'élaborer un vaccin. Après vaccination muqueuse, ce vaccin a permis d'induire une immunité stérilisante contre des épreuves virales infectieuses génitales dans un modèle de primate non humain (*Non-Human Primate* ou NHP) (Bomsel et al., 2011).
- La majeure partie des approches ciblent gp120, protéine qui est remarquablement variable relativement à tous les aspects évoqués plus tôt, alors que gp41 est très conservée : gp41 semble donc une cible vaccinale efficace (Bomsel et al., 2011; Lakhashe et al., 2022). Le ciblage de gp41 est à l'image de la faculté de neutralisation de 10E8-IgG (Haynes et al., 2023). Les applications en cliniques de cet IgG montre l'adéquation de cette approche (Gruell and Schommers, 2022).

C'est dans ce contexte que le laboratoire a démontré que chez des NHP, la vaccination muqueuse (primo vaccination intra musculaire, rappel intra nasal) permet l'induction d'une réponse IgA et IgG muqueuse associée à la protection de l'ensemble des macaques contre de

multiples infections répétées au niveau vaginal (Bomsel et al., 2011). Les IgA muqueux induits par cette vaccination bloquent la transcytose du virus et les IgG muqueux induisent l'ADCC des cellules infectées. Les IgG muqueux et sériques anti-gp41 ont aussi une fonction neutralisante mais limitée (Bomsel et al., 2011). Cet essai a été répété par le groupe du Pr Ruprecht avec un résultat similaire de protection et établissant la coopération des IgA muqueux et IgG systémiques induits par la vaccination dans la protection des animaux (Lakhashe et al., 2022). Ce type de stratégie vaccinale muqueuse ciblant gp41 pose un jalon dans l'élaboration d'une vaccination efficace contre le VIH-1. Il sera probablement nécessaire de combiner la neutralisation et les fonctions effectrices des Abs pour protéger les individus.

Les IgA sécrétoires peuvent aussi être eux-mêmes un vecteur de vaccination par voie orale ou nasale afin d'atteindre les compartiments génitaux et digestifs (Lycke, 2012). Ainsi, l'équipe du Pr Paul a pu montrer la faisabilité de l'approche dans un modèle murin dans lequel les DC muqueuses permettent l'induction d'Abs systémiques et muqueux (Rochereau et al., 2016, 2015).

Il semblerait de manière générale que la protection des individus ne puisse être obtenue en induisant seulement une réponse IgG ou IgA. En effet, même si chez certaines populations protégées naturellement contre l'infection, les ESN, la protection dépend majoritairement d'IgA anti-gp41 muqueux. De plus, les épreuves simiennes indiquent qu'une coopération entre les isotypes et les compartiments muqueux et sanguins soit nécessaire pour permettre une protection des animaux (Astronomo et al., 2016; Bomsel et al., 2011; Gong et al., 2021; Lakhashe et al., 2022; Sholukh et al., 2015; Watkins et al., 2011).

Cependant, si la neutralisation de l'infection ou l'inhibition de la transcytose sont éminemment importante dans la protection des individus, il est de plus en plus clair que ce n'est pas le seul mécanisme de défense dépendant des Abs.

#### *e) Dichotomie bNAbs et anticorps non-neutralisants*

Si les bNAbs sont particulièrement difficiles à induire par la vaccination, des Abs non-neutralisants (*Non-Neutralizing Abs* ou NNAbs) ont aussi été identifiés. Tout comme les bNAbs ces NNAbs peuvent induire des fonctions effectrices dirigées contre le VIH-1 (Mayr et al., 2017). Ces Abs ne sont pas dirigés contre des sites de l'enveloppe empêchant l'entrée du virus et/ou leur

affinité pour leur cible viral est trop faible pour leur permettre d'avoir une activité de neutralisation mesurable (Holl et al., 2006). Ces NNAbs ont pourtant une activité antivirale à médiation cellulaire comme l'ADCC ou la phagocytose dépendante des Abs (*Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis* ou ADCP). L'induction des fonctions effectrices reste absolument conditionnée par la faculté des Abs à lier l'enveloppe, ce qui peut expliquer les différences qui peuvent être observées dans l'induction des fonctions effectrices entre les NNAbs et bNAbs (Bruehl et al., 2017). Cependant, l'infusion de NNAbs chez des NHP ne permet qu'une protection faible, associée à une diminution de la quantité de virus T/F à l'origine de l'infection des animaux (Santra et al., 2015). Enfin, l'induction des fonctions effectrices par ces NNAbs est au moins partiellement responsable de la protection induite au cours de l'essai RV144 (Haynes et al., 2023; Rerks-Ngarm et al., 2009).

#### 4. Engagement des fonctions effectrices

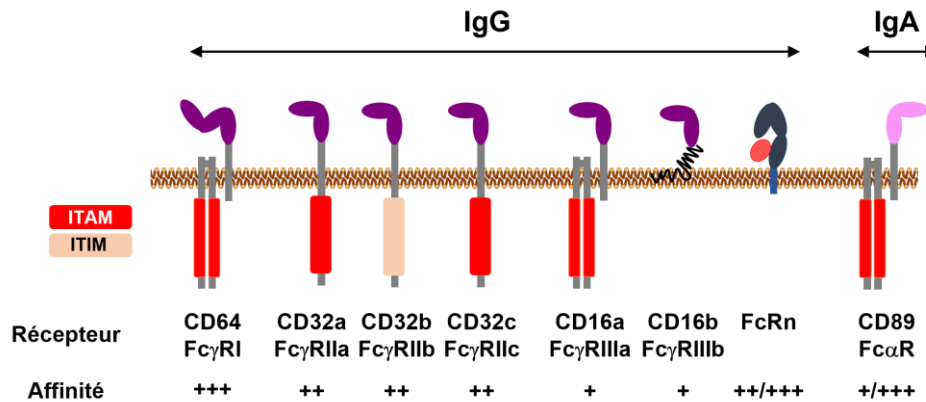
Les fonctions effectrices résultent de la liaison du Fc d'un Ab en Complexe Immun (*Immune Complex* ou IC) au Fc-récepteur (FcR) correspondant sur une cellule de l'immunité innée, dite effectrice. Les FcR sont spécifiques de chaque isotype et ainsi les Fc $\gamma$ R, liant le Fc $\gamma$  des IgG, n'ont pas la capacité de lier les IgA, qui lient spécifiquement le Fc $\alpha$ RI (Cottignies-Calamarte et al., 2023b).

Les conséquences fonctionnelles en aval de cette liaison sont dépendantes de la nature de l'Ab mais aussi de la cellule effectrice (Ben Mkaddem et al., 2019; Breedveld and van Egmond, 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Tay et al., 2019). Les fonctions effectrices permettraient à priori de parfaire l'immunité anti-VIH, en complément de la neutralisation que le paratope des Abs apporte (Haynes et al., 2012; Parsons et al., 2018; Tay et al., 2019).

##### a) Liaison anticorps-FcR en fonction des isotypes

Le domaine Fc des Abs peut adopter deux états conformationnels dominants, à savoir une forme en "U" ouverte et détendue ou une forme en "V" fermée et compacte, principalement régulée par la N-glycosylation. Chaque conformation de Fc $\gamma$  engage une classe distincte de FcRs, à savoir les FcRs de type I et de type II, et active à son tour diverses fonctions effectrices. La forme en "U" ouverte se lie préférentiellement au FcR de type I tandis que la forme en "V" fermée se lie préférentiellement au FcR de type II (Ben Mkaddem et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Pincetic et al., 2014; Vidarsson et al., 2014a). Il existe également d'autres FcRs pour les IgG, tels que TRIM21 et le FcRn, pour lesquels aucune conformation préférentielle du Fc n'est requise pour

l'engagement (Ben Mkaddem et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Foss et al., 2015; Pyzik et al., 2019). En revanche, le rôle de la conformation du Fc dans la liaison des FcR par les IgA a été moins décrit (Bonner et al., 2008; Breedveld and van Egmond, 2019; Correa et al., 2013; Herr et al., 2003; Kerr, 1990) bien que le Fc $\alpha$ RI/CD89, le principal FcR des IgA, apparaisse comme un FcR de type I.



**Figure 18 : Présentation des FcR aux IgG et aux IgA.** Les FcR sont des récepteurs aux Fc et présentent une spécificité d'isotype. Les Fc $\gamma$ R, lient les IgG et le Fc $\alpha$ RI/CD89 lient les IgA. Ces FcR peuvent être alternativement activateurs ou inhibiteurs, en fonction de la présence (respectivement) d'un domaine ITAM ou ITIM dans la partie cytosolique du FcR ou par son association avec la chaîne FcR $\gamma$  (Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RIIIa/CD16a et Fc $\alpha$ RI/CD89). Les FcR présentent différentes affinités pour leur ligand. Adapté de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*.

Les IgG peuvent se lier à six différents FcRs de type I spécifiques des IgG, à savoir Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RII/CD32a, b et c, et Fc $\gamma$ RIII/CD16a et b (**Figure 18**). Ces FcRs de type I sont soit pro-inflammatoires comme Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RIIa/CD32a, Fc $\gamma$ RIIc/CD32c, Fc $\gamma$ RIIIa/CD16a et Fc $\gamma$ RIIIb/CD16b, soit anti-inflammatoires comme Fc $\gamma$ RIIb/CD32b (Ben Mkaddem et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). L'équilibre entre les propriétés inflammatoires et anti-inflammatoires repose sur la signalisation cellulaire induite, et la libération ultérieure d'un ensemble spécifiques de cytokines, comme nous le verrons plus loin. L'IgG interagit avec les FcR de type I via la partie supérieure du domaine CH2 de l'Ab situé à proximité de la région charnière. Cette interaction active les FcR qui transduisent des signaux en aval par le biais d'un motif Immunorécepteur basé sur les Motifs Tyrosines Activateur, ou Inhibiteurs (*Immunorecepteur Tyrosine Activator/Inhibitor Motif* ou ITAM et ITIM, respectivement) (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Getahun and Cambier, 2015). L'ITAM est contenu soit dans le domaine cytoplasmique du récepteur (Fc $\gamma$ RIIa/CD32a et Fc $\gamma$ RIIc/CD32c), soit dans FcR $\gamma$ , la chaîne adaptatrice commune des FcR (Fc $\gamma$ RI/CD64 et Fc $\gamma$ RIIIa/CD16a). Ceci entraîne une cascade de signaux d'activation que nous détaillerons plus loin. L'activation de l'ITAM engage une voie de signalisation pro-inflammatoire

dans les cellules effectrices tandis que le domaine ITIM active une cascade de signalisation anti-inflammatoire en aval. Le Fc $\gamma$ RIIb/CD32b est le seul FcR inhibiteur qui porte le motif ITIM dans son domaine cytoplasmique (**Figure 18**), contrôlant ainsi de nombreux aspects de la réponse inflammatoire. Parmi les isotypes d'IgG, l'IgG3 présente la plus grande affinité pour le Fc $\gamma$ RI/CD64, suivie de l'IgG1 et de l'IgG4, tandis que l'IgG2 est incapable de se lier au Fc $\gamma$ RI/CD64 (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; de Taeye et al., 2019).

Les IgA lient deux FcRs de type I différents : Fc $\alpha$ RI/CD89 et Fc $\epsilon$ / $\mu$ RI. Leur liaison à Fc $\alpha$ RI/CD89 par l'intermédiaire de leurs domaines CH2 et CH3 et, comme Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\alpha$ RI/CD89 s'associe à la chaîne adaptatrice FcR $\gamma$  pour induire la signalisation en aval (**Figure 18**, Breedveld and van Egmond, 2019, Cottignies-Calamarte 2023). L'affinité du Fc $\alpha$ RI/CD89 pour l'IgA varie en fonction de sa capacité à former un IC avec l'antigène, libre ou à la surface de cellules ou de microbes opsonisés. L'affinité du Fc $\alpha$ RI/CD89 pour l'IgA est faible lorsque l'IgA est libre d'antigène mais augmente lorsque l'IgA est en IC. Comme nous le verrons plus loin, Fc $\alpha$ RI/CD89 peut propager, par le même ITAM de FcR $\gamma$ , des voies de signalisation activatrices mais aussi inhibitrices, appelées ITAM inhibitrices (ITAMi) si l'IgA liée n'est pas en IC. Les IgA monomériques et dimériques engagent Fc $\alpha$ RI/CD89 dans un rapport moléculaire IgA/récepteur de 1:2. Ce rapport est naturellement doublé pour les dIgA (1 dIgA peut lier 4 Fc $\alpha$ RI/CD89), mais l'engagement des IgA sécrétoires est limité par la présence du SC qui masque partiellement le domaine d'interaction Fc $\alpha$ RI/CD89 (Cottignies-Calamarte et al., 2023b). Le Fc $\alpha$ / $\mu$ RI est beaucoup moins bien décrit que le Fc $\alpha$ RI/CD89. Il est exprimé par les cellules B de la zone marginale, les DC folliculaires et les cellules amygdaliennes avec des rôles fonctionnels non détaillés ici (Kikuno et al., 2007), mais pas par les lymphocytes circulants.

Un paramètre supplémentaire qui affecte les fonctions médiées par les Fc est l'état d'oligomérisation des Abs. Par rapport à l'IgG qui est exclusivement exprimée sous forme d'Ab monomérique, les IgA sont principalement monomériques dans le sérum et polymériques (essentiellement dimérique) dans les tissus muqueux. Cette multimérisation, ainsi que l'encombrement stérique qu'elle apporte pourraient contribuer à réguler la liaison de l'Ab aux FcR (Breedveld and van Egmond, 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b).

Les FcRs de type II sont des lectines de type C, comme DC-SIGN ou Dectin-1, qui lient les hydrates de carbone sur les biomolécules, comme les Abs. Contrairement aux FcRs de type I, ces lectines interagissent préférentiellement avec la conformation fermée en "V" des domaines Fc des IgG mais aussi des IgA. La liaison des Ab à ces lectines déclenche des réponses anti-inflammatoires (Baumann et al., 2010; Yu et al., 2013), bien que ces résultats restent débattus (Figdor et al., 2002; Kara et al., 2020; Rochereau et al., 2016, 2015; Temming et al., 2019).

### *b) Le spectre d'expression des FcR dans l'organisme*

Comme résumé dans le **Tableau 3**, les FcRs sont principalement exprimés sur les cellules immunitaires innées qui sont donc considérées comme les principales cellules effectrices. L'expression des FcR sur les cellules immunitaires à travers le corps humain est bien décrite. Mais l'expression comparative des Fc $\alpha$ R et des Fc $\gamma$ R entre les cellules sanguines et les tissus muqueux fait défaut (Bournazos et al., 2017; Cheeseman et al., 2016; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Tay et al., 2019). L'expression des FcR varie qualitativement et quantitativement entre les sous-ensembles de DC sanguins, mais aussi entre les DC circulantes et des tissus des différentes muqueuses (Lundberg et al., 2016). Les DC des muqueuses génitales et rectales expriment Fc $\gamma$ RII/CD32, un faible niveau de Fc $\alpha$ RI/CD89 et Fc $\gamma$ RI/CD64 et sont dépourvues de Fc $\gamma$ RIII/CD16. Les DC sanguines ont un schéma d'expression des FcR similaire à celui des DC des tissus, bien que le niveau de Fc $\gamma$ RII/CD32 (a, b et c) soit plus élevé et celui de Fc $\gamma$ RIII/CD16 juste détectable dans les DCs du sang (Cheeseman et al., 2016). Les cellules NK sanguines et muqueuses expriment uniquement le Fc $\gamma$ RIII/CD16 mais pas le Fc $\alpha$ RI/CD89 chez l'homme et à faible fréquence dans les voies génitales féminines, en corrélation avec un polymorphisme sexuel (Cheeseman et al., 2016).

Tous les FcRs des IgA et IgG sont exprimés par les macrophages muqueux dans les tissus génitaux et rectaux alors que dans le tractus gastro-intestinal, les macrophages sont presque dépourvus de FcRs et n'expriment qu'un très faible niveau de Fc $\gamma$ RI/CD64 et Fc $\gamma$ RII/CD32. En revanche, les monocytes sanguins expriment tous les FcRs à un niveau élevé (Cheeseman et al., 2016; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Shen et al., 2009; Tay et al., 2019). Aucune comparaison de l'expression des FcR entre les neutrophiles sanguins et muqueux n'a été rapportée, bien que les neutrophiles du col de l'utérus et du côlon expriment Fc $\gamma$ RIII/CD16 et Fc $\alpha$ RI/CD89 de manière

similaire (Sips et al., 2016). De plus, nous avons constaté que les neutrophiles sanguins expriment uniquement FcγRII/CD32 et FcαRI/CD89 (Duchemin et al., 2018a).

**Tableau 3 : Spectre d'expression des FcR dans les cellules circulantes et muqueuses.** On peut observer que les cellules n'expriment pas toutes les mêmes FcR et que les cellules des muqueuses conservent une expression proche de celle des cellules circulantes. Adapté de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*.

Type cellulaire		FcγRI	FcγRIIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIb	FcαRI	DC-SIGN	plgR	FcRn	TRIM21
Sang	LB	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Faible	Faible
	LT	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Faible	Faible
	Cellules NK	Faible	Aucun	Faible	Faible	Fort	Aucun	Faible	Faible	Aucun	Faible	Intermédiaire
	Monocytes	Intermédiaire	Fort	Fort	Fort	Faible	Aucun	Fort	Faible	Aucun	Fort	Fort
	DC	Faible	Fort	Fort	Aucun	Faible	Faible	Faible	Faible	Aucun	Faible	Intermédiaire
	Neutrophiles	Aucun	Faible	Faible	Faible	Faible	Fort	Fort	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Eosinophiles	Aucun	Intermédiaire	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Intermédiaire	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Basophiles	Aucun	Faible	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Mastocytes	Faible	Intermédiaire	Fort	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Faible
Muqueuse	Epithélium	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Intermédiaire	Faible	Faible
	LB	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Faible	Faible
	LT	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Faible	Faible
	Cellules NK	Faible	Aucun	Faible	Faible	Fort	Aucun	Faible	Faible	Aucun	Faible	Fort
	Monocytes	Intermédiaire	Fort	Fort	Fort	Faible	Aucun	Faible	Faible	Aucun	Faible	Faible
	DC	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible	Aucun	Aucun	Faible	Fort	Aucun	Faible	Faible
	Macrophages	Faible	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire	Faible	Fort	Intermédiaire	Fort	Aucun	Fort	Faible
	Neutrophiles	Aucun	Faible	Faible	Faible	Faible	Fort	Fort	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Eosinophiles	Aucun	Intermédiaire	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Intermédiaire	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Basophiles	Aucun	Faible	Intermédiaire	Aucun	Aucun	Faible	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Faible
	Mastocytes	Faible	Intermédiaire	Fort	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Faible	Faible

Niveau d'expression :



c) *Signalisation induite par la liaison Fc-FcR dans les cellules myéloïdes*  
(1) Les récepteurs de type I

Les récepteurs de type I à haute affinité, FcγRI/CD64 et FcαRI/CD89, utilisent tous deux la même machinerie intracellulaire via les motifs de signalisation ITAM qui se trouvent dans la queue cytoplasmique de la chaîne FcRγ, mais avec une stœchiométrie différente de liaison entre les IgA et les IgG. Ainsi, alors que le Fcγ se lie au FcγRI/CD64 dans un rapport molaire 1:1, deux molécules de FcαRI/CD89 se lient à chaque Fcα, ce qui entraîne le recrutement de deux molécules de FcRγ par IgA (Breedveld and van Egmond, 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). Par conséquent, pour une quantité égale d'Ab, la cascade de signalisation induite par une IgA-IC via FcαRI/CD89 dépassera celle induite par une IgG-IC via FcγRI/CD64 (Brandsma et al., 2019). Il est intéressant de noter que les IgA monomériques et dimériques présentent des affinités comparables pour FcαRI/CD89, ce qui suggère que FcαRI/CD89 se lie aux deux formes d'IgA dans une stœchiométrie 2:1 similaire (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Herr et al., 2003; Oortwijn et al., 2006).

De façon similaire aux interactions FcγRI/CD64-IgG, les récepteurs d'IgG de moyenne et faible affinité FcγRII/CD32 et FcγRIII/CD16 se lient à la région Fc dans un rapport molaire de 1:1 (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; de Taeye et al., 2019). Ces interactions Ab:FcR entraînent trois types de cascades de signalisation intracellulaire illustrées en **Figure 19**:

- Les deux premiers types sont déclenchés uniquement par les Abs en IC avec l'antigène libre ou lorsqu'ils recouvrent la surface de cellules ou de microbes opsonisés. Ces complexes peuvent activer les récepteurs qui vont à leur tour amorcer l'activation cellulaire. Lors de l'activation induite par l'IgG-IC, la tyrosine kinase Src Fyn phosphoryle sur plusieurs sites soit l'ITAM du FcR, c'est-à-dire le FcγRIIIa/CD32a, soit la chaîne adaptatrice intracellulaire FcRγ associée au FcγRI/CD64 (**Figure 19a**). Lors de l'activation induite par l'IgA-IC, la tyrosine kinase Src Fyn phosphoryle la chaîne FcRγ adaptatrice intracellulaire associée au FcαRI/CD89 (**Figure 19b**). Dans les deux cas, cette phosphorylation permet le recrutement des protéines SH2-adaptatrices Syk qui activent à leur tour les PI3K et PLCγ. Cela déclenche finalement la voie ERK conduisant à une augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca<sup>2+</sup>. Cette activation va aussi pouvoir activer la translocation de facteurs de transcription tels qu'AP1, NFAT ou NFκB. Cela induit la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-6, le TNFα, l'interféron (IFN)

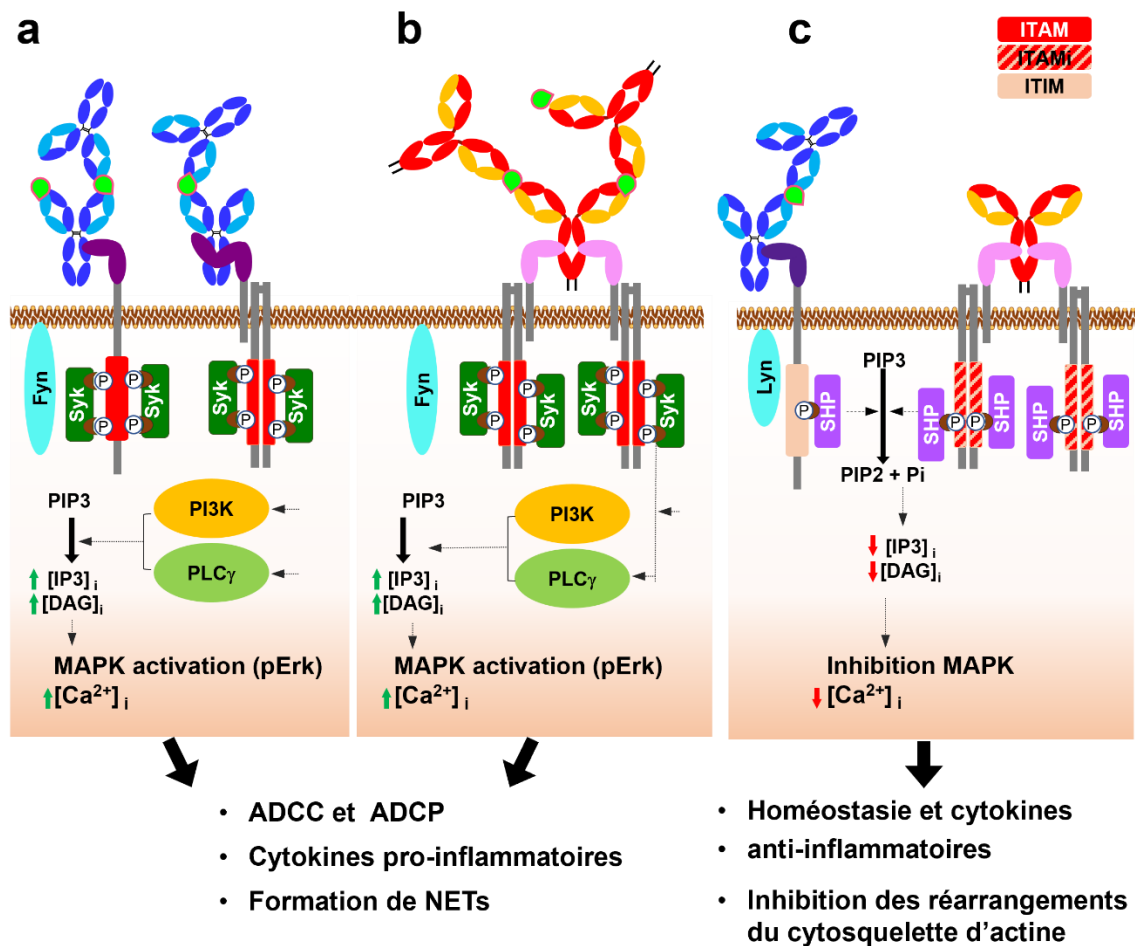
$\gamma$  ou encore l'IL-10, et favorise la survie des cellules. Ensemble, ces acteurs sont responsables de l'activation cellulaire, de la phagocytose, de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) et de NET (discutés plus tard), de la libération de cytokines et de la présentation d'antigènes (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Getahun and Cambier, 2015; Roghanian et al., 2018).

- En revanche, le dernier type est déclenché lorsque l'IgG forme un IC et engage le Fc $\gamma$ RIIb/CD32b. Il est aussi déclenché lorsque l'IgA est dépourvue d'antigène, ce qui conduit à une inhibition qui contribue à l'homéostasie immunitaire (**Figure 19c**). L'IgG-IC se lie au Fc $\gamma$ RIIb/CD32b contenant des ITIM qui deviennent monophosphorylés. Par ailleurs, l'IgA sans antigène se lie au Fc $\alpha$ RI/CD89. Cela déclenche une phosphorylation sous-optimale de l'adaptateur intracellulaire FcR $\gamma$  contenant l'ITAM, que l'on appelle alors ITAM inhibiteur ou ITAMi. À leur tour, l'ITIM et la monophosphorylation de l'ITAMi recrutent des SH2-phosphatases qui contrecarrent l'activité de Syk (Roghanian et al., 2018). Ainsi, l'activation des ITIM et des ITAMi contrebalancent celle de la signalisation d'ITAM dans les mêmes cellules (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Getahun and Cambier, 2015; Roghanian et al., 2018). Cependant, il a été montré qu'une stimulation suboptimale de Fc $\gamma$ RIIIa/CD32a par un Fab anti-Fc $\gamma$ RIIIa/CD32a déclenche également une signalisation ITAMi chez la souris (Ben Mkaddem et al., 2019; Bournazos et al., 2017; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Davis, 2007; Getahun and Cambier, 2015). Cependant, aucune phosphorylation suboptimale d'ITAM (à savoir la signalisation ITAMi) n'a été rapportée lors de l'engagement d'IgG non complexées avec Fc $\gamma$ RI/CD64 et Fc $\gamma$ RIIb/CD16b, ces derniers étant associés à la chaîne FcR $\gamma$  adaptatrice portant un ITAM. Cela est probablement dû au fait que l'affinité des IgG sans antigène pour les deux récepteurs est trop faible.

Bien que l'IgA puisse servir de médiateur à la signalisation lorsqu'elle est dépourvue d'antigène, l'IgG agit dans le contexte de complexes immuns *in vivo*. Dans ces conditions, la taille de l'IC, ainsi que la nature isotypique et le degré de glycosylation contribuent à la force de l'engagement du Fc $\gamma$ R et aux fonctions effectrices en aval (Cottignies-Calamarte et al., 2023b).

Au niveau cellulaire, la cellule effectrice exprime généralement de multiples FcR qui peuvent être chacun engagés par les multiples domaines des Fc compris dans un IC. Par

conséquent, les signaux d'activation (ITAM) et d'inhibition (ITIM et ITAMi) peuvent être déclenchés simultanément sur les cellules effectrices. La fonction effectrice nette qui en résulte dépendra de l'équilibre entre l'ampleur de la signalisation FcRs anti-inflammatoire et pro-inflammatoire induite.

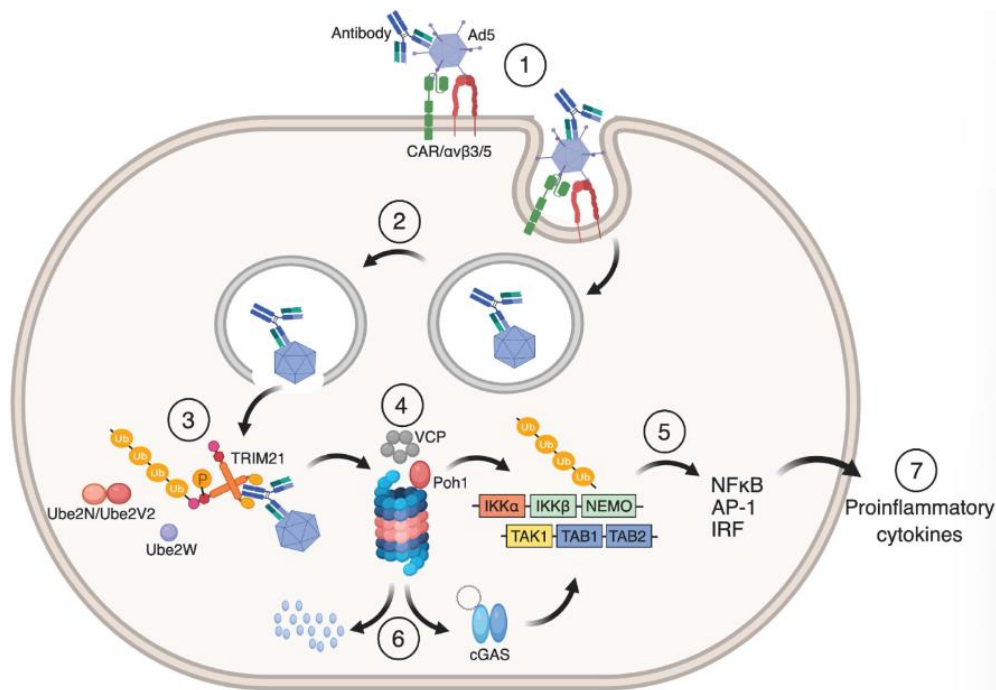


**Figure 19: Voies de signalisation des FcR.** L'engagement des FcR peut-être activateur comme par les IgG en IC liant CD64/Fc $\gamma$ RI ou CD32a/Fc $\gamma$ RIIa (a) ou d'IgA en IC liant CD89/Fc $\alpha$ RI (b) induisant l'auto-phosphorylation des ITAM correspondants. La phosphorylation des ITAM induit le recrutement des kinases Syk, permettant l'activation de la voie PI3K et PLC $\gamma$ , augmentant la conversion du PIP3 en DAG et IP3, activant la voie des MAPK et l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. (c) La liaison d'un IgG-IC au Fc $\gamma$ RIIb/CD32b ou d'IgA non lié à l'antigène au Fc $\alpha$ RI/CD89, induit une signalisation anti-inflammatoire par recrutement des Syk qui agissent à l'inverse des PI3K et PLC $\gamma$ . Adapté de Cottignies-Calamarte 2023 *Frontiers in Immunology*. PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PLC $\gamma$  : PhosphoLipase C  $\gamma$  ; PIP3 : Phosphadityl Inositol 3,4,6-triPhosphate ; IP3 : Inositol 3 Phosphate ; DAG : DiAcyl Glycérol ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase. Adapté de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*.

## (2) Les FcR non-canoniques

Trois FcRs non-canoniques ont été décrits. Le premier, TRIM21, pourrait agir comme un FcR cytoplasmique intracellulaire pour les IgG et les IgA (monomérique ou dimérique) (Bidgood et al., 2014; Caddy et al., 2020; James et al., 2007). En se liant aux Ab, TRIM21 déclenche la dégradation intracellulaire des IC virus-Ab grâce à l'activité Ub-ligase de TRIM21. Ce mécanisme est

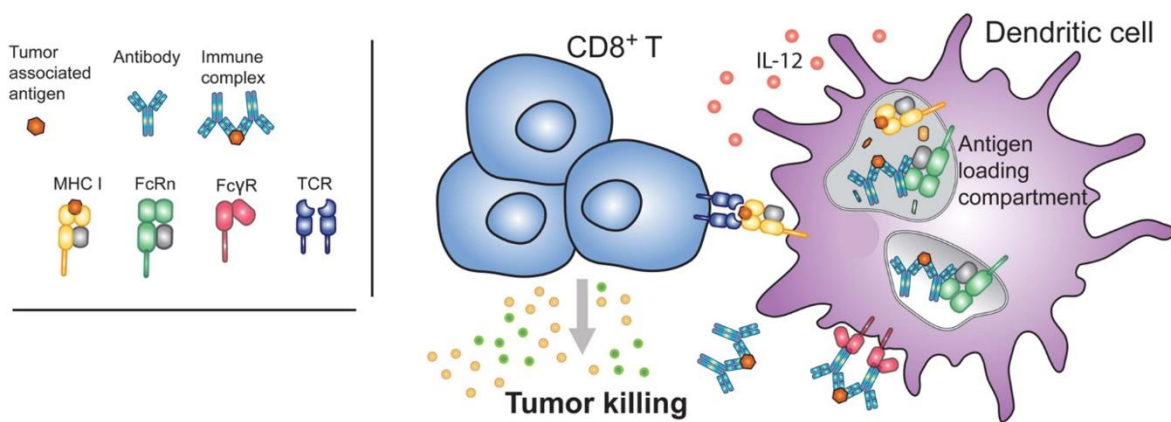
indépendant de l'activité neutralisante de l'Ab, même s'il est dénommé *Antibody-Dependent Intracellular Neutralization* (ADIN). En effet, ADIN fait référence à la neutralisation du virus due à sa dégradation plutôt qu'à la capacité de l'Ab à bloquer directement l'entrée du virus et l'infection des cellules cibles (Bidgood et al., 2014; Caddy et al., 2020; James et al., 2007). En outre, TRIM21 facilite les fonctions antivirales par la dégradation protéasomale et l'exposition du génome viral aux capteurs cellulaires (**Figure 20**) (Bidgood et al., 2014; Foss et al., 2019; Ng et al., 2019). Cependant, aucune évidence d'un tel mécanisme pour les Abs anti-VIH-1 n'a été mis en avant.



**Figure 20 : Schéma des activités antivirales induites par la liaison d'IC à TRIM21.** Le complexe virus-Ab est relargé dans le cytosol après endocytose ou phagocytose et permet l'adressage du complexe immunitaire au protéasome pour être dégradé en peptides antigéniques pour la présentation aux TCD8 et activer la production de chimokines pro-inflammatoires. Issu de Foss, 2019, *Frontiers in Immunology*.

Le second, FcRn, une molécule non classique du CMH-I, est exprimée de manière ubiquitaire. Le FcRn ne se lie à l'IgG qu'à un pH bas qui survient après l'endocytose de l'Ac par divers FcRs et sa libération dans un compartiment acide (**Figure 15**). Le FcRn est responsable du recyclage des IgG sans antigène vers la surface cellulaire et de leur libération à pH neutre. Ce recyclage empêche les IgG sans antigène de subir une dégradation protéasomique et entraîne le prolongement de la demi-vie systémique des IgG. En revanche, le FcRn achemine les IgG-IC vers la dégradation. Cela entraîne une présentation croisée dont nous détaillerons le mécanisme plus bas (Baker et al., 2014; Pyzik et al., 2019). Par conséquent, la liaison des IgG au FcRn augmente la présentation croisée des peptides aux cellules TCD8 spécifiques correspondantes *in vitro*,

établiant un pont entre l'immunité adaptative et innée (**Figure 21**) (Baker et al., 2014; Liu et al., 2011). La présentation croisée médiée par le FcRn pourrait être responsable de l'augmentation de la protection médiée par les TCD8 spécifiques du VIH chez les NHP prétraités par des bNAb avant infection par le virus de l'immunodéficience recombinant humain-simien (SHIV), comparativement aux animaux non traités (Ko et al., 2014). Les bNAb infusés présentaient la mutation LS qui augmente la liaison de l'Ab au FcRn. Le rôle du FcRn dans la présentation croisée a été confirmé dans des modèles animaux de cancer (Baker et al., 2014; Liu et al., 2011; Qiao et al., 2008; Zalevsky et al., 2010). Cette molécule non-classique du CMH-I mérite d'être étudiée plus en profondeur pour développer de nouveaux axes thérapeutiques.



**Figure 21 : Mécanisme de la présentation antigénique médiée par FcRn.** L'internalisation d'IC-IgG médiée par les FcγR permet l'interaction dans les endosomes avec le FcRn pour permettre l'adressage dans des compartiments de chargement des antigènes sur le CMH-I afin de présenter les antigènes tumoraux aux TCD8 spécifiques. Adapté de Pyzik, 2019, *Frontiers in Immunology*.

Les Ab peuvent également lier les récepteurs *FcR-Like* (FCRL), une famille de récepteurs nommés par homologie avec le FcγRI/CD64 canonique (Mechetina et al., 2002). La famille FCRL contient actuellement six membres (1-6) préférentiellement exprimés sur les cellules B pour FCRL1 à 5, bien que FCRL3 soit également exprimé par les Th17 et les Treg, tandis que FCRL6 est principalement exprimé par certains sous-ensembles de cellules T et NK (Agarwal et al., 2020; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Davis, 2007). La région intracellulaire des FCRL contient soit un seul domaine ITAM, comme dans FCRL1, soit un domaine ITAM avec un nombre variable de domaines ITIM, à savoir d'un à trois dans les FCRL2 à 6 (Rostamzadeh et al., 2018). Cette hétérogénéité dans la configuration ITIM/ITAM est probablement responsable des différences fonctionnelles majeures entre les divers FcRL. Néanmoins, la vision la plus couramment acceptée est que seul le FCRL1 fonctionne comme un récepteur activateur, les autres agiraient surtout comme des régulateurs négatifs.

Seuls les FCRL3, FCRL4 et FCRL5 agissent comme des récepteurs aux Abs. En effet, FCRL3 semble lier les IgA mais uniquement sous forme sécrétoire. Lorsqu'il est artificiellement agrégé à la chaleur, il entraîne l'inhibition des fonctions Treg et la promotion d'un phénotype Th17 (Agarwal et al., 2020). Ceci suggère que FCRL3 peut agir comme un capteur d'IC dans l'environnement muqueux favorisant localement un environnement inflammatoire. Il peut aussi moduler la plasticité des cellules T régulatrices pour aider au contrôle de l'invasion par les pathogènes. Cette hypothèse doit encore être validée en utilisant des sIgA réticulés par leur antigène spécifique. En revanche, FCRL4 exprimé par les cellules B mémoires se lie aux IgA sériques mais pas aux sIgA (Liu et al., 2020). Ceci laisse penser qu'il participe à la tolérance muqueuse. FCRL4 se lie également faiblement aux IgG3 et IgG4 agrégées par la chaleur (Wilson et al., 2012). Pourtant, d'autres expériences avec des IgG natives seules ou dans un IC sont nécessaires pour valider fonctionnellement ces interactions. FCRL5 se lie quant à lui à tous les isotypes d'IgG, mais avec des affinités différentes (Franco et al., 2013; Wilson et al., 2012). Dans les lignées cellulaires transfectées par FCRL5, la reconnaissance des IgG s'accroît avec la déglycosylation des Ab, phénomène qui augmente avec la durée de vie des IgG (Franco et al., 2013). Ce résultat doit être validés dans les cellules primaires FCRL5<sup>+</sup>.

La biologie et les fonctions des FcRLs restent mal comprises. Il a été proposé que les expressions de FCRL3, FCRL4 et FCRL5 soient impliquées dans le développement des cellules B dans différents sous-ensembles de cellules B (Dement-Brown et al., 2012; King et al., 2021; Liu et al., 2020). Par exemple, Dement-Brown et collègues ont montré que la réticulation de FCRL5 sur les cellules B contrecarre la signalisation du BCR tout en augmentant leur prolifération, une caractéristique majeure pour le développement des cellules B (Dement-Brown et al., 2012). Comme récemment proposé, les FCRL3-5 pourraient exercer des rôles importants dans la protection des muqueuses, en tant que capteurs favorisant l'immunité. Ils pourraient aussi servir en tant que marqueurs d'épuisement dans les cas de troubles auto-immuns et d'infections virales chroniques (Tolnay, 2022). Dans l'ensemble, le cross-linking des FCRL par des IC entraînant l'élimination de la cellule/micro-organisme ciblé(e) par l'Ab ne se produit que dans de rares cas.

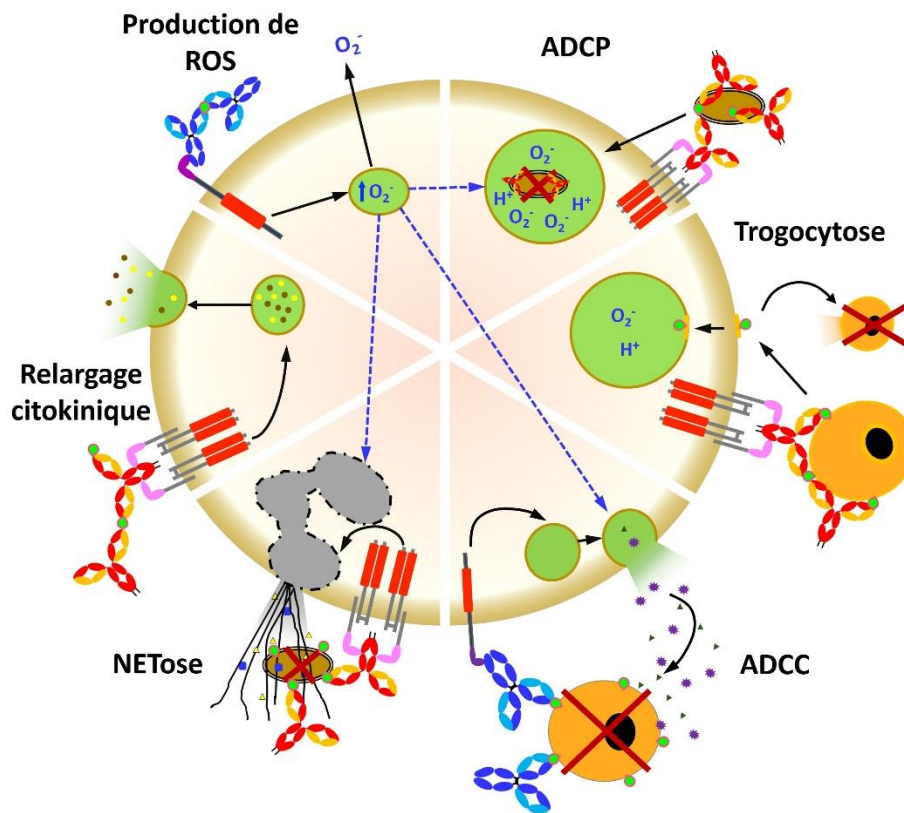
#### d) *Les fonctions effectrices*

L'intégration au niveau des cellules effectrices de l'engagement des FcR activateurs et inhibiteurs après la formation de l'IC entraîne un large spectre de fonctions, notamment la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) médiée par les Abs, l'ADCC, l'ADCP, la production et le relargage de cytokines, la production de ROS, la transcytose ainsi que leur recyclage (**Figure 22**) (Breedveld et al., 2021; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; de Taeye et al., 2019).

L'induction des fonctions effectrices chez les individus infectés est corrélée à une charge virale moins élevée et une progression moins rapide de la maladie chez les individus infectés par le VIH-1 (Ackerman et al., 2011; Ahmad et al., 2001; Dugast et al., 2011; Lyerly et al., 1987). Ces fonctions effectrices sont non exclusives de la neutralisation de l'infection et peuvent tout à fait corrélées (Bruehl et al., 2016). Le rôle de ces fonctions effectrices a pu être largement étudiée dans des contextes d'individus infectés, de vaccination mais aussi d'immunisation passive (Acharya et al., 2014; Ackerman et al., 2016; Barouch et al., 2013; MacLeod et al., 2016; Santra et al., 2015). Un des points d'entrée des études sur les fonctions effectrices est peut-être la démonstration de la perte de la protection des animaux infusés par les bNAbs s'ils présentent la mutation LALA (inhibant la liaison aux FcR $\gamma$ ) (Bournazos et al., 2014; Hessel et al., 2009, 2007).

##### (1) *Cytotoxicité dépendante du complément*

La reconnaissance des antigènes par les Abs, soit exprimés à la surface des cellules tumorales ou infectées par un virus conduit à leur opsonisation. À son tour, le complément est recruté par les Abs à la surface de la cellule, formant un complexe multiprotéique qui perturbe la bicouche lipidique de la membrane plasmique et tue la cellule opsonisée (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Sarma and Ward, 2011). Les IgG et les IgA sont toutes deux capables de recruter le système du complément, mais en utilisant des mécanismes différents, ce qui rend difficile une comparaison directe entre les activités dépendantes du complément des deux isotypes (Bindon et al., 1988; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Itami et al., 2020). Les deux voies convergent pour former le complexe terminal du complément C5b-C9, bien que les mécanismes d'initiation restent à décrire.



**Figure 22 : Vue d'ensemble des fonctions effectrices induites par l'activation des FcR.** La réticulation des FcR en surface des cellules de l'immunité innée induit un large spectre de fonctions impliquées dans la réponse dirigée contre l'épitope comme la sécrétion de cytokines, la production de ROS ou des fonctions agissant directement sur le pathogène en IC comme la NETose, l'ADCC et l'ADCP. Adapté de Cottignies-Calamarte, 2023, *Frontiers in Immunology*.

## (2) Cytotoxicité dépendante des anticorps à médiation cellulaire (ADCC)

L'ADCC est une fonction effectrice qui repose sur l'interaction du Fc avec un FcR à la surface de la cellule effectrice, ce qui déclenche la destruction de la cellule cible opsonisée (**Figure 22**). Dans le traitement du cancer, l'ADCC dépendant des NK est l'un des principaux mécanismes d'action des Abs thérapeutiques pour éliminer les cellules cancéreuses (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Miller and Finn, 2020; Ochoa et al., 2017; Pereira et al., 2018). Il est intéressant de noter que l'ADCC induite par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles est plus efficace lorsqu'elle est déclenchée par des cellules opsonisées par des IgA par rapport aux IgG. Cette amélioration de l'ADCC par des cellules opsonisées par des IgA est très probablement due à la stœchiométrie de liaison plus élevée du Fc $\alpha$  aux Fc $\alpha$ RI/CD89 (Brandsma et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Duchemin et al., 2018a; Lohse et al., 2016; Treffers et al., 2018) que celle du Fc $\gamma$  au Fc $\gamma$ RI/CD64 mentionné plus tôt. Cependant, une étude récente a pu faire une

comparaison extensive du rôle des isotypes IgA et IgG de différents bNAbs dans leur faculté d'induction de l'ADCC. Les auteurs rapportent que l'isotype IgA n'est pas forcément plus fort inducteur d'activité ADCC-like, mais que cela semble dépendre de l'épitope ciblé par les différents bNAbs (Noailly et al., 2022). Les auteurs rapportent cependant que, dans le cadre des bNAbs spécifiques de gp41, les IgA sont de meilleurs inducteurs de l'activité ADCC-like sans pour autant avoir un potentiel neutralisant plus fort. Ces résultats appuient le rôle de l'isotype IgA dans la protection des muqueuses contre l'infection par le VIH-1 via l'induction de des fonctions effectrices.

De façon intéressante, il a été montré au laboratoire que les IgG et les IgA agissent en synergie pour augmenter la lyse des cellules infectées par le VIH-1 par ADCC (Duchemin et al., 2018a). L'expression constitutive *in vivo* des FcR correspondants sur les cellules effectrices telles que les monocytes, macrophages et neutrophiles rends cette observation *in vitro* probable *in vivo* bien que la lignée cellulaire myéloïde THP1 n'expriment pas les récepteurs au même niveau (Cheeseman et al., 2016; Duchemin et al., 2018a; Tay et al., 2016). De plus, ceci permettrait d'expliquer la coopération entre les IgG et IgA dans la protection des NHP vaccinés ou immunisés passivement contre l'infection muqueuse rapportée par le groupe du Dr Ruprecht (Gong et al., 2021; Lakhashe et al., 2022; Anton M. Sholukh et al., 2015).

### (3) Phagocytose cellulaire médiée par les anticorps (ADCP) et présentation antigénique croisée

#### (a) La phagocytose médiée par les anticorps

La phagocytose cellulaire dépendante des Abs (*Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis* ou ADCP) peut être réalisée par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles stimulés par des cellules opsonisées *via* l'activation de FcγRIIa/CD32a, FcγRI/CD64 ou FcαRI/CD89. Ceci entraîne l'internalisation de la cellule cible opsonisée dans un phagosome (**Figure 22**). Le phagosome s'acidifie après fusion avec les compartiments endocytiques et lysosomaux pour former un phagolysosome dans lequel la cellule cible opsonisée est lysée (Tay et al., 2016; Vidarsson et al., 2014b). De manière intéressante, la présence à la surface de la cellule effectrice du FcRn en plus des FcγR augmente le score d'ADCP (Qiao et al., 2008; Vidarsson et al., 2006), suggérant qu'une coopération s'établie entre les deux classes de FcRs. L'internalisation de cellules cibles opsonisées

par l'ADCP dans les APC pourrait entraîner une dégradation de l'antigène. Après dégradation en peptides, ceux-ci peuvent être chargés sur le CMH-I conduisant à une présentation croisée efficace (Jusforgues-Saklani et al., 2008; León et al., 2014; Liu et al., 2011) puis à une réponse spécifique des cellules TCD8 (Gall et al., 2017; Niu et al., 2021; Tseng et al., 2013; Villinger et al., 2003). Ce mécanisme met en évidence un lien direct entre l'immunité humorale et cellulaire, qui s'ajoute à celui établi par le FcRn.

Seules quelques études ont comparé directement l'ADCP des cellules cibles médiée par IgG-Fc $\gamma$ RI/CD64 par rapport à IgA-Fc $\alpha$ RI/CD89. Globalement, l'isotype IgA induit de plus hauts niveaux d'ADCP l'isotype IgG (Aleyd et al., 2014; Brandsma et al., 2019; Duchemin et al., 2020; Evers et al., 2021, 2020; Lohse et al., 2018a, 2016). En particulier dans une étude du laboratoire à laquelle j'ai participé, nous avons montré que l'ADCP de TCD4 infectés effectuée par les monocytes et neutrophiles est plus efficace quand elle est médiée par le bNAb 2F5-IgA que lorsque le 2F5 est sous isotype IgG. De plus, l'ADCP médiée par l'IgA-2F5 est plus efficace que celle médiée par d'autres bNAbs IgG anti-gp41 ou -gp120, indépendamment du type de cellule effectrice (Duchemin et al., 2020). L'IgA spécifique de l'enveloppe du VIH-1 provenant d'un seul individu ayant reçu le vaccin RV144 a réalisé une ADCP robuste (Wills et al., 2018) bien que dans cette étude, l'ADCP médiée par l'IgG de la même personne n'ait pas été caractérisée. Les quelques études sur l'ADCP médiée par les IgA par rapport aux IgG dans les infections bactériennes ont montré que les IgA monomériques ont tendance à mieux protéger des souris humanisées *TgFc $\alpha$ RI/CD89* que les IgG, contre les infections à *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes. En revanche, les IgA polymériques induisent la phagocytose de *Neisseria meningitidis* de manière similaire aux isotypes IgG (Tran et al., 2020; Vidarsson et al., 2001).

S'il a été clairement établi que l'ADCP contribue à la protection contre le VIH-1 dans un modèle de NHP, c'est peut être aussi le cas dans l'essai vaccinal RV144 dans lequel des individus vaccinés ont développé des IgG3 capables d'ADCP dans un modèle de cellules rapportrices (Barouch et al., 2015, 2013; Neidich et al., 2019; Richardson et al., 2019). De plus, comme attendu (Brandtzaeg, 1997), le protocole de vaccination impacte à la fois la nature des Abs anti-HIV et les fonctions effectrices sous-jacentes (Ackerman et al., 2018). En effet, la vaccination par injection intramusculaire induit une réponse IgG associée à l'ADCP médiée par des macrophages alors que

la vaccination nasale induit des IgA et l'ADCP médiée par des neutrophiles. Ces résultats sont particulièrement importants puisque qu'au niveau des muqueuses, les principales cellules effectrices de l'ADCP sont les neutrophiles, plutôt que les macrophages (Sips et al., 2016).

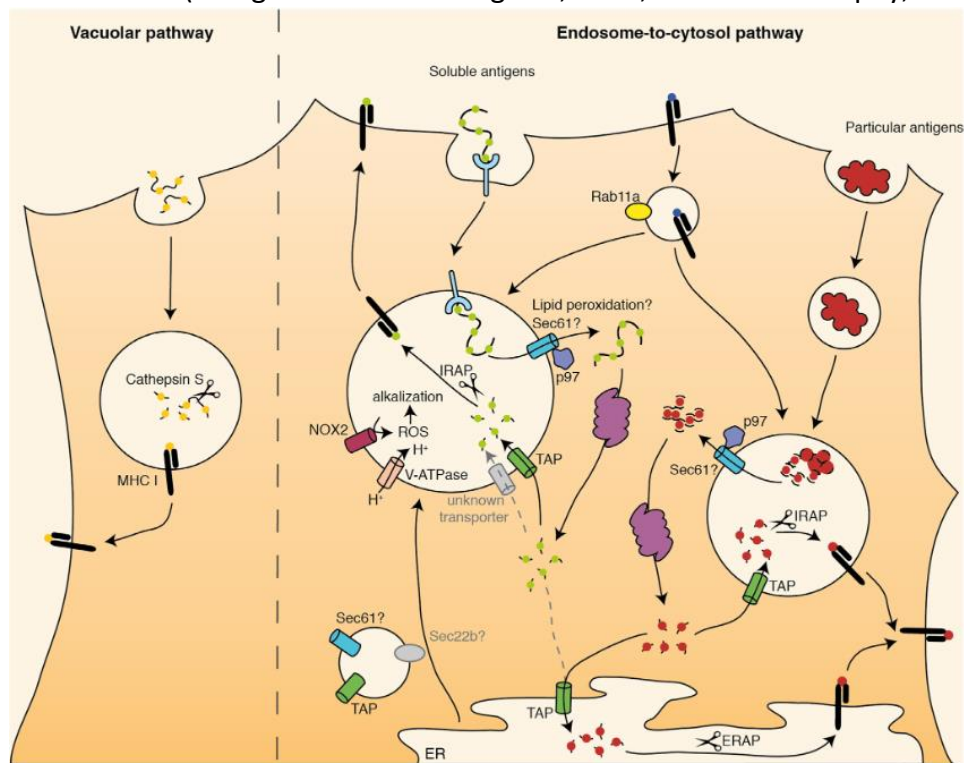
#### (b) La présentation antigénique de classe I

La présentation antigénique *via* le CMH-I est généralement restreinte aux peptides issus de l'infection d'une cellule ou de l'expression anormale d'une protéine, comme une protéine oncogénique. Les CMH-I sont exprimés de façon ubiquitaire par toutes les cellules de l'organisme, assurant leur protection. Les CMH-I sont constitutivement exprimés à la membrane plasmique mais sont recyclés à un niveau important (Montealegre and van Endert, 2019). Au cours d'une infection virale, les protéines du virus peuvent être dégradées par le protéasome, sous forme d'immuno-protéasome lorsque celui-ci est associé à une réponse inflammatoire antivirale. Les protéines virales peuvent aussi être dégradées par la voie de l'autophagie lors de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Ces deux voies de dégradation sont des sources de peptides de classe I qui sont ultérieurement chargés sur le CMH-I. Le chargement antigénique des CMH-I augmente leur temps de résidence à la membrane, ce qui favorise significativement l'efficacité de la présentation antigénique (Jusforgues-Saklani et al., 2008; León et al., 2014).

#### (c) La présentation croisée d'antigènes

Les peptides dits exogènes sont issus d'antigènes capturés depuis le milieu extracellulaire, par phagocytose ou endocytose. Ces peptides ont été initialement décrits comme alimentant la présentation antigénique de classe II *via* le CMH-II et destiné à l'activation des TCD4, selon un mécanisme non détaillé ici. Cependant, les peptides exogènes alimentent aussi la présentation antigénique de classe I *via* le CMH-I selon un processus défini alors comme présentation croisée aux TC8. La présentation croisée a été principalement décrite en cancérologie, où celle-ci est médiée par des cDC1 après phagocytose d'antigènes solubles (Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Ohara and Murphy, 2023). La phagocytose des antigènes solubles induit leur dégradation par les cathepsines cellulaires dans les endosomes en peptides antigéniques qui seront ensuite chargés sur les CMH-I également présents dans les endosomes. Cette voie de présentation croisée est décrite comme vacuolaire (**Figure 23**) (Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Ohara and Murphy, 2023). Une seconde voie de présentation croisée, dite cytosolique, concerne plutôt les antigènes

particulaires (micrométriques et/ou enveloppés) mais aussi les peptides solubles. Ces antigènes sont dégradés en protéines unitaires pour être adressés au cytosol. Dans le cytosol, le protéasome dégradera les protéines en peptides antigéniques, qui seront retransloqués dans des compartiments de recyclage des CMH-I, où ils seront chargés sur ces derniers avant d'être adressés à la membrane (**Figure 23**) (Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Ohara and Murphy, 2023). Indépendamment des voies empruntées, la présentation antigénique nécessite que la dégradation du matériel phagocyté soit finement contrôlée, notamment en terme d'acidité du compartiment et la production de ROS (Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Ohara and Murphy, 2023).



**Figure 23 : Présentation des voies de chargement du CMH-I par les voies vacuolaires et du cytosol.** Pour la voie vacuolaire, les protéines solubles sont phagocytées et dégradées dans les endosomes par les cathepsines cellulaires. Les peptides issus de cette dégradation seront chargés sur les molécules de CMH-I circulantes pour être ensuite exportés à la membrane plasmique. La voie cytosolique suppose que l'antigène phagocyté soit ensuite exporté dans le cytosol pour permettre sa dégradation par le protéasome. Le protéasome génère des peptides antigéniques qui suivent la voie de présentation des antigènes de classe I classique. Issu de Embgenbroich et Burgdorf, 2018, *Frontiers in Immunology*.

Comme évoqué plus tôt, la protection de NHP par des bNAbs peut être aussi dépendante de l'activation de TCD8 VIH-spécifiques (Nishimura et al., 2017; Niu et al., 2021; Villinger et al., 2003). Cependant la réponse de lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T Lymphocytes* ou CTL) ne semble pas dépendre d'un épitope spécifique ciblé par les bNAbs mais des fonctions effectrices engagées par les bNAbs. Il se pourrait toutefois que la différence de séquence du Fc et/ou le degré de glycosylation des anticorps soit responsable de leur faculté à induire une réponse CTL via les

FcR (Villinger et al., 2003). Plus récemment, le groupe du Pr Søggaard a montré que l'injection de bNAb 3BNC117-IgG à l'initiation de la cART permet un meilleur contrôle de la virémie par rapport aux individus ayant reçu uniquement la cART (Gunst et al., 2022). Les auteurs présentent en plus que ces individus maintiennent un contrôle de la virémie jusqu'à 4 ans post-traitement bNabs sans cART. Ce contrôle est dépendant d'une réponse CTL VIH-spécifique (Rosás-Umbert et al., 2022)

Ainsi, l'engagement de l'ADCP et de l'ADCC permettrait l'induction de la présentation croisée par les deux mécanismes. Dans le premier, l'ADCC de cellules infectées induit leur mort et le relargage de protéines/peptides viraux par perte de leur intégrité membranaire. Ces peptides sont ensuite phagocytés par une APC. Cette phagocytose permettrait de présenter, par la voie vacuolaire, des antigènes viraux aux TCD8 spécifiques du VIH-1 comme proposé pour les macrophages et DC dérivés de monocytes (Tang-Huau et al., 2018). L'ADCP de cellules infectées entières, comme la phagocytose de débris enfermés par des membranes de cellules mourantes de l'ADCC, permettrait une alimentation de la voie cytosolique de la présentation croisée des antigènes viraux (Baker et al., 2013; Embgenbroich and Burgdorf, 2018). Si les deux hypothèses sont possibles, il est très difficile de tester l'une ou l'autre uniquement *in vitro* pour déterminer le mécanisme sous-jacent. De plus en plus d'études suggèrent qu'il s'agit d'un mécanisme étendu à d'autres APC non professionnelles comme les macrophages (Liu et al., 2011; Muntjewerff et al., 2020; Mysore et al., 2021). Plus récemment, le concept de présentation croisée post-ADCP a été étendu aux neutrophiles, qui, après stimulation par des OVA-IC se repolarisent vers un profile DC (*neutrophil-APC* ou nAPC) et sont capables d'induire des réponses T spécifiques de l'OVA (Mysore et al., 2021). Ces résultats élargissent le spectre d'efficacité de la présentation de classe I d'antigènes phagocytés par ADCP. Cependant, ce processus a été majoritairement décrit pour les antigènes de l'OVA par les DC (Boross et al., 2014; Gall et al., 2017; Mysore et al., 2021; Ng et al., 2019; Yada et al., 2003). De plus, la présentation croisée après ADCP médiée par les IgA n'a pas été étudiée.

#### (4) Production de ROS

La réticulation des FcR par la liaison d'Abs en IC peut stimuler la formation de ROS intracellulaires. Ces ROS intracellulaires médient une pléthore de fonctions (**Figure 22**), y compris le ciblage des cellules opsonisées aux phagosomes, la formation de NET suivie de la dégranulation

et la libération de ROS extracellulaires (Babior, 2000; Ben Mkaddem et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Fuchs et al., 2007). Ainsi, les ROS intracellulaires agissent comme des seconds messagers pour amplifier l'ADCP et la NETose. Il a été démontré que les IgG et les IgA stimulent toutes deux la formation de ROS. Cependant, les IgA induisent plus fortement les ROS que les IgG, favorisant la formation de NET, l'ADCC et l'ADCP médiés par les IgA (Aleyd et al., 2015). La production de ROS dans les DC favorise aussi la cross-présentation en offrant un environnement de dégradation des protéines en peptides modéré et compatible avec la présentation *via* le CMH-I (Battisti et al., 2017; Ohara and Murphy, 2023; Savina et al., 2006).

#### (5) Sécrétion de cytokines

La liaison des Fc des IC aux FcR des cellules immunes stimule également la libération de nombreuses cytokines par la cellule effectrice innée (**Figure 22**). Le profil des cytokines sécrétées dépend du type de FcR stimulé et de la signalisation qui en résulte. Les FcRs pro-inflammatoires, à savoir FcγRI/CD64, FcγRIIa/CD32a, FcγRIIc/CD32c, FcγRIIIa/CD16a, FcγRIIIb/CD16b, et FcαRI/CD89, induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires, comprenant IL-6, IL-2, IL-12p40, IFNγ et TNFα, tandis que les FcR anti-inflammatoires, notamment FcγRIIb/CD32b, déclenchent la libération de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, ou bloquent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Boross et al., 2014; Gayet et al., 2020; Mishra et al., 2018; Siedlar et al., 2011).

#### (6) Sécrétion de NETs

La formation de pièges extracellulaires composés de la chromatine des neutrophiles (*Neutrophils Extracellular Traps* ou NETs) résulte principalement de la mort cellulaire médiée par les neutrophiles (**Figure 22**). L'activation des neutrophiles déclenche la sécrétion de peptides granulaires antimicrobiens et la libération de la chromatine du noyau cellulaire. Ensemble ils forment des fibres extracellulaires capturant le pathogène ou la cellule cancéreuse, dans un processus appelé NETose (Estúa-Acosta et al., 2019; Fuchs et al., 2007). La NETose apparaît comme un outil supplémentaire dans l'arsenal des stratégies antimicrobiennes et anticancéreuses. La NETose peut être induite à la fois par les IgG et les IgA, bien que les IgA soient les inducteurs les plus forts (Aleyd et al., 2015; Chen et al., 2012; Steffen et al., 2020). La capacité des IgA muqueuses à induire la NETose reste à évaluer.

## (7) Trogocytose

Des mécanismes alternatifs basés sur les Fc permettant la dégradation des cellules cibles ont été décrits comme pour la trogocytose. L'interaction entre les cellules opsonisées et les cellules effectrices exprimant les FcR peut entraîner la capture d'un morceau de la membrane de la cellule cible par la cellule effectrice. Ceci conduit dans la plupart des cas à la mort de la cellule cible. Ce mécanisme est appelé trogocytose (**Figure 22**). Tous les FcR, à l'exception de celui du Fc $\gamma$ RIIc/CD32c, entraînent la trogocytose des cellules opsonisées par les monocytes, les macrophages et les granulocytes effecteurs (Beum et al., 2008; Daubeuf et al., 2010; Iwasaki et al., 2011; Masuda et al., 2012). L'efficacité relative de la trogocytose médiée par différentes sous-classes d'IgG n'ont pas été étudiées. De plus, la capacité des IgA muqueuses à induire la trogocytose est mal décrite et les études comparatives entre isotypes manquent (Chadebech et al., 2010).

### e) Paramètres influant sur l'induction des fonctions effectrices

#### (1) Rôle de l'isotype

Comme discuté plus tôt, la liaison du Fc $\alpha$  sur le Fc $\alpha$ RI/CD89 est plus efficace que celle des IgG au Fc $\gamma$ RI/CD64, à condition que ces premiers soient en IC. Ainsi, des IgA anti-VIH-1 seront plus particulièrement capables d'induire les fonctions effectrices protectrices si et seulement si, ils sont en complexe immun. De plus, les IgA muqueux sont dimériques, ce qui rend chaque molécule plus avide pour son épitope comparativement aux molécules d'IgG. Cependant, la présence de la SC masquant le site de liaison des IgA au Fc $\alpha$ RI/CD89 empêche les sIgA d'induire les fonctions effectrices dépendante de Fc $\alpha$ RI/CD89 (Breedveld and van Egmond, 2019; Carayannopoulos et al., 1996; Vidarsson et al., 2001).

#### (2) Polymorphisme du FcR

Les FcR sont des protéines conservées et permettent donc d'assurer une protection par l'induction des fonctions Fc des anticorps. Cependant, il existe un polymorphisme des FcR. Celui-ci a notamment été associé à une progression plus rapide de l'infection par le VIH-1 et à une variation de la susceptibilité pour le Fc $\gamma$ RIIa/CD32a (Brouwer et al., 2004; Forthal et al., 2007). Une étude récente a même montré que le génotype rs10800309 AA était plus fréquemment retrouvé dans une population de contrôleur élite (*Elite Controller* ou EC) que chez les patients progressant dans la maladie, et de façon indépendante de la présence de HLA protecteur – détaillés plus tard (Carapito

et al., 2020). Ces résultats indiquent que la réponse TCD8 protectrice contre le VIH reste encore mal compris et son élucidation pourrait permettre le développement de vaccins ultérieurement.

### (3) Glycosylation du Fc

Seuls les IgG présentent des glycosylations dans le site de liaison au Fc $\gamma$ R. La N-glycosylation en N297 est très conservée au sein des classes d'IgG et retrouvée sur toutes les IgG circulantes bien qu'elle puisse être très diverse qualitativement (Zauner et al., 2013). La présence des N-glycosylations joue un rôle majeur dans la solubilité des molécules et leur liaison aux Fc $\gamma$ R. Leur présence va influencer les fonctions effectrices induites en aval et aller jusqu'à dicter le potentiel auto-immun des anticorps (Bowden et al., 2012; Davies et al., 2001; Mimura et al., 2001; Wuhrer et al., 2009). La perte du core fucosylé est le plus impactant et se traduit par une augmentation des propriétés inflammatoires (Kapur et al., 2014; Wuhrer et al., 2009). Les IgG anti-VIH afucosylés sont plus affins pour Fc $\gamma$ RIIIb/CD16b et induisent plus efficacement la destruction des cellules cibles, associée à meilleur contrôle de la virémie (Ackerman et al., 2013). Le changement de glycosylation à la faveur de galactosylations ou sialylations est associé à une diminution des fonctions effectrices, a priori causé par le démasquage du site de liaison aux FcR de type II, non compétents dans l'induction des fonctions effectrices (Anthony et al., 2011; Kaneko, 2006; Naso et al., 2010; Scallon et al., 2007).

A l'inverse des IgG, l'impact des glycosylations des IgA sur l'induction de leur fonctions effectrices est encore mal caractérisé. Outre la répartition différente des glycosylations, il semblerait que les IgA soit majoritairement sialylées (Mattu et al., 1998; Royle et al., 2003). Une étude récente a pu montrer que la nature sialylée des IgA est inversement proportionnelle à l'activation des neutrophiles et des macrophages *in vitro*, comme pour les IgG (Steffen et al., 2020). De plus il a été montré que les glycosylations des IgA diminuent le temps de demi-vie sérique (Lombana et al., 2019).

### (4) Contexte cytokinique

Les fonctions effectrices peuvent être modulées par l'environnement cytokinique qui régule le niveau d'expression des FcR. Ce mécanisme est appelé régulation *inside-out* (Koenderman, 2019). Les cytokines, après leur liaison à leurs récepteurs spécifiques sur les cellules effectrices peuvent également influencer l'affinité du FcR et les voies induites en aval en agissant

sur des kinases et phosphatases partagées entre FcR et les récepteurs cytokiniques (Duchemin et al., 1994; Koenderman, 2019). Par exemple, la stimulation des neutrophiles par le GM-CSF augmente la liaison des IgG et des IgA à leurs FcR respectifs, sans toutefois modifier leurs niveaux d'expression. Les neutrophiles sont alors plus enclins à induire l'ADCC et l'ADCP des cellules cancéreuses (Repp et al., 1991; Weisbart et al., 1988). Ce mécanisme est particulièrement efficace lorsque le GM-CSF entre en synergie avec l'activation de Fc $\alpha$ RI/CD89 par l'IgA. Cette interaction active la voie de signalisation PI3K, partagée avec la signalisation ITAM des FcR (**Figure 19**) et en amont de l'ADCC et l'ADCP (Bracke et al., 2000). L'équilibre entre la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires dépend de la signalisation nette ITAM et ITAMi induite sur Fc $\alpha$ RI/CD89 après engagement de l'IC-IgA ou de l'IgA non complexée. Pour les IgG, cet équilibre dépend du type de récepteur impliqué, soit Fc $\gamma$ RIIa/CD32a et c portant l'ITAM, soit Fc $\gamma$ RIIb/CD32b portant l'ITIM (Aleyd et al., 2015; Anthony et al., 2011; Bournazos et al., 2017; Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Hansen et al., 2017).

#### f) Méthodes d'étude des fonctions médiées par le Fc et leurs limites

##### (1) Analyses *in vitro*

A ce jour, toutes les fonctions effectrices connues peuvent être évaluées *in vitro*. La plupart des méthodes sont basées sur la cytométrie en flux permettant une analyse quantitative à l'échelle de la cellule unique et à large échelle (Idusogie et al., 2001; Moore et al., 2010).

- L'ADCC peut être étudiée par analyse du relargage du chrome ou des granzymes. Plus récemment la quantification de l'ADCC a été facilitée par la mise au point d'un test rapide d'ADCC (RFADCC) (Gómez-Román et al., 2006; Miller and Finn, 2020; Pollara et al., 2018, 2011; van der Haar Àvila et al., 2019; Wilkinson et al., 2001). Ces approches permettent de déterminer directement la diminution des cellules cibles en coculture avec les cellules effectrices, ce qui facilite l'interprétation.
- La mesure de la trogocytose est réalisée avec un marquage similaire au RFADCC, ce qui rend son interprétation plus complexe (Alrubayyi et al., 2018; Beum et al., 2008; Richardson et al., 2018). Il faut noter qu'une absence de corrélation entre la sécrétion des granzymes et le RFADCC a été décrite, ce qui semble indiquer que les deux tests mesurent des activités fonctionnelles différentes (Alrubayyi et al., 2018)

- L'ADCP, quant à elle, est exclusivement analysée par mesure de l'internalisation des cellules cibles par les cellules effectrices et quantifiée par cytométrie en flux (Ackerman et al., 2011; Miller & Finn, 2020, Duchemin 2020).

La mesure par cytométrie en flux peut de plus bénéficier de fluorophores sensibles aux variations de pH permettant leur émission dans les endolysosomes (Kamen et al., 2019). Les résultats d'ADCP ne corrélerent pas nécessairement avec ceux d'ADCC. Cette différence suggère que pour caractériser un Ab, il est important d'utiliser plusieurs tests disponibles afin de déterminer le spectre des fonctions médiées par le Fc. Aujourd'hui les tests ont évolué pour offrir des méthodes de quantification à haut débit, ce qui, la plupart du temps, nécessite de travailler avec la lignée cellulaire monocyttaire THP1 comme cellules effectrices. Cependant, cette contrainte ne permet pas de refléter la complexité des FcR exprimés par les monocytes primaires, puisqu'ils n'expriment pas le Fc $\alpha$ RI/CD89 (Lewis et al., 2019). De plus, l'infection des cibles ne correspond pas à une infection retrouvée chez les patients. En effet, les lignées cellulaires sont généralement exposées à des peptides viraux qui miment une infection mais ne reflètent pas l'intégralité des effets viraux possibles. Les cibles utilisées peuvent aussi être des billes fluorescentes pour l'ADCP. Pour se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*, d'autres études se concentrent sur l'utilisation de cellules primaires comme cellules effectrices (Borrok et al., 2015; Duchemin et al., 2020, 2018b; Georgia D. Tomaras et al., 2013).

Les cellules THP1 n'expriment pas ou peu de Fc $\alpha$ RI/CD89. Ainsi, l'évaluation de la capacité des IgA à induire l'ADCC ou l'ADCP est largement sous-estimé dans ce modèle et remet en cause le dogme selon lequel les IgA circulants des patients infectés chroniquement par le VIH-1 ou induits par la vaccination seraient délétères à l'induction des fonctions effectrices des IgG anti-VIH. En effet, Tomarras et collègues avaient proposé que les IgA spécifiques de gp120 induits par la vaccination au cours de l'essai RV144 inhibent l'ADCC induite par les IgG spécifiques de gp120 (Georgia D. Tomaras et al., 2013). Cependant, les THP1 étaient utilisées comme cellules effectrices. Le laboratoire et d'autres groupe ont pu proposer et démontrer que l'isotype IgA des bNAbs se lie de façon efficace à l'enveloppe et peuvent coopérer avec les bNAbs IgG dans l'induction de l'ADCC des cellules infectées par le VIH-1 (Duchemin et al., 2018a; Noailly et al., 2022). Ces résultats

font écho aux résultats du Pr Ruprecht sur la coopération des isotypes IgG et IgA dans la protection des NHP contre l'infection muqueuse ((Gong et al., 2021; Lakhashe et al., 2022).

## (2) Modèles animaux

Les modèles animaux (souris, NHP) sont essentiels pour étudier le rôle des Abs, de leur fonctions effectrices et de leur contribution à la pathophysiologie. Cependant, le contrôle de l'engagement spécifique des FcR par les Abs étudiés peut être altéré si ceux-ci sont issus d'une espèce différente (souvent humain ou humanisés). L'affinité des Ab humains pour les FcRs animaux et inversement, diffèrent d'une situation autologue. En particulier, les IgG humaines ont une affinité légèrement inférieure pour les FcRs de souris (y compris le FcRn) en comparaison de leurs homologues humains. De plus, le niveau d'expression des FcRs peut varier entre les cellules effectrices animales et humaines. Ces différences peuvent donc impacter l'analyse des résultats d'interaction Ab-FcR (Akula et al., 2014; Bournazos et al., 2017; Breedveld and van Egmond, 2019; Crowley and Ackerman, 2019; de Taeye et al., 2019; Dekkers et al., 2017; Mancardi and Daëron, 2014). De plus, l'utilisation de souris transgéniques exprimant Fc $\alpha$ RI/CD89 (*Tg hCD89*) est impératif pour l'étude des fonctions effectrices des IgA, puisque celles-ci expriment le pIgR et non Fc $\alpha$ RI/CD89 (Akula et al., 2014; Heineke and Egmond, 2017; Mancardi and Daëron, 2014). Les NHP, modèle animal le plus proche de l'homme, expriment quant à eux tous les Fc $\gamma$ Rs, Fc $\alpha$ RI/CD89 et pIgR. Les NHP sont donc des modèles plus adaptés aux études précliniques d'Ab thérapeutiques, y compris les IgA (Akula et al., 2014; Crowley et al., 2021; Crowley and Ackerman, 2019). Les neutrophiles ont aussi leur particularité. Cependant, des différences d'expression des FcR sont observés pour les neutrophiles : les neutrophiles humains expriment uniquement Fc $\gamma$ RIIIa/CD32a et Fc $\gamma$ RIIIb/CD16b, tandis que les neutrophiles NHP expriment Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RIIIa/CD32a et Fc $\gamma$ RIIIb/CD32b mais pas le Fc $\gamma$ RIIIb/CD16b. Ainsi, les études visant à caractériser l'effet de l'engagement d'un couple d'Ab-FcR nécessitent le développement de modèles animaux humanisés complexes et coûteux.

## (2) Réponse T CD8 Cytotoxique

La réponse CTL est une réponse qui dépend du chargement des molécules de CMH-I mais aussi de la faculté des TCD8 à être activés par ce signal. Chez les individus *elite controllers* (EC), cette réponse est associée au contrôle de la virémie et de la progression de la maladie. Les individus EC

sont caractérisés par une sérologie VIH positive mais une de répllication virale sous le seuil de détection malgré l'absence de traitement antirétroviral. Chez ces individus, la protection contre la progression de la maladie dépend essentiellement des TCD8 VIH-spécifiques (Genovese et al., 2013; Hendel et al., 1999; Klein and Miedema, 1995). Certains EC peuvent ne plus contrôler la virémie ce qui nécessite un retour au traitement cART (Boufassa et al., 2014).

### 1. Présentation antigénique par les HLA-I protecteurs

L'expression de certains allèles de HLA pourrait être responsable de la protection des individus, notamment HLA-B14, HLA-B27, HLA-B57/58, HLA-C03 et HLA-C8 (Almeida et al., 2007; Fellay et al., 2007; Flores-Villanueva et al., 2001; Hendel et al., 1999; Klein and Miedema, 1995; Migueles et al., 2000). L'expression de ces allèles favoriserait la mise en place d'une réponse TCD8 efficace. Elle permettrait aussi le contrôle de l'infection chez les individus EC, notamment par leur faculté à présenter un spectre plus large d'antigènes issus de Gag aux cellules NK et aux TCD8 VIH-spécifiques (Altfeld et al., 2003; Bonaparte and Barker, 2004; Flores-Villanueva et al., 2001; Gaudieri et al., 2005; Migueles et al., 2000; Vieira et al., 2021).

### 2. Particularités de la réponse cytotoxique associée au contrôle de la virémie

Le second élément de la protection dépendante des CTL repose sur les CTL eux-mêmes. Au fil des années, il est apparu que les TCD8 des EC présentent des particularités propres, notamment de réactivité à des épitopes conservés du VIH-1. Cette réactivité pourrait aussi être initiée par réactivité croisée au VIH-2 préalablement contracté (Klein et al., 1998; Pollack et al., 1997; Rowland-Jones et al., 1998). D'après la caractérisation ultérieure des CTL chez les EC, leur poly-fonctionnalité forte est accompagnée d'un profil d'activation particulier (Jagannathan et al., 2009; Migueles et al., 2002; Nguyen et al., 2019; Sáez-Ciri6n et al., 2007). De plus, les TCD8 des EC présentent un phénotype central mémoire plus important (L6pez et al., 2011). Il semble clair que ces TCD8 soient activés dans ces études, même si une étude récente suggère qu'au contraire, ce n'est pas l'activité cytotoxique classique des TCD8 et leur contenu en granules lytiques (Migueles et al., 2002), qui permet de contrôler la virémie et la progression de l'infection (Nguyen et al., 2019). Dans ce cas, les TCD8 ganglionnaires des EC auraient plutôt un profil transcriptionnel et fonctionnel différent des CTL classiques, avec notamment une augmentation de multiples cytokines et d'autres facteurs sécrétés, ainsi que de celle d'éléments du processus de traduction

des protéines (Nguyen et al., 2019). De plus, dans cette étude, les TCD8 des EC présentent un profil métabolique plus flexible associé à une réduction de l'épuisement immunologique (ou *exhaustion*), favorisant la préservation de leurs fonctions d'élimination des cellules infectées (Angin et al., 2019; Henriquez et al., 2019). Finalement il est possible que cette réponse TCD8 protectrice des EC ne se limite pas aux TCD8 circulants, mais que cette réponse soit aussi active au niveau muqueux (Ferre et al., 2010, 2009; Mazzoli et al., 1997a).

Concernant la réponse humorale, les EC ne génèrent pas une quantité plus grande d'Ab neutralisants. En revanche, ces Ab sont de meilleurs inducteurs de l'ADCC des cellules infectées comparé aux individus progressant dans la maladie (Lambotte et al., 2009). Ces résultats font écho à une forte association génotype-phénotype entre l'allèle dit AA du FcγRIIIa/CD32a par les DC chez les EC et indépendamment de la nature du HLA (Carapito et al., 2020). Ces observations suggèrent en plus que la présentation croisée via les FcR joue un rôle déterminant dans l'établissement du contrôle de la virémie chez les EC.

### **(3) Niveau d'activation des TCD4**

Finalement, les EC présentent aussi un niveau d'activation des TCD4 plus bas avec un phénotype soit moins soit pas du tout épuisé (*exhausted*) relativement à celui des TCD4 d'individus progressant vers le SIDA (Buranapraditkun et al., 2017; Canouï et al., 2017; Pohlmyer et al., 2017). La population de lymphocytes T régulateurs augmente aussi, mais les mécanismes de cette augmentation ne sont pas déterminés (Hartigan-O'Connor et al., 2011; Schulze Zur Wiesch et al., 2011). Le plus faible niveau d'activation des CD4 aurait un double effet inhibiteur. Premièrement, en diminuant l'entrée et l'infection de nouvelles cellules cibles, il aurait un effet direct sur la circulation virale, ce qui laisserait du temps à la réponse immunitaire de se développer plus facilement. Deuxièmement, le faible niveau d'activation limiterait l'expression virale, ce qui influencerait négativement la dissémination virale.

L'ensemble de ces mécanismes indique qu'un traitement cART initié suffisamment tôt permettrait à des individus infectés de devenir des EC avec tous les avantages associés (Climent et al., 2023; Okulicz et al., 2010). Mais, comme pour les EC-natifs, les EC cART-induits pourraient perdre leur protection pour des causes encore mal comprises (Boufassa et al., 2014).

#### (4) Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée agissent comme première barrière contre le virus ce qui indique qu'elles pourraient contribuer à la protection contre le VIH-1. Nous ne détaillerons ici que des cellules particulières : les cellules Natural Killer (NK) et les neutrophiles, cellules particulièrement intéressantes car elles ne sont pas permissives à l'infection et expriment un large spectre des FcR comme mentionné précédemment.

##### 1. Les cellules Natural-Killer

Les cellules NK sont des lymphocytes d'un intérêt particulier dans le cadre du VIH car elles sont activées par des cellules n'exprimant pas le CMH-I, mais par le *Killer Immunoglobulin-like Receptor* (KIR) et d'autres récepteurs d'activation (*NK cell activation Receptor* ou NKR) (Abel et al., 2018). Après infection par le VIH dont l'expression de Nef diminue celle du CMH-I, les cellules infectées présentent un profil favorable à l'activation des NK (Dillon et al., 2014; Gb et al., 1999; Tomescu et al., 2011). Les cellules NK éliminent les cellules cibles grâce à la sécrétion de granules cytotoxiques mais aussi de chimiokines régulant ainsi négativement la progression de l'infection, comme CCL3, CCL4 et CCL5, ou encore l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  (Coffey et al., 1997; Handen and Rosenberg, 1997; Jansson et al., 1996; Schols et al., 1997).

Les NK circulants et muqueux expriment les Fc $\gamma$ RIIa et peuvent ainsi être capables d'induire l'ADCC des cellules infectées (Cottignies-Calamarte et al., 2023b; Katz et al., 1988, 1987). De plus, la présence d'anticorps sériques capables d'induire l'ADCC de cellules infectées médiée par les NK permettait un meilleur contrôle de l'infection et la réduction de la transmission verticale (Ahmad et al., 2001; Mabuka et al., 2012; Wren et al., 2013).

##### 2. Les Neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules immunitaires du système polymorphonucléaire, particulièrement efficaces dans la phagocytose de cellules infectées, de virus et de bactéries (van Kessel et al., 2014). Comme les NK, ces cellules sont d'un intérêt majeur dans la lutte contre le VIH car leur densité au niveau des muqueuses est importante et ces cellules expriment à la fois les Fc $\gamma$ R et le Fc $\alpha$ RI/CD89. Les neutrophiles peuvent donc interagir aussi bien avec les IgG que les IgA (Cheeseman et al., 2016; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). De fait, ces cellules sont particulièrement importantes dans l'élimination des cellules infectées par le VIH par ADCP

(Duchemin et al., 2020; Worley et al., 2018). Bien que la phagocytose des cellules infectées par ADCP soit plus efficace quand elle est induite par les IgA que les IgG, ces deux Abs peuvent coopérer dans l'induction de l'ADCP par les neutrophiles. Cette ADCP médiée par les neutrophiles pourrait participer à la protection et/ou au contrôle de l'infection (Borrok et al., 2015; Brandsma et al., 2019; Duchemin et al., 2020; Heemskerk et al., 2021; Shen and Fanger, 1981).

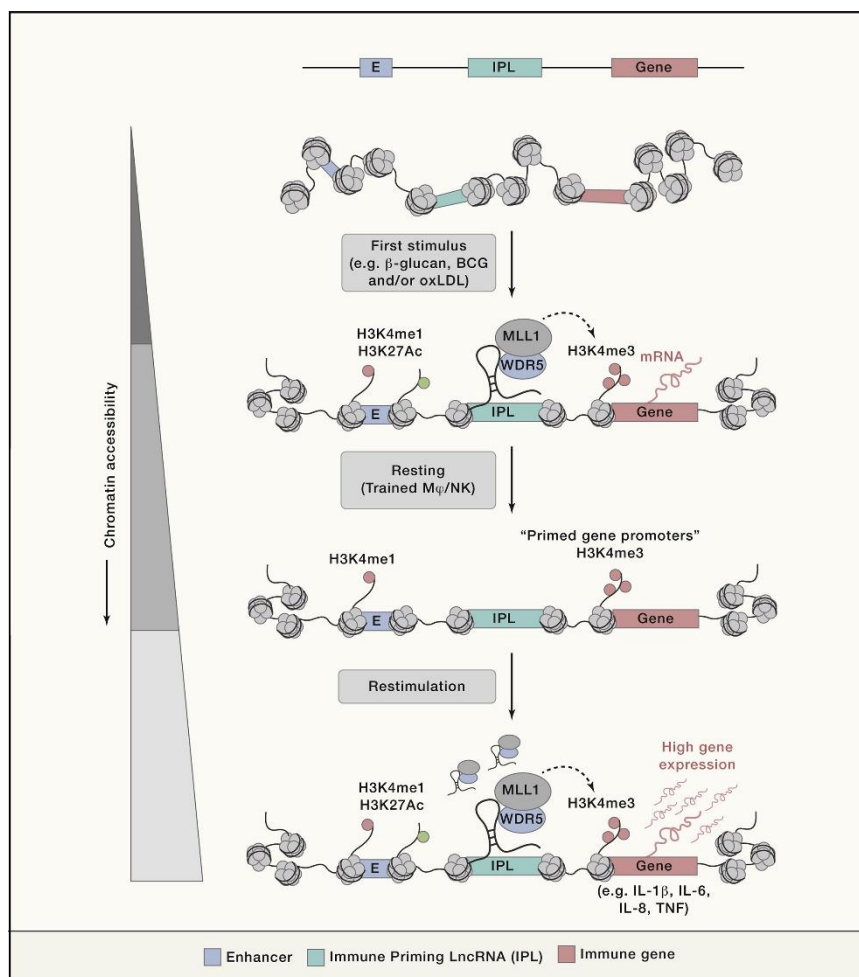
Enfin, après vaccination muqueuse, la protection semble dépendante de la réponse IgA et de l'ADCP induite par les neutrophiles résidents (Ackerman et al., 2018; Sips et al., 2016). Cette observation fait directement écho à la faculté de différenciation des neutrophiles en nAPCs lorsqu'ils sont stimulés par des IC-IgG (Mysore et al., 2021). Bien que cette propriété n'ait pas été démontrée pour les IgA, il est fort probable que ce soit le cas.

### 3. La généralisation du concept de *trained immunity*

Au fil des années, un nouveau concept caractérisant l'immunité innée est apparu, celle de la mémoire immunitaire, appelée pour ce contexte entraînement immunitaire ou *trained immunity* (Fanucchi et al., 2021). Selon ce concept, les cellules de l'immunité innée primo-stimulée par les *Pattern Recognition Receptors* (PRR), reconnaissant des éléments structuraux conservés des pathogènes, conservent la « mémoire » de cette stimulation, leur permettant de se réactiver plus facilement lors d'une rencontre ultérieure avec un pathogène. Ce phénomène préserve l'absence de spécificité des cellules de l'immunité innée pour un pathogène, ce qui est la caractéristique première des cellules innées. Ainsi, la primo stimulation par le  $\beta$ -glucan par exemple induit des remodelages épigénétiques ouvrant la chromatine au niveau des régions responsables des réponses inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$ . De telle sorte, lors d'une restimulation au lipopolysaccharide bactérien (LPS), les cellules produisent plus de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF $\alpha$ , qu'en l'absence de conditionnement initial au  $\beta$ -glucan (**Figure 24**). Ceci traduit la mise en place d'une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une re-stimulation (Fanucchi et al., 2021). Les cellules dites entraînées, caractérisées par une production plus élevée de cytokines pro-inflammatoires ont une durée de vie plus longue que les cellules naïves, ce qui favoriserait leur participation à un effet antiviral protecteur contre le VIH-1. Le contexte de *trained immunity*, bien que majoritairement étudié dans le modèle des monocytes, a été récemment étendu aux NK, puisqu'une étude a rapporté que les patients qui présentent des NK à longue durée

de vie, dits « *memory-like* » sont associés avec un meilleur contrôle de la virémie durant la primo-infection et après l'initiation de la cART (Gondois-Rey et al., 2017). Cette étude démontre aussi que les NK *memory-like* préexisteraient à l'infection. Ces résultats mettent en avant le rôle majeur de la pré-activation de ces NK dans le contrôle cART-induit tout en faisant écho au concept de *trained immunity*.

Dans une certaine mesure, la stimulation par des IC conditionne les cellules de l'immunité innée en promouvant leur entraînement (Gayet et al., 2020; Hansen et al., 2018; Mes et al., 2023; Mysore et al., 2021). Ceci renforcerait l'effet thérapeutique des anticorps anti-VIH-1. Cependant, la démonstration formelle de l'entraînement par les IC reste à faire.



**Figure 24 : Schéma de principe du fonctionnement de la Trained Immunity.** A l'état basal, la cellule immunitaire présente une chromatine fermée, principalement des régions promotrices des gènes du priming immunitaire mais aussi des gènes pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , etc...), limitant l'expression de ces derniers. Le premier stimuli conditionnant permet une ouverture de la chromatine de la région enhancer, des gènes de priming immunitaire et inflammatoire, par dépôt de marques épigénétiques d'ouverture H3K4me1 et H3K27Ac, permettant l'expression des gènes immunitaires à faible niveau. Au cours de la phase de repos, l'ouverture de la chromatine chute mais à un niveau qui reste supérieur à l'état basal. La restimulation permet alors d'ouvrir une chromatine relativement plus relâchée qu'au niveau basal et permet la production de haut niveau de gènes immunitaires. Issu de Fanucchi 2020 Immunity.

## (5) Cas des individus exposés au VIH mais non infectés

### 1. Aspects génétiques

Certains individus sont naturellement protégés par l'expression de formes tronquées de CCR5 délétées des 32 ou 24 derniers acides aminés. Ces délétions sont respectivement identifiées principalement dans les populations caucasiennes et africaines (Masquelier et al., 2007; Samson et al., 1996). De telles mutations homozygotes protègent les individus contre l'infection par le VIH-1 systémique et muqueuse. Quand ces mutations sont hétérozygotes, elles sont associées à une diminution du risque d'infection (Casado et al., 2010).

Ces mutations homozygotes CCR5<sup>Δ32</sup> protectrices ont été utiles à la mise en place de traitements, pour éradiquer l'infection dont le patient de Berlin est l'unique exemple de succès durable (Hütter et al., 2009). Ce patient infecté par le VIH, a dû recevoir une greffe de moelle osseuse, suite au développement d'une leucémie. Il a d'abord subi une irradiation du corps entier permettant d'éliminer les cellules immunes, y compris les progénitrices, avant de recevoir une greffe de moelle. La moelle qui a été sélectionnée pour la greffe venait d'un sujet CCR5<sup>Δ32</sup>. Ce protocole a permis au patient de survivre tout en ayant éradiqué l'infection qui ne s'est plus manifestée durant le reste de sa vie. Cependant, la généralisation du protocole thérapeutique à l'ensemble des individus infectés par le VIH-1 ne semble pas adaptée. Si quelques essais semblent rapporter son efficacité transitoire, l'absence de protection systématique et dans la durée, ainsi que le fort risque de mortalité associé au traitement rendent l'approche inadaptée à la population générale, à une époque où la cART reste la plus efficace (Duarte et al., 2015; Gupta et al., 2019).

### 2. Population exposée par voie muqueuse et non-seroconvertie (ESN)

Les individus exposés au VIH mais non séropositifs (*Exposed SeroNegative* ou ESN) sont une population d'intérêt scientifique majeur concernant les corrélats de protection directs (Fourcade et al., 2018). Malheureusement, la plupart des cas ESN étudiés sont des travailleurs ou travailleuses du sexe, dans un contexte où les protections ne sont pas toujours utilisées. Les cas d'ESN concernent aussi des sujets vivant en couple avec des partenaires séropositifs et qui forment des couples serodiscordants, et plus rarement des individus chroniquement exposés à du sang contaminé. L'étude approfondie des mécanismes de protection des ESN a permis de mettre en lumière quatre aspects non-exclusifs de leur protection.

### a) *La réponse NK*

Comme pour les EC, les ESN présentent une réponse NK particulièrement robuste (Montoya et al., 2006, 2006; Scott-Algara et al., 2003; Tomescu et al., 2011). Cette réponse ne semble pas être qualitativement différente de celle des EC, mais associée à une forme particulière du KIR (Boulet et al., 2008b, 2008a). L'activation de ces cellules NK nécessite une primo-stimulation des cellules par de l'INF $\alpha$ , notamment produit par les pDC et les macrophages des ESN au niveau muqueux. Ceci favoriserait la mise en place de cette réponse protectrice qui pourrait agir comme première ligne de défense contre le VIH-1 chez les ESN (Tomescu et al., 2011, 2010).

### b) *L'importance des anticorps muqueux anti-VIH-1*

Le laboratoire, à la suite des travaux pionniers de l'équipe de M. Clerici (Mazzoli et al., 1997b) puis d'autres équipes (Devito et al., 2002; Pastori et al., 2000; Raux et al., 1999), a pu montrer que la protection des ESN dépendait en particulier de la présence d'IgA muqueux spécifiques du virus, exclusivement de gp41, et neutralisants *in vitro* (Tudor et al., 2009). Les épitopes de gp41 reconnus spécifiquement par les IgA varient selon les cohortes étudiées et incluent des épitopes linéaires comme le MPER et QARI/VLAVERY, ou des épitopes tri-dimensionnels comme le laboratoire l'a montré récemment (Bélec et al., 2001; Benjelloun et al., 2013; Clerici et al., 2002; Jain and Rosenthal, 2011; Khamassi et al., 2020; Tudor et al., 2009). En effet le laboratoire a isolé plusieurs IgA monoclonaux à partir de cellules B génitales d'ESN. Ces IgA présentent des caractéristiques génétiques démontrant qu'ils ont bien été générés par rencontre avec le VIH et que ce ne sont pas des anticorps naturels (Tudor et al., 2009). On peut suggérer que ces individus ESN ont été en contact sexuel/muqueux avec des inoculum contenant une majorité de virus défectifs permettant à l'immunité immunitaire humorale muqueuse de se mettre en place et d'induire des IgA contre l'enveloppe virale. Il est aussi envisageable que les APC locales aient présenté un profil *primé* ou de *trained immunity* favorisant la dégradation des virus/cellules infectées à la faveur de la présentation antigénique aux LB. Il reste encore à comprendre pourquoi les IgA des ESN ne ciblent que gp41 et pas gp120, ou pourquoi aucune réponse IgG anti-VIH muqueuse n'a été induite.

Au niveau fonctionnel, les IgAs d'ESN sont neutralisants cross-clade. Leur transformation en IgG, tout en gardant le même paratope, conduit à une perte d'affinité d'environ 10 fois par

rapport à l'IgA correspondant (Khamassi et al., 2020). Ces résultats établissent que les IgA anti-gp41 permettront une meilleure liaison aux antigènes viraux, se traduisant le plus vraisemblablement par une neutralisation plus importante mais aussi à une induction des fonctions effectrices plus efficaces. De plus, les IgA spécifiques de gp41 induisent plus efficacement les fonctions antivirales dépendantes du Fc comme l'ADCC et l'ADCP (Duchemin et al., 2020, 2018a). Le laboratoire a ainsi établi une corrélation entre la protection contre l'infection sexuelle par le VIH et l'induction d'une réponse IgA spécifique du virus. L'induction d'IgG spécifique du VIH-1 n'a pas été observée. Par contre, d'autres études auxquelles le laboratoire a participé ont permis d'identifier chez certains ESN, homme et femme, des IgG dirigés contre la première boucle extracellulaire de CCR5 aux propriétés neutralisantes et permettant l'inhibition de la transmission au niveau muqueux *in vitro* (Bomsel et al., 2007; Lopalco et al., 2000).

#### *c) Rôle de la réponse T-CD8*

Les individus ESN présentent aussi des HLA-I associés à la protection contre l'infection (Boulet et al., 2008a). A ce titre, la réponse CTL, comme évoquée pour les EC, est un aspect qui a été beaucoup étudié dans la protection des ESN d'autant qu'ils sont retrouvés autant au niveau muqueux que circulant (Kaul et al., 2000; Pinto et al., 1995; Ponnann et al., 2021; Rowland-Jones et al., 1998, 1995). Comme pour la réponse anticorps, l'exposition à un virus déficient ou moins infectieux pourrait avoir conduit à la mise en place de cette réponse systémique et muqueuse, permettant la protection des individus. Les CTL des ESN présentent des caractéristiques similaires à celles des EC concernant les épitopes ciblés et leurs propriétés d'activation propre.

Une réponse cytotoxique dirigée contre Gag et Nef a aussi été observée chez le partenaire ESN du couple sérodiscordant suite à la pratique de sexe oral ou vaginal non protégé (Hasselrot et al., 2010; Liu et al., 2006). Cette réponse est polyfonctionnelle et similaire à celle observée chez les ESN travailleuses du sexe et diminue avec la diminution de la charge virale du partenaire (Hasselrot et al., 2010; Liu et al., 2006).

#### *d) Rôle des chimiokines*

CCL3, CCL4 et CCL5 sont des  $\beta$ -chimiokines déjà identifiées comme inhibitrices de l'infection par le VIH *in vitro* (Coffey et al., 1997; Handen and Rosenberg, 1997; Jansson et al., 1996; Schols et

al., 1997). Leur concentration au niveau circulant et muqueux est fortement augmenté chez les ESN par rapport aux sujets non exposés au VIH (Cocchi et al., 2000; Iqbal et al., 2005; Lajoie et al., 2012; Shieh et al., 2001a). En plus de leur activité antivirale, ces chimiokines peuvent aussi recruter les cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de l'infection comme les NK, les TCD8, les neutrophiles mais aussi de potentielles cellules cibles du virus comme les macrophages, les monocytes et les TCD4. Malgré leur pouvoir chimiotactique des cellules cibles de l'infection, ces chimiokines restent un des paramètres protecteurs de individus contre l'infection. On peut donc imaginer qu'une fois les cellules cibles du virus recrutées dans la muqueuse, CCL5 dont la concentration a augmenté chez ces individus, se lie à son récepteur CCR5 et bloque l'infection.

### III. Perspectives

Quarante ans après la découverte du virus, la caractérisation des paramètres associés à la protection contre l'infection par le VIH ou de son contrôle reste un champ scientifique regorgeant d'inconnus. Élucider ces aspects pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes permettant la mise en place de la protection naturelle des individus. Bien que les facteurs génétiques de l'hôte tels que le polymorphisme de CCR5 ou la nature du HLA-I, ne soient pas directement adaptés pour élaborer des stratégies anti-VIH, les autres facteurs associés à la protection des ESN ou le contrôle des EC peuvent être à l'origine de nouvelles pistes thérapeutiques et vaccinales. Parmi ces facteurs corrélant avec le contrôle et la protection contre l'infection figurent la présence d'Abs d'isotype IgA muqueux dirigés contre gp41 avec un spectre neutralisant étendu, une réponse innée robuste, la présence d'une réponse TCD8 dirigée contre le VIH-1 et la sécrétion de chimiokines  $\beta$  comme CCL3/4 et 5. Le caractère protecteur d'autres facteurs évoqués plus haut n'a pas encore été démontré. L'association de ces facteurs au contrôle (au moins relatif) de l'infection en fait néanmoins des pistes à ne pas négliger, comme le recrutement de cellules immunitaires innées au site d'infection. Il devient aussi évident qu'il ne faut pas négliger la possibilité d'une action conjointe des facteurs, permettant par exemple le ciblage des population innées par les Abs anti-VIH-1 aux cellules infectées afin de maximiser l'efficacité du système protecteur.

## Chapitre 2 : Perturbation du métabolisme cellulaire par SARS-CoV-2

### I. Le Coronavirus 2 du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

#### (1) Émergence et taxonomie

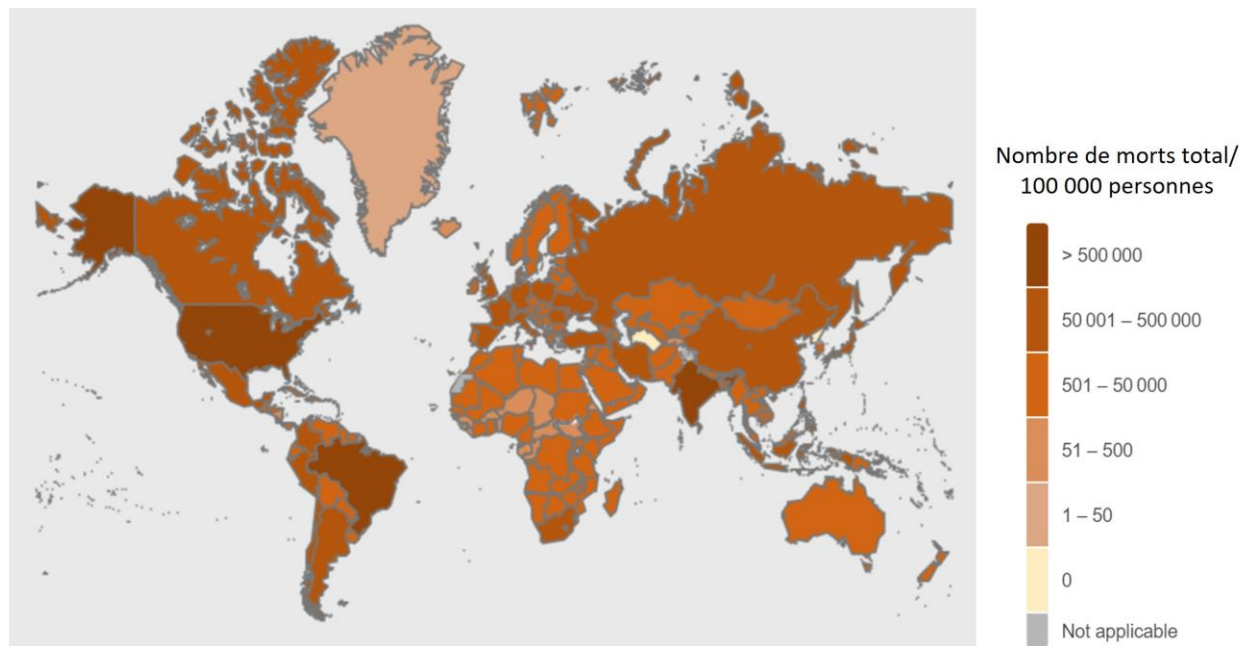
A la fin de l'année 2019, plusieurs cas de pneumonies atypiques sévères ont été recensés à Wuhan, province de Hubei en Chine et déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'hypothèse de l'émergence d'un nouveau coronavirus, génétiquement proche du coronavirus à syndrome respiratoire aigu sévère (*Severe Acute Respiratory Syndrom CoronaVirus* ou SARS-CoV) de 2002 et de celui du syndrome respiratoire du moyen orient (*Middle Eastern Respiratory Syndrom CoronaVirus* ou MERS-CoV), a été confirmée (Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020). La pandémie résultante, dénommée *CoronaVirus Disease- 19* (COVID-19) a ensuite été décrétée par l'OMS le 11 mars 2020 et le virus pandémique a été appelé SARS-CoV-2.

Le SARS-CoV-2, l'agent étiologique de la COVID-19, fait partie de l'ordre des *Nidovirales* et appartient à la famille des *Coronaviridae*. Les coronavirus ciblent principalement les oiseaux et les mammifères, le réservoir le plus important étant établi dans les chauves-souris (Ciotti et al., 2019; Hu et al., 2021; Lu et al., 2020; Zhou et al., 2020). La sous-famille des *Coronavirinae* est divisée en 4 genres : *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus* et *deltacoronavirus* (Haque et al., 2020; Hu et al., 2021). Le SARS-CoV-2 fait partie du genre *betacoronavirus*, tout comme le SARS-CoV et le MERS-CoV (Haque et al., 2020).

Les SARS-CoV-2 a entraîné l'infection de plus de 770 millions d'individus et causé près de 7 millions de morts en septembre 2023 (OMS/covid-19, **Figure 25**) depuis fin 2019, mais le SARS-CoV-2 n'est plus considéré comme pandémique par l'OMS depuis le 6 mai 2023.

Le SARS-CoV-2 est un virus à transmission aéroportée (Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020) ciblant l'épithélium nasal puis pulmonaire dans lequel le virus se réplique. Suite à l'infection, l'individu développe généralement un ensemble de symptômes grippaux dans les 3 à 5 jours : fièvre, toux, sinusite, courbatures et essoufflement sont les principaux symptômes décrits (Ciotti et al., 2019; Haque et al., 2020; Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020). Dans les formes graves de la

maladie, les patients développent des pneumonies massives. Ils sont alors admis en service de réanimation où ils pourront bénéficier d'une assistance à la respiration et d'une oxygénothérapie. Ce protocole permet de compenser la dépression respiratoire sévère induite par la réplication virale et l'emballement immun et la tempête cytokinique (Hajjar et al., 2021; Hu et al., 2021; Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020).



**Figure 25 : Carte du nombre de morts de l'infection par SARS-CoV-2 par 100 000 personnes.** La mortalité normalisée permet de faire ressortir qu'aucune région du globe n'a été épargnée de l'épidémie de SARS-CoV-2. Adapté du site de l'OMS, données au 01 octobre 2023.

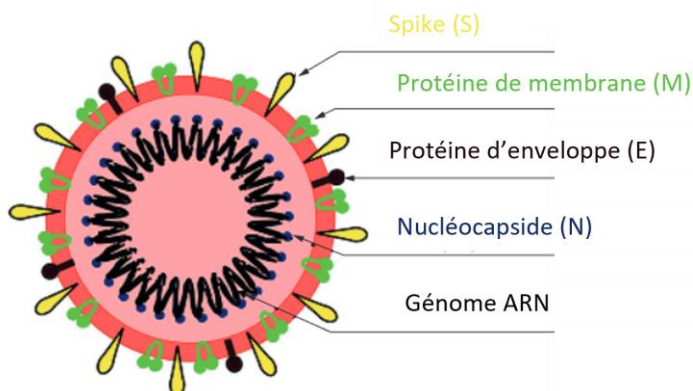
## (2) La pandémie et son contrôle

La COVID-19 a pu être contenue de manière relativement efficace grâce à la mise au point rapide de vaccins et aux décisions efficaces prises en matière de santé publique. Cependant, malgré ces efforts, des variants préoccupants (*Variants Of Concern* ou VOC) du SARS-CoV-2 ont continué d'émerger et ont participé à la dissémination continue du virus dans la population, causant près de 7 millions de morts jusqu'en septembre 2023 dans le monde (Fernandes et al., 2022; Hu et al., 2021). Cette mortalité élevée pourrait s'expliquer par une prise en charge trop limitée des cas de COVID par les unités de soins intensifs. En effet, celle-ci est restée difficile en raison de difficultés logistiques devant l'affluence des patients mais surtout à cause de l'absence d'antiviraux efficaces présentant un rapport bénéfice/risque acceptable. Le traitement des patients en unité de soins

intensifs s'est limité à tempérer la tempête cytokinique (Hajjar et al., 2021). C'est le cas du tocilizumab, un Ab monoclonal (*monoclonal Ab* ou mAb) qui se lie de façon compétitive à l'IL-6R pour moduler l'emballage pro-inflammatoire médié par l'IL-6 chez patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Scott, 2017) et qui a été repositionné pour le traitement de la COVID-19.

### (3) Structure de la particule virale

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé d'un diamètre d'environ 100 nm (Zhu 2020) (**Figure 26**). Sa capside hélicoïdale est associée à l'ARN génomique viral de polarité positive (ARN(+)) avec lequel il forme un complexe ribonucléique stable à l'intérieur du virus (Zhu et al., 2020). La membrane virale contient plusieurs protéines transmembranaires dites de membrane (ou M) et d'enveloppe (ou E), ainsi que la spicule (Spike ou S). Ces protéines, exprimées à forte densité dans la membrane virale, sont responsables de la forme caractéristique en couronne des coronavirus. La protéine Spike permet la liaison du virus à ses récepteurs sur la cellule hôte et son entrée (Haque et al., 2020; Y. Wang et al., 2020).

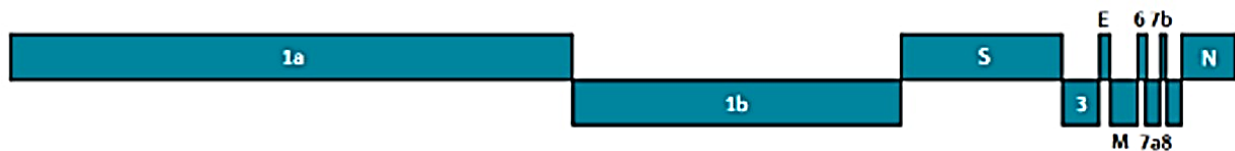


**Figure 26 : Schéma de la structure du SARS-CoV-2.** Le virus est enveloppé et présente une forte densité de protéines membranaires Spike (S), de membrane (M) et d'enveloppe (E) à sa surface. Le génome ARN(+) est encapsidé dans une capsidie hélicoïdale courbée sous la membrane virale. Adapté de Haque, 2020, *Future Virology*.

### (4) Organisation génomique

Le génome du SARS-CoV-2 est un ARN linéaire monocaténaire de polarité positive, coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. La taille du génome varie entre 27 et 32 kilobases, ce qui en fait l'un des plus grands génome viral à ARN connus. Le génome contient 15 phases ouvertes de lecture (*Open Reading Frame* ou ORF), pour exprimer environ 30 protéines (Haque et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Y. Wang et al., 2020) (**Figure 27**).

L'organisation génomique du SARS-CoV-2 est typique de celle des *Coronavirinae*. Son génome comprend un grand ORF dit *ORF1ab* représentant les deux tiers du génome sur l'extrémité 5'. *ORF1* code les protéases et la plupart des protéines non structurales (*non structural protein* ou nsp) notées nsp1 à nsp16 (Haque et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Y. Wang et al., 2020). Ces nsp sont nécessaires au contrôle de l'expression et de la réplication des gènes. L'ORF1a chevauche ORF1b qui code notamment pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (*RNA-dependent RNA polymerase* ou RdRp), dont la fidélité est relativement faible, ainsi que pour l'hélicase et l'exonucléase. Ces dernières assurent l'élimination des bases incorporées par erreur par la RdRp, tout en étant aussi impliquée dans la recombinaison de l'ARN (Gribble et al., 2021; Y. Wang et al., 2020). L'extrémité 3' composant le tiers restant du génome code pour les protéines structurales S, E, M et N (Haque et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Y. Wang et al., 2020).



**Figure 27 : Organisation génomique du SARS-CoV-2.** Les ORF1a et ORF1b, située en 5' codent pour les éléments viraux non structuraux dont le complexe de réplication de l'ARN viral, permettant aussi l'expression des gènes structuraux en 3' du génome. Adapté de V'kovski, 2021, Nature Review.

## (5) Emergence des variants viraux

Au cours de la pandémie, l'émergence de nombreux variants a été observée. Ceux-ci ont été classés en variants à risque pandémique et préoccupants (VOC) ou en variants à risque modéré (*Variants Of Interest* ou VOI) mais dont la surveillance s'est imposée (Fernandes et al., 2022). Depuis l'émergence de la souche d'origine à Wuhan en 2019, le variant B.1 contenant la mutation D614G dans la protéine spike a ensuite émergé en Italie dès le printemps 2020. Ce variant est probablement à l'origine des autres variants caractérisés par la suite. Le VOC alpha (B.1.1.7) a, quant à lui, émergé au en Afrique du Sud durant l'hiver 2021 en même temps que le VOC beta (B.1.351) au Royaume Uni. Le VOC Delta (B.1.617.2) a ensuite été décrit pour la première fois en Inde en mai 2021. A contrario des précédents VOCs, ce variant est capable d'échapper aux mAbs neutralisants disponibles sur le marché. Enfin, le VOC omicron (BA.1 et suivants) est apparu à l'automne 2021 en Afrique du Sud. L'ensemble de ces données est résumé dans le **Tableau 6**.

**Tableau 4 : Caractéristiques générales des différents VOC identifiés de 2019 à 2022.** Adapté de Fernandes 2021, Annals of Medicine.

Dénomination OMS	Nom du variant	Pays de première d'identification	Caractéristiques cliniques
Variant d'Italie	B.1	Italie	Transmissibilité augmentée
Alpha	B.1.1.7	Afrique du Sud	Augmentation de la transmissibilité, sévérité et fatalité de l'infection. Impact faible sur la sensibilité aux mAbs neutralisants
Beta	B.1.351	Royaume Uni	Augmentation de la transmissibilité. Diminution de la sensibilité aux mAbs neutralisants et aux Abs neutralisants induits par vaccination.
Delta	B.1.617.2	Inde	Augmentation de la transmissibilité. Diminution de la sensibilité aux mAbs neutralisants et aux Abs neutralisants induits par vaccination.
Omicron	BA.1 et suivants	Afrique du Sud	Augmentation de la transmissibilité. Echappement aux mAbs neutralisants et aux Abs neutralisants induits par vaccination.

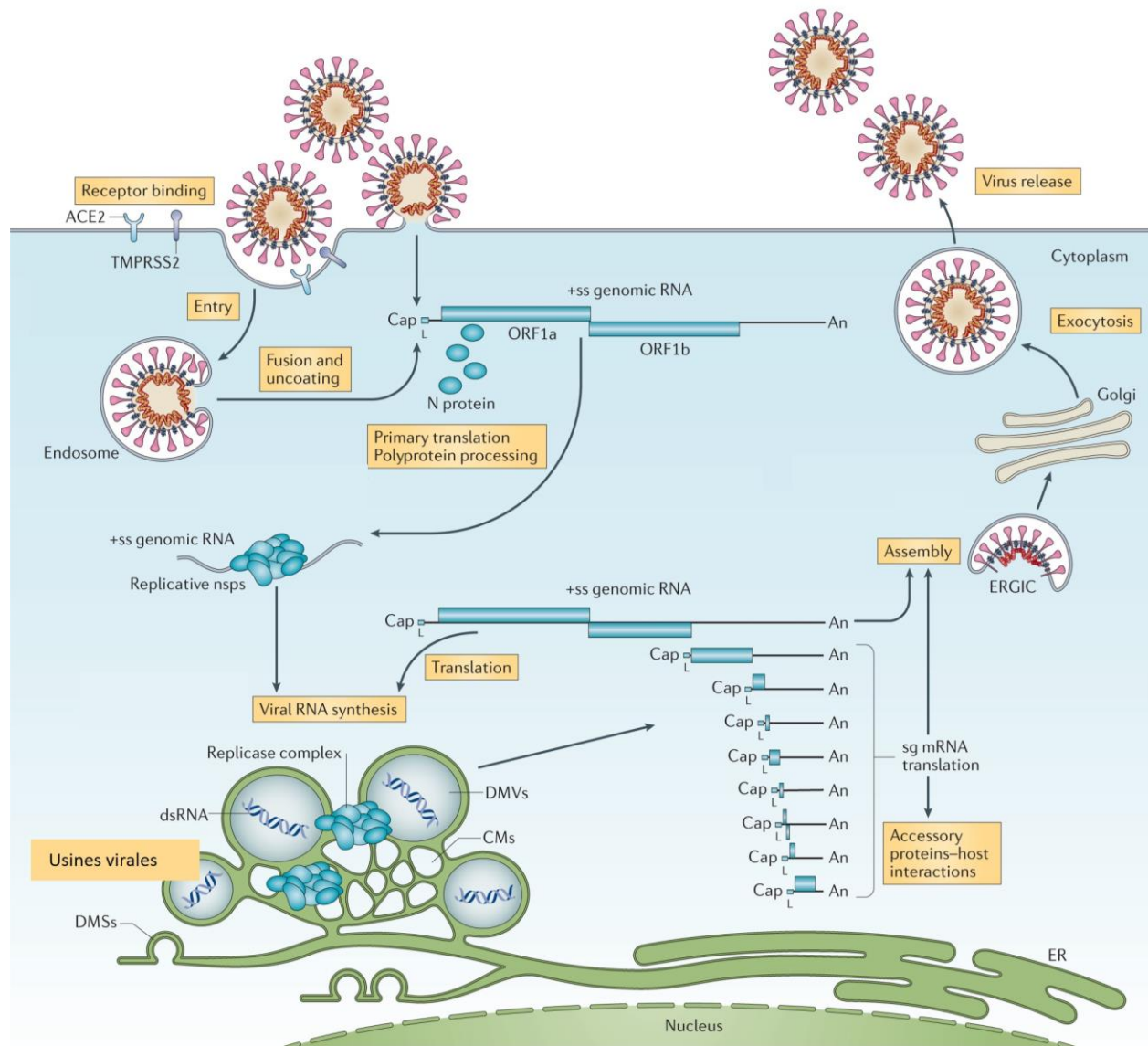
Cependant, six lignages différents dérivant du variant d'Italie B.1 ont été identifiés dans la période de février à avril 2020 (Alteri et al., 2021). Cette évolution complexe peut être expliquée par deux hypothèses : i) l'évolution de ce coronavirus ou de ce variant est particulièrement rapide, ou ii) le virus circulait déjà avant sa première identification sur le territoire en janvier-février 2020. En effet, de nombreuses études ont pu montrer que le SARS-CoV-2 circulait déjà en Italie dès septembre 2019 puisque rétrospectivement, jusqu'à 14% des échantillons testés ont présentés une réactivité contre le domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine Spike (Apolone et al., 2021). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études, principalement centrées sur des échantillons collectés en Italie mais aussi en France et sur le continent Africain. En revanche, en Chine les résultats de séroréactivité contre le SARS-CoV-2 d'échantillons collectés avant pandémie

sont plus hétérogènes (Carrat et al., 2021; Chang et al., 2023; Deslandes et al., 2020; Kaneko et al., 2021; Montomoli et al., 2021; Pedersen et al., 2022; Trombetta et al., 2022). D'un point de vue de santé publique, ces résultats remettent en question les dispositions à prendre pour mieux anticiper les futurs risques associés à l'émergence d'un virus zoonotique. De plus, la détection simultanée de réponses immunitaires (séroconversion ou réponse des lymphocytes T) dirigées contre le SARS-CoV-2 à l'automne 2019 en Europe, en Asie mais aussi en Afrique suggère que le SARS-CoV-2 a émergé plus précocement que décembre 2019, probablement à l'été 2019 (Apolone et al., 2021; Montomoli et al., 2021; Pekar et al., 2020).

## (6) Cycle viral

Le SARS-CoV-2 infecte en majorité les cellules pulmonaires épithéliales (**Figure 28**). Le virus se fixe grâce à la protéine Spike à ses récepteurs comme l'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine (*Angiotensine-Converting Enzyme 2* ou ACE2) et/ou de la protéase à sérine 2 (*Transmembrane Serine Protease 2* ou TMPRSS2) à la surface des cellules épithéliales (Haq et al., 2020; Lan et al., 2020; V'kovski et al., 2021). D'autres récepteurs au virus ont été décrits pour les cellules myéloïdes comme CD147 ou d'autres lectines (Jackson et al., 2022; Lan et al., 2020; Y. Wang et al., 2020). La fusion des membranes virale et cellulaire nécessite le clivage de la protéine Spike en deux sous-unités S1 et S2. Ce clivage est généralement médié par la furine cellulaire, mais peut également avoir lieu après l'attachement à TMPRSS2 (Haq et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Hu et al., 2021; Johnson et al., 2021). Après libération du génome viral dans le cytoplasme, les deux premières ORF (ORF1a et ORF1b) du génome sont immédiatement traduits pour produire les nsp1 à nsp16. Ces protéines s'assemblent pour partie en un complexe multiprotéique de réplication et d'expression du génome viral, composé notamment de la RdRp (Nakagawa et al., 2016; V'kovski et al., 2021). Le complexe de réplication synthétise des ARN de polarité négatives (-) de chacune des ORF se trouvant en 3' de l'ORF1b. Ce sont des ARN(-) sous-génomiques. Chaque ARN sous-génomique sert de matrice à la synthèse d'une grande quantité d'ARNm correspondants, ce qui permet d'assurer une expression efficace des protéines de structure virales. Le complexe de réplication synthétise aussi des ARN(-) de la longueur totale du génome et destinés à servir de

matrice pour la synthèse des ARN(+) génomiques qui seront ensuite encapsidés dans la particule virale au cours de sa formation (Haque et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Zhou et al., 2020).



**Figure 28 : Représentation du cycle viral du SARS-CoV-2.** Après liaison à son récepteur ACE2 et à TMPRSS2 (quand présent), le virus fusionne avec la membrane plasmique. La particule virale pénètre dans la cellule par endocytose puis fusionne avec la membrane des endosomes. La capsid est ensuite relarguée dans le cytosol pour permettre la traduction immédiate depuis le génome viral des ORF1a et ORF1b, permettant la mise en place du complexe de réplication. Le complexe de réplication va opérer depuis les usines virales, mises en place par les différentes nsp, et permettre la synthèse des ARNm de chacune des ORF structurales. Ces ARNm sont ensuite traduits pour permettre l'assemblage des particules virales qui transitent via l'ERGIC. Les particules virales sont ensuite acheminées au travers de l'appareil de Golgi pour être relarguées par exocytose ou lors de la lyse des cellules. Adapté de V'kovski, 2021, *Nature Reviews in Microbiology*.

La réplication des coronavirus a lieu dans un compartiment cellulaire viro-induit, nommé usines virales, situé à proximité du noyau cellulaire (Haque et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Y. Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020). La formation des usines virales est d'ailleurs un mécanisme de réplication commun aux virus à ARN à réplication cytosolique tels que les *Coronaviridae*, les

*Flaviviridae* ou les *Togaviridae* (Fernández de Castro et al., 2021). Les usines virales sont des organites de réplication qui bourgeonnent à partir des membranes du RE en les recourbant sur elles-mêmes. Ces usines sont le principal site de réplication et d'expression des protéines virales (de Castro et al., 2013; Fernández de Castro et al., 2021; Miao et al., 2021; Snijder et al., 2020). Ces compartiments ont des délimitations variables : vésicules à double membrane, à simple membrane, ou en séparation de phase liquide-liquide (Fernández de Castro et al., 2021; Mendonça et al., 2021; Perdikari et al., 2020). Le volume tridimensionnel des usines virales est destiné à servir de plate-forme à la réplication virale et à l'assemblage ultérieur des protéines en virions. Ce réseau membranaire complexe permet l'isolation vis-à-vis des senseurs de l'immunité intrinsèque tels que le *Retinoic acid-Induced Gene-1* (RIG-I) et la *Mitochondrial AntiViral-Signaling protein* (MAVS) (Fernández de Castro et al., 2021; Mendonça et al., 2021; Perdikari et al., 2020). Ces senseurs sont notamment activés par les ARN viraux par leur absence de coiffe en 5' ou les ARNdb, physiologiquement non présents dans la cellule. L'échappement à cette détection permet l'échappement à la mise en place de la réponse IFN de type I.

Les protéines S, M et E, traduites simultanément, sont ensuite dirigées vers le réticulum endoplasmique de la cellule (Brahim Belhaouari et al., 2020; Haque et al., 2020; Mendonça et al., 2021). Précisément, les protéines sont transportées par voie vésiculaire vers le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (*Endoplasmic Reticulum – Golgi Intermediate Compartment* ou ERGIC) (Brahim Belhaouari et al., 2020; Scherer et al., 2022).

L'ERGIC est le site d'assemblage des coronavirus et le lieu du bourgeonnement des nouvelles particules virales (Brahim Belhaouari et al., 2020; Scherer et al., 2022; Zhou et al., 2020). Les particules virales sont ensuite acheminées au travers de l'appareil de Golgi où les protéines d'enveloppe pourront être glycosylées. Ces glycosylations sont une caractéristique partagée avec le SARS-CoV responsable de l'épidémie de 2002 et sont associées à l'échappement du virus au système immunitaire (V'kovski et al., 2021; Walls et al., 2016; Watanabe et al., 2020). C'est aussi dans l'appareil de Golgi que la furine cellulaire va cliver le site polybasique entre S1 et S2 localisé dans le précurseur de S en S1 et S2, nécessaire à l'infectiosité des particules virales. Ce processus n'est pas parfait et certaines particules peuvent présenter des S clivées ou non à leur surface. Le clivage des formes immatures se fera alors au moment de l'entrée par la protéase TMPRSS2

(Hoffmann et al., 2020). Enfin, les particules sont relarguées hors de la cellule par exocytose ou durant la lyse des cellules infectées (Brahim Belhaouari et al., 2020; Mendonça et al., 2021).

## **(7) Arsenal thérapeutique**

La pandémie a notamment été marquée par le développement rapide de vaccins contre le SARS-CoV-2, ce qui a permis la limitation des cas graves de COVID-19 (Corbett et al., 2020; Walsh et al., 2020). Cependant, la vaccination en population générale n'a pas suffi à contenir la dissémination virale et l'apparition de formes graves chez certains individus. Les cas de patients infectés et développant des formes sévères est toujours d'actualité. Le développement de traitement antiviraux reste donc d'intérêt majeur (Fernandes et al., 2022).

Certaines approches antivirales ont été développées mais aucune ne présente une balance bénéfice-risque suffisamment acceptable pour être utilisé quotidiennement en clinique. L'utilisation de ces molécules est de fait restreinte aux cas graves des services réanimation (Haque et al., 2020; Hu et al., 2021). Parmi ces antiviraux, le remdesevir est un antiviral puissant agissant comme inhibiteur de la polymérase virale (analogue de base nucléosidique). Son utilisation permet une amélioration du statut clinique des patients en service de réanimation (Haque et al., 2020; Kokic et al., 2021; Scavone et al., 2020; Y. Wang et al., 2020). Malgré l'émergence de VOC, le remdesevir reste un des seuls antiviraux encore utilisé (Showers et al., 2021), probablement car la polymérase virale qu'il cible présente peu de mutations entre les variants. Parmi les autres antiviraux, le Paxlovid a été récemment développé par Pfizer. Ce dernier est une combinaison du nirmatrelvir et du ritonavir (inhibiteur de protéase). Le nirmatrelvir inhibe le cytochrome C 3A4, enzyme principale de la dégradation du ritonavir, ce qui diminue la dégradation du ritonavir et augmente son activité antivirale (Boras et al., 2021). Le paxlovid et le remdesevir constituent actuellement les seules approches antivirales post-infection disponibles sur le marché et utilisé en clinique.

## II. Les voies de l'hôte détournées par le virus

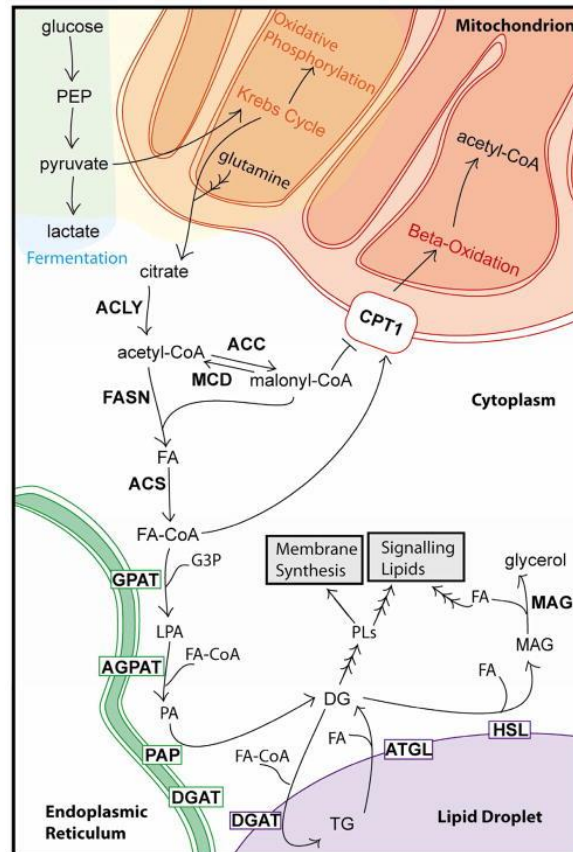
Au cours de l'infection, les protéines virales peuvent détourner certaines voies moléculaires de la cellule cible, assurant ainsi l'établissement d'un environnement cellulaire favorable à la réplication virale. A plus large échelle, ce détournement inclus également l'échappement au système immunitaire inné comme adaptif et favorise la dissémination du virus à l'individu comme en population générale.

### (1) Métabolisme des lipides

#### 1. Aspects généraux

Le métabolisme des lipides comprend la somme des voies anaboliques et cataboliques des acide gras (*Fatty Acids* ou FA) et des stérols (**Figure 29**). Les FA sont des acides carboxyliques à longue chaîne carbonée présentant ou non des insaturations. La première étape de la synthèse des FA est catalysée par l'enzyme Acetyl-coA Carboxylase (ACC) (Currie et al., 2013). Cette étape limite l'anabolisme lipidique puisqu'elle est la seule à pouvoir générer du malonyl-CoA, un substrat essentiel de la *Fatty-Acids Synthase* (FASN). Le malonyl-CoA est polymérisé sur un Acetyl-CoA par la FASN qui réitère cette opération jusqu'à l'obtention d'un FA d'au moins seize atomes de carbone, ou acide palmitique. Par une série d'actions enzymatiques (**Figure 29**) et non détaillées ici, les acides palmitiques peuvent être désaturés par des hydrogénases cellulaires. Ainsi la diversité des FA repose autant sur leur longueur que sur la quantité et la disposition des insaturations. Ces FA, insaturés ou non, sont stockés dans les gouttelettes lipidiques et servent de stock d'énergie pour la cellule (**Figure 29**). Ces gouttelettes lipidiques sont naturellement remplies par les FA lors de l'excès d'activité des enzymes de synthèse. Les FA peuvent aussi être couplés au glycérol pour former des phospholipides (PL). Ceux-ci seront intégrés dans les membranes néosynthétisées pour les renouveler. Les phospholipides sont un groupe de molécules extrêmement diverses ajoutant de la diversité au répertoire des lipides. Le catabolisme des FA est régulé notamment par l'activité de l'ACC. En effet, le malonyl-CoA produit par l'ACC inhibe l'activité du *Carnityl Palmitate Transporter 1* (CPT1), ce qui bloque l'import des FA dans la mitochondrie et prévient de leur dégradation par  $\beta$ -oxydation. L'activité de l'ACC est contrôlée par diverses kinases dont la kinase activée par l'AMP (*AMPK-activated Kinase* ou AMPK), qui inhibent son activité par phosphorylation. En conséquence, la synthèse *de novo* de FA est complètement inhibée. L'ajout de FA peut aussi

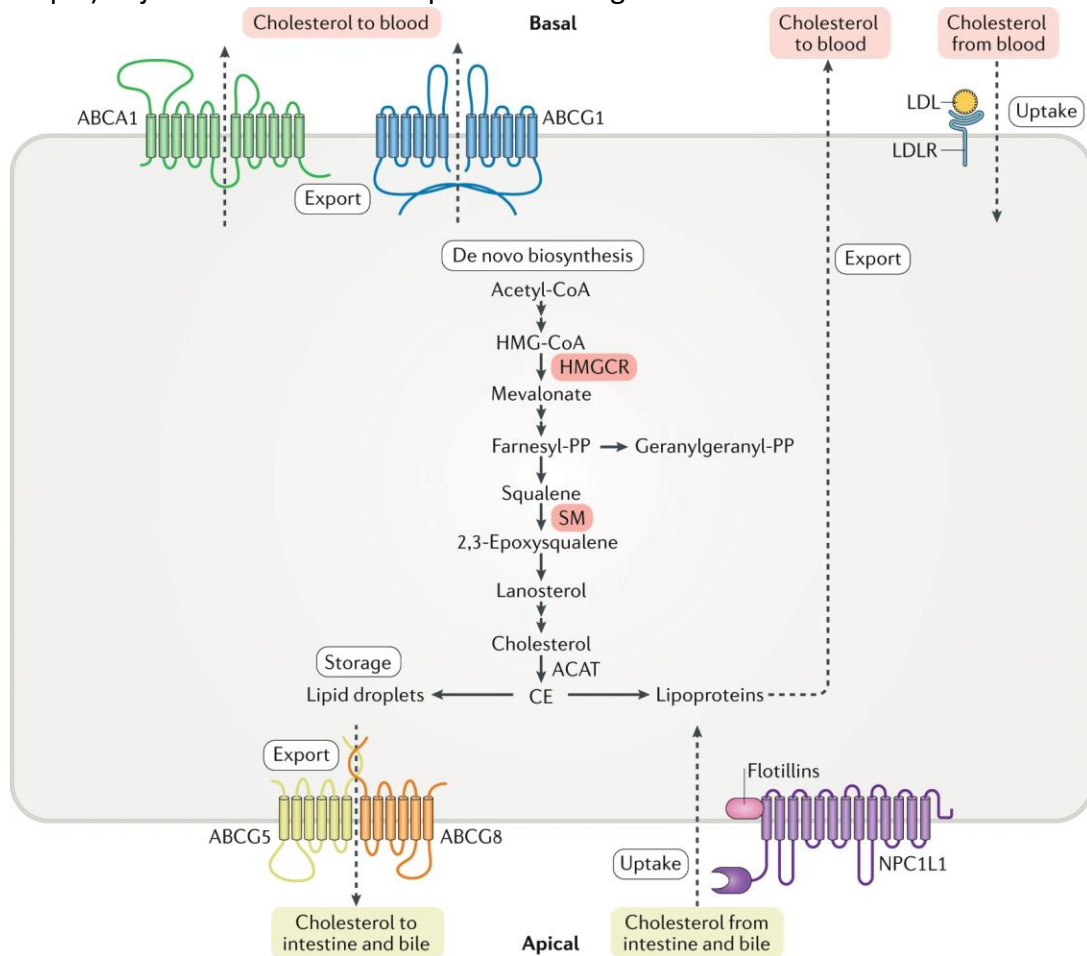
être une modification post-traductionnelle des protéines permettant à la protéine d'acquérir un profil plus liposoluble, généralement associé à un attachement membranaire (Wang and Chen, 2022). Ainsi, les FA ont de nombreux rôles à l'échelle de la cellule et de l'organisme : homéostasie des membranes, signalisation et un énergétique (Currie et al., 2013).



**Figure 29: Représentation du métabolisme lipidique permettant la synthèse des FA et leur stockage sous forme de gouttelettes lipidiques.** La synthèse des FA débute par la prise en charge d'Acétyl-CoA cytosolique par l'ACC pour générer du Malonyl-CoA. Les Malonyl-CoA sont ensuite polymérisés sur l'Acétyl-CoA par la FASN pour générer des FA (FA). De plus le Malonyl-CoA inhibe l'import mitochondrial des FA et prévient de leur dégradation. Un processus multienzymatique polymérise deux FA sur phosphoglycérol (G3P), permettant la génération de diacylglycérol (DG). Le DG est très versatile puisque la polymérisation d'un FA supplémentaire génère des triglycérides (TG) qui sont stockés dans les gouttelettes lipidiques. Il peut aussi servir d'échafaudage à la génération des (glycéro)phospholipides (PL), ayant des rôles structuraux dans les membranes mais aussi en tant que tel pour la signalisation. Adapté de Currie, 2013, *Cell Metabolism*.

Enfin les stérols, dont le représentant le plus connu est le cholestérol, sont synthétisés selon une cascade biochimique complexe (**Figure 30**). La première étape limitante est catalysée par l'enzyme 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl coenzyme A réductase (HMGCR). Cette enzyme, comme l'ACC, est régulée négativement par phosphorylation, notamment par l'AMPK. Les stérols sont une classe de lipides d'importance majeure dans la biologie des membranes car ils permettent à la fois d'augmenter la courbure des membranes et de l'organiser en microdomaines fonctionnels tels que

les radeaux lipidiques. Les stérols sont aussi stockés dans les gouttelettes lipidiques (Luo et al., 2020). Les stérols sont les précurseurs des hormones stéroïdiennes (testostérone et progestérone par exemple) et jouent ainsi un rôle capital dans la signalisation.

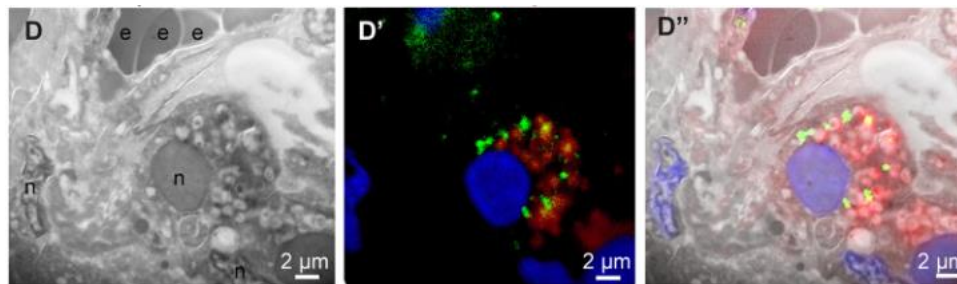


**Figure 30: Etapes clés du métabolisme du cholestérol dans une cellule hépatique.** Le processus multi-étape démarre de la même manière que pour la synthèse des FA. Un Acétyl-CoA transformé en HMG-CoA et pris en charge par l'HMGCR. Cette enzyme est limitante dans le processus biosynthétique qui permet la génération d'esters de cholestérols qui sont ensuite sécrétés dans la circulation ou stockés dans les gouttelettes lipidiques. Issu de Luo, 2019, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

## 2. Rôles dans la réplication du SARS-CoV-2

La réplication du SARS-CoV-2 est associée à une perturbation du métabolisme lipidique (Farley et al., 2022; Tabata et al., 2021; Tanner and Alfieri, 2021). Le répertoire des lipides dans les cellules hôtes est amplement modifié au cours de l'infection par SARS-CoV2, mais aussi par d'autres virus (Bajimaya et al., 2017; McBride and Machamer, 2010; Mesquita et al., 2021). Lors de l'infection par SARS-CoV-2, celui-ci est considérablement modifié en faveur des FA polyinsaturés, par un mécanisme notamment dépendant de ORF9, nsp4 et nsp6 (Farley et al., 2022; Grootemaat et al., 2022).

Dans les cellules infectées, des gouttelettes lipidiques s'accumulent et colocalisent avec les sites de réplication virale *in vitro*, vraisemblablement avec les usines virales (Dias et al., 2020; Farley et al., 2022; Grootemaat et al., 2022; Nardacci et al., 2021). Dans les autopsies de patients décédés de la COVID-19, il a été montré que ces gouttelettes lipidiques s'accumulent aussi dans les vésicules contenant des virus (**Figure 31**) (Grootemaat et al., 2022). L'accumulation des gouttelettes lipidiques au cours de la réplication virale n'est ni un phénomène nouveau ni un phénomène restreint au SARS-CoV-2. Cependant la compréhension fine du rôle de cette accumulation dans le cycle viral reste incomplète (Qu et al., 2023). Cependant, il a déjà été montré que l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées pourrait notamment favoriser la production de molécules inflammatoires comme l'IL-6 et le LTB4 (médiateur lipidique de l'inflammation), elles-mêmes associées à la tempête cytokinique (Dias et al., 2020). Enfin les lipides sont nécessaires à la génération des membranes virales. Leur contenu lipidique est finement régulé et conditionne l'infectivité des particules virales de SARS-CoV-2, comme c'est aussi le cas pour SARS-CoV (Cheng et al., 2022; McBride and Machamer, 2010; Mesquita et al., 2021).



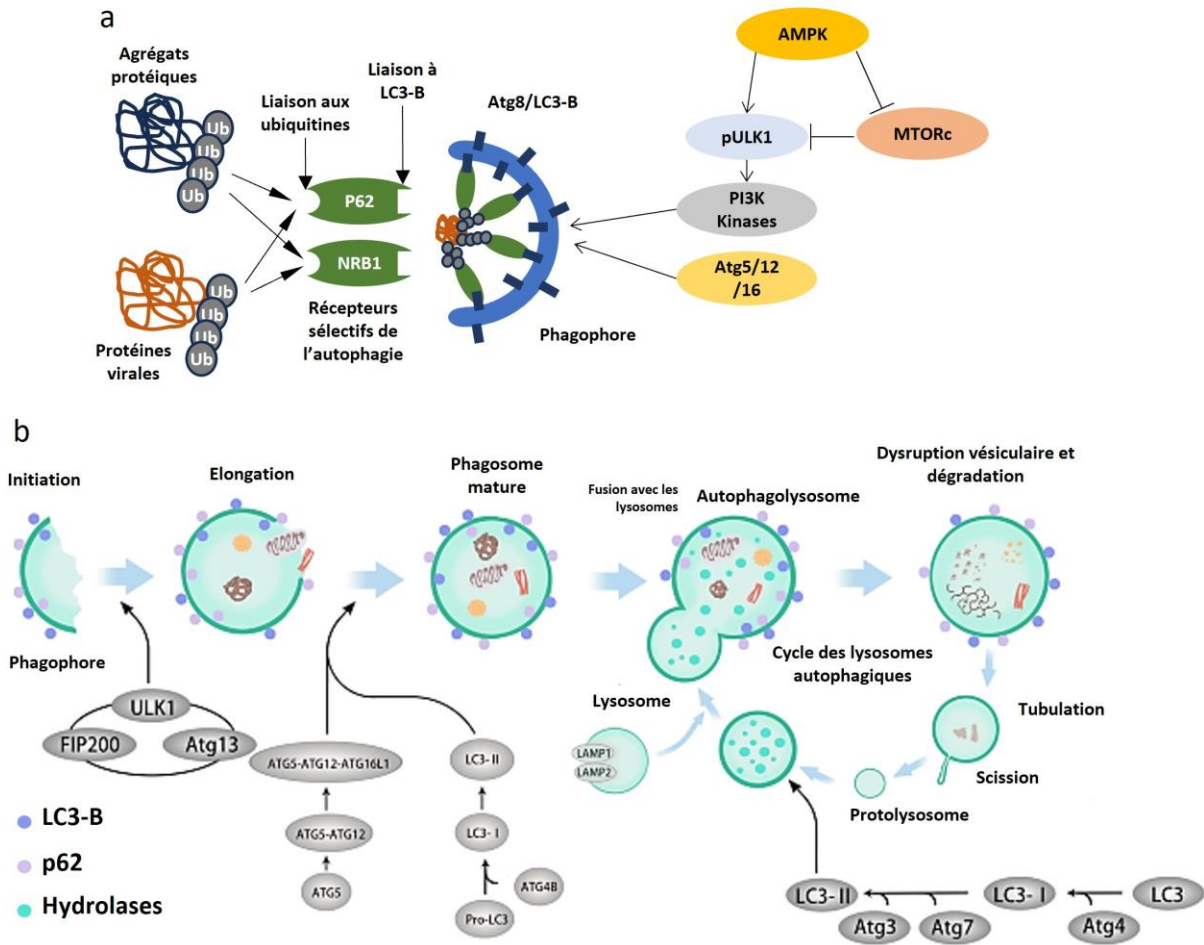
**Figure 31:** Microscopie électronique (D) et confocale à fluorescence (D') de biopsies de patients décédés de COVID-19. Pour D', le bleu est le marquage DAPI des noyaux, en rouge le marquage Nile Red des gouttelettes lipidiques et en vert le marquage de la Nucléocapside. D'' représente la combinaison des 2 précédentes images. e : érythrocytes ; n : noyau. Issu de Grootemaat 2022 *Clinical Microbiology*.

L'inhibition de la synthèse des lipides est associée à une diminution de l'infection. Cette réduction est due au blocage de la synthèse des gouttelettes lipidiques, de la restauration du profil lipidique ou de la diminution de l'infectivité des particules virales néoformées (Baek et al., 2022; Dias et al., 2020; Farley et al., 2022; Mesquita et al., 2021; Tabata et al., 2021; Wang et al., 2023). Ces résultats mettent en avant le rôle déterminant du métabolisme des lipides dans la réplication du SARS-CoV-2, ainsi que leur potentielle utilisation comme cible thérapeutique.

## (2) Autophagie dans les cellules infectées

### 1. Présentation générale

L'autophagie est un processus cellulaire permettant la génération d'organites destinés à fusionner avec le lysosome et ainsi conduire à la dégradation de son contenu vésiculaire (Aman et al., 2021; Koepke et al., 2021; Kumar et al., 2022)(**Figure 32**). Ce processus permet de restaurer le niveau énergétique de la cellule mais peut aussi de permettre la dégradation de composants viraux au cours de l'infection. L'initiation du processus, débute par l'initiation du phagophore, sous l'impulsion de la *microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3* (LC3) activée. LC3 activée est une forme conjuguée LC3-Phosphatidyléтанолamine, nommé LC3-B, qui s'associe à la membrane du futur phagophore (Aman et al., 2021; Lippai and Lów, 2014). Cette activation permet le bourgeonnement de la membrane du phagophore, destiné à devenir un autophagosome. Les protéines ou les cargos à dégrader sont poly-ubiquitinylés, permettant leur orientation vers les phagophores suite à leur liaison aux récepteurs sélectifs de l'autophagie dont le *Sequestosome-1* (ou P62) (**Figure 32a**). Ces récepteurs présentent également un domaine d'interaction avec LC3-B, ce qui permet l'adressage des protéines à dégrader dans le phagophore naissant. La fermeture du phagophore, ou sa maturation, nécessite l'activation de protéines impliquées dans l'élongation de la membrane du phagophore dont la protéine kinase *Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1* (ULK1). Le recrutement de ULK1 au phagophore promeut son autophosphorylation et entraîne son activation. Celle-ci est inhibée par le complexe MTORc (*Mammalian Target of Rapamycin complex*) mais est stimulée par l'activation de l'AMPK (**Figure 32a**). La maturation du phagophore se termine par l'action de diverses enzymes et protéines telles que Atg5/12/16 et l'incorporation supplémentaire de LC3-B (**Figure 32b**). Le phagophore devient alors un autophagosome mature, capable de fusionner avec les lysosomes, qui expriment les protéines *Lysosomal Associated Membrane-Protein 1* et 2 (LAMP1 et LAMP2). La formation des autophagolysosomes par fusion de l'autophagosome avec le lysosome permet la dégradation du contenu de l'autophagosome par l'action des enzymes et du pH lysosomal (Aman et al., 2021; Kumar et al., 2022; Lippai and Lów, 2014). Les lysosomes sont ensuite régénérés.

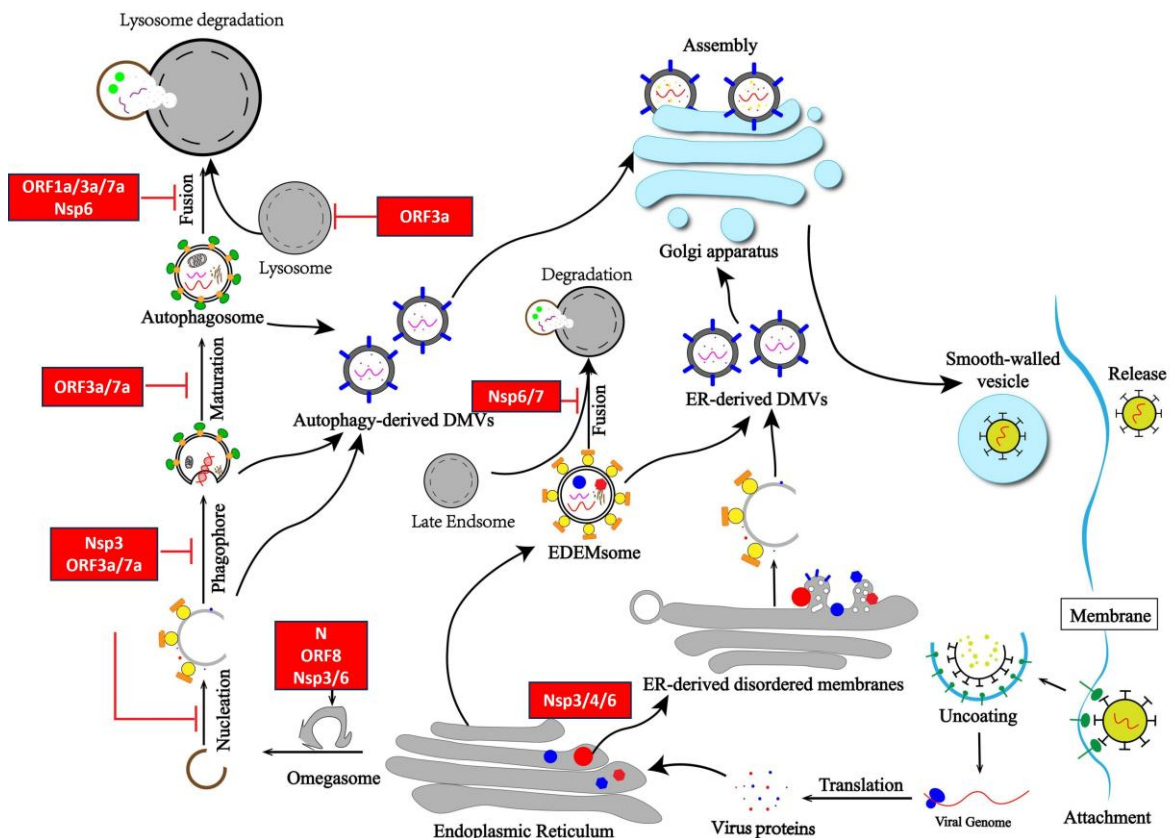


**Figure 32: Représentation temporelle des étapes majeures de l'autophagie et des acteurs impliqués.** (a) Les protéines agrégées ou virales à dégrader par autophagie sont poly-ubiquitinylées puis liées par ces ubiquitines par les récepteurs sélectifs de l'autophagie P62 ou NRB1 qui permettent ensuite, par leur, liaison à LC3-B, l'adressage du cargo protéique au phagosome naissant. La maturation du phagosome dépend du recrutement des Atg5/12/16 mais aussi de l'activation de ULK1 phosphorylé. Cette phosphorylation est inhibée par la voie mTOR alors que l'AMPK active phosphoryle ULK1 et inhibe la voie mTOR. Adapté de Lippai, 2014, Biomed Research International. (b) L'autophagolysosome est formé par recrutement séquentiel d'acteurs protéiques au cours du processus autophagique. Les hydrolases lysosomales assurent la dégradation du contenu de l'autophagosome avant de régénérer le lysosome pour permettre à nouveau leur fusion avec un futur autophagosome. Adapté de Zhao, 2020, Archives of Gynecology and Obstetric.

## 2. Rôles dans la réplication du SARS-CoV-2

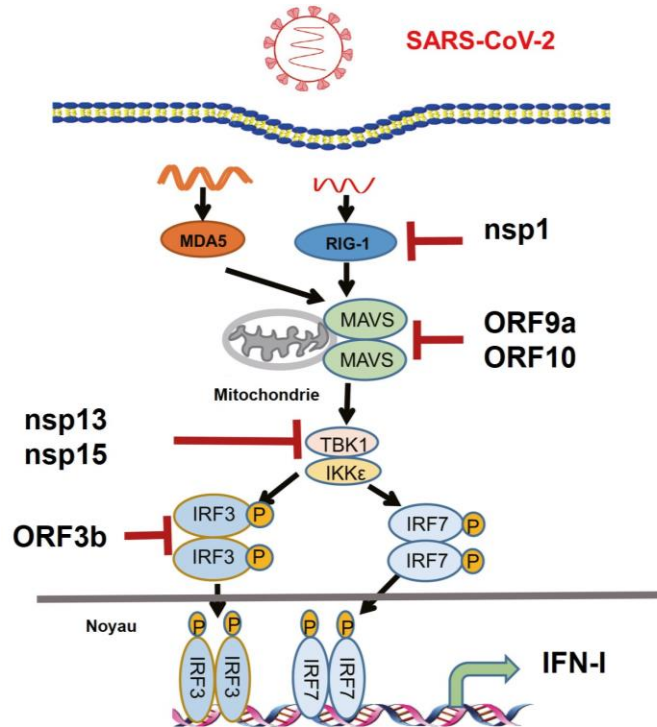
Le cycle viral du SARS-CoV-2 est associé à la perturbation du flux autophagique (Koepeke et al., 2021). L'initiation de l'autophagie par les protéines nsp principalement, mais aussi ORF3a et ORF8, permet de d'induire la courbure membranaire caractéristique des usines virales par bourgeonnement à partir du RE (Fernández de Castro et al., 2021; Gassen et al., 2021; Liang et al., 2022; Qu et al., 2021; Y. Zhang et al., 2022). Cependant le flux autophagique induit par l'infection virale est interrompu avant la maturation complète des compartiments. L'absence fusion entre les autophagosomes et les lysosomes pourrait empêcher la dégradation du virus et permettre sa

propagation (Chen et al., 2021; Hou et al., 2022; Koepke et al., 2021; Qu et al., 2021; Twu et al., 2021). La perturbation du flux autophagique probablement causée par les protéines virales ORF3a et ORF7a qui augmentent l'expression de LC3-B et la phosphorylation de ULK1. Pourtant, cette perturbation n'est pas accompagnée par une augmentation de l'expression de P62, ou de la colocalisation des composants viraux avec le compartiment lysosomal LAMP-1<sup>+</sup> (Chen et al., 2021; Hou et al., 2022; Koyama-Honda et al., 2013; Miao et al., 2021; Y. Zhang et al., 2022; Zhou et al., 2023). L'échappement à la dégradation des protéines virales par les lysosomes peut également conduire à une diminution du chargement des molécules CMH-I avec peptides viraux. Ceci favoriserait l'échappement à la réponse CTL protectrice (Øynebråten, 2020; Wen et al., 2023). De plus, ORF8 diminue l'expression du CMH-I au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées, les rendant moins sensibles aux CTL spécifiques du SARS-CoV-2 (Zhang et al., 2021). La perturbation du flux autophagique est un processus essentiel à la réplication du SARS-CoV-2, que les protéines virales détournent à la faveur de sa réplication (Liang et al., 2022) (**Figure 33**).



**Figure 33 : Illustration des différentes étapes de l'autophagie détournées à la faveur de la réplication du SARS-CoV-2.** Les protéines nsp3/4/6 et ORF8 favorisent les étapes d'initiation de l'autophagie à la faveur des usines virales et de la sécrétion des particules néoformées. En parallèle, les protéines virales nsp3/6/7 et ORF1a/3a/7a ainsi que N sont impliquées dans l'inhibition de différentes étapes aboutissant à la maturation du phagosome et sa fusion avec les lysosomes et la dégradation des composants viraux ou des virions. Adapté de Liang, 2022, *Frontiers in Microbiology*.

### (3) Echappement à la réponse interféron



**Figure 34 :** Illustration de la mise en place de la réponse IFN-I et des protéines virales inhibitrices. La signalisation IFN-I est inhibée à différents niveaux allant de la détection des ARN viraux par nsp1, à la transduction du signal par induction de la mitophagie par M ou ORF9a/10 ou en aval par les différentes protéines virales. Adapté de Lin & Shen, 2020, *Pediatric Investigation*.

L'induction d'une réponse à l'IFN de type I (IFN-I) chez les patients infectés par le SARS-CoV-2 est associée à une maladie de moindre gravité. Dans 20% des cas graves de COVID-19, une interféronopathie causée par des autoanticorps dirigés contre les IFN de type I empêchant leur activité biologique, a été identifiée (Bastard et al., 2021; Wang et al., 2021). La réponse IFN I est notamment initiée par la détection d'ARN exogènes cytosoliques (absence de coiffe, de queue polyA ou ARN double brin) par les senseurs cellulaires MDA5 et RIG-I (**Figure 34**). Ces protéines activent ensuite MAVS qui initie la cascade de signalisation responsable de la transcription des ARNm des gènes des *IFN-I* ensuite traduits. Les IFN-I agissent de façon auto- et paracrine sur les cellules afin d'induire la production de gènes stimulés par les IFN (*Interferon Stimulated Genes* ou ISG) qui limitent la réplication du SARS-CoV-2, tels que *Mx dynamin like GTPase* (Mx1) ou *2'-5'-OligoAdenylate Synthetase 1* (OAS1) (Bizzotto et al., 2020; Danziger et al., 2022; Schroeder et al., 2021; Smith et al., 2022; Q. Zhang et al., 2021). De plus, la stimulation par les IFN-I induit l'expression de la RnaseL destinée à dégrader les ARN viraux. Elle induit aussi la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , ce qui inhibe la traduction des ARNm non dépendant des sites d'entrée interne des

ribosomes et limite l'expression des protéines virales. Enfin, la stimulation par l'IFN-I potentialise la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires induite par l'activation de RIG-I ou MDA-5, telles que l'IL-6 ou encore le TNF-alpha (Ramasamy and Subbian, 2021).

De nombreuses protéines virales sont impliquées dans l'inhibition de la réponse IFN-I (**Figure 34**) (Lin and Shen, 2020). Par exemple les protéines virales S, M et ORF10 inhibent le transport nucléaire de IRF3 et dégradent MAVS par mitophagie ce qui diminue la production d'IFN-I (Hui et al., 2021; Li et al., 2022; Q. Zhang et al., 2021). Ainsi dans les cas sévères de COVID-19, la forte inhibition de la réponse IFN-I au début de l'infection va favoriser la dissémination virale. Cependant, si les dommages cellulaires et tissulaires sont trop importants, la réponse IFN-I est engagée de façon disproportionnée et peut provoquer la tempête cytokinique (J. S. Lee et al., 2020; Ramasamy and Subbian, 2021; Ruiz et al., 2022; Smith et al., 2022).

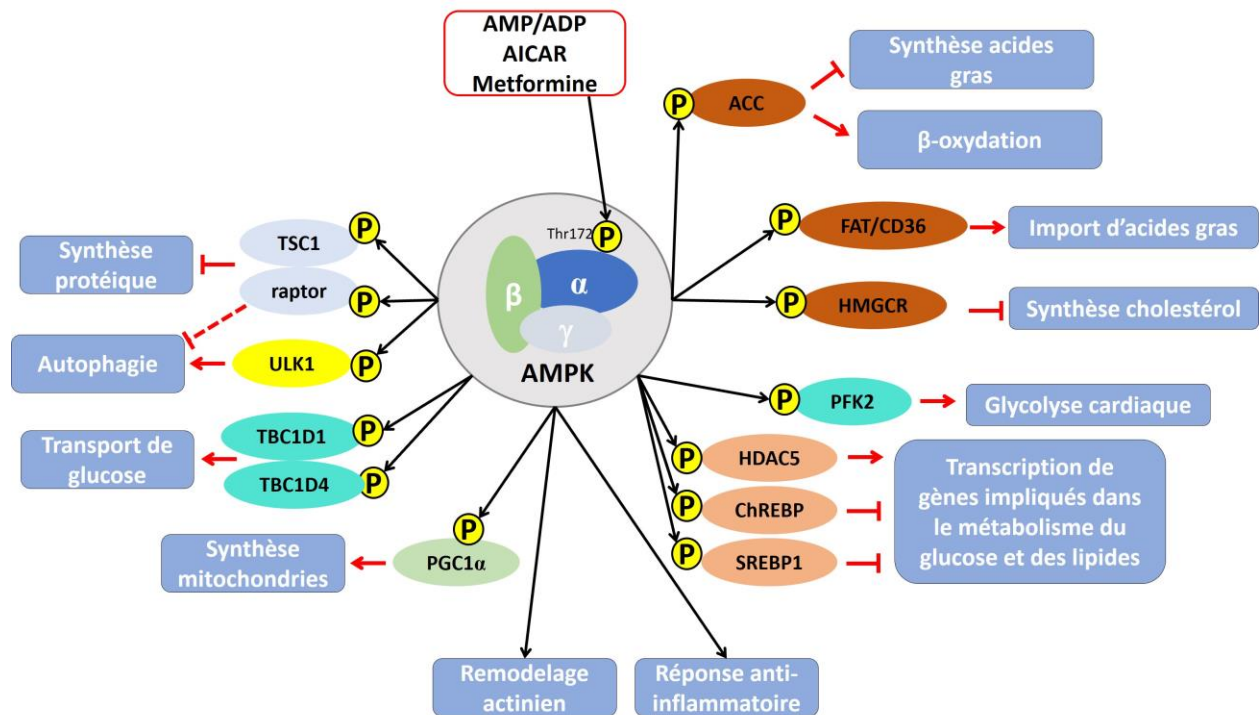
### III. La piste thérapeutique de l'AMPK contre le SARS-CoV-2

#### (1) Protéine centrale de l'homéostasie énergétique

##### 1. Structure et fonction

La protéine Kinase activée par l'AMP (AMPK), est une protéine hétérotrimérique composée d'une unité catalytique  $\alpha$  et de deux unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023). En cas de carence métabolique, le niveau cellulaire d'AMP augmente, ce qui favorise sa liaison à la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK. Cette interaction conduit à l'autophosphorylation de l'AMPK sur la Thréonine 172 et stimule l'activité kinase de l'AMPK (**Figure 35**). L'AMPK va permettre d'initier les programmes cellulaires destinés à restaurer les niveaux d'énergie disponible par génération d'ATP (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023). L'AMPK activée favorise l'import du glucose et son hydrolyse, selon des mécanismes que nous ne détaillerons pas ici mais qui sont des régulateurs majeurs de l'homéostasie énergétique (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023). L'AMPK inhibe la synthèse lipidique par phosphorylation de l'ACC, de la FASN et de l'HMGR, qui inhibent respectivement la synthèse des FA et du cholestérol (**Figures 29, 35**). L'inhibition de ces trois acteurs majeurs du métabolisme lipidique favorise la consommation des lipides stockés dans les gouttelettes lipidiques dont la taille diminue. L'activation de l'AMPK induit aussi l'autophagie, notamment par l'activation de ULK1 et l'induction de l'expression de P62 d'une façon Nrf2-

dépendante (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023). De plus, en inhibant la voie mTOR (TSC1/raptor), l'AMPK activée renforce sa capacité à induire l'autophagie (**Figures 32a, 35**). Enfin, l'AMPK activée a une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'activation cellulaire, généralement requise pour les fonctions pro-inflammatoires (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023).



**Figure 35 : Schéma de la structure de l'AMPK et des cibles en aval de son activation.** L'activation de l'AMPK par phosphorylation sur la Thréonine 172 permet l'activité kinase de l'AMPK, destinée à inhiber les mécanismes énergivores et de promouvoir le catabolisme afin de restaurer les niveaux énergétiques cellulaires. Adapté de Moreira, 2016, *Current Drug Target*.

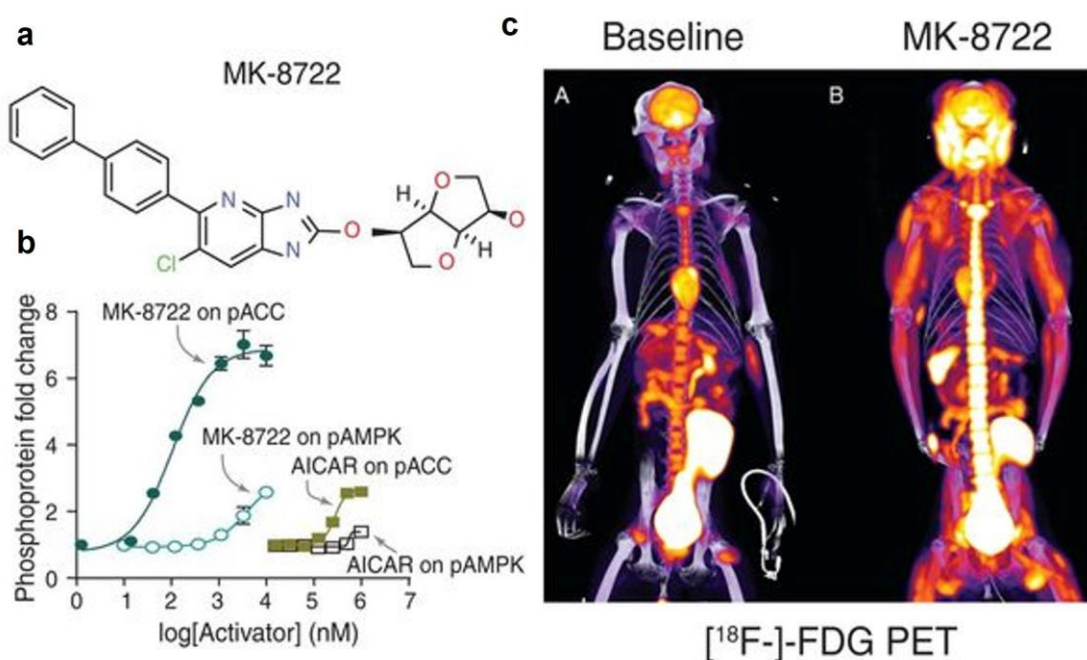
## 2. Ciblage pharmacologique

La metformine et l'AICAR sont deux activateurs chimiques de l'AMPK (Moreira et al., 2016; Sharma et al., 2023). Cependant cette activation ne dépend pas de leur liaison directe à l'AMPK. En conséquence, de fortes concentrations de chacune de ces deux molécules sont nécessaires pour induire un effet *in vitro* (de l'ordre du millimolaire). De plus, ces molécules peuvent également agir sur d'autres cibles contrairement à des activateurs directs.

Récemment, le MK-8722, un activateur allostérique de l'AMPK (**Figure 36a**), a été développé par les laboratoires Merck pour activer spécifiquement la sous-unité  $\beta$  de l'AMPK à l'échelle du nanomolaire (**Figure 36b**) (Myers et al., 2017). L'administration par voie orale de dose moyennes (à l'échelle du micromolaire) de MK-7822 a montré une bonne biodisponibilité du

produit dans des modèles NHP. Dans cette étude, les NHP traités présentent une légère hypertrophie cardiaque passagère, sans conséquence sur l'état des animaux, et aucun effet secondaire n'a été rapporté, démontrant la sûreté de son utilisation (Myers et al., 2017). Enfin, cette étude a également confirmé l'efficacité de MK-8722, puisqu'une augmentation de la consommation de glucose dans l'intégralité du corps a été observée par tomographie par émission de positons/tomodensitométrie (PET-scan, **Figure 36c**) chez les NHP et démontre l'activation de l'AMPK.

Ces données suggèrent que le MK-8722 est un activateur de choix de l'AMPK qui pourrait être utilisé au cours d'essais cliniques.



**Figure 36:** Présentation de MK-8722, l'activateur pan-AMPK développé par les laboratoires Merck. (a) Structure de la drogue et (b) son activité biologique sur l'activation de l'AMPK et de sa cible ACC, comparativement à l'AICAR. (c) Dégradation du glucose radioactif mesuré par PET-scan en corps total de NHP traité ou non par MK-8722. Issu de Myer 2017 Science.

### 3. Ciblage pharmacologique de l'AMPK contre les infections virales

Les protéines régulatrices du métabolisme lipidique (ACC, FASN et HMGCR) ainsi que de l'autophagie (activation de ULK1, induction indirecte de P62) sont régulées par l'AMPK active. Cette dernière apparaît ainsi comme une cible de choix permettant d'inhiber la biosynthèse lipidique et induire le flux autophagique. L'activation de l'AMPK par la metformine a permis de bloquer l'infection de cellules Vero par les virus de la Dengue (DenV), de la Fièvre Jaune et de Zika (ZikV) *in*

*in vitro* (Farfan-Morales et al., 2021a). Le traitement à la metformine réduit la quantité d'usines virales de ces virus à ARN à réplication cytosolique. Ces trois virus sont aussi connus pour détourner l'autophagie et la voie de biosynthèse des lipides à la faveur de leur cycle viral. Ceci suggère que l'activation de l'AMPK pourrait agir en contrecarrant l'effet de l'infection sur l'autophagie et/ou sur le métabolisme lipidique (Farfan-Morales et al., 2021b; Fernández de Castro et al., 2021). Cependant, si Farfan-Morales et collègues ont démontré que le traitement à la metformine réduit les symptômes de DenV dans un modèle murin, ils n'ont pas observé d'impact sur le tableau clinique dans le cas d'infection par le ZikV (Farfan-Morales et al., 2021a). Les auteurs supposent que l'effet antiviral est lié au fait que la metformine agit principalement au niveau hépatique, organe dans lequel le DenV se réplique, alors que ce n'est pas le cas pour le ZikV. Ces résultats montrent que la diffusion des molécules antivirales jusqu'au site d'infection est un facteur déterminant pour leur effet antiviral.

Concernant le SARS-CoV-2, il a été rapporté que l'infection de cellules Vero diminue l'activation de l'AMPK et la phosphorylation des cibles en aval telles que ULK1 et TSC2 (Gassen et al., 2021). Cependant, le traitement des cellules à l'AICAR ne permet pas d'inhiber l'infection aux doses testées (Gassen et al., 2021). Plus récemment, Parthasarathy et collègues ont montré *in vitro* que l'activation de l'AMPK par la metformine inhibait la réplication virale dans les cellules épithéliales Calu-3 et Caco2 à des concentrations de 2mM et 5mM respectivement (Parthasarathy et al., 2023). Cependant, la cytotoxicité de la metformine dès 5-10mM limite la portée de ces résultats. Les auteurs ont pu aussi démontrer que le traitement à l'AICAR inhibe la réplication du SARS-CoV-2 mais l'impact du traitement sur la viabilité des cellules infectées et traitées. Si un effet antiviral de la metformine et de l'AICAR contre le SARS-CoV-2 a pu être observé, il est fort probable que l'absence d'effet rapporté par Gassen et collègues corresponde à une dose non efficace de traitement par AICAR (1mM dans l'étude de Parthasarathy contre 25µM dans l'étude de Gassen).

Le traitement à la metformine diminue également le relargage de médiateurs de l'inflammation comme l'IL-6 et l'IL-1β par les macrophages alvéolaires stimulés au LPS (Xian et al., 2021). Une réduction de l'inflammation pulmonaire de souris hACE2 prétraitées à la metformine et infectées par le SARS-CoV-2 comparativement aux souris non traitées a également pu être

caractérisé. Cependant, si le traitement a permis de retarder l'inflammation dans les souris traitées, toutes sont mortes de l'infection, pour des raisons indépendantes de l'inflammation pulmonaire et probablement lié à l'expression ubiquitaire de hACE2 et à la réplication extra-pulmonaire du SARS-CoV-2 (Xian et al., 2021).

#### **IV. Perspectives**

En dépit de la mise en place rapide sur le marché de vaccins contre le SARS-CoV-2, aucune drogue antivirale n'est aujourd'hui disponible au grand public. Dans l'ensemble, les résultats de la littérature suggèrent que l'activation thérapeutique de l'AMPK chez des patients infectés par le SARS-CoV-2 pourrait permettre de diminuer la réplication virale tout en diminuant l'évolution sévère de la maladie COVID-19. Cependant, aucune preuve n'est disponible pour le moment dans des modèles pertinents *in vivo*. De plus, le traitement à base de metformine ciblant majoritairement le foie et est toxique aux doses efficaces contre l'infection virale *in vitro* (Farfan-Morales et al., 2021a; Parthasarathy et al., 2023). Ceci rend son utilisation impossible *in vivo*. Il semble aujourd'hui opportun de développer une approche antivirale basée sur l'activation de l'AMPK par un agoniste plus spécifique comme le MK-8722.

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Les travaux réalisés au laboratoire appuient l'importance de l'isotype IgA dans la protection des ESN par inhibition de l'infection et la destruction des cellules infectées par les fonctions effectrices. Les ESN présentent en plus une réponse CTL VIH-spécifique associée à leur protection et pour laquelle, la mise en place n'est pas clairement comprise aujourd'hui. Les résultats de la littérature suggèrent que les bNAb-IgG sont capables d'induire une réponse CTL VIS/SHIV/VIH-spécifique chez les NHP et l'humain (Niu et al., 2021; Rosás-Umbert et al., 2022), cependant aucune étude n'a documenté cet effet en utilisant des bNAbs-IgA. Ce mécanisme a été largement étudié *in vitro* et il semblerait que les IgG en IC favorisent leur ADCP par des cellules exprimant les Fc $\gamma$ R, ce qui active les cellules et promeut une présentation croisée de l'antigène phagocyté. Etant donné que les IgA sont capables d'induire des niveaux plus hauts d'ADCP de TCD4 infectés que les IgG, il semble alors envisageable que l'ADCP médiée par les IgA permette une réponse CTL VIH-spécifique plus importante que lorsqu'elle est médiée par les IgG. Un tel phénomène pourrait alors s'appliquer à la protection des muqueuses des ESN.

Dans ce but, durant ma thèse nous avons concentré nos travaux sur les conséquences de l'ADCP, en relation avec la protection des individus ESN afin d'évaluer :

- La faculté relative des IgA à induire la présentation croisée de peptides viraux après ADCP de TCD4 infectés.
- Le rôle de l'isotype dans le devenir du monocyte effecteur de l'ADCP en étudiant :
  - o Le profil différentiation du monocyte
  - o La sécrétion de chimiokines et leurs fonctionnalités
  - o L'induction d'une *trained immunity*

Ma thèse a aussi été marquée par l'émergence du SARS-CoV-2. Ce virus, comme le VIH-1, infecte les muqueuses. Il est responsable de syndromes respiratoires graves, pour lesquels aucune thérapie curative n'est accessible en dehors des services de réanimation. Le virus cible le métabolisme des lipides et l'autophagie pour réaliser son cycle et installer la pathologie COVID19, notamment marquée par la tempête cytokinique.

Notre collaborateur, Dr B. Viollet, avait précédemment suggéré que l'activation de l'AMPK, pourrait présenter une piste antivirale attractive par inhibition du métabolisme lipidique mais aussi l'induction de l'autophagie (Moreira et al., 2016). L'activation spécifique de l'AMPK est depuis peu possible par le composé MK-8722, récemment développé par les laboratoires Merck pour d'autres applications. Les essais pré-cliniques montrent une affinité augmentée et une excellente biodisponibilité sans effets secondaires majeurs (Myers et al., 2017). Nous nous sommes alors concentrés à :

- Mettre au point une technique de détection robuste et sensible de l'infection par les différents variants du SARS-CoV-2, à l'échelle de la cellule unique.
- Déterminer le potentiel antiviral de MK-8722 et sa fenêtre d'action.
- Déterminer le(s) mécanisme(s) antiviral(aux) de MK-8722.
- Evaluer sa compatibilité avec la réponse TCD8 SARS-CoV-2 spécifique.

Dans l'ensemble nos travaux présentent des approches thérapeutiques innovantes contre les virus muqueux et permettent de mieux comprendre la réponse immune destinée à contrôler et prévenir l'infection par le VIH-1 comme par le SARS-CoV-2.

## RESULTATS

## **I. L'ADCP de cellules infectées médiée par les IgA anti-VIH-1 conduit à la présentation croisée de l'antigène aux T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 et induit une immunité innée entraînée (Manuscrit 1)**

### **(1) Contexte**

Les IgA sont les principaux effecteurs immunitaires au niveau des muqueuses génitales et participent à la protection contre la transmission muqueuse du VIH-1. Cette protection par les IgA a été bien caractérisée chez les individus exposés au VIH-1 qui restent séronégatifs malgré des rapports sexuels non protégés avec des partenaires infectés par le VIH-1 (ESN). En effet, les individus ESN développent des IgA muqueux spécifiques de la protéine d'enveloppe virale gp41 (Mazzoli et al., 1997b) ayant des activités neutralisantes cross-clade puissantes (Khamassi et al., 2020). Ces IgA spécifiques de gp41 sont un des corrélats de protection des ESN (Miyazawa et al., 2009). D'autre part, ces IgA pourraient également protéger les ESN par des activités antivirales dépendantes de leur région Fc comme l'indique les études réalisées au laboratoire. En utilisant comme modèle 2F5, un bNAb spécifique de gp41 sous isotype IgA et IgG, le laboratoire a montré que bien que les deux isotypes induisent l'ADCC (Duchemin et al., 2018a) et l'ADCP (Duchemin et al., 2020) de cellules infectées, ces deux fonctions sont induites plus efficacement par l'isotype IgA que l'isotype IgG.

Les conséquences de ces fonctions destructrices médiées par les IgA restent à analyser. En effet, l'ADCP pourrait conduire à une stimulation des cellules effectrices et mettre en place une réponse médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (TCD8) contribuant ainsi à amplifier la réponse immune contre le VIH. Ces hypothèses sont confortées par la littérature. En effet, des cellules de l'immunité innée particulièrement actives et des TCD8 spécifiques du VIH-1 ont été décrites au niveau muqueux et dans le sang circulant (Miyazawa et al., 2009; Tomescu et al., 2011). Par ailleurs, l'infusion de bNAbs de format IgG à des primates non-humains les protègent contre l'infection par le VIH. Mais cette protection met en jeu une réponse TCD8 plutôt que l'activité neutralisante des anticorps infusés (Ko et al., 2014; Niu et al., 2021; Villinger et al., 2003). Bien que le mécanisme de l'induction de cette réponse TCD8 protectrice n'ai pas été décrit, ces résultats suggèrent que la liaison de la région constante Fc de l'Ab au FcR sur les cellules de l'immunité innée joue un rôle

déterminant dans la protection (Baker et al., 2014; Boross et al., 2014; Gunst et al., 2022; Mysore et al., 2021; Ng et al., 2019).

Un nouveau pan de recherche s'intéresse à la mémoire que pourraient développer les cellules de l'immunité innée. A la différence de la mémoire immunitaire adaptative qui caractérise les cellules T et B, la mémoire innée s'établie suite à une reprogrammation épigénétique et métabolique dénommée mémoire entraînée *ou trained immunity*. Celle-ci peut être induite par différents pathogènes par leur stimulation des *pattern recognition receptors* (PRR). Selon le concept de *trained immunity*, la cellule de l'immunité innée répond de manière plus rapide et plus efficace à une infection ultérieure. La mise en place d'une *trained immunity* dans les monocytes/macrophages et son implication dans la protection contre les infections muqueuses, comme c'est le cas du VIH, n'a pas encore été établie. Cependant, l'existence de l'induction d'une *trained immunity* par les IgA muqueux ciblant gp41, présents chez les ESN, permettrait d'expliquer leurs mécanismes protecteurs et validerait l'importance d'induire des IgA par vaccination.

## **(2) Objectifs**

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la protection des ESN par des anticorps IgA et clarifier l'implication de la région Fc dans les fonctions protectrices de ces IgA, nous avons évalué leur capacité à promouvoir (i) la cross-présentation des peptides viraux issus de l'ADCP des cellules infectées par le VIH-1 et l'activation de cellules TCD8 spécifiques du VIH, ii) l'activation des monocytes par l'ADCP et (iii) la *trained immunity* des monocytes effecteurs suite à l'ADCP des cellules infectées par le VIH-1.

## **(3) Résultats**

Nous avons établi un modèle de présentation croisée d'antigènes viraux après l'ADCP en utilisant comme anticorps le 2F5 sous isotype IgA (2F5-IgA) et IgG (2F5-IgG). Dans ce modèle, les monocytes (HLA-A2<sup>+</sup>) phagocytent des cellules T (HLA-A2<sup>-</sup>) infectées par un virus de clade B par ADCP médiée par le 2F5-IgA ou IgG. Les monocytes sont ensuite mis en présence de clones de TCD8 spécifiques de Nef et l'activation des TCD8 a été quantifiée. Dans ce modèle, nous avons montré

que le 2F5-IgA est capables de cross-présenter un antigène de Nef ce qui conduit à une activation efficace des TCD8 spécifiques de Nef. Cette activation est plus efficace que lorsque que l'ADCP est médiée par le 2F5-IgG. Cette réponse s'accompagne d'une différenciation des monocytes effecteurs en macrophages ayant des propriétés mixtes pro- et anti-inflammatoires. Suite à l'ADCP médiée par les IgA, les monocytes ont acquis un profil de *trained immunity* et de macrophages mixte pro- et anti-inflammatoires. Finalement, la stimulation par les IgA entraîne la sécrétion par les monocytes de chimiokines pro-inflammatoires comme CCL3, CCL4 et CCL5. Ces chimiokines conduisent à l'augmentation de l'expression de CD11b et CD62L lesquels sont associés *in vivo* à l'extravasation et l'activation des neutrophiles, monocytes et TCD8 circulants.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Ma thèse a été marquée par l'épidémie à Coronavirus 2 du Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère ou SARS-CoV-2. Étant donné mes compétences en virologie moléculaire et ma volonté de contribuer à l'effort global, j'ai participé à plusieurs projets sur le SARS-CoV-2 développés au laboratoire, dont deux particulièrement exposés ci-dessous (Manuscrits 2 et 3).

## **II. Mise au point d'un protocole de quantification du contenu infectieux d'échantillons infectés par le SARS-CoV-2 à l'échelle de la cellule unique (Manuscrit 2)**

### **(1) Contexte**

Le virus du SARS-Cov-2, aussi bien le virus originel que les nombreux variants qui en ont découlé, est transmis par la muqueuse nasale dont les cellules épithéliales s'infectent. Le virus se propage ensuite aux cellules épithéliales respiratoires mais aussi à d'autres cellules muqueuses dont les cellules myéloïdes. Le virus peut ensuite diffuser vers d'autres tissus. Il est important de pouvoir détecter les virus dans ces divers types cellulaires, y compris lorsque le degré d'infection est faible, afin de comprendre puis contrôler la pathologie du COVID-19 (Fiege et al., 2021). De plus, des niveaux faibles et persistants de composants du SARS-CoV-2 peuvent être détectés dans des échantillons cliniques plusieurs mois après l'infection, ce qui pourrait être lié au développement du COVID long (Sherif et al., 2023). Pour détecter ces faibles niveaux de virus, indétectables par les techniques de titrage conventionnelles ou de RT-qPCR classiques, le développement de méthodes très sensibles applicables à l'ensemble des variants viraux est nécessaires.

### **(2) Objectifs**

Le but de cette étude a été de mettre au point un protocole robuste permettant de quantifier l'infectiosité d'échantillons biologiques, même faiblement infectieux, avec une gamme dynamique étendue.

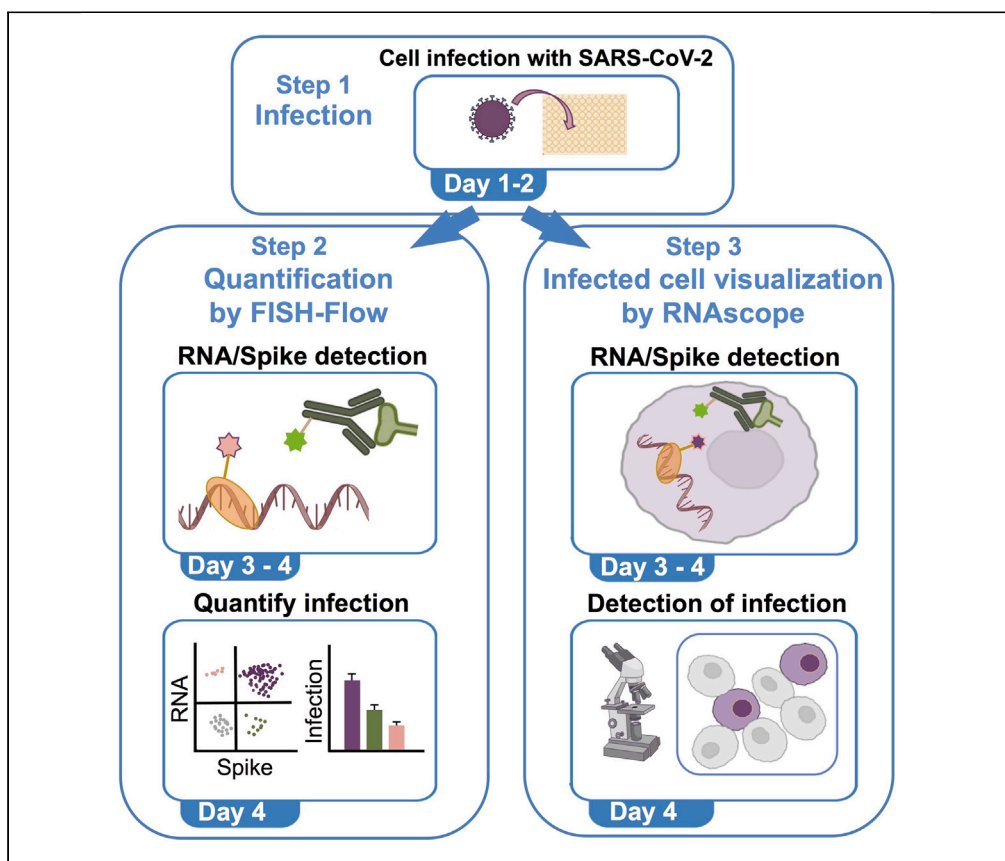
### (3) Résultats

Nous avons mis en place un protocole permettant la détection d'un faible niveau d'infection par le SARS-CoV-2. Ce protocole comprend deux techniques complémentaires. La première est une approche quantitative qui combine la détection de l'ARN par FISH et celle de la protéine spike par immunomarquage à l'échelle de la cellule unique à l'aide de la technique FISH-flow, établie préalablement au laboratoire pour le VIH (Real et al., 2022, 2020). La seconde est une approche morphologique qui détecte l'ARN par FISH en utilisant la méthode de RNAscope (ACD, 848561) combinée à celle de la protéine Spike par immunodétection. Les deux marquages sont analysés simultanément par microscopie confocale. Cette méthode a été mise au point pour la détection des variants alpha, beta, delta et omicron de SARS-CoV-2 à des concentrations allant jusqu'à un virus par ml. Les deux méthodes montrent une sensibilité similaire. La robustesse et l'aspect quantitatif de l'évaluation de l'infection par FISH-flow rendent la méthode particulièrement attractive pour les échantillons faiblement infectieux. La détection morphologique permet aussi de décrire les compartiments cellulaires impliqués dans la réplication.

De plus, la quantification de l'infection par FISH-flow combinant détection d'ARN et de protéine Spike et la détection morphologique de la Spike serviront à la caractérisation et à l'évaluation de mécanismes antiviraux, comme nous le présenteront dans **l'article 3**.

## Protocol

# Protocol to detect infectious SARS-CoV-2 at low levels using *in situ* hybridization techniques



Low and persistent levels of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA/protein/virus can be detected in clinical samples months after infection, possibly related to the emergence of SARS-CoV-2 variants or development of long coronavirus disease. Here, we present a protocol to detect low levels of viral RNA together with protein using flow cytometry and microscopy. We describe steps for cell infection with SARS-CoV-2 and quantification by fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry. We then detail procedures for visualization using immunolabeling and RNAscope. This approach is directly applicable to clinical samples.

Publisher's note: Undertaking any experimental protocol requires adherence to local institutional guidelines for laboratory safety and ethics.

Andréa Cottignies-Calamarte, Feifan He, Aiwei Zhu, Fernando Real, Morgane Bomsel

morgane.bomsel@inserm.fr

### Highlights

Protocol to quantify low level of infectious SARS-CoV-2 at the single-cell level

Immunolabeling and *in situ* hybridization details to detect spike protein and viral RNA

Combining morphological and flow cytometry quantifications for improving robustness

Guidance to deal with background and to improve signal-to-noise ratios

Cottignies-Calamarte et al.,  
STAR Protocols 4, 102593  
December 15, 2023 © 2023  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102593>



## Protocol

Protocol to detect infectious SARS-CoV-2 at low levels using *in situ* hybridization techniques

Andréa Cottignies-Calamarte,<sup>1,2,3</sup> Feifan He,<sup>1,2,3</sup> Aiwei Zhu,<sup>1,2</sup> Fernando Real,<sup>1,2</sup> and Morgane Bomsel<sup>1,2,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mucosal Entry of HIV and Mucosal Immunity, Université de Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup>Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup>These authors contributed equally

<sup>4</sup>Lead contact

<sup>5</sup>Technical contact

\*Correspondence: [morgane.bomsel@inserm.fr](mailto:morgane.bomsel@inserm.fr)  
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102593>

## SUMMARY

Low and persistent levels of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA/protein/virus can be detected in clinical samples months after infection, possibly related to the emergence of SARS-CoV-2 variants or development of long coronavirus disease. Here, we present a protocol to detect low levels of viral RNA together with protein using flow cytometry and microscopy. We describe steps for cell infection with SARS-CoV-2 and quantification by fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry. We then detail procedures for visualization using immunolabeling and RNAscope. This approach is directly applicable to clinical samples.

For complete details on the use and execution of this protocol, please refer to Zhu et al. (2022).<sup>1</sup>

## BEFORE YOU BEGIN

The protocol below describes the specific steps for using Vero E6 cells (referred to as Vero cells) as reporter cells for detection of low amounts of SARS-CoV-2. This protocol can be adapted for other infected cell culture supernatants or biological other fluids from clinical samples.<sup>1</sup>

The protocol describes two complementary techniques for detection of *in situ* hybridized SARS-CoV-2 RNA: one quantitative at the single cell level using flow cytometry, also known as FISH-flow<sup>2,3</sup> and the other semi-quantitative using microscopy from samples processed for *in situ* hybridization using the “RNAscope” technology.<sup>3,4</sup>

## Design of FISH-flow probes

⌚ Timing: 1 h for design, 1–2 weeks for delivery of probes, 1 h for preparing probe set stocks

1. Design the Cy5-tagged probe sets for SARS-CoV-2 gene targets using the LGC Biosearch Technologies Stellaris Probe designer tool, a software free with registration, accessed at <https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer>.
  - a. Create an account at the LGC Biosearch Technologies website: <https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>
  - b. Log in with username and password.
  - c. Complete the required fields.



- i. For organism, select "Other."
- ii. Masking level defaults to "2."
- iii. Set number of probes to "48," oligo length to "20," and min spacing length to "2."
- d. Enter the target sequences provided below into the provided field.
- e. Select "Design probes."

△ **CRITICAL:** The tool designs probes that are antisense to the input sequence. It corresponds to the present protocol established for the detection of positive-sense vRNA. Therefore, enter the 5' → 3' cDNA target sequence; the resulting probes will be anti-positive-sense vRNA.

- f. After selecting "Design probes," the "Review design results" screen displays. By selecting "Order", the probes can be purchased directly through LGC Biosearch Technologies. Select Quasar 670 as the desired fluorophore and add the item to the cart. Fluorophore selection depends on the optical system that will be used for analysis and must be chosen such as the optical system used can detect signal in this wavelength.

**Note:** In this FISH-flow assay, we used a combination of 4 different probe sets (40–48 probes each) covering 2 regions of the *RdRp* gene, and the *S* and *N* genes (Wuhan strain, reference genome: GenBank : NC\_045512) as described in the table below. In contrast, targeting only the most variable *S* gene failed to detect SARS-CoV-2 infected cells obtained from samples from infected patients (data not shown). The detection of SARS-CoV-2 variants may require the design of variant-specific probes, although the combination of probes described here detected alpha, beta, delta, and omicron variants (see below). It should be noted that using only probe set 1 that targets the *RdRp* gene did not detect SARS-CoV-2 alpha infection.

Probe set 1 First part of <i>RdRp</i> gene (12688-14185)	Probe set 2 Second part of <i>RdRp</i> gene (14186-16236)	Probe set 3 <i>N</i> gene (28274-29533)	Probe set 4 <i>S</i> Gene (21631-23303)
GCAACAGGACTAAGCTCATT	CAACATGTGACTCTGCAGTT	TGATTTTGGGGTCCATTATC	GAATTAGTGTATGCAGGGGG
AGCACAAGACATCTGTCGTA	CCCACCTAATGTAAGGCTTT	AACGTAATGCGGGGTGCATT	GGGTAATAAACACCACGTGT
CAAGCAGTTTGTGTAGTACC	TCTTCCCGTGAAGTCATAT	AGTTGAATCTGAGGGTCCAC	ACAAGTCCTGAGTTGAATGT
AGCTAACGCATTGTGCATCAG	ATTTGGGTGGTATGTCTGAT	GTTCTCCATTCTGGTTACTG	GGTCCCAGAGACATGTATAG
GTGCAAGTACAAACCTACCT	TGCAGAATGCATCTGTATC	CGACGTTGTTTTGATCGCGC	GACAGGGTTATCAAACCTCT
GCCCATTTCAAATCCTGTAA	GTGGTCCAAAACCTGTAGGT	AGACGCAGTATTATTGGGTA	ACCAAAAAATCCAGCCTCTTA
TCCATCACTCTTAGGGAATC	CTGAAGTGGTATCCAGTTGA	TGTTGAGTGAGAGCGGTGAA	ATAAGTAGGGACTGGGTCTT
GGTTCAGTTCTGTATAGAT	CCTGATTATGTACAACACCT	GGGAATTTAAGGTCTTCCTT	ACACCCAAAAATGGATCATT
CACTTTAGGACCTTAGGTG	TAGATTACCAGAAGCAGCGT	AATTGGAACGCCTTGTCCTC	ACTCTGAACCTCACTTTCCAT
CCATACCTCTATTAGGTTG	ACGTAGTGCCTTATCTAGT	CATCTGGACTGCTATTGGTG	GTGCAATTATTCGCACTAGA
GTGGCAGCTAACTACCAAG	ATTACCGGGTTTGACAGTTT	CTTCGGTAGTAGCCAATTTG	AGGCTGAGAGACATATTTCAA
ATTACCAGCTTGTAGACGTA	AGAAACCCTTAGACACAGCA	ACCACGAATTCGTCTGGTAG	TTCTTCAAGGTCCATAAGA
TACAGTTGAATTGGCAGGCA	ACCATCCTGAGCAAAGAAGA	GATCTTTTCATTTACCGTCA	CGCACTAAATTAATAGGCGT
TGTAAGCTTTAGCAGCATCT	CATAATCGCTGATAGCAGCA	TTTGTAGCACCATAGGGAA	AAGCCGAAAAACCTGAGGG
AATTAGTGATTGGTTGTCCC	AATACAGCCACCATCGTAAC	CAGTTGCAACCCATATGATG	GGCAAATCTACCAATGGTTC
CCAGTGTGTGTACACAACAT	TGACGATGACTTGGTTAGCA	GATTGCAGCATTGTTAGCAG	ACCTAATGATGTTAATACCT
GTGTAACGTGTTATTGCCTGA	AACCAGCTGATTTGTCTAGG	TAGAAGCTTTTGGCAATGT	ATAATAAGCTGCAGCACCAG
TTCTTGATCCATATTGGCTT	GCATCTTGATCCTCATAACT	ACGAGAAGAGGCTTGACTGC	TCCTAGGTTGAAGATAACCC
AACACGATGCACCACCAAG	GAGCTCTATTCTTGCACCTA	TGTTGCGACTACGTGATGAG	TCTACAGCATCTGTAATGGT
TATGTGGCAACGGCAGTACA	AGATAGAGACACCAGCTACG	GCCTGGAGTTGAATTTCTTG	TGAGAGAGGGTCAAGTGCAC
ATCCTTTAGGATTTGGATGA	GGCGGCTATTGATTTCAATA	CAGGAGAAGTCCCCTACTG	GATTTCAACGTACACTTTGT
GGTATTTGTACATACTTACC	TTACTACAGTAGCTCCTCTA	CAGCAAAGCAAGAGCAGCAT	GATTCCTTTTTCTACAGTGA
CAGGGTCATTAGCACAAAGTT	CCATAGAATTTGCTTGTGCC	AGCTGGTTCAATCTGTCAAG	AGATTCTGTTGGTTGGACTC
AGACGGTACAGACTGTGTTT	GTTTTTAACATGTTGTGCCA	TTTACCAGACATTTTGCTCT	CCAAAAGGGCACAAGTTTGT
AGCCATAACCTTTCCACATA	GTGAGGGTTTTCTACATCAC	TAGTGGCAGTACGTTTTTGC	TCTGTTGGCGTTAAAAACTT

(Continued on next page)

**Continued**

Probe set 1 First part of <i>RdRp</i> gene (12688-14185)	Probe set 2 Second part of <i>RdRp</i> gene (14186-16236)	Probe set 3 <i>N</i> gene (28274-29533)	Probe set 4 <i>S</i> Gene (21631-23303)
TTCGCGGAGTTGATCACAAAC	GCATGGCTCTATCACATTTA	GCTTGTGTTACATTGTATGC	TCCAAGCATAAACAGATGCA
TGTGCATCAGCTGACTGAAG	CGGTGTGACAAGCTACAACA	TTTGTCTGGACCACGTCTG	GCGGAATTATATAGGACAGA
CCGCAAACCCGTTTAAAAAC	ACTTGAGCACACTCATTAGC	TGGTCCCAAAATTCCTTG	GGAGACTCCATAAACAATT
TGTAAGACGGGCTGCACTTA	ACACATGACCATTTCACTCA	AGTTCCTTGCTGATTAGTT	ATTTGTCTGACTTCATCACC
CATCAGTACTAGTGCTGTG	TTCCACCTGGTTAACATAT	CAATTTGCGGCAATGTTG	CAGCAATCTTCCAGTTTGC
ATGTCAAAAGCCCTGTATAC	AAGTGCATTAACATTGGCCG	GAAGCGCTGGGGCAAATTG	GATTGTTAGAATTCCAAGCT
ACCAGTACTTTATCATTGT	CGGCAATTTTGTACCATCA	ATGCGCGACATCCGAAGAA	TTACCACCAACCTTAGAATC
AATTGTCATCTTCGTCCTTT	GTCTGTGTGTAATGCGG	CGAAGGTGTGACTTCCATGC	GGTTTGAGATTAGACTTCCT
CATGTTTAGCAACAGCTGGA	AGTCTGTGTCAACATCTCTA	CTGTGTAGGTCAACCACGTT	GCCTGATAGATTTCAAGTTGA
GTCACCGTCTATTCTAAACT	CACAACAGCATCGTCAGAGA	ATTTGGATCTTTGTCATCCA	ACCATTACAAGGTGTGCTAC
GACGTGATATATGTGGTACC	ACCTTGAGATGCATAAGTGC	TTGTATGCGTCAATATGCTT	TACTACTCTGTATGGTTGGT
TCTGCCATTGTGATTTAGT	AAGTCTTTATGCTAGCCAC	GGTAAGGCTTGAGTTTCATC	GGTGCATGTAGAAGTTCAAA
ATGCCTTAAAGCATAGACGA	TCAGTCCAACATTTTGCTTC	GAAGAGTCACAGTTTGCTGT	GACACATTTGTTTTAAACCA
GTGTACAATTACCTTCATC	TGAGTCCCTTTAGTAAGTTC	ATCATCCAAATCTGCAGCAG	GCCTGTTAAACCAATTGAAGT
ACAAAATCATAACAGTCCTT	AGCATTGTATGTTGAGAGCA	GGATTGTTGCAATTGTTGG	TAGACTCAGTAAGAACACCT
GTTGGCGTATACGCGTAATA	TGGATCTGGGTAAGGAAGGT		ATCACGGACAGCATCAGTAG
AAAGCTTGGCGTACACGTTT	TCATCTACAAAACAGCCGGC		
CGCATGGCATCACAGAATTG	GTGTACCATCTGTTTTACG		
GTACACCAACAATACCAGCA	AGACACGAACCGTTCAATCA		
CCGAAATCATACCAGTTACC	AGTGGGTAAGCATCTATAGC		
CTGGCGTGGTTTGTATGAAA	GCATACTCCTGATTAGGATG		
TCTACAACAGGAACCTCACT	CCCAATACCTGAAGTGTTA		
GGTCAAGGTTAATATAGGCA	AAGACTGTATGCGGTGTGTA		

- Aliquot each Quasar 670-labeled probe set separately at 12.5  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O in 2  $\mu$ L aliquots in RNA-free 1.5 mL tubes upon receipt for single use.
- Store aliquots at  $-80^{\circ}$ C. In such storage conditions, probes are stable for several years.

### Preparation of Vero cell cultures

⌚ Timing: 2 days

- Get Vero cells ready for infection.
  - Culture Vero cells DMEM supplemented with Penicillin/streptomycin (100 U/mL) and 10% FCS (D10) in standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
  - Trypsinize Vero cells using Trypsin 0.05% v/v for 5 min at 37°C.
  - Neutralize trypsin with an equal volume of D10.
  - Centrifuge cells.
  - Resuspend cells in D10.
  - Seed 50,000 cells per well of a 96-flat well plate.
  - Place the plate at 37°C until the next day (> 15 h).

### Preparation of buffers

⌚ Timing: 2 h

- Prepare buffers (as described in the Materials and Equipment section) and a fresh paraformaldehyde 4% solution in PBS from the 16% stock using Nuclease-free reagents.

△ **CRITICAL:** Paraformaldehyde is highly toxic. It is a strong irritant and has caustic effects on skin, eyes and mucous membranes. There is limited evidence of carcinogenic effects. Handle it in a well-ventilated workspace and handle the 16% stock in a fume hood to avoid breathing vapor.

△ **CRITICAL:** Growing the cells until confluence ensures optimal detection of infectious particles. In contrast, over-confluence is detrimental to the infection of the cells.

△ **CRITICAL:** Plan to have at least three infected cell replicates per virus dilution and per sample to ensure robustness of detection and analyzes.

### Setting incubators

⌚ **Timing:** 2 h

6. Set two different non-CO<sub>2</sub> incubators to 37°C and 40°C.

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti-SARS-CoV/SARS-CoV-2 (COVID-19) spike antibody (1A9), mouse IgG1 monoclonal (concentration: 2 µg/mL)	GeneTex	GTX632604
Alexa Fluor 488 AffiniPure goat anti-mouse IgG1 (dilution 1:8000)	Jackson ImmunoResearch	115-545-205
SARS-CoV-2 spike S1 subunit Alexa Fluor 488-conjugated antibody, monoclonal mouse IgG <sub>2A</sub> clone# 1035226 (dilution 1:250)	R&D Systems	FAB105805G-100UG
<b>Biological samples</b>		
Horse serum	Vector Laboratories	FV-93951-74
Human serum	Sigma-Aldrich	H4522
SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs)	Desmarests et al. <sup>9</sup>	Desmarests et al. <sup>9</sup>
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
Paraformaldehyde 16%	Electron Microscopy Sciences	15710
Trypsin 0.05%	Gibco	25300-024
TPCK-treated trypsin	Sigma	T1426
Phosphate-buffered saline without calcium and magnesium	Gibco	14190-114
10× PBS nuclease-free	Thermo Fisher Scientific	AM9939
RNase-free BSA	Thermo Fisher Scientific	AM2616
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Thermo Fisher Scientific	10977-035
Tween 20	Sigma	P1379
Saponin	Sigma	S-7900
20× saline-sodium citrate (SSC) buffer	Sigma	SRE0068
Formamide	MP Biomedicals	FORMD002
Dextran sulfate	Calbiochem	265152
Yeast tRNA	Thermo Fisher Scientific	15401029
10× TRR, RNAscope target retrieval reagents	Advanced Cell Diagnostics (ACD)	322000
Protease Plus, provided in RNAscope H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and Protease Plus reagents	ACD	322330
AMP1-3, HRP-C1, HRP blocker, TSA buffer are provided in RNAscope multiplex fluorescent v2	ACD	323110

(Continued on next page)

### Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
50× wash buffer, RNAscope wash buffer reagents	ACD	310091
Opal 570	Akoya Biosciences	FP1488001KT
ibidi mounting medium	ibidi	50001
DAPI	Sigma-Aldrich	D8417-10MG
Gelatin from cold water fish skin (45%)	Sigma-Aldrich	G7765-1L
EDTA (0.5 M)	Sigma-Aldrich	03609
BSA (fraction V)	Sigma-Aldrich	10735086001
Viability 405/452 fixable dye	Miltenyi	130-130-420

### Experimental models: Cell lines

Vero E6 cells	ATCC	CRL-1587
DMEM	Gibco	41966-029
Fetal calf serum (FCS)	Eurobio	CVFSVF06-01
Penicillin/streptomycin	Gibco	15140-022

### Oligonucleotides

Probe set 1 First part of <i>RdRp</i> gene (12688-14185)	LGC Biosearch Technologies	This study
Probe set 2 Second part of <i>RdRp</i> gene (14186-16236)	LGC Biosearch Technologies	This study
Probe set 3 <i>N</i> gene (28274-29533)	LGC Biosearch Technologies	This study
Probe set 4 <i>S</i> gene (21631-23303)	LGC Biosearch Technologies	This study
RNAscope SARS-CoV-2 spike probe: RNAscope Probe - V-nCoV2019-S	ACD	848561

### Software and algorithms

Stellaris probe designer tool	LGC Biosearch Technologies	<a href="https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer">https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer</a>
FlowJo	FlowJo (BD)	Version 10.7.2
GuavaSoft	Millipore	Version 3.4

### Other

Poly-L-lysine-coated slides: poly-prep slides	Sigma-Aldrich	P0425-72EA
Hydrophobic pen: ReadyProbes Hydrophobic Barrier Pap Pen	Thermo Fisher Scientific	R3777
Flow cytometer	Merck	Guava easyCyte 12HT System
Confocal microscope	Olympus	IXplore, spin microscope

## MATERIALS AND EQUIPMENT

### PBS-FISH

Reagent	Final concentration	Amount
10× PBS Nuclease-free	1×	5 mL
RNase-free BSA	0.2 mg/mL	0.2 mL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	N/A	44.8 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

△ **CRITICAL:** Pass PBS-FISH through a 0.22 μm filter to sterilize and keep at 4°C for 2 months maximum for storage.

### Stock solution of permeabilization buffer (10% PERM-FISH-Tween Stock)

Reagent	Final concentration	Amount
Tween 20	10% v/v	5 mL
10× PBS Nuclease-free	1×	5 mL

(Continued on next page)

**Continued**

Reagent	Final concentration	Amount
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	N/A	40 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

△ **CRITICAL:** Pass 10% PERM-FISH-Tween Stock through a 0.22 µm filter to sterilize and keep at 20°C–23°C for a maximum of 12 months. This later is a stock solution for long-term storage.

△ **CRITICAL:** Tween 20 is viscous and needs to be pipetted slowly, rinsing the pipette several times into the solution for proper mixing. Avoid formation of bubbles. Pipettes with big orifices are also useful for pipetting viscous solution like Tween 20.

**Permeabilization buffer (PERM-FISH-Tween)**

Reagent	Final concentration	Amount
10% PERM-FISH-Tween stock	2% v/v (corresponding to 0.2% v/v final for Tween 20)	1 mL
10× PBS Nuclease-free	1×	5 mL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	N/A	44 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

△ **CRITICAL:** Pass PERM-FISH-Tween through a 0.22 µm filter to sterilize and keep at 20°C–23°C. This is the solution to be used in the reaction and to be discarded after use

**Alternatively prepare Permeabilization buffer Saponin (PERM-FISH-Sapo)**

Reagent	Final concentration	Amount
Saponin 10% in nuclease-free H <sub>2</sub> O	0.1% (dilute 100×)	500 µL
FCS	2%	1 mL
PBS 1×		48.5 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

△ **CRITICAL:** Pass PERM-FISH-Sapo through a 0.22 µm filter to sterilize and keep at 20°C–23°C. This is the solution to be used in the reaction and to be discarded after use.

**Hybridization wash buffer (HWB)**

Reagent	Final concentration	Amount
20× SSC	2×	5 mL
Formamide	10% v/v	5 mL
RNase-free BSA	0.2 mg/mL	0.2 mL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	N/A	39.8 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

△ **CRITICAL:** Warm Formamide stored at 4°C to 20°C–23°C before use.

△ **CRITICAL:** Formamide is a carcinogen. Work in a fume hood to avoid breathing vapor. Avoid mixing techniques that generate aerosols (i.e., pipette instead of vortex). Avoid direct skin contact. Collect all waste containing formamide and dispose according to institutional environmental health and safety guidelines.

△ CRITICAL: Pass HWB through a 0.22 µm filter to sterilize and keep at 4°C for 2 months maximum for storage.

Hybridization buffer 10% dextran sulfate (HB10%dx)		
Reagent	Final concentration	Amount
Dextran sulfate	10% w/v	5 g
Yeast tRNA	0.1% w/v	50 mg
20× SSC	2×	5 mL
Formamide	10% v/v	5 mL
RNase-free BSA	0.2 mg/mL	0.2 mL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	N/A	Top to 50 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>50 mL</b>

**Note:** Dissolve first the Dextran Sulfate and the Yeast tRNA in 30 mL of Nuclease-free water. Then add the SSC buffer, the formamide and the RNase-free BSA and top to 50 mL of total volume with Nuclease-free water.

△ CRITICAL: Warm Formamide stored at 4°C to 20°C–23°C before use.

△ CRITICAL: Formamide is a carcinogen. Work in a fume hood to avoid breathing vapor. Avoid mixing techniques that generate aerosols (i.e., pipette instead of vortex). Avoid direct skin contact. Collect all waste containing formamide and dispose according to institutional environmental health and safety guidelines.

△ CRITICAL: This solution is viscous: avoid formation of bubbles before aliquoting and freezing.

△ CRITICAL: Pass HB10%dx through a 0.22 µm filter to sterilize aliquot in RNase-free 1.5 mL tubes (1 mL/aliquot) and keep at –20°C for 12 months maximum for storage.

RNAscope Target Retrieval Reagent (TRR)		
Reagent	Final concentration	Amount
Target Retrieval Reagent 10×	1×	35 mL
dH <sub>2</sub> O	N/A	315 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>350 mL</b>

△ CRITICAL: Do not store TRR, discard after use.

RNAscope wash buffer (RWB)		
Reagent	Final concentration	Amount
RNAscope wash buffer 50×	1×	60 mL
dH <sub>2</sub> O	N/A	2.94 L
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>3 L</b>

△ CRITICAL: Keep TRR at 37°C throughout procedure. Do not store, discard after use.

Opal 570 fluorescent dye solution (Opal 570)		
Reagent	Final concentration	Amount
Opal 570 dye	1:1,500 v/v in TSA	1 µL
TSA buffer	1×	1.499 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>1.5 mL/10 samples</b>

△ **CRITICAL:** Keep at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 12 months maximum

RNAscope immunolabeling blocking buffer (blocking buffer)		
Reagent	Final concentration	Amount
EDTA 0.5 M	50 mM	1 mL
Gelatin from cold water fish skin	0.5% v/v	100 $\mu\text{L}$
BSA (fraction V)	1% w/v	0.1 g
Horse serum	1% v/v	100 $\mu\text{L}$
Human serum	5% v/v	500 $\mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O	N/A	Top to 10 mL
<b>Total</b>	<b>N/A</b>	<b>10 mL</b>

△ **CRITICAL:** Pass blocking buffer through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter to sterilize, aliquot in 1.5 mL tubes (1 mL/aliquot) and keep at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 12 months maximum.

## STEP-BY-STEP METHOD DETAILS

For both assays, cells need to be infected following steps 1–14. For quantifying infection by the FISH-flow assay, follow steps 15–23, and for evaluating the infection with the morphological RNAscope assay, follow steps 24–57.

### Infection of Vero cells

⌚ **Timing:** 24 h

In this step, Vero cells are incubated with various amounts of infectious virus with indicated multiplicity of infection (MOI) ranging from 0.01 to 0.00001, thus including a condition with low infectious virus concentration ( $< 10$  infectious virus/mL), not detectable in techniques such as plaque forming assays or RT-qPCR, this later one being sensitive but unable to discriminate infectious from non-infectious virus.

This protocol applies to the detection of low levels of infectious virus produced by different cells in *ex vitro* or *in vitro* culture systems.

1. Seed cells in D10 in a 96-flat well plate so that a layer of confluent cells can be infected with the virus on the day of infection (usually 50,000 cells/well the day before). Anticipate having at least 3 replicates per dilution of virus tested and per sample in order to ensure robustness of the detection.
2. Perform 10-fold serial dilutions of viral stocks or biological samples in DMEM supplemented with Penicillin/streptomycin (100 U/mL) and 2% FCS (D2).

△ **CRITICAL:** Addition of 1% final TPCK-treated trypsin might increase detection of infectious particles from biological samples in Vero E6 cells that lack expression of the protease TMPRSS2.<sup>5</sup>

3. Infect cells with 50  $\mu\text{L}$  viral dilution for 1–3 h at  $37^{\circ}\text{C}$ .
4. Replace inoculum with 100  $\mu\text{L}$  fresh pre-warmed D2.
5. Incubate Vero cells for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
6. Wash two times Vero cells with PBS-FISH.
7. Detach Vero cells by incubating them in Trypsin 0.05% v/v solution for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
  - a. Add 50  $\mu\text{L}$  trypsin/well.

- b. After the 5 min incubation, add 100  $\mu\text{L}$  D2 to neutralize trypsin, and then transfer cells to a round bottom plate.
  - c. Wash the wells of the culture plate with 100  $\mu\text{L}$  PBS and transfer cells to the corresponding wells of a round bottom plate.
8. Centrifuge cells at  $300 \times g$  for 10 min and remove media.
9. Before staining with RNA probes for FISH-flow, perform a viability staining with 50  $\mu\text{L}$  Viability 405/452 diluted in PBS (final dilution 1:100), 5 min on ice.
10. Add 200  $\mu\text{L}$  PBS and centrifuge cells at  $300 \times g$  for 5 min to remove the excess of Viability staining solution.
11. Resuspend cell pellets with 4% v/v paraformaldehyde and incubate for 30 min for cell fixation.
12. Remove fixative by washing cells three times with PBS-FISH using the same centrifugation settings as in step 8.
13. Reserve cells in suspension for FISH-flow.
14. Make dry spots of the fixed Vero cells on poly-L-Lysine-coated slides for RNAscope.
  - a. Resuspend  $10^5$  cells in 20  $\mu\text{L}$  of PBS without calcium and magnesium.
  - b. Drop the 20  $\mu\text{L}$  of cell suspension on the poly-L-Lysine-coated slide. Deposit a maximum of two to three drops per slide.
  - c. Allow drying at  $20^\circ\text{C}$ – $23^\circ\text{C}$  for 2 h.
  - d. Store slides at  $4^\circ\text{C}$  until the RNAscope assay is run.

### Quantification of infection by FISH-flow

**Note:** In the FISH-flow assay, *in situ* hybridization step is performed **after** immunolabeling.

### Immunolabeling for FISH-flow

⌚ Timing: 1 h

In this step, cells will be permeabilized for intracellular immunolabeling of the SARS-CoV-2 spike protein. This step is performed **before** *in situ* hybridization.

15. Resuspend cells in solution of primary antibodies diluted in PERM-FISH-Tween or PERM-FISH-Sapo buffer.
  - a. Dilute Alexa Fluor 488-conjugated anti-S1 antibody at 1:250 in any perm buffer.
  - b. Add 50  $\mu\text{L}$  of diluted antibody solution per well.
  - c. Mix the cells.
16. Incubate for 30 min at  $20^\circ\text{C}$ – $23^\circ\text{C}$ .
17. Add 200  $\mu\text{L}$  PERM-FISH-Tween or PERM-FISH-Sapo to the wells.
18. Wash out PERM-FISH-Tween buffer containing antibody by pelleting down the cells at  $300 \times g$ , 5 min,  $20^\circ\text{C}$ – $23^\circ\text{C}$  and resuspend cells in 200  $\mu\text{L}$  HWB.

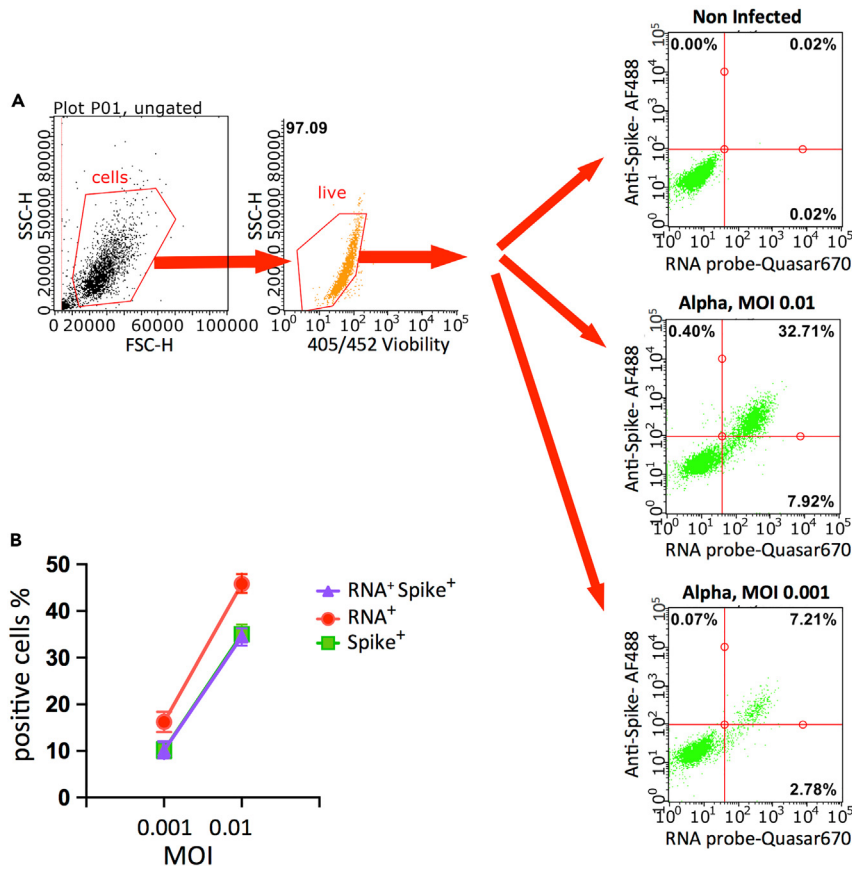
⏸ **Pause point:** Immunolabeled cells can be stored up to 16–18 h in HWB at  $4^\circ\text{C}$ .

### *In situ* hybridization for FISH-flow

⌚ Timing: 1 day

In this step, to detect viral RNA in immunolabeled cells, RNA probe sets tagged with Quasar 670 (a fluorophore alternative of Cy5) will be hybridized to SARS-CoV-2 RNA.

19. Washout HWB and resuspend immunolabeled cells in HB10%dx buffer containing the combined probe sets.



**Figure 1. Quantification of Vero cell infection by FISH-flow**

Cells were infected with low quantities of SARS-CoV-2 alpha variant (0.01 and 0.001 MOI) or left uninfected (non-infected) and incubated for 24 h at 37°C, labeled for viral RNA and spike protein and infection was quantified by flow cytometry.

(A) Gating strategy using non-infected cells as negative control.

(B) Quantification of cells expressing viral RNA (RNA<sup>+</sup>), spike protein (Spike<sup>+</sup>) and both the viral RNA and spike protein (RNA<sup>+</sup>Spike<sup>+</sup>). Values are shown as mean ± SEM (n = 3).

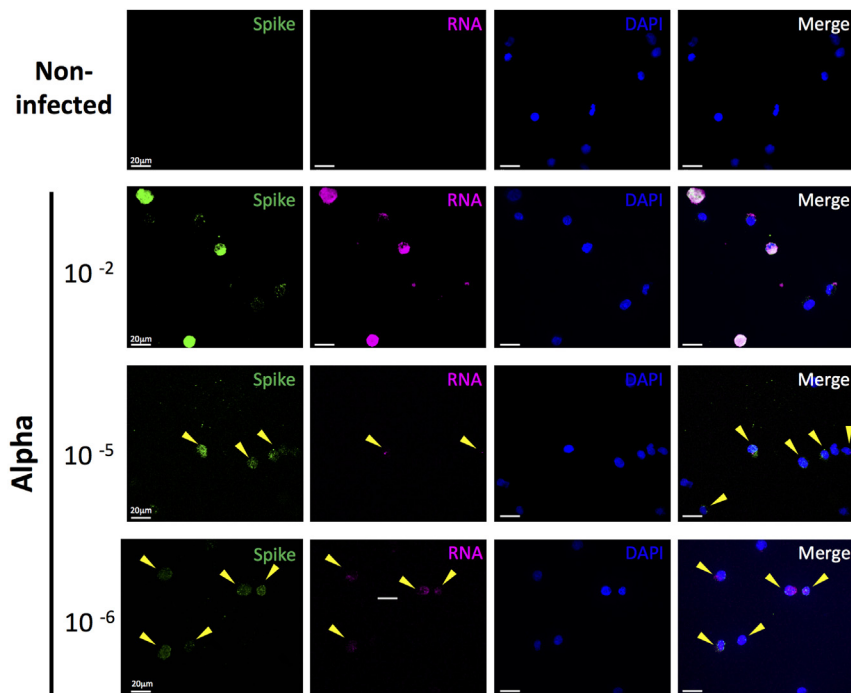
- Final probe concentration is 50 nM. For the combination of 4 different probe sets, as used in this assay, use 12.5 nM of each probe set diluted in HB10%dx buffer.
- If necessary, pre-dilute probes from probe stock solutions using Nuclease-free water as diluent.
- Avoid bubbles when mixing probes in the HB10%dx buffer and when mixing cell with the HB10%dx buffer containing the probes.
- Use 50 μL of HB10%dx buffer containing the probes per reaction. Distribute samples in 96-well plates with round bottom.
- Gently mix cells and probe-containing solution.

△ **CRITICAL:** HB10%dx is viscous. Therefore prepare 10% more volume of the HB10%dx buffer solution containing the probes than actually required for the experiment.

20. Seal the 96-well plate containing samples with an adhesive film or with parafilm.

21. Incubate 16–18 h at 37°C.

△ **CRITICAL:** 16–18 h incubation must not exceed 16 h to avoid detection of false positives.



**Figure 2. Detection of Vero cell infection by *in situ* hybridization using RNAscope and spike protein (Spike)-immunolabeling**

Cells were infected with SARS-CoV-2 alpha variant at low MOI ( $10^{-2}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  MOI) or left uninfected (non-infected) and incubated for 24 h at 37°C. The cells were labeled for viral RNA using RNAscope (pink) and Spike (green), and counterstained for visualization of cell nuclei with DAPI (blue) and infection was analyzed by confocal microscopy using a 60× oil immersion objective. Spike, RNA and DAPI staining, and the merge of the three are individually shown. Yellow arrows point to low although specific signal observed at low MOI. Scale bar: 20 μm.

22. Add 200 μL HWB to each well to wash out the HB10%dx buffer solution containing the probes and centrifuge at 300 x g for 5 min at 20°C–23°C. Repeat the procedure once. Resuspend cells in PBS without calcium and magnesium.

▣▣ **Pause point:** Fixed samples can be stored at 4°C for up to 7 days before flow cytometry analysis.

23. Proceed for flow cytometry acquisition, in this protocol Guava 12-HT (Millipore) was used. Further analyze the flow cytometry data with dedicated software such as GuavaSoft 3.4 (Millipore) as used in the present study, or FlowJo (BD) as in Zhou et al.<sup>1</sup> Outline of the gating strategy is presented in Figure 1A. As shown in Figure 1B, both viral RNA and Spike are detected in an MOI-dependent fashion. In the present context of acute infection, detection of viral RNA is usually more sensitive than that of Spike.

### Morphological detection of infection by RNAscope

**Note:** In the RNAscope assay, *in situ* hybridization step is performed before immunolabeling.

### *In situ* hybridization using RNAscope

⌚ **Timing:** 1 day

In this step, SARS-CoV-2 genes are hybridized with RNAscope commercial probes, using RNAscope commercial kit as follows.

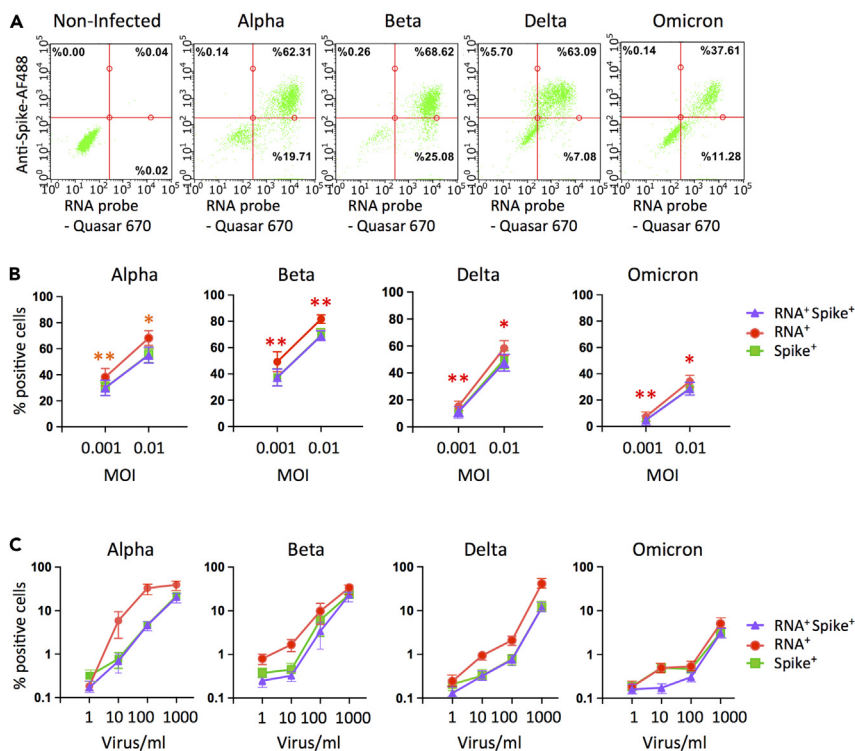
24. Submerge the poly-L-lysine-coated slides containing dried spots of cell suspension in 100% v/v Ethanol solution in a Coplin jar for 1 min, for dehydration. Then, let the slide dry at 20°C–23°C.
25. Boil TRR in a heating plate until solution starts bubbling.
26. Submerge the slides in the boiling TRR, reduce the heat of the heating plate by 30% and incubate for 30 min.
27. Wash slides in dH<sub>2</sub>O by 3–5 up-and-down movements. Repeat two times, changing dH<sub>2</sub>O each time.
28. Wash slides in 100% v/v Ethanol by 2 up-and-down movements. Let slides dry at 20°C–23°C.
29. Create a hydrophobic barrier around dried cell spots using a hydrophobic pen. Let the hydrophobic barrier dry for 5 min at 20°C–23°C.
30. Add drops of Protease Plus solution on dried spots. Incubate slides at 40°C for 5 min.
  - a. During this time, pre-warm the RNAscope SARS-CoV-2 probe at 40°C.
31. Wash slides in dH<sub>2</sub>O by 3–5 up-and-down movements. Repeat two times by changing the dH<sub>2</sub>O.
32. Add drops of pre-warmed RNAscope SARS-CoV-2 probe on dried spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 2 h.
  - a. During this time, prepare the RWB keeping it at 37°C ([materials and equipment](#)).
33. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB.
34. Add drops of AMP1 on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 30 min.
35. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB.
36. Add drops of AMP2 on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 30 min.
37. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB. Add drops of AMP3 on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 15 min.
38. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB.
39. Add drops of HRP-C1 on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 15 min.
40. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB.
  - a. Prepare fluorescent dye solution Opal 570 during submersion time.
41. Add drops of Opal 570 on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 30 min.
42. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB.
43. Add drops of HRP blocker on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 40°C for 15 min.
44. Wash slides by submerging them for 2 min in warmed RWB. Repeat one time by changing the RWB;
45. Add drops of blocking buffer on dried cell spots. Incubate slides in a humidified chamber at 20°C–23°C for 2 h.

▮▮▮ **Pause point:** Alternatively, slides can be stored in blocking buffer 16–18 h at 4°C.

### Immunolabeling after RNAscope

⌚ **Timing:** 2 h

In this step, cells will be permeabilized for intracellular immunolabeling of the SARS-CoV-2 spike protein. This step is performed after *in situ* hybridization.



**Figure 3. Quantification of infection by different variants of SARS-CoV-2 Vero cell at low MOI by FISH-flow**

Cells were infected with low quantities of either SARS-CoV-2 alpha, beta, delta or omicron variants or left uninfected (non-infected) and incubated for 24 h at 37°C. The cells were labeled for viral RNA and spike protein and the infection was quantified by flow cytometry.

(A) Comparative flow cytogram of cell infection by each variant at an MOI of 0.01.

(B) Comparative quantification of cells expressing viral RNA (RNA<sup>+</sup>), spike protein (Spike<sup>+</sup>) and both the viral RNA and spike protein (RNA<sup>+</sup>Spike<sup>+</sup>) after infection by each variant at MOI of 0.01 and 0.001. Values are shown as mean ± SEM (n > 7/group). Statistics indicate comparison between the percentage of RNA<sup>+</sup> cells with RNA<sup>+</sup>/Spike<sup>+</sup> and Spike<sup>+</sup> cells by Wilcoxon test. \* = : p < 0.05, \*\* : p < 0.01.

(C) Comparative quantification of cells expressing viral RNA (RNA<sup>+</sup>), spike protein (Spike<sup>+</sup>) and both the viral RNA and spike protein (RNA<sup>+</sup>Spike<sup>+</sup>) after infection by each variant with very low quantities of infectious virus from 1000 up to 1 virus/mL. Values are shown as mean ± SEM (n > 6).

46. Remove blocking buffer and add drops of primary antibody diluted in blocking buffer.
  - a. For antibody against SARS-CoV-2 spike protein, use 2 µg/mL concentration in 100 µL per reaction.
47. Incubate 16–18 h at 4°C in a humidified chamber.
  - a. This chamber can be built using a regular plastic box containing the slides and dH<sub>2</sub>O-soaked paper.
48. Wash slides by submerging them in PBS without calcium and magnesium for 5 min under mild tangential agitation. Repeat 2×.
49. Add drops of secondary antibody diluted in blocking buffer.
  - a. For immunolabeling of anti-SARS-CoV-2 spike protein antibody, use 1:8000 (v/v) of AF488-coupled goat anti-mouse IgG1 antibody in 100 µL per reaction.
50. Incubate for 2 h at 20°C–23°C.
51. Wash slides by submersion in PBS without calcium and magnesium for 5 min under mild tangential agitation. Repeat 2×.
52. Add 20 µL drops of 5 µg/mL DAPI solution in PBS without calcium and magnesium.
53. Wash slides by submersion in PBS without calcium and magnesium for 5 min under mild tangential agitation in a shaking plate. Repeat 2×.

54. Mount slides for microscopic observation; therefore, deposit a 20  $\mu$ L drop of ibidi mounting medium on the sample and cover it with a coverslip.
55. Dry at 20°C–23°C for 30 min or 16–18 h at 4°C.
56. Protect slides from light.

**▮▮ Pause point:** Fixed samples can be stored at 4°C for up to several weeks before microscopy analysis.

57. Proceed to fluorescence microscopy, typically a confocal microscopy equipped with a x 60 oil immersion objective. As shown in [Figure 2](#) spike protein and RNA signal are easily detected around nuclei.

## EXPECTED OUTCOMES

SARS-CoV-2 is a coronavirus that spread rapidly during the global pandemic coronavirus disease (COVID-19) that began early 2020.<sup>6</sup> Highly sensitive, and rapid ways to measure low levels of SARS-CoV-2 (e.g., RT-qPCR) have been already developed. However, RT-qPCR fails to capture whether those low-level positive samples are truly infectious. The technique we describe here reports minimal amplification of virus on Vero cells (24 h infection time), followed by highly sensitive techniques for RNA/protein detection to demonstrate whether a sample contains infectious virus. This protocol applies for low-level detection of infectious SARS-CoV-2 in cell culture media or in biological fluids from infected individuals.<sup>1</sup>

We describe two assays. The first assay is a quantitative approach that combines the detection of RNA by FISH with detection of spike protein by immunolabeling at the single cell level using FISH-flow.<sup>1–3</sup> The second assay is a morphological approach combining RNA detection by FISH and visualization of spike protein by immunodetection both labeling analyzed by confocal microscopy.<sup>1,3,4</sup>

Over the years, viral variants have evolved from the ancestral Wuhan strain,<sup>7</sup> and numerous SARS-CoV-2 variants have been identified in humans, including the Alpha, Beta, Delta and Omicron.<sup>8</sup> The spike protein exposed on the surface of the virus is essential for the SARS-CoV-2 viral infection and following selection pressure, is highly susceptible to mutations that confer a selective advantage in a population. We sought to evaluate FISH-flow and RNAscope assays to detect these variants at a low rate of infection.

For the assays, Vero cells were infected with each of several variants, namely Alpha, Beta, Delta and Omicron<sup>7,9</sup> starting with a MOI of 0.01 for 1–3 h, after which the virus was removed and cells were further incubated 24 h. Cells were trypsinized and fixed, allowing further quantification of infection outside a confined environment (BSL3). The presence of both RNA and spike protein was quantified by FISH-flow and RNAscope and as described above.

As shown on [Figures 3A](#) and [3B](#), all variants tested were detected by FISH-flow using the RNA probes and spike protein-specific monoclonal antibody originally developed to target the ancestral Wuhan variant. Over 60% of cells were labeled with the SARS-CoV-2 RNA probes after infection with the Alpha, Beta and Delta variants at a MOI of 0.01, whereas the detection of RNA after infection with Omicron variant was lower, with 35% of the cells labeled. The percentage of cells positive for Spike detection was in the same range as for RNA FISH detection, although slightly lower for all variants and equal in number with cells positive for both spike protein and RNA. This suggests that after 24 h of infection most, but not all, infected cells can be detected by spike protein staining. In case of lower viral input, a longer infection time up to 48 h will likely increase the sensitivity of detection.

Detection of SARS-CoV-2 RNA and spike protein was concentration dependent, with the percentage of infected cells decreasing threefold for Alpha and Beta variants and fivefold for the Delta and Omicron variants, when infected with a MOI of 0.001 compared to 0.01. The lower detection of Omicron variant may be explained by the greater phylogenetic distance of the omicron variant from the alpha variant,<sup>7</sup> especially in the *Spike* gene and consequently in the protein, compared to the other tested variants.

These mutations may alter the recognition of the S gene and the Spike protein by the RNA- and Spike protein-specific probes that were originally designed against the ancestral Wuhan variant. The present study therefore established a protocol describing a robust method for the detection of all variants.

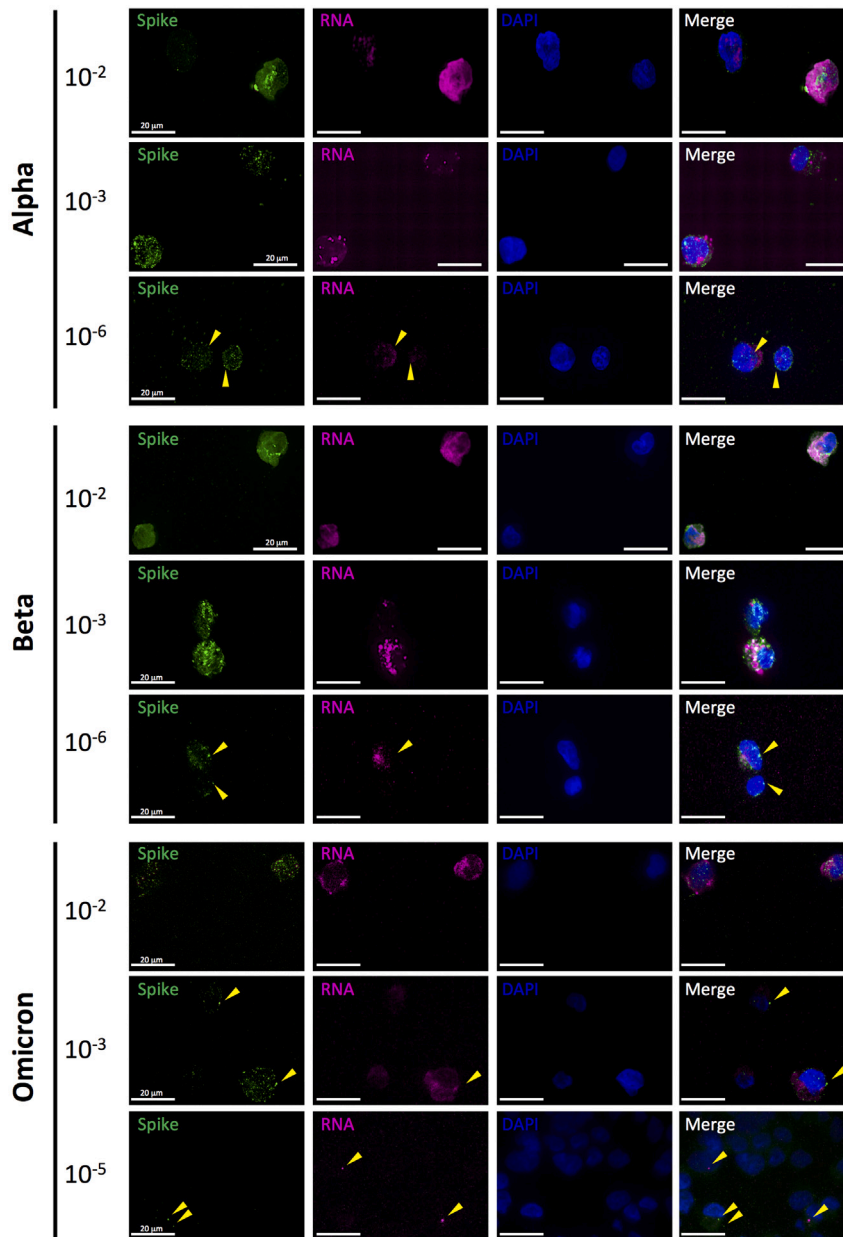
The infectious virus content in biological fluids can be low at later stage of the disease<sup>10</sup> or in case of viral persistence, as has been proposed in patients with post-COVID-19 symptoms referred to as Long COVID-19.<sup>11</sup> We therefore titrated the minimal amount of infectious virus detectable by FISH-flow from 1000 to 1 virus/mL using the protocol described here. As shown in [Figure 3C](#), the technique detected as low as 1 infectious viruses/mL for all variants. The assay was setup with minimal inoculum volumes and incubation times to facilitate the experimental protocol. However, this protocol could be adapted to higher volume, different numbers of replicates and different infection times to improve the detection of infectious content from low input samples. Although the signal may be very low due to the small viral inoculum, the combination of RNA FISH and antibody probes greatly increases the robustness of detection.

The 96-well plate format used in the FISH-flow assay for the detection of SARS-CoV-2 in samples accounts for the high throughput of the assay, while the sample dilution replicates accounts for robustness. In addition, the combined detection of viral protein and RNA increases the sensitivity of the assay and downstream analysis, especially for samples with low viral content. As illustrated in the [Figure 1A](#) illustrating the gating strategy for Vero cells infected with Alpha with different MOI, the method is very specific as the anti-s spike protein antibody and the RNA FISH probes have no background signals in uninfected cells, which was consistently observed over experiments. In contrast, upon infection, cells double-labeled for spike protein and viral RNA are clearly detected. Furthermore, additional cells labeled only for RNA may represent cells at an earlier stage of infection, prior to detectable viral spike protein synthesis. As expected, cells labeled for spike protein but not RNA were not detected. Finally, although the background increases slightly in uninfected cells, it did not affect detection of infection.

The sensitivity of the method, and its applicability to multiple SARS-CoV-2 variants was evaluated. After infection with serial dilution up to 1 infectious virus/mL of all viral variant stocks tested at the same time, infection was detected by FISH-flow in all conditions assessed ([Figure 3C](#)). These data confirm the robustness of FISH-flow, therefore a suitable high throughput method. Referring experimental infection to a standard curve using viral production of known titers may allow accurate quantification of infectious content in the sample.<sup>1</sup>

We also assessed the ability of the RNAscope to detect infection with the alpha, beta and omicron variants at an MOI of  $10^{-2}$  to  $10^{-6}$ . As shown in [Figure 4](#), viral RNA was detected after infection of Vero cells with the alpha, beta and omicron variants at an MOI of  $10^{-5}$  and even  $10^{-6}$  for the alpha and beta variants. RNA and spike protein signals were very strong at an MOI of  $10^{-2}$ , always remaining cytosolic as expected, and decreased in a dose-dependent manner with decreasing MOI. At lower MOI, the RNA and spike protein staining pattern appeared punctate, as expected for RNA, which resides in compartments of the viral factory, and for spike protein, a glycoprotein that associates with the membrane of the secretory pathway. The combined detection of RNA FISH and antibody probes greatly increases the sensitivity and robustness of detection. In addition, the background was negligible. Therefore this morphological technique can reliably detect a few infected cells, even with the current probes originally designed for the Wuhan ancestral variant by the manufacturer.

Overall, our protocol can be applied to infections by different SARS-CoV-2 variants, although for each new variant, the optimal conditions for detection of RNA and spike protein may slightly differ from those reported here. Finally, additional cell markers can be detected alongside with viral RNA and spike protein, as we described previously.<sup>1,12</sup> This multiparametric labeling can allow accurate phenotyping of infected cells or quantification of infected cells at the single cell level in a mixed cell population (biological fluid, cell suspension prepared from tissues),<sup>1,12-14</sup> and therefore valuable for rare human clinical sample analyses.



**Figure 4. Detection of Vero cell infection by different variants of SARS-CoV-2 by RNAscope and spike protein (Spike)-immunolabeling**

Cells were infected with SARS-CoV-2 alpha, beta or omicron variants (MOI of  $10^{-2}$  up to  $10^{-6}$ ) or left uninfected (non-infected) and incubated for 24 h at 37°C, labeled for viral RNA using RNAscope (pink) and Spike (green), and counterstained to visualize cell nuclei with DAPI (blue) and infection was analyzed by confocal microscopy. Spike, RNA and DAPI staining, and a merge of the three are individually shown. Yellow arrows point to low although specific signal observed at low MOI. Scale bar: 20  $\mu$ m.

#### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

The results are represented as the means with respective standard errors of the mean using GraphPad Prism 8. Statistical tests were performed using Wilcoxon test. Asterisks indicate significant differences considering p values below 0.05 and 0.01, as indicated.

### LIMITATIONS

For samples with very low concentration of infectious particles (1–10 virus/mL), it might be necessary to increase the technical replicates in order to detect signal in at least one well.

As exemplified in [Figure 3](#), all variants will replicate viral RNA and produce viral proteins during infection, but their relative abundance may vary depending on the SARS-CoV-2 variant. This will have a direct impact on the detection of infection using either FISH-flow and/or RNA-scope. With the present technique, we were able to detect infected cells with all tested variants, which demonstrates the robustness of the method.

FISH-flow does not allow spatial resolution of the labeling, which is why RNAscope has been developed. This lack of spatial resolution in FISH-flow could be resolved by quantifying FISH-Flow with an imaging cytometry system such as Image Stream (Amnis), instead of standard flow cytometry.

### TROUBLESHOOTING

#### Problem 1

Bubbles in HB10%dx; Assay step 19.

#### Potential solution

Try to gently pipette carefully up and down samples with probes using a smaller volume of probes containing HB10%dx < 50  $\mu$ L (such as 25  $\mu$ L) and by decreasing aspiration/dispensing speed of the pipet. Centrifuge plate at low speed (50 x g for 3 min).

#### Problem 2

All cells appear to be stained for 405/452 Viability dye; Assay step 23.

#### Potential solution

Increase dye final dilution below the recommended concentration starting from 1:200.

Decrease staining time to 3 min.

#### Problem 3

RNA probe signal too weak; Assay step 23.

#### Potential solution

Ensure that the cell layer reach confluency before infection by increasing seeding cell number to 100 000 per well.

Increase the duration of the infection time (>24 h, i.e., 36 h or 48 h) to allow sufficient amplification of viral RNA and therefore its detection.

#### Problem 4

No detection of infectious particles in all the infected wells; Assay step 23.

#### Potential solution

In the case of low input, detection of positive signals is not expected in all infected wells, which could explain discrepancies in statistical spread of the virus(es) in the wells. To improve detection of low infectious virus concentration, increase the inoculum volume up to 100  $\mu$ L.

#### Problem 5

No signal detection of a known to be positive sample; Assay step 23.

**Potential solution**

Ensure that TPCK-treated trypsin is added to the inoculum at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  final concentration. Biological samples such as bronchoalveolar lavage also contain other compounds/microorganisms that may interfere with infection. Although counterintuitive, samples could be diluted with DMEM containing 10% FCS, 1% Gentamicin 1% Amphotericin B and incubate at 37°C for 20 min. Mix samples thoroughly and centrifuge at 500  $\times$  g for 5 min before cell infection.

**Problem 6**

High background in RNA probe emission channel; assay step 23.

**Potential solution**

Increase the number of washes to 3 times or more at step 22. Check cell autofluorescence and treat cells with 100 mM Glycine 75 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 7.4 for 10 min, remove the buffer and wash one time with PBS. Decrease the probe concentration by 10 or 20%. Make sure probe staining does not exceed 16 h.

**Problem 7**

High background in antibody staining; Assay step 23.

**Potential solution**

Antibody staining might need titration down (by two-fold dilution) in your setup to ensure optimal staining.

**Problem 8**

High heterogeneity in markers staining; Assay step 23.

**Potential solution**

Make sure to mix carefully after addition of antibody and/or RNA-probe solution to the cells.

**Problem 9**

Abnormal FSC-H and/or SSC-H profile; Assay step 23.

**Potential solution**

Reduce trypsin treatment time to 3 min. Reduce centrifugation speed while cells are not fixed (do not exceed 300  $\times$  g). Handle cells more carefully before fixation, for instance avoid giving mechanical stress and producing bubbles during vortexing steps.

**Problem 10**

Tissue dries during treatment; Assay steps 24–52.

**Potential solution**

Add enough reagents to completely cover tissue/cells. Make sure that the humidified paper is still moist at the end of the incubation periods in the chamber. Decrease number of slides processed at the same time. Check incubation temperature is as indicated.

**Problem 11**

Tissue dries during treatment; Assay step 56.

**Potential solution**

Ensure that cells have been properly fixed to the slide before the beginning of treatment for RNA-scope staining (Step 24). Alternatively, double the quantity of cells deposited.

**Problem 12**

High Background; Assay step 56.

## Potential solution

Establish pre-treatment conditions specific to your samples by reducing boiling and protease treatment time and concentration, as suggested by the RNAscope manufacturer (<https://acdbio.com/technical-support/solutions>).

## RESOURCE AVAILABILITY

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Morgane Bomsel ([morgane.bomsel@inserm.fr](mailto:morgane.bomsel@inserm.fr)).

### Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

### Data and code availability

This study did not generate new unique reagents.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by joint funding from the Agence Nationale de la Recherche (France) and Fondation pour la Recherche Médicale (France): Flash COVID ANR-FRM: ANR-20-COVI-0024. Funders of the study had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the manuscript. A.Z. and F.H. were supported by the China Scholarship Council.

The authors are grateful to Pr. J. Dubuisson and Dr. Sandrine Belouzard (Centre d'infection et d'Immunité de Lille, CNRS UMR 9017, INSERM U1019, Lille, France) and Dr. Arielle Rosenberg (Hôpital Cochin, Paris, France) for kindly providing viruses. The authors acknowledge the IMAG'IC facility for instruction on the IXplore Spin Confocal Imaging Microscope System (Olympus) during the COVID-19 confinement period.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Method, design, and writing, A.C.-C., F.H., A.Z., F.R., and M.B.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## REFERENCES

- Zhu, A., Real, F., Capron, C., Rosenberg, A.R., Silvin, A., Dunsmore, G., Zhu, J., Cottoignies-Callamarte, A., Massé, J.M., Moine, P., et al. (2022). Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 365. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04318-x>.
- Vir, P., Arrigucci, R., Lakehal, K., Davidow, A.L., Pine, R., Tyagi, S., Bushkin, Y., Lardizabal, A., and Gennaro, M.L. (2015). Single-Cell Cytokine Gene Expression in Peripheral Blood Cells Correlates with Latent Tuberculosis Status. *PLoS One* 10, e0144904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144904>.
- Real, F., Capron, C., Sennepin, A., Arrigucci, R., Zhu, A., Sannier, G., Zheng, J., Xu, L., Massé, J.M., Greffe, S., et al. (2020). Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4<sup>+</sup> T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. *Sci. Transl. Med.* 12, eaat6263. <https://doi.org/10.1126/scitransmed.aat6263>.
- Deleage, C., Wietgreffe, S.W., Del Prete, G., Morcock, D.R., Hao, X.P., Piatak, M., Jr., Bess, J., Anderson, J.L., Perkey, K.E., Reilly, C., et al. (2016). Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues. *Pathog Immun.* Spring 1, 68–106. <https://doi.org/10.20411/pai.v1i1.100>.
- Chaudhry, M.Z., Eschke, K., Hoffmann, M., Grashoff, M., Abassi, L., Kim, Y., Brunotte, L., Ludwig, S., Kröger, A., Klawonn, F., et al. (2022). Rapid SARS-CoV-2 Adaptation to Available Cellular Proteases. *J. Virol.* 96, e0218621. <https://doi.org/10.1128/jvi.02186-21>.
- Lamers, M.M., and Haagmans, B.L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.
- Carabelli, A.M., Peacock, T.P., Thorne, L.G., Harvey, W.T., Hughes, J., COVID-19 Genomics UK Consortium, Peacock, S.J., Barclay, W.S., de Silva, T.J., Towers, G.J., and Robertson, D.L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 162–177. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>.
- Pagani, I., Ghezzi, S., Alberti, S., Poli, G., and Vicenzi, E. (2023). Origin and evolution of SARS-CoV-2. *Eur Phys J Plus* 138, 157. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>.
- Desmarests, L., Callens, N., Hoffmann, E., Danneels, A., Lavie, M., Couturier, C., Dubuisson, J., Belouzard, S., and Rouillé, Y. (2022). A reporter cell line for the automated quantification of SARS-CoV-2 infection in living cells. *Front. Microbiol.* 13, 1031204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1031204>.
- Ruiz, M.J., Siracusano, G., Cottignies-Calamarate, A., Tudor, D., Real, F., Zhu, A., Pastori, C., Capron, C., Rosenberg, A.R., Temperton, N., et al. (2022). Persistent but dysfunctional mucosal SARS-CoV-2-specific IgA and low lung IL-1 $\beta$  associate with COVID-19 fatal outcome: A cross-sectional analysis. *Front. Immunol.* 13, 842468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842468>.

11. Chen, B., Julg, B., Mohandas, S., and Bradfute, S.B.; RECOVER (2023). Mechanistic Pathways Task Force. Viral persistence, reactivation, and mechanisms of long COVID. *Elife* 12, e86015. <https://doi.org/10.7554/eLife.86015>.
12. Valdebenito, S., Bessis, S., Annane, D., Lorin de la Grandmaison, G., Cramer-Bordé, E., Prideaux, B., Eugenin, E.A., and Bomsel, M. (2021). COVID-19 Lung Pathogenesis in SARS-CoV-2 Autopsy Cases. *Front. Immunol.* 12, 735922. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.735922>.
13. Andrews, M.G., Mukhtar, T., Eze, U.C., Simoneau, C.R., Ross, J., Parikshak, N., Wang, S., Zhou, L., Koontz, M., Velmeshev, D., et al. (2022). Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 119, e2122236119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122236119>.
14. Real, F., Zhu, A., Huang, B., Belmellat, A., Sennepin, A., Vogl, T., Ransy, C., Revol, M., Arrigucci, R., Lombès, A., et al. (2022). S100A8-mediated metabolic adaptation controls HIV-1 persistence in macrophages *in vivo*. *Nat. Commun.* 13, 5956. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33401-x>.

### III. Mécanisme antiviral de l'activation de l'AMPK contre le SARS-CoV-2 par redistribution des lipides, induction de l'autophagie et cohabitation avec la réponse T (Manuscrit 3)

#### (1) Contexte

Bien que le cycle viral du SARS-CoV-2 soit assez clairement établi, des antiviraux efficaces et sans effets secondaires n'ont pas été encore caractérisés. Plusieurs molécules antivirales ont été évaluées, mais aucune ne présente une balance bénéfice-risque suffisante pour être utilisé quotidiennement en clinique. En pratique, ces antiviraux sont réservés pour traiter les cas formes sévères de l'infection en réanimation. La plupart des antiviraux prescrits en clinique, ciblent le virus lui-même. Une autre piste thérapeutique serait de cibler les éléments de la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication du SARS-CoV-2.

Notre collaborateur, Dr B. Viollet a proposé que l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), senseur énergétique du métabolisme cellulaire, soit une cible potentielle pour bloquer la réplication de nombreux virus, notamment via l'induction de l'autophagie et/ou la perturbation du métabolisme lipidique (Moreira et al., 2016). En effet, la réplication du SARS-CoV-2 est associée à l'augmentation du métabolisme des lipides et une perturbation du flux autophagique. Ces voies pourraient être bloquées par l'activation de l'AMPK et en conséquence la réplication virale serait inhibée (Koepke et al., 2021; Tanner and Alfieri, 2021). Les activateurs de l'AMPK pourraient donc avoir des propriétés antivirales robustes contre le SARS-CoV-2 et être utilisé en clinique. L'AMPK est activée par la metformine, l'AICAR ou le salicylate, un des produits principaux de la dégradation de l'aspirine. Mais cette activation n'est pas spécifique et pourrait causer des effets secondaires. Récemment, un activateur allostérique et hautement spécifique de l'AMPK, MK-8722, a été développé. Le MK-8722 a été testé dans des modèles précliniques de NHP qui tolèrent très bien la drogue (Myers et al., 2017). L'activité antivirale du MK-8722 contre l'infection par le SARS-CoV-2 reste à démontrer.

## **(2) But de l'étude**

Notre objectif a été de caractériser l'activité antivirale du MK-8722 contre l'infection par le SARS-CoV-2 *in vitro*, puis d'en décrire son mode d'action. Nous avons finalement évalué si le MK-8722 interférait avec la réponse immunitaire T-dépendante spécifique du SARS-Cov-2 induite *in vivo*.

## **(3) Résultats**

L'activité antivirale de MK-8722 a été évalué en combinant des analyses cellulaires et biochimiques quantifiées par western blot, titrages viraux, RT-qPCR et imagerie à fluorescence confocale.

L'activité antivirale de MK-7822 contre le SARS-CoV-2 a d'abord été évaluée dans un modèle de cellules Vero puis de cellules pulmonaires Calu-3 *in vitro* et quantifiée par cytométrie en flux. Nous avons observé que MK-8722 inhibe l'infection des cellules Vero76 et Calu-3 à des concentrations de l'ordre du micromolaire. MK-7822 agit sur l'infection par un mécanisme indépendant de l'expression des récepteurs d'entrée et des étapes sous-jacentes à l'entrée virale. L'inhibition de la réplication virale est corrélée de manière significative à l'inhibition de la biosynthèse des lipides et des gouttelettes lipidiques. De plus, l'inhibition de la synthèse des lipides lors du traitement par MK-8722 diminue l'infectivité des particules néoformées. Par ailleurs, le traitement des cellules infectées par MK-8722 restaure le flux autophagique, ce qui dirige les protéines virales vers les lysosomes et favorise une réponse IFN-I. Enfin, l'activation de l'AMPK par MK-8722 n'a pas d'effet inhibiteur de l'activation ou sur l'activité cytotoxique SARS-CoV-2 spécifique des TCD8, associés avec la protection contre le SARS-CoV-2 *in vivo*.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

## **DISCUSSION**

Les muqueuses génitales et respiratoires sont particulièrement exposées au milieu extérieur. Elles représentent la première défense face aux agressions par les microorganismes. Au-delà de leurs fonctions de barrière physique, ces muqueuses possèdent également des fonctions immunitaires et leur intégrité assure leur bon fonctionnement. Le développement de stratégies permettant soit de prévenir efficacement l'entrée des pathogènes et de limiter leur dissémination, et/ou de traiter les infections après franchissement de la barrière, reste indispensable et demeure un enjeu de taille pour la santé mondiale.

C'est dans ce contexte que s'intègrent mes travaux de thèse. Ces travaux permettent de proposer de stratégies antivirales qui ciblent soit i) le pathogène, ici le VIH-1, un virus à tropisme génital (**Article 1**), soit ii) la cellule hôte, ici la cible d'un virus à transmission respiratoire, le SARS-CoV-2 (**Articles 2 et 3**).

Dans notre première étude, nous avons développé une approche immunologique ciblant directement le pathogène VIH-1. Pour cela nous avons ciblé les cellules infectées à l'aide d'anticorps IgA spécifiques d'un domaine hautement conservé de la protéine d'enveloppe gp41 du VIH-1 pour les éliminer. Nous avons observé que les IgA induisent une réponse TCD8 cytotoxique suite à une présentation croisée d'antigènes viraux issus de l'ADCP médiée par les IgA (**Article 1**). Dans une seconde étude, nous proposons une approche antivirale ciblant la cellule hôte. Le potentiel antiviral de l'AMPK, senseur de l'homéostasie énergétique cellulaire, a été évalué contre le SARS-CoV2. Pour cela nous avons utilisé un activateur hautement spécifique de l'AMPK, MK-8722. Nous avons pu démontrer que l'activation de l'AMPK par MK-8722 à faible dose induit notamment un flux autophagique et/ou une perturbation du métabolisme lipidique permettant de réduire significativement la production virale (**Article 3**).

## I. Nouvelles propriétés antivirales dépendantes du Fc des IgA spécifiques de gp41

### (1) Rationalisation de l'approche

Au cours des 20 dernières années, la caractérisation des fonctions protectrices des Abs a permis de mettre en évidence le rôle clef du domaine Fc, complétant les fonctions de neutralisation médiées par leur domaine Fab (Su et al., 2019). Les IgG et IgA spécifiques du VIH-1 peuvent ainsi induire la destruction par ADCC et par ADCP de cibles opsonisées, telles les cellules infectées ou les particules virales. Ces mécanismes ont notamment été associés à une diminution du risque d'infection par le VIH-1 chez l'Homme comme démontré au cours de l'essai vaccinal de phase 3 RV144 (revue dans (Su et al., 2019), dans lequel l'activité ADCC des IgG corrèle avec la protection.

L'interaction entre les domaines Fc et les FcR spécifiques de chaque isotype permet l'activation des cellules immunitaires innées conduisant à une réponse immunitaire plus efficace. Le niveau d'activation varie en fonction de l'isotype impliqué et la quantité de récepteurs liés. En effet, l'intensité de la signalisation induite par les IgA via le Fc $\alpha$ RI/CD89 est plus efficace que celle des IgG (revue dans (Cottignies-Calamarte et al., 2023b)). En conséquence, il est nécessaire d'évaluer comparativement l'efficacité des fonctions effectrices des IgG à celle des IgA. Ces derniers sont actuellement encore peu étudiés. Des études précédentes de notre équipe ont montré que le bNAb 2F5-IgA spécifique de gp41 induit des activités ADCC et ADCP plus robustes que l'isotype IgG (Duchemin et al., 2020, 2018a). Les conséquences de ces activités ADCC et ADCP sur la réponse immunitaire adaptative dirigée contre le VIH, notamment cytotoxique, dans un contexte tissulaire muqueux en présence d'autres cellules immunes comme les TCD8 n'ont pas été décrites.

Pour aller plus loin dans cette caractérisation, nous avons donc évalué comparativement les capacités du 2F5-IgA et 2F5-IgG à promouvoir l'activation de TCD8 après présentation croisée de peptides viraux issus de la phagocytose des cellules infectées par le VIH-1. Pour compléter le tableau des activités antivirales non-neutralisantes dépendantes de la partie Fc, nous avons également analysé la capacité du 2F5-IgA à induire une *trained immunity* des monocytes effecteurs de la cross-présentation à la suite de l'ADCP. La mémoire entraînée des cellules de l'immunité innée est un concept novateur décrit récemment (Fanucchi et al., 2021) qui remet en question le dogme

selon lequel la mémoire immunologique est l'unique apanage du système immunitaire adaptatif. La *trained immunity* est un ensemble de mécanismes de remaniements métabolique et épigénétique induits par la rencontre d'un pathogène et d'une cellule de l'immunité innée, conditionnant des réponses plus efficaces lors de la rencontre ultérieure avec un autre pathogène. La capacité des Abs, IgG mais surtout IgA, à induire des modifications métaboliques et épigénétiques en conséquence de la signalisation par les Fc $\alpha$ RI ou Fc $\gamma$ R dans le contexte des infections virales est encore mal décrit.

## (2) Mise en place d'une réponse TCD8 VIH-1 après ADCP médiée par les IgA

Afin de comparer la capacité du bNAbs 2F5 sous isotype IgA ou IgG à activer des cellules TCD8, nous avons développé un modèle d'évaluation de la présentation croisée des antigènes du VIH-1 après ADCP de cellules infectées. Pour cela, nous avons utilisé des monocytes comme cellules présentatrices après phagocytose *via* leur Fc $\alpha$ RI/CD89 et Fc $\gamma$ RI/CD64 de cellules opsonisées préalablement infectées par le VIH-1 (Duchemin et al., 2020). Nous montrons pour la première fois que ces monocytes sont capables de faire de la présentation croisée des antigènes viraux à des cellules TCD8 spécifiques du virus et de les activer (**article 1**). De plus, nous avons démontré que l'activation des TCD8 est systématiquement plus importante lorsque l'ADCP est médiée par 2F5-IgA en comparaison de 2F5-IgG. En effet, la présentation croisée suite à l'ADCP médiée par le 2F5-IgG est négligeable à des temps précoces, et faible à des temps plus tardifs. Chez les ESN, la présence de TCD8 spécifiques du VIH-1 ainsi que des IgA anti-gp41 ont été associées à leur protection (Kaul et al., 2000; Mazzoli et al., 1999, 1997a; Pinto et al., 1995; Ponnann et al., 2021; Tudor et al., 2009). Nos résultats suggèrent donc que les Abs IgA muqueux spécifiques du VIH-1 peuvent activer les cellules TCD8 VIH-1 spécifiques dans les muqueuses via la présentation croisée après ADCP. Ainsi, les fonctions effectrices des IgA spécifiques du VIH-1 ne se limitent pas à leur propriétés de neutralisation et d'induction de l'ADCC et l'ADCP (Duchemin et al., 2020, 2018a).

Le potentiel supérieur des IgA comparé aux IgG à induire une présentation croisée peut très probablement être attribué à une meilleure efficacité à effectuer l'ADCP (Duchemin et al., 2020) et/ou à une activation plus forte des voies de signalisation en aval de leur FcRs respectifs (Brandtsma

et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). En effet, alors qu'un IgG en complexe avec sa cible se lie uniquement à une molécule de Fc $\gamma$ RI/CD64, le complexe immun d'IgA se lie à deux molécules de Fc $\alpha$ RI/CD89 par Fc $\alpha$  (**Figure 19**). Chaque Fc $\gamma$ RI/CD64 et Fc $\alpha$ RI/CD89 recrute une chaîne adaptatrice FcR $\gamma$ , ce qui est responsable d'une signalisation en aval des Fc $\alpha$ RI/CD89 deux fois plus intense que celle des Fc $\gamma$ RI/CD64 (revu dans (Cottignies-Calamarte et al., 2023b)). Cette différence repose donc sur l'intensité de la signalisation, et non pas sa qualité. Cette différence entre isotypes peut également être expliquée par une exposition différente des épitopes tridimensionnels sur l'enveloppe reconnus par chacun des isotypes, l'affinité de 2F5-IgA pour l'antigène étant plus élevée d'un log que celle de l'IgG correspondant (Daniela Tudor et al., 2012).

Nos résultats confirment l'importance de l'isotype IgA dans l'efficacité de fonctions antivirales, déjà démontrées par l'équipe (Duchemin et al., 2020, 2018a; Khamassi et al., 2020; Daniela Tudor et al., 2012). De plus, notre étude suggère que les IgA permettent l'établissement d'une connexion entre l'immunité humorale et cellulaire qui dépend de Fc $\alpha$ RI/CD89. Ainsi, l'axe IgA-Fc $\alpha$ RI/CD89 pourrait participer à la stimulation de la réponse TCD8 muqueuse chez les ESN. La signalisation responsable de ce phénomène étant uniquement quantitativement différente entre le Fc $\alpha$ RI/CD89 et le Fc $\gamma$ RI/CD64, nos résultats expliqueraient que la protection contre l'infection par SIV-SHIV des NHP traités par des bNAbs-IgG induit une réponse TCD8 qui découle de l'engagement de l'axe Fc $\gamma$ -Fc $\gamma$ RI/CD64 (Nishimura et al., 2017; Niu et al., 2021; Villinger et al., 2003). Il serait donc intéressant d'évaluer l'efficacité d'une thérapie à base de bNAbs-IgA.

### **(3) Différenciation des monocytes en macrophages-APC après ADCP médiée par les IgA**

Les monocytes circulants des ESN expriment CD68 à un niveau plus haut que les individus HIV<sup>+</sup> (Blondin-Ladrie et al., 2022), ce que nous avons aussi observé dans les monocytes après l'ADCP médiée par 2F5-IgA de façon précoce. A titre de comparaison, les monocytes activés par l'ADCP médiée par les IgG présentent une augmentation de l'expression de CD68 après 60h. Ces résultats concordent avec une présentation croisée retardée et moins efficace après ADCP médiée par les IgG. Ceci indique une claire association entre ADCP, présentation croisée et différenciation en

macrophages. Il serait intéressant d'étudier la sensibilité au VIH-1 des monocytes après ADCP médiée par les IgA ou les IgG et de la comparer à celle de monocytes issus d'individus ESN, afin d'évaluer leur contribution à la protection de ces individus.

Nous avons pu observer que la mise en place de la *trained immunity* est précédée d'une reprogrammation transcriptionnelle des cellules effectrices de l'ADCP-IgA, en particulier dans les voies partagées avec la réponse antivirale, au LPS, aux protozoaires mais aussi ceux de la différenciation des monocytes et l'augmentation de la production de chimiokines. Nos analyses montrent que l'ADCP médiée par les IgA promeut une différenciation des monocytes vers des macrophages avec une polarisation mixte pro- et anti-inflammatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux préalablement publiés proposant que les monocytes se différencient « par défaut » en macrophages (B. Zhang et al., 2022). Cependant, les auteurs montrent que la différenciation par défaut est accélérée par une stimulation notamment par le LPS ou le  $\beta$ -glucan (B. Zhang et al., 2022). Nos résultats concordent avec cette description puisque l'ADCP médiée par les IgA semble accélérer la différenciation des monocytes en macrophages dès 16h et s'accroît à 60h. Les macrophages sont une source majeure de réservoir du VIH-1 au niveau muqueux chez l'Homme (Ganor et al., 2019). Il serait donc intéressant d'évaluer la sensibilité à l'infection de macrophages isolés d'individus non-infectés et après différenciation induite par des IC-IgA.

De plus, l'ADCP médiée par les IgA et effectuée par ces macrophages de polarisation mixte augmente l'expression des gènes codant des protéines de voies impliquées dans le métabolisme des ROS et celui de la *Cathepsine L*, impliqués dans la mise en place d'un environnement favorable à la présentation croisée (Battisti et al., 2017; Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Zhang et al., 2019). Nous avons confirmé fonctionnellement que seule l'ADCP médiée par les IgA augmente la production de ROS, en plus d'augmenter l'expression des CMH-I à la membrane plasmique contrairement à l'ADCP médiée par les IgG. Ces éléments suggèrent une augmentation du chargement des CMH-I en peptides viraux par présentation croisée après ADCP probablement *via* la voie cytosolique (Battisti et al., 2017; Embgenbroich and Burgdorf, 2018; Jusforgues-Saklani et al., 2008; León et al., 2014). Les macrophages ainsi obtenus présentent donc en plus des caractéristiques d'APC. Une fois différenciés, ces macrophages pourraient se maintenir au niveau muqueux après la phagocytose et favoriser la réactivation d'une réponse CTL spécifique du VIH

plus rapide qu'en absence d'IgA. A ce titre, nos travaux suggèrent qu'un rappel vaccinal muqueux basé sur les IgA en complexe immun avec une protéine virale permettrait d'induire une réponse locale CTL durable en ciblant les monocytes/macrophages.

#### **(4) Extension du concept d'APC induite par les complexes immuns à la protection des muqueuses**

Les tissus muqueux contiennent différents types cellulaires exprimant Fc $\alpha$ RI/CD89 (macrophages résidents, DC, neutrophiles) et capables d'ADCP médiée par les IgA (Cheeseman et al., 2016). C'est également le cas des monocytes recrutés dans la muqueuse en condition inflammatoire dans laquelle ils se différencient en macrophages. En revanche, les LC n'expriment pas Fc $\alpha$ RI/CD89, par l'action spécifique du TGF- $\beta$  fortement produit dans les tissus muqueux (Geissmann et al., 2001). Les LCs ne peuvent donc pas être source de présentation croisée après ADCP médiée par les IgA. Les travaux de Mysore et collègues ont montré que la stimulation des neutrophiles par un IC-IgG peut induire les neutrophiles à acquérir des propriétés de présentation antigénique ressemblant à celle des DC et pourraient être considérés comme des neutrophiles-APC (nAPC) (Mysore et al., 2021). Bien que cette propriété n'ait pas été montrée pour les IgA et l'axe Fc $\alpha$ RI/CD89 dans les neutrophiles, nous avons pu démontrer au laboratoire que les neutrophiles effectuent l'ADCP médiée par IgA-Fc $\alpha$ RI/CD89 plus efficacement que par IgG/Fc $\gamma$ R (Duchemin et al., 2020). Il serait donc intéressant d'évaluer comparativement dans notre modèle la capacité des macrophages, des DC et des neutrophiles à faire de la présentation croisée des antigènes du VIH-1 pour induire et/ou réactiver une réponse CTL spécifique du VIH-1 après ADCP médiée par 2F5-IgA.

Les neutrophiles effectuent l'ADCP médiée par les IgA par un mécanisme rapide (Duchemin et al., 2020), corrélant avec leur capacité à répondre rapidement à la présence de bactéries pathogènes (van Kessel et al., 2014). Il serait intéressant d'évaluer si l'ADCP de cellules entières médiée par les IgA et effectuée par des neutrophiles humains est capable d'induire leur reprogrammation en nAPCs, et par conséquent d'activer des CTL spécifiques. Le groupe du Dr Pelegriin a démontré que l'infusion d'un IgG monoclonal dirigé contre l'enveloppe du virus de la

leucémie murine protège les souris contre de l'apparition de cancers viro-induits (Naranjo-Gomez et al., 2018). Les auteurs rapportent que l'infusion de bNAb ciblant l'enveloppe virale protège les souris de l'infection par l'induction d'une réponse IgG dirigée contre l'enveloppe. De plus, l'infusion de bNAbs dirigés contre l'enveloppe virale induit une réponse TCD8 spécifique du virus qui ne semble pas dépendante de la présence des neutrophiles. A l'inverse, Mysore et collègues ont mis en évidence la faculté des nAPC stimulés par des IC-IgG à migrer dans les ganglions lymphatiques pour activer une réponse TCD4 et TCD8 après transfert adoptif (Mysore et al., 2021). Il semble que la faculté d'induction d'une réponse TCD8 par les neutrophiles soit dépendante du modèle étudié et particulièrement du complexe immun étudiée. Il serait intéressant d'évaluer la capacité de migration des neutrophiles après ADCP dans les ganglions pour initier les réponses TCD4 et TCD8 spécifiques du VIH-1 *in vivo*.

La signalisation induite par les IgA étant plus intense que celle des IgG (Brandsma et al., 2019; Cottignies-Calamarte et al., 2023b), l'ADCP médiée par les IgA et effectuée par les neutrophiles pourrait permettre de produire plus rapidement et en quantité plus importante des nAPC. De fait, ceci pourrait favoriser l'induction d'une réponse T plus rapide et probablement plus efficace pour protéger contre l'infection par le VIH-1. Les IC-IgA ainsi pris en charge par des DC résidentes du tissu, promeuvent leur maturation ainsi que leur migration au ganglion lymphatique drainant afin d'initier des réponses TCD4 et TCD8 VIH-spécifiques. Il semble important de noter que les sIgA ne peuvent pas se lier au Fc $\alpha$ RI/CD89, à l'inverse des dIgA qui se lient à Fc $\alpha$ RI/CD89 et engagent chacun quatre molécules de récepteurs, contre deux par IgA monomérique (Bonner et al., 2008; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). Nos travaux suggèrent que l'induction de l'ADCP par des dIgA induira plus efficacement la présentation croisée aux CTL, probablement au moins partiellement responsable de la protection des ESN.

Le groupe du Pr Paul a montré que la vectorisation de la protéine p24 par des SIgA à des fins vaccinales chez la souris permet l'activation des lymphocytes T, dépendante de la prise en charge des IC-sIgA par les DC tissulaires. Cependant, les souris n'exprimant pas le Fc $\alpha$ RI/CD89, l'effet vaccinal est médié par le biais de Dectine-1 (Rochereau et al., 2016, 2015), récepteur alternatif des sIgA. Ces résultats suggèrent que des voies alternatives à l'axe Fc $\alpha$ -Fc $\alpha$ RI/CD89 peuvent aussi être impliquées dans la protection médiée par les IgA chez les ESN.

**(5) L'ADCP médiée par les IgA promeut la sécrétion de chimiokines dont les fonctions chimiotactiques corrént avec la protection des individus.**

Le profil mixte anti- et pro-inflammatoire des macrophages obtenus après ADCP médiée par les IgA est en partie similaire aux profils des cytokines pro- (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) et anti-inflammatoires (IL-10) et des chimiokines (CCL3, 4 et 5) secrétées par d'autres APC comme les DC stimulées par des IgA en complexes immuns (Gayet et al., 2020; Hansen et al., 2018, 2017). La stimulation des monocytes et des DC par les IgA présente néanmoins des différences. En effet, si la stimulation de DC dérivées de monocytes *in vitro* par les IgA semble les activer, des études récentes sur des DC résidentes des tissus (CD103<sup>+</sup>) montrent que la production d'IL-6, TNF $\alpha$  et d'IL-10 après stimulation IgA n'est possible que lors d'une costimulation avec un agoniste de TLR2 et/ou TLR4 (Hansen et al., 2018; Mes et al., 2023). Ceci indique donc qu'*in vivo*, l'implication de l'ADCP dans la réponse immunitaire met en jeu plusieurs facteurs comme : l'isotype IgA ou IgG, le FcR impliqué pour chaque isotype (différents Fc $\gamma$  pour les IgG, Dectine ou Fc $\alpha$ RI/CD89 pour les IgA, Trim21, ..., etc), le type de cellule effectrice mais aussi l'environnement des cellules et les signaux qu'elles reçoivent (IL-10, GM-CSF, ligands des PRR, ..., etc).

L'ensemble des facteurs secrétés par les monocytes après ADCP médiée par les IgA activent plus fortement les neutrophiles et induisent l'expression de CD11b et CD62L. Cela pourrait conduire à un recrutement de cellules immunitaires qui participerait au contrôle et la protection contre le VIH-1 (Om et al., 2020; Sugawara et al., 2022; Tomescu et al., 2011; Worley et al., 2018). En revanche, nous avons montré que ces facteurs n'activent pas les TCD4 circulants. Ceci aurait l'avantage de limiter le recrutement de TCD4 activés, cibles potentielles du VIH, au site d'infection, réduisant ainsi la probabilité de transmission du VIH à travers la barrière muqueuse. De façon intéressante, les TCD4 stimulés par ces facteurs après ADCP médiée par les IgA diminuent l'expression du corécepteur CCR5, ce qui diminuerait leur sensibilité à l'infection par les virus R5 tropiques majoritairement transmis au niveau muqueux. L'effet chimiotactique observé après ADCP médiée par les IgA corrént notamment avec une amplification de la sécrétion des  $\beta$ -chimiokines au niveau muqueux ou circulant observé chez les ESN (Iqbal et al., 2005; Shieh et al., 2001b). Cette plus grande sécrétion de  $\beta$ -chimiokines est aussi associée à la présence d'IgA neutralisantes spécifiques de gp41 au niveau des muqueuses des ESN (Bélec et al., 2001; Mazzoli

et al., 1999, 1997a; Daniela Tudor et al., 2012). De plus, nous observons qu'après ADCP médiée par les IgA, les monocytes sécrètent moins de CXCL10, ce qui est aussi le cas dans les muqueuses des ESN (Lajoie et al., 2012). Les auteurs de ces études rapportent cependant une diminution de la quantité de CXCL9 dans les muqueuses des ESN, alors que nous n'observons pas de différence dans les niveaux de CXCL9 quel que soit la condition de phagocytose. Ceci pourrait s'expliquer soit par i) un défaut de la sensibilité de notre méthode de mesure, ou bien ii) la chute dans la sécrétion de CXCL9 observée chez les ESN n'est pas imputable aux seuls monocytes.

Il serait donc intéressant d'étudier si l'ADCP médiée par les IgA conduit au recrutement de cellules immunitaires. Ceci pourrait être étudié dans des modèles de reconstruction muqueuse, comme ceux qui ont été mis au point au laboratoire (Ganor et al., 2013, 2010; F. Real et al., 2018).

#### **(6) Acquisition d'une mémoire immunitaire innée après ADCP médiée par les IgA**

Enfin, l'acquisition d'une *trained immunity* par les monocytes après ADCP médiée par les IgA, que ce soit le bNAb 2F5-IgA ou ceux de patients infectés, suggère que les cellules sont plus réactives lors d'une rencontre ultérieure avec un pathogène (Brandi et al., 2022; Fanucchi et al., 2021; Gill et al., 2022; Gondois-Rey et al., 2017). *In vivo*, les macrophages différenciés grâce à l'ADCP médiée par les IgA et entraînés pourrait permettre l'élimination des virus et des cellules infectées. Cette destruction impliquerait une augmentation des propriétés inflammatoires de ces macrophages ainsi que la sécrétion de  $\beta$ -chimiokines (Taks et al., 2022). De ce fait, l'induction d'une mémoire immunitaire innée par l'ADCP médiée par les IgA constitue un élément de défense supplémentaire contre l'infection par le VIH-1.

Cet aspect de la mémoire immunitaire innée est aussi développé par d'autres cellules telles que les neutrophiles, les ILC, les NK (Taks et al., 2022), cellules qui participent toutes à la résolution de l'infection par le VIH-1 (Gondois-Rey et al., 2017; Tomescu et al., 2011). Il serait donc important de caractériser si les des IgA en complexes immuns peuvent induire cette mémoire dans les cellules immunitaires innées présentes dans les muqueuses afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de protection contre le VIH-1. De plus, il faudrait comprendre les différences épigénétiques et métaboliques entre l'induction de la mémoire immunitaire par les IgA-IC et celle

induite dans les modèles classiques utilisant du  $\beta$ -glucan (Taks et al., 2022). L'évaluation du rôle de la *trained immunity* dans l'infection par le VIH-1 serait particulièrement utile pour décrire au niveau moléculaire les mécanismes de protection des ESN. Ces études pourraient commencer par des approches exploratoires de séquençage de l'épigénome des cellules de l'immunité innée retrouvées dans les sécrétions génitales d'ESN par rapport à des individus infectés et des personnes saines. Ces résultats pourraient ensuite être corrélés avec l'évaluation *in vitro* de leur faculté à éliminer des agents infectieux variés (BCG, *E.coli*, *C. albicans*, VIH-1 libre ou encore des cellules infectées). De la sorte, l'évaluation fonctionnelle de l'état de *trained immunity* chez les ESN permettra d'établir de nouveaux corrélats de la protection.

### **(7) Parallèles avec les paramètres des ESN**

Nos résultats décrivent une voie qui s'ajoute aux mécanismes déjà connus de la protection médiée par les IgA anti-VIH. De manière opposée, les IgG ne sont pas capables d'induire de telles modifications dans les monocytes effecteurs de l'ADCP, le signal inducteur étant probablement trop faible. L'ensemble de ces résultats souligne le lien que les IgA établissent entre les cellules de l'immunité innée ayant fait l'ADCP de cibles virales et les cellules TCD8. Cette coordination entre immunité humorale et cellulaire favorise la protection contre le virus et suggèrent que les IgA muqueux chez les ESN pourraient aussi agir par ce mécanisme.

Dans l'ensemble, nous avons mis en évidence trois nouvelles activités antivirales caractéristiques de l'ADCP médiée par les IgA :

- La présentation croisée de peptides viraux issus de cellules infectées aux CTL spécifiques du VIH-1
- Le recrutement de populations immunitaires (qui pourrait être associé avec la protection des individus contre l'infection).
- La différenciation des monocytes effecteurs de l'ADCP en macrophages qui acquièrent une mémoire immunitaire.

## (8) Perspectives thérapeutiques : Ingénierie du Fc d'anticorps neutralisants d'ESN

En conclusion, nos résultats suggèrent que les bNAbs sous isotype IgA serait plus efficaces dans la mise en place d'un contrôle de la virémie chez les individus (Brandsma et al., 2019; Duchemin et al., 2020, 2018a; Evers et al., 2020; Lohse et al., 2018b, 2016). Cependant, si les résultats sont engageants, la production des IgA fonctionnels reste difficile. De plus *in vivo*, les IgA ont une durée de vie plus courte dans la circulation que les IgG et, au niveau muqueux, toutes les cellules de l'immunité innée n'expriment pas le Fc $\alpha$ RI/CD89 (Cheeseman et al., 2016; Cottignies-Calamarte et al., 2023b). Ces éléments jouent à la défaveur du développement d'Abs thérapeutiques d'isotype IgA.

Pour essayer de surmonter toutes ces limitations, et en s'inspirant de formats innovants d'Abs thérapeutiques produits pour la recherche en oncologie, générer des chimères à partir des Abs muqueux des ESN afin d'augmenter leurs fonctions effectrices, sans compromis sur leur demi-vie est une option attirante. Le développement de tels formats d'Abs thérapeutiques ouvrirait une nouvelle voie thérapeutique contre les infections virales et particulièrement dans le cas du VIH-1. Dans ce but, nous avons généré des plasmides permettant l'expression d'un IgA d'ESN suivit, en C-terminal de l'Abs, d'un Fc $\gamma$  (dénommé IgAG). Pour ces études, nous nous sommes inspirés des travaux de Borrok et collègues (Borrok et al., 2015) dans lesquels l'Ab spécifique de Her2 (trastuzumab) chimérique présente un Fc IgG1 puis un Fc IgA2 exprimés en tandem (IgGA). Ce chimérisme améliore les capacités d'ADCC et d'ADCP, relativement à chacun des isotypes parentaux seuls ou en combinaison (Borrok 2015). Ces chimères, par la présence des deux types de Fc se lieraient mieux aux cellules effectrices et auraient des fonctions antivirales plus efficaces (Borrok et al., 2015; Li et al., 2017). Comme contrôle de nos études, nous avons généré les plasmides permettant l'expression des versions parentales présentant un Fc $\alpha$  (IgA) ou Fc $\gamma$  (IgG), ainsi que la variante présentant le Fc $\alpha$  avant le Fc $\gamma$  (IgAG) (**Annexe 1**). Afin d'éviter les cotransfections de chaîne légère et de chaîne lourde des Abs, nous avons fusionné les ADN des deux chaînes à l'aide d'un adaptateur protéique flexible (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub> qui devrait permettre la production d'une chimère dont les chaînes légères et lourdes s'associent dans une conformation tridimensionnelle capable de lier l'antigène (Wu et al., 2018). Bien que les séquences aient été conformes à nos attentes, aucune de nos tentatives de transfection ou de transduction n'a conduit

à la production suffisante d’Abs chimériques permettant d’évaluer le gain fonctionnel de ces Abs (**Annexe 1**). Nous avons tiré profit de cette expertise pour publier une revue sur le rationnel de développement de cette approche d’ingénierie des anticorps (Cottignies-Calamarte et al., 2023b)

## **II. Caractérisation du mécanisme antiviral de l’activation de l’AMPK contre le SARS-CoV-2 par redistribution des lipides, induction de l’autophagie et promotion de la réponse T**

### **(1) Rationalisation de l’approche**

Dans le but de développer un traitement curatif efficace contre le SARS-CoV-2, de nombreuses études basées sur des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été initiées mais peu se sont avérées réellement efficaces. On distingue les approches ciblant directement des facteurs viraux et d’autres ciblant les facteurs de l’hôte (Andrews et al., 2024). La première catégorie a pour but d’interférer avec la réplication du génome viral (remdesevir/Veklury) ou l’activité de la protéase 3CLPro (nirmatrelvir-ritonavir/Paxlovid). Cependant, l’utilisation de ces drogues est actuellement limitée aux patients en service de réanimation ou chez des individus à risque élevé et sous surveillance médicale. Ainsi, le développement de nouveaux traitements antiviraux efficaces et sûrs contre le virus est nécessaire.

Le ciblage des voies de l’hôte est une approche immunomodulatrice contre le SARS-CoV-2, visant à tempérer l’emballement immunitaire lors du syndrome hyper-inflammatoire. Les approches se basent sur l’utilisation de corticoïdes, d’Abs neutralisant de l’IL-6 ou encore d’inhibiteurs de JAK. Cependant, aucune approche ciblant des facteurs de l’hôte essentiels à la réplication virale n’a encore abouti à une autorisation de mise sur le marché. Cette approche a pourtant l’intérêt de cibler pharmacologiquement un mécanisme qui ne mute pas, à l’inverse d’éléments viraux.

Parmi les voies cellulaires connues comme étant essentielles au cours du cycle infectieux du SARS-CoV-2, on distingue notamment la lipogenèse et l’autophagie. En effet, l’infection et la réplication du SARS-CoV-2 sont associées à une forte perturbation du profil lipidique cellulaire. Celle-ci favorise l’expression de SREBP-1 et PPAR $\gamma$  ce qui induit une reprogrammation cellulaire

vers un phénotype lipogénique et l'accumulation de gouttelettes lipidiques (Dias et al., 2020; Farley et al., 2022; Tanner and Alfieri, 2021; Wang et al., 2023). L'engagement de la voie de biosynthèse des lipides dépend de la production de malonyl-CoA par l'ACC. Cette enzyme assure l'homéostasie lipidique.

De plus, des études ont montré que les protéines virales nsp induisent l'initiation de l'autophagie alors que les protéines ORF inhibent quant à elles les étapes tardives de fusion des autophagosomes et des lysosomes (Liang et al., 2022). L'expression précoce des protéines nsp et tardive des protéines ORF, suggère que l'initiation de l'autophagie pourrait participer à la mise en place des usines virales et que l'inhibition de la maturation des phagosomes et de leur fusion favorise le relargage des particules virales néoformées (Hou et al., 2023; Liang et al., 2022; Miao et al., 2021; Qu et al., 2021). Le processus de régulation de l'autophagie a été démontré comme étant largement dépendant de la lipogenèse médiée par l'enzyme ACC (Gross et al., 2019).

L'activité de ACC est contrôlée par l'AMPK, une kinase impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique et capable d'inhiber ACC par phosphorylation. Ainsi, l'AMPK pourrait contrebalancer les effets de la réplication du SARS-CoV-2, en inhibant la synthèse des lipides par phosphorylation d'ACC et en induisant l'autophagie par phosphorylation d'ULK1 notamment (Moreira et al., 2016). L'AMPK constitue ainsi une cible thérapeutique de choix.

L'utilisation de metformine ou d'AICAR pour activer l'AMPK a déjà été démontrée comme étant une approche antivirale prometteuse dans un modèle murin d'infection par DenV, un autre virus à réplication cytosolique (Farfan-Morales et al., 2021a). Cependant, l'effet antiviral de ces molécules n'a pu être observé qu'à fortes doses dans des modèles *in vitro* d'infection par le SARS-CoV-2 (Farfan-Morales et al., 2021a; Gassen et al., 2021). Malgré le fort potentiel activateur de ces molécules, celles-ci ne sont cependant pas spécifiques de l'AMPK et provoquent des effets indésirables notables et une action très restreinte au foie (Farfan-Morales et al., 2021a).

L'activateur allostérique de l'AMPK, MK-8722 a été récemment développé contre le diabète par les laboratoires Merck et active l'AMPK à faible dose (Myers et al., 2017). Cette drogue a déjà été testée chez des NHP et présente d'excellentes biodistribution et tolérance, en dépit d'une légère hypertrophie cardiaque passagère et sans conséquences. Ce composé, par sa spécificité

forte pour l'AMPK et par son action à faible concentration, pourrait constituer une piste antivirale dirigée contre le SARS-CoV-2.

Nous avons étudié l'effet de l'activation de l'AMPK par MK-8722 (**Article 3**) sur le cycle infectieux du SARS-COV-2 comme potentielle piste thérapeutique. Nous avons criblé l'activité antivirale sur cellules Vero, et validé ces résultats dans un modèle physiologique de l'infection, les cellules humaines bronchiques Calu-3. Cette lignée est classiquement utilisée comme modèle d'étude de pathologies respiratoires et présente l'avantage d'être compétente pour la voie de signalisation aux IFN-I, contrairement aux cellules Vero.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé notamment la méthode FISH-flow que nous avons mise au point pour la détection de faibles quantités de virus (**Article 2**).

## **(2) Mise au point d'un protocole de quantification du contenu infectieux d'échantillons infectés par le SARS-CoV-2 à l'échelle de la cellule unique (Article 2)**

La caractérisation d'effets antiviraux nécessite l'utilisation de tests sensibles. Les méthodes classiques de titrage par plages de lyse ou focci manquent de sensibilité pour la quantification précise en dessous de 100 virions infectieux par ml. Quant à l'approche RT-qPCR, considérée comme extrêmement sensible, elle ne permet pas la détection de l'infectiosité des particules virales. Cette dernière méthode repose sur la détection de plusieurs gènes comme ceux de E, N ou S, parmi d'autres, après l'amplification par PCR de l'ADN retro-transcrit de l'ARN viral.

Nous avons mis au point une méthode permettant la détection de faibles niveaux de virus infectieux. Pour cela, nous avons combiné une approche de quantification de l'infection qui mesure l'ARN viral et une protéine virale à l'échelle de la cellule unique par FISH-Flow quantifié par cytométrie en flux et morphologiquement par analyses en immunofluorescence. Ces deux techniques sont complémentaires, mais peuvent être utilisées indépendamment : le FISH flow pour mesurer la production virale soit après infection de lignées reportrices pour la caractérisation d'antiviraux, soit dans des fluides biologiques avec une technique standardisée et à haut débit. La morphologie permet d'étudier l'hétérogénéité cellulaire autour du site d'infection *in situ* dans des tissus d'autopsies ou de biopsies prélevés chez les patients.

Notre méthode présente l'avantage de pouvoir détecter l'infectiosité d'échantillons jusqu'à un virus/ml et ce pour l'intégralité des variants testés. Cette méthode permettra notamment d'évaluer des niveaux faibles d'infection dans des environnements cellulaires complexes comme le poumon et d'aborder la caractérisation des réservoirs viraux qui existerait chez certains patients développant des formes de COVID-long.

Les sondes FISH et RNAscope sont basées sur la séquence du virus original, ce qui aurait pu se traduire par des variations de détection entre les variants. Ces deux méthodes permettent cependant de détecter l'infection par tous les variants du SARS-CoV-2. Le FISH flow, utilise plus de 33 sondes différentes pour cibler chacune des 4 régions de l'ARN viral. Ces sondes sont directement couplées à un fluorophore. Lorsque la majorité de ces sondes sont liées à l'ARN le signal devient détectable par cytométrie ou en microscopie, cette technique ayant été développée pour l'analyse morphologique. En conséquence, même si quelques sondes individuelles se lient non spécifiquement de manière dispersée sur l'ARN cible, le signal total n'est pas détectable et le bruit de fond de la technique est quasi inexistant. Dans le cas du RNAscope, c'est l'amplification du signal qui est particulièrement efficace et spécifique. En effet, les sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'ARN cible (conceptualisées comme un "Z") sont hybridées par paires ("ZZ") tout le long de la molécule d'ARN. La détection est effectuée par la liaison spécifique de molécules oligonucléotidiques préamplificatrices elles-mêmes liées à plusieurs amplificateurs couplés à des fluorophores. Le signal obtenu fournit ainsi un résultat quantitatif et mesurable. Il est important de noter que le préamplificateur ne peut pas se lier à une seule sonde Z (sonde Z non appariée), car une paire de Z est nécessaire pour lier le préamplificateur et générer des signaux.

Bien que le RNAscope soit particulièrement informative sur les questions de morphologie et de structure tissulaire, cette technique nécessite un temps d'observation et d'analyse plus longs que la cytométrie. Cependant, les deux méthodes ont démontré leur capacité à détecter des foyers infectieux issus d'un inoculum contenant une unité formant focci de SARS-CoV-2, pour chaque variant, validant leur sensibilité.

Ainsi nous proposons deux approches complémentaires pour permettre l'étude de la réplication virale et évaluer des approches antivirales (Cottignies-Calamarte et al., 2023a).

### **(3) Application du FISH-Flow à l'étude du mécanisme antiviral de MK-8722**

L'utilisation de cette méthode nous a permis de démontrer que le MK-8722 à faible dose (micromolaires) diminue la fréquence des cellules Calu-3 exprimant à la fois la protéine spike et les ARN viraux avec un IC50 d'environ 1µM. De plus, nous avons confirmé que le traitement post-infection par MK-8722 à 5µM permet d'inhiber l'infection de cellules Calu-3 par les variants Alpha et Omicron, à des niveaux comparables. L'utilisation du FISH-Flow dans l'évaluation de l'activité antivirale de MK-8722 a permis de mettre à l'épreuve l'application de cette méthode qui s'est avérée satisfaisante.

### **(4) Etude du mécanisme d'action de MK-8722 contre le SARS-CoV-2**

Par une combinaison d'approches biochimiques, d'immunofluorescence et de cytométrie en flux, nous avons pu montrer que l'activation de l'AMPK par MK-8722 présente au moins deux mécanismes thérapeutiques, non exclusifs.

#### **1. Activité antivirale de l'inhibition de la synthèse des lipides**

Nous avons montré que l'inhibition de la synthèse lipidique suite à la phosphorylation de l'ACC par MK-8722 conduit à une diminution de la formation des gouttelettes lipidiques et à une forte réduction de l'infectivité des particules virales néoformées.

En effet, l'ACC est une des enzymes limitantes de la synthèse des AG. Par conséquent, son inhibition par l'AMPK activée diminue la quantité d'AG disponibles pour alimenter le cycle viral (Farley et al., 2022; Tabata et al., 2021; Tanner and Alfieri, 2021). Cette diminution de la synthèse des AG peut aussi affecter la teneur en lipides des particules virales et en altérer l'infectiosité. De plus, la diminution du nombre de gouttelettes lipidiques et de leur colocalisation avec les éléments viraux en condition de traitement suggère une délocalisation de ces éléments vers d'autres compartiments cellulaires comme les lysosomes. Cependant, la diminution des gouttelettes lipidiques est associée à une inhibition de l'infection. Enfin, nous avons montré que le traitement des cellules par MK-8722 diminue l'infectiosité des virus néoformés. Il est possible que la modification du profil lipidique cellulaire soit responsable de l'altération de l'infectiosité des particules virales (Cheng et al., 2022; Mesquita et al., 2021). L'augmentation du nombre de

particules défectueuses suggère une dépendance du cycle viral à certains lipides et souligne l'importance de la régulation fine du répertoire lipidique cellulaire (Cheng et al., 2022; Farley et al., 2022; Grootemaat et al., 2022; Mesquita et al., 2021).

Dans l'ensemble, nous avons montré que MK-8722 inhibe la synthèse lipidique et en conséquence la réplication et la dissémination du SARS-CoV-2. Il serait donc intéressant de caractériser la nature des changements des lipides cellulaires ou dans les virions produits en présence de MK-8722 par des approches de spectrométrie de masse. Ceci permettrait d'établir l'importance des différents lipides associés à la réplication et ceux favorisant l'infectiosité des particules de SARS-CoV-2, comme c'est le cas pour l'acylation et la myristoylation de la spike nécessaire à l'infectiosité des particules (Cheng et al., 2022; Farley et al., 2022; Mesquita et al., 2021).

Rapidement après l'infection par SARS-CoV-2, une réponse humorale IgA anti-spike se met en place (Ruiz et al., 2022; Sterlin et al., 2021). Ces Abs sont capables d'éliminer les virons par ADCP (Natarajan et al., 2021). Comme nous l'avons montré pour les cellules infectées par le VIH (**Article 1**), il serait intéressant d'évaluer si l'ADCP de ces virus défectueux du SARS-CoV-2 pourrait favoriser la présentation croisée aux TCD8 spécifiques du SARS-CoV-2. Cet effet pourrait favoriser le rappel de la réponse immunitaire adaptative initié par la vaccination à grande échelle en France et dans le Monde, mais aussi par l'infection naturelle (Liu et al., 2022; Taus et al., 2022; Vitiello et al., 2022). Nous supposons qu'en présence de MK-8722, la présentation croisée aux TCD8 SARS-CoV-2-spécifiques favoriserait le contrôle de l'infection et de la pathologie.

## 2. Inhibition de l'infection par restauration de l'autophagie

En second lieu, l'inhibition de la réplication du SARS-CoV-2 par MK-8722 pourrait être la conséquence de l'induction de l'autophagie et la fusion des phagosomes avec les lysosomes. En effet, l'augmentation de la colocalisation des protéines virales avec les compartiments lysosomaux LAMP1<sup>+</sup> observée par microscopie, indique que leur adressage vers le lysosome augmente, ce qui n'a pas lieu au cours du cycle naturel du virus (Hou et al., 2023; Koepke et al., 2021; Qu et al., 2021; Twu et al., 2021). Bien que l'augmentation de la colocalisation des composants viraux et des compartiments lysosomaux lors du traitement soit de quelques pourcents, il est possible que l'activité de dégradation par les lysosomes altère la détection des protéines virales au-delà d'un

certain stade d'activité lysosomale. Néanmoins, l'augmentation du marquage par le LysoTracker des cellules Calu-3 infectées et traitées par MK-8722 est indicateur d'une augmentation de leur activité, ce qui conforte notre interprétation.

L'autophagie et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes apparaît donc comme un des mécanismes antiviraux induit par MK-8722, bien qu'il ne soit pas clair si ce flux autophagique permet la dégradation des protéines virales et/ou des virions néoformés. La présence de virions relargués dans le surnageant des cellules infectées traitées suggère que si la dégradation des particules virales est possible, certains virus y échappent. Il est d'ailleurs probable que la dégradation d'éléments viraux par autophagie crée un défaut, partiel ou total, dans les particules virales. La connaissance de facteurs viraux essentiels à l'infectiosité des particules constitue un aspect critique dans la génération de vaccins vivants atténués. A cet effet, il serait intéressant d'analyser par spectrométrie de masse les virus relargués en condition de traitement ou non afin d'étudier cette piste.

### 3. Restauration de la faculté à produire de l'interféron de type I

La dégradation des protéines virales par autophagie induite par le traitement par MK-8722 conduit aussi à initier la réponse IFN-I, qui est supprimée par les protéines virales et en accord avec la littérature (Hui et al., 2021; Li et al., 2022). Ainsi le traitement par MK-8722 permettrait de rétablir une réponse IFN-I précoce et l'expression des ISG Mx1 et OAS1, impliqués dans le contrôle de l'infection (Cheemarla et al., 2021; Lopez et al., 2021; Schroeder et al., 2021). Nos résultats confirment le rôle de l'autophagie dans le contrôle de la sécrétion d'IFN-I par le SARS-CoV-2. De plus, les formes graves de COVID-19 sont associées à dysrégulation de la sécrétion d'IFN-I (Bastard et al., 2021; S. Lee et al., 2020; Ruiz et al., 2022; Smith et al., 2022; Viox et al., 2023). Une étude *in vivo* permettra de déterminer l'impact du traitement sur la réponse IFN-I en regard du tableau clinique.

### (5) Interaction de MK-8722 et de la réponse T spécifique du virus

La réponse médiée par les TCD4 et TCD8 est un élément central de la protection contre l'infection par le SARS-CoV-2 (Liu et al., 2022; Taus et al., 2022; Vitiello et al., 2022). Etant donné que l'activation de l'AMPK agit à l'inverse de l'activation cellulaire, nous avons évalué l'effet du

traitement par MK-8722 sur les lymphocytes T dans différents cas d'activation. Il apparaît que le traitement par MK-8722 n'inhibe pas l'activation des cellules TCD4 et TCD8 lors de la stimulation par des Abs anti-CD3 et anti-CD28, ce qui encouragerait son utilisation en clinique. De plus, les peptides de Spike et de Nucléocapside n'ont pas permis d'induire une réactivation (ou faible) des TCD4 ou des TCD8 spécifiques sans traitement par MK-8722. On peut suggérer que le MK-8722 conduit à une augmentation de la sensibilité des TCD4 et TCD8 à leur antigène spécifique, permettant d'éliminer plus rapidement et efficacement les cellules infectées. Ceci est d'autant plus intéressant qu'au cours de l'infection, l'expression du CMH-I est diminuée par ORF8 (Zhang et al., 2021). Notre test d'inhibition de l'infection par SARS-CoV-2 dans des cellules infectées en présence de MK-8722 et de TCD8 nous a permis de montrer que les effets inhibiteurs de MK-8722 et des TCD8 s'additionnent. Cela indique qu'a priori, un traitement par MK-8722 serait compatible avec l'établissement naturel de la réponse TCD4 et TCD8 contre l'infection. Ces résultats renforcent l'intérêt que pourrait avoir un traitement par MK-8722 chez les patients infectés afin d'améliorer l'élimination du virus et les symptômes cliniques.

## **(6) Perspectives thérapeutiques**

L'ensemble de nos résultats sur MK-8722 représentent une preuve de concept de son application contre l'infection par le SARS-CoV-2 *in vitro*, même si l'utilisation des lignées cellulaires ne peut pas modéliser la complexité cellulaire au site de réplication chez l'humain. De plus, tous nos résultats ont été obtenus avec des virus sauvages : le variant Alpha, pour lequel la quasi-totalité des outils d'étude a été mise au point, et Omicron, le lignage circulant le plus récemment et le plus distant de Alpha. La validation de nos résultats contre ces deux virus phylogénétiquement différents permet d'assurer la robustesse de nos résultats. Néanmoins, il faudrait caractériser l'impact de la drogue dans des cellules primaires ou des reconstructions d'épithélium respiratoire variés (nasal, pulmonaire ou bronchique) afin d'évaluer le rôle de l'hétérogénéité cellulaire sur l'activité de MK-8722. Aussi, il faudrait estimer l'efficacité du traitement par MK-8722 en condition post-exposition dans des animaux infectés comparativement à des animaux préalablement traités ou non. Cette étude (à venir) devrait permettre de caractériser plus précisément l'interaction entre la drogue et la réponse immunitaire en condition d'infection. Nous mesurerons ainsi la réponse

IFN-I mais aussi l'évaluation qualitative et quantitative de la réponse T spécifique du virus. En effet, par son action d'inhibition de l'activation cellulaire, l'AMPK activée par MK-8722 pourrait permettre de contenir l'hyper-inflammation observée au cours de la COVID-19 et médiée principalement par les monocytes et macrophages mais aussi les cellules infectées (Boumaza et al., 2021; Dias et al., 2020). Si le MK-8722 inhibe effectivement l'infection, il pourrait permettre de réduire le temps pendant lequel le virus se réplique et donc diminuer les dommages cellulaires et ceux provoqués par des médiateurs de l'inflammation associés bien que ces deux paramètres ne soient pas systématiquement associés (Dichtl et al., 2023).

Par ailleurs, la diminution des gouttelettes lipidiques viro-induites après traitement par MK-8722 pourrait être associée à une diminution de la production de l'IL-6 et de LTB<sub>4</sub>, médiateurs majeurs de l'inflammation (Dias et al., 2020). Le traitement par MK-8722 chez les patients COVID-19 pourrait permettre un meilleur contrôle temporel de l'infection par altération du répertoire lipidique viro-induit et restauration du flux autophagique. Ces deux éléments devraient permettre d'une part le rétablissement d'une réponse IFN-I protectrice et cantonnée dans le temps, et d'autre part des réponses TCD4 et TCD8 rapidement efficaces. Finalement, après le traitement, les patients devraient bénéficier d'une diminution de leur état inflammatoire et du besoin d'oxygénothérapie ce qui favoriserait leur survie.

Il serait aussi intéressant de vérifier l'effet antiviral de cette drogue contre d'autres virus émergents et détournant aussi l'autophagie et la synthèse des lipides à leur avantage comme les virus de la Dengue, de la Fièvre Jaune, ZikV ou la grippe (Bajimaya et al., 2017; Farfan-Morales et al., 2021a; Fernández de Castro et al., 2021; Ke, 2018; Tabata et al., 2021).

Aujourd'hui l'épidémie de SARS-CoV-2 n'est plus un problème de santé publique majeure et le nombre de cas graves de la COVID-19 a diminué. Cependant, étant donné le fort potentiel d'émergence des *Coronavirus* et l'universalité des voies ciblées par MK-8722 au cours du cycle des *Coronavirus*, notre étude propose un antiviral prêt à tester dans le cas d'une prochaine épidémie (Guo et al., 2023; Li et al., 2018).

### III. Conclusion générale

Au cours de mes travaux de thèse nous avons développé deux approches antivirales muqueuses complémentaires.

La première permet, par le ciblage d'éléments viraux effectué par les anticorps, la mise en place d'une réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre le VIH-1 qui serait plus rapide et plus efficace. Les nouvelles informations apportées par cette étude complètent la caractérisation des activités antivirales médiées par le domaine Fc de l'Ab 2F5 sous isotype IgA et IgG. Cette nouvelle activité antivirale restreinte aux IgA suggère que l'induction d'IgA muqueux anti-gp41 chez des individus à risque favorisera l'induction/le rappel d'une réponse cytotoxique lors de la rencontre avec le virus. Nos résultats indiquent qu'il est possible que ce phénomène soit impliqué chez les ESN au niveau muqueux, présentant des IgA anti-gp41 protecteurs. Par notre étude, nous montrons également l'induction d'une mémoire entraînée par les IgA spécifiques de gp41. Cette mémoire innée permettrait une meilleure protection contre des infections muqueuses émergentes.

En conclusion, ces informations sont des preuves en faveur de l'utilisation des anticorps IgA spécifiques de gp41 dans une stratégie de PrEP pour réduire le risque de transmission du virus. De plus, cette approche de PrEP permettrait la mise en place d'une immunité protectrice TCD8 dépendante chez des individus à risque de contracter l'infection. Enfin l'induction d'une mémoire entraînée par les IgA représente un critère à prendre en considération dans la stratégie de PrEP.

Nous pouvons aussi considérer que l'induction des anticorps IgA au niveau muqueux par vaccination permettrait une protection plus efficace comme c'est le cas chez les ESN.

Le développement de thérapies bNAb basées sur les IgA sera aussi utile dans des approches de *shock-and-kill* (Bekker et al., 2023; Gruell and Schommers, 2022) en éliminant les réservoirs latents réactivés. Nos résultats suggèrent que les individus pourront développer une réponse TCD8 plus efficace limitant de fait le rebond viral.

La seconde approche antivirale est dirigée contre les voies de l'hôte sur lesquelles la réplication virale repose. Ainsi, la drogue MK-8722 que nous avons évalué présente les caractéristiques idéales pour être testée dans des essais précliniques. L'activation de l'AMPK par cette drogue entraîne l'inhibition de processus cellulaires importants pour la réplication virale par régulation des voies de l'autophagie et du métabolisme lipidique (Farfan-Morales et al., 2021b; Liang et al., 2022; Moreira et al., 2016; Tanner and Alfieri, 2021; Wang et al., 2023; Y. Wang et al., 2020). De fait, il est plus difficile d'observer l'émergence de mutants résistants au traitement. Par ce mécanisme d'action, l'approche basée sur l'utilisation de MK-78722 pourrait être transposée à d'autres virus.

Cependant, il est critique d'évaluer l'impact de la drogue *in vivo* dans des modèles d'infection afin d'évaluer le potentiel antiviral réel, mais également si la combinaison du traitement dans un contexte d'infection ne provoque pas des effets secondaires rédhibitoires. L'existence d'un traitement post-infection ouvre également la voie vers un traitement préventif notamment chez des individus à risque de développer des formes graves ou chez personnes immunodéprimées.

Les autres projets du laboratoire concernant le SARS-CoV-2 auxquels j'ai pu participer pendant ma thèse permettent également d'établir des paramètres prédictifs de l'évolution de la pathologie vers les formes graves (Luu et al., 2021; Ruiz et al., 2022; Zhu et al., 2022). L'évaluation de ces paramètres au cours d'études pré-cliniques seraient particulièrement informatifs sur le potentiel thérapeutique de MK-8722 contre le SARS-CoV-2.

Enfin il semble crucial de déterminer *in vitro* l'impact de ces deux traitements sur la diversité virale dans la progénie des cellules traitées afin d'évaluer le potentiel d'émergence de virus résistants au traitement ou plus virulents.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abdool Karim, Q., Baxter, C., Birx, D., 2017. Prevention of HIV in Adolescent Girls and Young Women: Key to an AIDS-Free Generation. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 75, S17.  
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001316>
- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9.
- Acharya, P., Tolbert, W.D., Gohain, N., Wu, X., Yu, L., Liu, T., Huang, W., Huang, C.-C., Kwon, Y.D., Louder, R.K., Luongo, T.S., McLellan, J.S., Pancera, M., Yang, Y., Zhang, B., Flinko, R., Foulke, J.S., Sajadi, M.M., Kamin-Lewis, R., Robinson, J.E., Martin, L., Kwong, P.D., Guan, Y., DeVico, A.L., Lewis, G.K., Pazgier, M., 2014. Structural definition of an antibody-dependent cellular cytotoxicity response implicated in reduced risk for HIV-1 infection. *J. Virol.* 88, 12895–12906.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02194-14>
- Ackerman, M.E., Crispin, M., Yu, X., Baruah, K., Boesch, A.W., Harvey, D.J., Dugast, A.-S., Heizen, E.L., Ercan, A., Choi, I., Streeck, H., Nigrovic, P.A., Bailey-Kellogg, C., Scanlan, C., Alter, G., 2013. Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J. Clin. Invest.* 123, 2183–2192. <https://doi.org/10.1172/JCI65708>
- Ackerman, M.E., Das, J., Pittala, S., Broge, T., Linde, C., Suscovich, T.J., Brown, E.P., Bradley, T., Natarajan, H., Lin, S., Sassic, J.K., O’Keefe, S., Mehta, N., Goodman, D., Sips, M., Weiner, J.A., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., Lauffenburger, D.A., Bailey-Kellogg, C., Roederer, M., Alter, G., 2018. Route of immunization defines multiple mechanisms of vaccine-mediated protection against SIV. *Nat Med* 24, 1590–1598. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0161-0>
- Ackerman, M.E., Mikhailova, A., Brown, E.P., Dowell, K.G., Walker, B.D., Bailey-Kellogg, C., Suscovich, T.J., Alter, G., 2016. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog* 12, e1005315. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005315>
- Ackerman, M.E., Moldt, B., Wyatt, R.T., Dugast, A.-S., McAndrew, E., Tsoukas, S., Jost, S., Berger, C.T., Sciaranghella, G., Liu, Q., Irvine, D.J., Burton, D.R., Alter, G., 2011. A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. *J. Immunol. Methods* 366, 8–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.12.016>
- Agarwal, S., Kraus, Z., Dement-Brown, J., Alabi, O., Starost, K., Tolnay, M., 2020. Human Fc Receptor-like 3 Inhibits Regulatory T Cell Function and Binds Secretory IgA. *Cell Rep.* 30, 1292-1299.e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.099>
- Ahmad, R., Sindhu, S.T., Toma, E., Morisset, R., Vincelette, J., Menezes, J., Ahmad, A., 2001. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. *J. Clin. Immunol.* 21, 227–233.  
<https://doi.org/10.1023/a:1011087132180>
- Akula, S., Mohammadamin, S., Hellman, L., 2014. Fc Receptors for Immunoglobulins and Their Appearance during Vertebrate Evolution. *PLOS ONE* 9, e96903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096903>
- Aleyd, E., Heineke, M.H., van Egmond, M., 2015. The era of the immunoglobulin A Fc receptor Fc $\alpha$ RI; its function and potential as target in disease. *Immunol. Rev.* 268, 123–138.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12337>
- Aleyd, E., van Hout, M.W.M., Ganzevles, S.H., Hoeben, K.A., Everts, V., Bakema, J.E., van Egmond, M., 2014. IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fc $\alpha$  receptor I. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 2374–2383.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300261>
- Alfsen, A., Bomsel, M., 2002. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* 277, 25649–59.
- Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A., Bomsel, M., 2005. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis

- across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* 16, 4267–79. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-03-0192>
- Almeida, J.R., Price, D.A., Papagno, L., Arkoub, Z.A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T.E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Marcelin, A.-G., Douek, D., Autran, B., Appay, V., 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* 204, 2473–2485. <https://doi.org/10.1084/jem.20070784>
- Alrubayyi, A., Schuetz, A., Lal, K.G., Jongrakthaitae, S., Paolino, K.M., Ake, J.A., Robb, M.L., de Souza, M.S., Michael, N.L., Paquin-Proulx, D., Eller, M.A., 2018. A flow cytometry based assay that simultaneously measures cytotoxicity and monocyte mediated antibody dependent effector activity. *J. Immunol. Methods* 462, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.012>
- Alteri, C., Cento, V., Piralla, A., Costabile, V., Tallarita, M., Colagrossi, L., Renica, S., Giardina, F., Novazzi, F., Gaiarsa, S., Matarazzo, E., Antonello, M., Vismara, C., Fumagalli, R., Epis, O.M., Puoti, M., Perno, C.F., Baldanti, F., 2021. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 reveals multiple lineages and early spread of SARS-CoV-2 infections in Lombardy, Italy. *Nat. Commun.* 12, 434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20688-x>
- Altfeld, M., Addo, M.M., Rosenberg, E.S., Hecht, F.M., Lee, P.K., Vogel, M., Yu, X.G., Draenert, R., Johnston, M.N., Strick, D., Allen, T.M., Feeney, M.E., Kahn, J.O., Sekaly, R.P., Levy, J.A., Rockstroh, J.K., Goulder, P.J., Walker, B.D., 2003. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* 17, 2581–2591. <https://doi.org/10.1097/00002030-200312050-00005>
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R.I., Simon, A.K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N., Rubinsztein, D.C., Partridge, L., Kroemer, G., Labbadia, J., Fang, E.F., 2021. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat. Aging* 1, 634–650. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>
- Anderson, D.J., Politch, J.A., Nadolski, A.M., Blaskewicz, C.D., Pudney, J., Mayer, K.H., 2010. Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. *AIDS* 24, 163–87. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833424c8>
- Andrews, H.S., Herman, J.D., Gandhi, R.T., 2024. Treatments for COVID-19. *Annu. Rev. Med.* 75, null. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052422-020316>
- Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Lecuroux, C., Monceaux, V., Dillies, M.-A., Valle-Casuso, J.C., Pancino, G., Vaslin, B., Le Grand, R., Weiss, L., Goujard, C., Meyer, L., Boufassa, F., Müller-Trutwin, M., Lambotte, O., Sáez-Ciri3n, A., 2019. Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nat. Metab.* 1, 704–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0081-4>
- Anthony, R.M., Kobayashi, T., Wermeling, F., Ravetch, J.V., 2011. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475, 110–113. <https://doi.org/10.1038/nature10134>
- Apolone, G., Montomoli, E., Manenti, A., Boeri, M., Sabia, F., Hyseni, I., Mazzini, L., Martinuzzi, D., Cantone, L., Milanese, G., Sestini, S., Suatoni, P., Marchian3, A., Bollati, V., Sozzi, G., Pastorino, U., 2021. Unexpected detection of SARS-CoV-2 antibodies in the prepandemic period in Italy. *Tumori* 107, 446–451. <https://doi.org/10.1177/0300891620974755>
- Astronomo, R.D., Santra, S., Ballweber-Fleming, L., Westerberg, K.G., Mach, L., Hensley-McBain, T., Sutherland, L., Mildenberg, B., Morton, G., Yates, N.L., Mize, G.J., Pollara, J., Hladik, F., Ochsenbauer, C., Denny, T.N., Warrier, R., Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayapan, S., Kaewkungwal, J., Ferrari, G., Shaw, G.M., Xia, S.-M., Liao, H.-X., Montefiori, D.C., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., McElrath, J.M., 2016. Neutralization Takes Precedence Over IgG or IgA Isotype-

- related Functions in Mucosal HIV-1 Antibody-mediated Protection. *EBioMedicine* 14, 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.024>
- Babior, B.M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109, 33–44. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00481-2)
- Baek, Y.-B., Kwon, H.-J., Sharif, M., Lim, J., Lee, I.-C., Ryu, Y.B., Lee, J.-I., Kim, Ji-Sun, Lee, Y.-S., Kim, D.-H., Park, S.-I., Kim, D.-K., Kim, Jeong-Sun, Choy, H.E., Lee, S., Choi, H.-S., Osborne, T.F., Jeon, T.-I., Cho, K.-O., 2022. Therapeutic strategy targeting host lipolysis limits infection by SARS-CoV-2 and influenza A virus. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 367. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01223-4>
- Bajimaya, S., Frankl, T., Hayashi, T., Takimoto, T., 2017. Cholesterol is required for stability and infectivity of influenza A and respiratory syncytial viruses. *Virology* 510, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.024>
- Baker, K., Rath, T., Lencer, W.I., Fiebigler, E., Blumberg, R.S., 2013. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1319–1334. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1100-8>
- Baker, K., Rath, T., Pyzik, M., Blumberg, R.S., 2014. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 5, 408. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00408>
- Barouch, D.H., Alter, G., Broge, T., Linde, C., Ackerman, M.E., Brown, E.P., Borducchi, E.N., Smith, K.M., Nkolola, J.P., Liu, J., Shields, J., Parenteau, L., Whitney, J.B., Abbink, P., Ng'ang'a, D.M., Seaman, M.S., Lavine, C.L., Perry, J.R., Li, W., Colantonio, A.D., Lewis, M.G., Chen, B., Wenschuh, H., Reimer, U., Piatak, M., Lifson, J.D., Handley, S.A., Virgin, H.W., Koutsoukos, M., Lorin, C., Voss, G., Weijtens, M., Pau, M.G., Schuitemaker, H., 2015. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. *Science* 349, 320–4. <https://doi.org/10.1126/science.aab3886>
- Barouch, D.H., Stephenson, K.E., Borducchi, E.N., Smith, K., Stanley, K., McNally, A.G., Liu, J., Abbink, P., Maxfield, L.F., Seaman, M.S., Dugast, A.S., Alter, G., Ferguson, M., Li, W., Earl, P.L., Moss, B., Giorgi, E.E., Szinger, J.J., Eller, L.A., Billings, E.A., Rao, M., Tovanabutra, S., Sanders-Buell, E., Weijtens, M., Pau, M.G., Schuitemaker, H., Robb, M.L., Kim, J.H., Korber, B.T., Michael, N.L., 2013. Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. *Cell* 155, 531–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.061>
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Bastard, P., Gervais, A., Le Voyer, T., Rosain, J., Philippot, Q., Manry, J., Michailidis, E., Hoffmann, H.-H., Eto, S., Garcia-Prat, M., Bizien, L., Parra-Martínez, A., Yang, R., Haljasmägi, L., Migaud, M., Särekannu, K., Maslovskaja, J., de Prost, N., Tandjaoui-Lambiotte, Y., Luyt, C.-E., Amador-Borrero, B., Gaudet, A., Poissy, J., Morel, P., Richard, P., Cognasse, F., Troya, J., Trouillet-Assant, S., Belot, A., Saker, K., Garçon, P., Rivière, J.G., Lagier, J.-C., Gentile, S., Rosen, L.B., Shaw, E., Morio, T., Tanaka, J., Dalmau, D., Tharoux, P.-L., Sene, D., Stepanian, A., Megarbane, B., Triantafyllia, V., Fekkar, A., Heath, J.R., Franco, J.L., Anaya, J.-M., Solé-Violán, J., Imberti, L., Biondi, A., Bonfanti, P., Castagnoli, R., Delmonte, O.M., Zhang, Y., Snow, A.L., Holland, S.M., Biggs, C., Moncada-Vélez, M., Arias, A.A., Lorenzo, L., Boucherit, S., Coulibaly, B., Anglicheau, D., Planas, A.M., Haerynck, F., Duvlis, S., Nussbaum, R.L., Ozcelik, T., Keles, S., Bousfiha, A.A., El Bakkouri, J., Ramirez-Santana, C., Paul, S., Pan-Hammarström, Q., Hammarström, L., Dupont, A., Kurolap, A., Metz, C.N., Aiuti, A., Casari, G., Lampasona, V., Ciceri, F., Barreiros, L.A., Dominguez-Garrido, E., Vidigal, M., Zatz, M., van de Beek, D., Sahanic, S., Tancevski, I., Stepanovskyy, Y., Boyarchuk, O., Nukui, Y., Tsumura, M., Vidaur, L., Tangye, S.G., Burrell, S., Duffy, D., Quintana-Murci, L., Klocperk, A., Kann, N.Y., Shcherbina, A., Lau, Y.-L., Leung, D., Coulangeat, M., Marlet, J., Koning, R., Reyes, L.F., Chauvineau-

- Grenier, A., Venet, F., Monneret, G., Nussenzweig, M.C., Arrestier, R., Boudhabhay, I., Baris-Feldman, H., Hagin, D., Wauters, J., Meyts, I., Dyer, A.H., Kennelly, S.P., Bourke, N.M., Halwani, R., Sharif-Askari, N.S., Dorgham, K., Sallette, J., Sedkaoui, S.M., AlKhater, S., Rigo-Bonnin, R., Morandeira, F., Roussel, L., Vinh, D.C., Ostrowski, S.R., Condino-Neto, A., Prando, C., Bonradenko, A., Spaan, A.N., Gilardin, L., Fellay, J., Lyonnet, S., Bilguvar, K., Lifton, R.P., Mane, S., HGID Lab, COVID Clinicians, COVID-STORM Clinicians, NIAID Immune Response to COVID Group, NH-COVAIR Study Group, Danish CHGE, Danish Blood Donor Study, St. James's Hospital, SARS CoV2 Interest group, French COVID Cohort Study Group, Imagine COVID-Group, Milieu Intérieur Consortium, CoV-Contact Cohort, Amsterdam UMC Covid-19, Biobank Investigators, COVID Human Genetic Effort, CONSTANCES cohort, 3C-Dijon Study, Cerba Health-Care, Etablissement du Sang study group, Anderson, M.S., Boisson, B., Béziat, V., Zhang, S.-Y., Vandreakos, E., Hermine, O., Pujol, A., Peterson, P., Mogensen, T.H., Rowen, L., Mond, J., Durette, S., de Lamballerie, X., Duval, X., Mentré, F., Zins, M., Soler-Palacin, P., Colobran, R., Gorochov, G., Solanich, X., Susen, S., Martinez-Picado, J., Raoult, D., Vasse, M., Gregersen, P.K., Piemonti, L., Rodríguez-Gallego, C., Notarangelo, L.D., Su, H.C., Kisand, K., Okada, S., Puel, A., Jouanguy, E., Rice, C.M., Tiberghien, P., Zhang, Q., Cobat, A., Abel, L., Casanova, J.-L., 2021. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Sci. Immunol.* 6, eabl4340. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl4340>
- Battisti, F., Napoletano, C., Rahimi Koshkaki, H., Belleudi, F., Zizzari, I.G., Ruscito, I., Palchetti, S., Bellati, F., Benedetti Panici, P., Torrisi, M.R., Caracciolo, G., Altieri, F., Nuti, M., Rughetti, A., 2017. Tumor-Derived Microvesicles Modulate Antigen Cross-Processing via Reactive Oxygen Species-Mediated Alkalinization of Phagosomal Compartment in Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 8, 1179. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01179>
- Baumann, J., Park, C.G., Mantis, N.J., 2010. Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol. Lett.* 131, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.03.005>
- Bekker, L.-G., Beyrer, C., Mgodhi, N., Lewin, S.R., Delany-Moretlwe, S., Taiwo, B., Masters, M.C., Lazarus, J.V., 2023. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 9, 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00452-3>
- Bélec, L., Ghys, P.D., Hocini, H., Nkengasong, J.N., Tranchot-Diallo, J., Diallo, M.O., Ettiègne-Traore, V., Maurice, C., Becquart, P., Matta, M., Si-Mohamed, A., Chomont, N., Coulibaly, I.M., Wiktor, S.Z., Kazatchkine, M.D., 2001. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J. Infect. Dis.* 184, 1412–1422. <https://doi.org/10.1086/324375>
- Ben Mkaddem, S., Benhamou, M., Monteiro, R.C., 2019. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Front. Immunol.* 10, 811. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00811>
- Benjelloun, F., Dawood, R., Urcuqui-Inchima, S., Rochereau, N., Chanut, B., Verrier, B., Lucht, F., Genin, C., Paul, S., 2013. Secretory IgA specific for MPER can protect from HIV-1 infection in vitro. *AIDS Lond. Engl.* 27, 1992–1995. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283632ea1>
- Benjelloun, F., Oruc, Z., Thielens, N., Verrier, B., Champier, G., Vincent, N., Rochereau, N., Girard, A., Jospin, F., Chanut, B., Genin, C., Cogné, M., Paul, S., 2016. First Membrane Proximal External Region-Specific Anti-HIV1 Broadly Neutralizing Monoclonal IgA1 Presenting Short CDRH3 and Low Somatic Mutations. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 197, 1979–1988. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600309>
- Beum, P.V., Mack, D.A., Pawluczko, A.W., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., 2008. Binding of Rituximab, Trastuzumab, Cetuximab, or mAb T101 to Cancer Cells Promotes Trophocytosis Mediated by THP-1

- Cells and Monocytes. *J. Immunol.* 181, 8120–8132.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.8120>
- Bidgood, S.R., Tam, J.C.H., McEwan, W.A., Mallery, D.L., James, L.C., 2014. Translocalized IgA mediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13463–13468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410980111>
- Bindon, C.I., Hale, G., Brüggemann, M., Waldmann, H., 1988. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. Exp. Med.* 168, 127–142. <https://doi.org/10.1084/jem.168.1.127>
- Bizzotto, J., Sanchis, P., Abbate, M., Lage-Vickers, S., Lavignolle, R., Toro, A., Olszewicki, S., Sabater, A., Cascardo, F., Vazquez, E., Cotignola, J., Gueron, G., 2020. SARS-CoV-2 Infection Boosts MX1 Antiviral Effector in COVID-19 Patients. *iScience* 23, 101585. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101585>
- Blondin-Ladrie, L., Fourcade, L., Modica, A., Aranguren, M., de Montigny, N., Labbé, A.-C., Alary, M., Guédou, F., Poudrier, J., Roger, M., 2022. Monocyte Gene and Molecular Expression Profiles Suggest Distinct Effector and Regulatory Functions in Beninese HIV Highly Exposed Seronegative Female Commercial Sex Workers. *Viruses* 14, 361. <https://doi.org/10.3390/v14020361>
- Bomsel, M., 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* 3, 42–47.
- Bomsel, M., Alfsen, A., 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 57–68.
- Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., Desgranges, C., 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9, 277–87.
- Bomsel, M., Pastori, C., Tudor, D., Alberti, C., Garcia, S., Ferrari, D., Lazzarin, A., Lopalco, L., 2007. Natural mucosal antibodies reactive with first extracellular loop of CCR5 inhibit HIV-1 transport across human epithelial cells. *AIDS* 21, 13–22. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328011049b>
- Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.-S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.-G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomede, L., Devillier, G., Cong, Z., Wei, Q., Gao, H., Qin, C., Yang, G.-B., Zurbriggen, R., Lopalco, L., Fleury, S., 2011. Immunization with HIV-1 gp41 Subunit Virosomes Induces Mucosal Antibodies Protecting Nonhuman Primates against Vaginal SHIV Challenges. *Immunity* 34, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.015>
- Bonaparte, M.I., Barker, E., 2004. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood* 104, 2087–2094. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0696>
- Bonner, A., Furtado, P.B., Almogren, A., Kerr, M.A., Perkins, S.J., 2008. Implications of the near-planar solution structure of human myeloma dimeric IgA1 for mucosal immunity and IgA nephropathy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 1008–1018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1008>
- Boras, B., Jones, R.M., Anson, B.J., Arenson, D., Aschenbrenner, L., Bakowski, M.A., Beutler, N., Binder, J., Chen, E., Eng, H., Hammond, H., Hammond, J., Haupt, R.E., Hoffman, R., Kadar, E.P., Kania, R., Kimoto, E., Kirkpatrick, M.G., Lanyon, L., Lendy, E.K., Lillis, J.R., Logue, J., Luthra, S.A., Ma, C., Mason, S.W., McGrath, M.E., Noell, S., Obach, R.S., O’ Brien, M.N., O’Connor, R., Ogilvie, K., Owen, D., Pettersson, M., Reese, M.R., Rogers, T.F., Rosales, R., Rossulek, M.I., Sathish, J.G., Shirai, N., Stepan, C., Ticehurst, M., Updyke, L.W., Weston, S., Zhu, Y., White, K.M., García-Sastre, A., Wang, J., Chatterjee, A.K., Mesecar, A.D., Frieman, M.B., Anderson, A.S., Allerton, C., 2021. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. *Nat. Commun.* 12, 6055. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26239-2>

- Boross, P., van Montfoort, N., Stapels, D.A.C., van der Poel, C.E., Bertens, C., Meeldijk, J., Jansen, J.H.M., Verbeek, J.S., Ossendorp, F., Wubbolts, R., Leusen, J.H.W., 2014. FcRγ-Chain ITAM Signaling Is Critically Required for Cross-Presentation of Soluble Antibody–Antigen Complexes by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 193, 5506–5514. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302012>
- Borrok, M.J., Luheshi, N.M., Beyaz, N., Davies, G.C., Legg, J.W., Wu, H., Dall'Acqua, W.F., Tsui, P., 2015. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with FcαRI (CD89) binding. *mAbs* 7, 743–751. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1047570>
- Boufassa, F., Lechenadec, J., Meyer, L., Costagliola, D., Hunt, P.W., Pereyra, F., Deeks, S., Pancino, G., Taulera, O., Lichtenfeld, M., Delobel, P., Saez-Cirion, A., Lambotte, O., ANRS CO18 HIV Controllers Cohort, Cascade Collaboration in Eurocoord, SCOPE Cohort, International HIV Controllers Study, 2014. Blunted response to combination antiretroviral therapy in HIV elite controllers: an international HIV controller collaboration. *PLoS One* 9, e85516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085516>
- Boulet, S., Kleyman, M., Kim, J.Y., Kanya, P., Sharafi, S., Simic, N., Bruneau, J., Routy, J.-P., Tsoukas, C.M., Bernard, N.F., 2008a. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B\*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* 22, 1487–1491. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e>
- Boulet, S., Sharafi, S., Simic, N., Bruneau, J., Routy, J.-P., Tsoukas, C.M., Bernard, N.F., 2008b. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS Lond. Engl.* 22, 595–599. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f56b23>
- Boumaza, A., Gay, L., Mezouar, S., Bestion, E., Diallo, A.B., Michel, M., Desnues, B., Raoult, D., La Scola, B., Halfon, P., Vitte, J., Olive, D., Mege, J.-L., 2021. Monocytes and macrophages, targets of SARS-CoV-2: the clue for Covid-19 immunoparalysis. *J. Infect. Dis.* [jiab044](https://doi.org/10.1093/infdis/jiab044). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab044>
- Bournazos, S., Klein, F., Pietzsch, J., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C., Ravetch, J.V., 2014. Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies Require Fc Effector Functions for In Vivo Activity. *Cell* 158, 1243–1253. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.023>
- Bournazos, S., Wang, T.T., Dahan, R., Maamary, J., Ravetch, J.V., 2017. Signaling by Antibodies: Recent Progress. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 285–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052433>
- Bowden, T.A., Baruah, K., Coles, C.H., Harvey, D.J., Yu, X., Song, B.-D., Stuart, D.I., Aricescu, A.R., Scanlan, C.N., Jones, E.Y., Crispin, M., 2012. Chemical and Structural Analysis of an Antibody Folding Intermediate Trapped during Glycan Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 17554–17563. <https://doi.org/10.1021/ja306068g>
- Bracke, M., Nijhuis, E., Lammers, J.-W.J., Coffey, P.J., Koenderman, L., 2000. A critical role for PI 3-kinase in cytokine-induced Fcα-receptor activation. *Blood* 95, 2037–2043. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.6.2037>
- Brahim Belhaouari, D., Fontanini, A., Baudoin, J.-P., Haddad, G., Le Bideau, M., Bou Khalil, J.Y., Raoult, D., La Scola, B., 2020. The Strengths of Scanning Electron Microscopy in Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle. *Front. Microbiol.* 11, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02014>
- Brandi, P., Conejero, L., Cueto, F.J., Martínez-Cano, S., Dunphy, G., Gómez, M.J., Relano, C., Saz-Leal, P., Enamorado, M., Quintas, A., Dopazo, A., Amores-Iniesta, J., Del Fresno, C., Nistal-Villán, E., Ardavín, C., Nieto, A., Casanovas, M., Subiza, J.L., Sancho, D., 2022. Trained immunity induction by the inactivated mucosal vaccine MV130 protects against experimental viral respiratory infections. *Cell Rep.* 38, 110184. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110184>
- Brandtsma, A.M., Bondza, S., Evers, M., Koutstaal, R., Nederend, M., Jansen, J.H.M., Rösner, T., Valerius, T., Leusen, J.H.W., ten Broeke, T., 2019. Potent Fc Receptor Signaling by IgA Leads to Superior Killing

- of Cancer Cells by Neutrophils Compared to IgG. *Front. Immunol.* 10, 704. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00704>
- Brandtzaeg, P., 1997. Mucosal immunity in the femal genital tract. *J Reprod Immunol* 36, 23–50.
- Breedveld, A., van Egmond, M., 2019. IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front. Immunol.* 10, 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>
- Breedveld, A.C., van Gool, M.M.J., van Delft, M.A.M., van der Laken, C.J., de Vries, T.J., Jansen, I.D.C., van Egmond, M., 2021. IgA Immune Complexes Induce Osteoclast-Mediated Bone Resorption. *Front. Immunol.* 12, 651049. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651049>
- Brouwer, K.C., Lal, R.B., Mirel, L.B., Yang, C., van Eijk, A.M., Ayisi, J., Otieno, J., Nahlen, B.L., Steketee, R., Lal, A.A., Shi, Y.P., 2004. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* 18, 1187–1194. <https://doi.org/10.1097/00002030-200405210-00012>
- Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Amraoui, S., Malbec, M., Richard, L., Bourdic, K., Donahue, D.A., Lorin, V., Casartelli, N., Noel, N., Lambotte, O., Mouquet, H., Schwartz, O., 2016. Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat Commun* 7, 10844. <https://doi.org/10.1038/ncomms10844>
- Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Lorin, V., Lortat-Jacob, H., Baleux, F., Bourdic, K., Noel, N., Lambotte, O., Mouquet, H., Schwartz, O., 2017. Lack of ADCC Breadth of Human Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibodies. *J Virol* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02440-16>
- Buranapraditkun, S., Pissani, F., Teigler, J.E., Schultz, B.T., Alter, G., Marovich, M., Robb, M.L., Eller, M.A., Martin, J., Deeks, S., Michael, N.L., Streeck, H., 2017. Preservation of Peripheral T Follicular Helper Cell Function in HIV Controllers. *J. Virol.* 91, e00497-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00497-17>
- Burger, H., Weiser, B., Robinson, W.S., Lifson, J., Engleman, E., Rouzioux, C., Brun-Vézinet, F., Barré-Sinoussi, F., Montagnier, L., Chermann, J.C., 1986. Transmission of lymphadenopathy-associated virus/human T lymphotropic virus type III in sexual partners. Seropositivity does not predict infectivity in all cases. *Am. J. Med.* 81, 5–10. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90174-9)
- Caddy, S.L., Vaysburd, M., Wing, M., Foss, S., Andersen, J.T., O’Connell, K., Mayes, K., Higginson, K., Iturriza-Gómara, M., Desselberger, U., James, L.C., 2020. Intracellular neutralisation of rotavirus by VP6-specific IgG. *PLoS Pathog.* 16, e1008732. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008732>
- Calado, M., Pires, D., Conceição, C., Santos-Costa, Q., Anes, E., Azevedo-Pereira, J.M., 2023. Human immunodeficiency virus transmission-Mechanisms underlying the cell-to-cell spread of human immunodeficiency virus. *Rev. Med. Virol.* e2480. <https://doi.org/10.1002/rmv.2480>
- Canouï, E., Lécuroux, C., Avettand-Fenoël, V., Gousset, M., Rouzioux, C., Saez-Cirion, A., Meyer, L., Boufassa, F., Lambotte, O., Noël, N., and the ANRS CO21 CODEX Study Group, 2017. A Subset of Extreme Human Immunodeficiency Virus (HIV) Controllers Is Characterized by a Small HIV Blood Reservoir and a Weak T-Cell Activation Level. *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx064. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx064>
- Carapito, R., Mayr, L., Molitor, A., Verniquet, M., Schmidt, S., Tahar, O., Partisani, M., Rey, D., Lambotte, O., Bahram, S., Moog, C., 2020. A Fc $\gamma$ RIIa polymorphism has a HLA-B57 and HLA-B27 independent effect on HIV disease outcome. *Genes Immun.* 21, 263–268. <https://doi.org/10.1038/s41435-020-0106-8>
- Carayannopoulos, L., Hexham, J.M., Capra, J.D., 1996. Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Calpha2 and Calpha3 in human IgA1. *J Exp Med* 183, 1579–86.
- Cardenas, M.C., Farnan, S., Hamel, B.L., Mejia Plazas, M.C., Sintim-Aboagye, E., Littlefield, D.R., Behl, S., Punia, S., Enninga, E.A.L., Johnson, E., Temesgen, Z., Theiler, R., Gray, C.M., Chakraborty, R., 2023. Prevention of the Vertical Transmission of HIV; A Recap of the Journey so Far. *Viruses* 15, 849. <https://doi.org/10.3390/v15040849>

- Carrat, F., Figoni, J., Henny, J., Desenclos, J.-C., Kab, S., de Lamballerie, X., Zins, M., 2021. Evidence of early circulation of SARS-CoV-2 in France: findings from the population-based “CONSTANCES” cohort. *Eur. J. Epidemiol.* 36, 219–222. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00716-2>
- Casado, C., Colombo, S., Rauch, A., Martínez, R., Günthard, H.F., Garcia, S., Rodríguez, C., Del Romero, J., Telenti, A., López-Galíndez, C., 2010. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 5, e11079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011079>
- Centers for Disease Control (CDC), 1983. Prevention of acquired immune deficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 32, 101–103.
- Chadebech, P., Michel, M., Janvier, D., Yamada, K., Copie-Bergman, C., Bodivit, G., Bensussan, A., Fournie, J.-J., Godeau, B., Bierling, P., Izui, S., Noizat-Pirenne, F., 2010. IgA-mediated human autoimmune hemolytic anemia as a result of hemagglutination in the spleen, but independent of complement activation and Fc $\alpha$ RI. *Blood* 116, 4141–4147. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276162>
- Chakrabarti, B.K., Walker, L.M., Guenaga, J.F., Ghobbeh, A., Poignard, P., Burton, D.R., Wyatt, R.T., 2011. Direct antibody access to the HIV-1 membrane-proximal external region positively correlates with neutralization sensitivity. *J Virol* 85, 8217–26. <https://doi.org/10.1128/JVI.00756-11>
- Chang, L., Zhao, L., Xiao, Y., Xu, T., Chen, L., Cai, Y., Dong, X., Wang, C., Xiao, X., Ren, L., Wang, L., 2023. Serosurvey for SARS-CoV-2 among blood donors in Wuhan, China from September to December 2019. *Protein Cell* 14, 28–36. <https://doi.org/10.1093/procel/pwac013>
- Cheemarla, N.R., Watkins, T.A., Mihaylova, V.T., Wang, B., Zhao, D., Wang, G., Landry, M.L., Foxman, E.F., 2021. Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics. *J. Exp. Med.* 218, e20210583. <https://doi.org/10.1084/jem.20210583>
- Cheeseman, H.M., Carias, A.M., Evans, A.B., Olejniczak, N.J., Ziprin, P., King, D.F., Hope, T.J., Shattock, R.J., 2016. Expression Profile of Human Fc Receptors in Mucosal Tissue: Implications for Antibody-Dependent Cellular Effector Functions Targeting HIV-1 Transmission. *PLoS One* 11, e0154656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154656>
- Chen, B., 2019. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol.* 27, 878–891. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.002>
- Chen, D., Zheng, Q., Sun, L., Ji, M., Li, Y., Deng, H., Zhang, H., 2021. ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Dev. Cell* 56, 3250–3263.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.006>
- Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D.D., Stan, R., Croce, K., Mayadas, T.N., 2012. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by Fc $\gamma$ RIIB but induces neutrophil extracellular traps via Fc $\gamma$ RIIA in vivo. *Blood* 120, 4421–4431. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-401133>
- Cheng, N., Liu, M., Li, W., Sun, B., Liu, D., Wang, G., Shi, J., Li, L., 2022. Protein post-translational modification in SARS-CoV-2 and host interaction. *Front. Immunol.* 13, 1068449. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1068449>
- Chintalacheruvu, K.R., Gurbaxani, B., Morrison, S.L., 2007. Incomplete assembly of IgA2m(2) in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Immunol.* 44, 3445–3452. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.030>
- Cicala, C., Arthos, J., Fauci, A.S., 2011. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *J. Transl. Med.* 9 Suppl 1, S2. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-S1-S2>
- Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S., Sagnelli, C., Bianchi, M., Bernardini, S., Ciccozzi, M., 2019. COVID-19 Outbreak: An Overview. *Chemotherapy* 64, 215–223. <https://doi.org/10.1159/000507423>
- Clerici, M., Barassi, C., Devito, C., Pastori, C., Piconi, S., Trabattoni, D., Longhi, R., Hinkula, J., Broliden, K., Lopalco, L., 2002. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 16, 1731–41.

- Climont, N., Ambrosioni, J., González, T., Xufré, C., Casadellà, M., Noguera-Julian, M., Paredes, R., Plana, M., Grau-Expósito, J., Mallolas, J., Alcamí, J., Sánchez-Palomino, S., Miró, J.M., Hospital Clínic de Barcelona PHI investigators, 2023. Immunological and virological findings in a patient with exceptional post-treatment control: a case report. *Lancet HIV* 10, e42–e51. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(22\)00302-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(22)00302-2)
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Yarchoan, R., Redfield, R., Cleghorn, F., Blattner, W.A., Garzino-Demo, A., Colombini-Hatch, S., Margolis, D., Gallo, R.C., 2000. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13812–13817. <https://doi.org/10.1073/pnas.240469997>
- Coffey, M.J., Woffendin, C., Phare, S.M., Strieter, R.M., Markovitz, D.M., 1997. RANTES inhibits HIV-1 replication in human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 272, L1025-1029. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.272.5.L1025>
- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., Godbole, S.V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B.R., Mayer, K.H., Hoffman, I.F., Eshleman, S.H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L.A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T.E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M., Fleming, T.R., HPTN 052 Study Team, 2011. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 493–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105243>
- Corbett, K.S., Edwards, D.K., Leist, S.R., Abiona, O.M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R.A., Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, C.T., DiPiazza, A.T., Dinnon, K.H., Elbashir, S.M., Shaw, C.A., Woods, A., Fritch, E.J., Martinez, D.R., Bock, K.W., Minai, M., Nagata, B.M., Hutchinson, G.B., Wu, K., Henry, C., Bahl, K., Garcia-Dominguez, D., Ma, L., Renzi, I., Kong, W.-P., Schmidt, S.D., Wang, L., Zhang, Y., Phung, E., Chang, L.A., Loomis, R.J., Altaras, N.E., Narayanan, E., Metkar, M., Presnyak, V., Liu, C., Louder, M.K., Shi, W., Leung, K., Yang, E.S., West, A., Gully, K.L., Stevens, L.J., Wang, N., Wrapp, D., Doria-Rose, N.A., Stewart-Jones, G., Bennett, H., Alvarado, G.S., Nason, M.C., Ruckwardt, T.J., McLellan, J.S., Denison, M.R., Chappell, J.D., Moore, I.N., Morabito, K.M., Mascola, J.R., Baric, R.S., Carfi, A., Graham, B.S., 2020. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 586, 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
- Correa, A., Trajtenberg, F., Obal, G., Pritsch, O., Dighiero, G., Oppezzo, P., Buschiazzo, A., 2013. Structure of a human IgA1 Fab fragment at 1.55 Å resolution: potential effect of the constant domains on antigen-affinity modulation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 388–397. <https://doi.org/10.1107/S0907444912048664>
- Cottignies-Calamarte, A., He, F., Zhu, A., Real, F., Bomsel, M., 2023a. Protocol to detect infectious SARS-CoV-2 at low levels using in situ hybridization techniques. *STAR Protoc.* 4, 102593. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102593>
- Cottignies-Calamarte, A., Tudor, D., Bomsel, M., 2023b. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Front. Immunol.* 14.
- Coutant, J., Yu, H., Clement, M.J., Alfsen, A., Toma, F., Curmi, P.A., Bomsel, M., 2008. Both lipid environment and pH are critical for determining physiological solution structure of 3-D-conserved epitopes of the HIV-1 gp41-MPER peptide P1. *FASEB J* 22, 4338–51. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113142>
- Crowley, A.R., Ackerman, M.E., 2019. Mind the Gap: How Interspecies Variability in IgG and Its Receptors May Complicate Comparisons of Human and Non-human Primate Effector Function. *Front. Immunol.* 10.
- Crowley, A.R., Osei-Owusu, N.Y., Dekkers, G., Gao, W., Wuhrer, M., Magnani, D.M., Reimann, K.A., Pincus, S.H., Vidarsson, G., Ackerman, M.E., 2021. Biophysical Evaluation of Rhesus Macaque Fc Gamma

- Receptors Reveals Similar IgG Fc Glycoform Preferences to Human Receptors. *Front. Immunol.* 12, 754710. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.754710>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., Farese, R.V., 2013. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* 18, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- Danziger, O., Patel, R.S., DeGrace, E.J., Rosen, M.R., Rosenberg, B.R., 2022. Inducible CRISPR activation screen for interferon-stimulated genes identifies OAS1 as a SARS-CoV-2 restriction factor. *PLOS Pathog.* 18, e1010464. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010464>
- Daubeuf, S., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., Joly, E., Hudrisier, D., 2010. The Direction of Plasma Membrane Exchange between Lymphocytes and Accessory Cells by Trogocytosis Is Influenced by the Nature of the Accessory Cell. *J. Immunol.* 184, 1897–1908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901570>
- Davies, J., Jiang, L., Pan, L.Z., LaBarre, M.J., Anderson, D., Reff, M., 2001. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol. Bioeng.* 74, 288–294.
- Davis, R.S., 2007. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 525–560. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141541>
- de Castro, I.F., Volonté, L., Risco, C., 2013. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell. Microbiol.* 15, 24–34. <https://doi.org/10.1111/cmi.12029>
- de Taeye, S.W., Rispen, T., Vidarsson, G., 2019. The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies* 8, 30. <https://doi.org/10.3390/antib8020030>
- Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A., Buchbinder, S., 2015. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>
- Dekkers, G., Bentlage, A.E.H., Stegmann, T.C., Howie, H.L., Lissenberg-Thunnissen, S., Zimring, J., Rispen, T., Vidarsson, G., 2017. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *mAbs* 9, 767–773. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1323159>
- Dement-Brown, J., Newton, C.S., Ise, T., Damdinsuren, B., Nagata, S., Tolnay, M., 2012. Fc receptor-like 5 promotes B cell proliferation and drives the development of cells displaying switched isotypes. *J. Leukoc. Biol.* 91, 59–67. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211096>
- Deslandes, A., Berti, V., Tandjaoui-Lambotte, Y., Alloui, C., Carbonnelle, E., Zahar, J.R., Brichtler, S., Cohen, Y., 2020. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 106006. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106006>
- Devito, C., Hinkula, J., Kaul, R., Kimani, J., Kiama, P., Lopalco, L., Barass, C., Piconi, S., Trabattoni, D., Bwayo, J.J., Plummer, F., Clerici, M., Broliden, K., 2002. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 30, 413–20.
- Dias, S.S.G., Soares, V.C., Ferreira, A.C., Sacramento, C.Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J.R., Teixeira, L., Nunes da Silva, M.A., Barreto, E., Mattos, M., de Freitas, C.S., Azevedo-Quintanilha, I.G., Manso, P.P.A., Miranda, M.D., Siqueira, M.M., Hottz, E.D., Pão, C.R.R., Bou-Habib, D.C., Barreto-Vieira, D.F., Bozza, F.A., Souza, T.M.L., Bozza, P.T., 2020. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog.* 16, e1009127. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009127>
- Dichtl, S., Diem, G., Jäger, M., Zaderer, V., Lupoli, G., Dächert, C., Muenchhoff, M., Graf, A., Blum, H., Keppler, O.T., Lass-Flörl, C., Weiss, G., Wilflingseder, D., Posch, W., 2023. Antiviral drugs block replication of highly immune-evasive Omicron subvariants ex vivo, but fail to reduce tissue inflammation. *Antiviral Res.* 213, 105581. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105581>
- Dillon, S.M., Lee, E.J., Bramante, J.M., Barker, E., Wilson, C.C., 2014. The Natural Killer Cell Interferon-Gamma Response to Bacteria Is Diminished in Untreated HIV-1 Infection and Defects Persist

- Despite Viral Suppression. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 65, 259–267.  
<https://doi.org/10.1097/01.qai.0000435603.50598.2b>
- Duarte, R.F., Salgado, M., Sánchez-Ortega, I., Arnan, M., Canals, C., Domingo-Domenech, E., Fernández-de-Sevilla, A., González-Barca, E., Morón-López, S., Nogues, N., Patiño, B., Puertas, M.C., Clotet, B., Petz, L.D., Querol, S., Martínez-Picado, J., 2015. CCR5  $\Delta$ 32 homozygous cord blood allogeneic transplantation in a patient with HIV: a case report. *Lancet HIV* 2, e236-242.  
[https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(15\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(15)00083-1)
- Duchemin, A.M., Ernst, L.K., Anderson, C.L., 1994. Clustering of the high affinity Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI) results in phosphorylation of its associated gamma-chain. *J. Biol. Chem.* 269, 12111–12117. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32688-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32688-1)
- Duchemin, M., Khamassi, M., Xu, L., Tudor, D., Bomsel, M., 2018a. IgA Targeting Human Immunodeficiency Virus-1 Envelope gp41 Triggers Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Cross-Clade and Cooperates with gp41-Specific IgG to Increase Cell Lysis. *Front. Immunol.* 9, 244.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00244>
- Duchemin, M., Khamassi, M., Xu, L., Tudor, D., Bomsel, M., 2018b. IgA Targeting Human Immunodeficiency Virus-1 Envelope gp41 Triggers Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Cross-Clade and Cooperates with gp41-Specific IgG to Increase Cell Lysis. *Front. Immunol.* 9, 244.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00244>
- Duchemin, M., Tudor, D., Cottignies-Calamarte, A., Bomsel, M., 2020. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis of HIV-1-Infected Cells Is Efficiently Triggered by IgA Targeting HIV-1 Envelope Subunit gp41. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01141>
- Dugast, A.-S., Tonelli, A., Berger, C.T., Ackerman, M.E., Sciaranghella, G., Liu, Q., Sips, M., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Ghebremichael, M., Alter, G., 2011. Decreased Fc receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody-mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV-1 infected individuals. *Virology* 415, 160–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.012>
- Edelman, G.M., 1973. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180, 830–840.  
<https://doi.org/10.1126/science.180.4088.830>
- Elsheikh, M.M., Tang, Y., Li, D., Jiang, G., 2019. Deep latency: A new insight into a functional HIV cure. *eBioMedicine* 45, 624–629. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.020>
- Embsgenbroich, M., Burgdorf, S., 2018. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* 9.
- Emery, A., Swanstrom, R., 2021. HIV-1: To Splice or Not to Splice, That Is the Question. *Viruses* 13, 181.  
<https://doi.org/10.3390/v13020181>
- Estúa-Acosta, G.A., Zamora-Ortiz, R., Buentello-Volante, B., García-Mejía, M., Garfias, Y., 2019. Neutrophil Extracellular Traps: Current Perspectives in the Eye. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8090979>
- Evers, M., Rösner, T., Dünkel, A., Jansen, J.H.M., Baumann, N., ten Broeke, T., Nederend, M., Eichholz, K., Klausz, K., Reiding, K., Schewe, D.M., Kellner, C., Peipp, M., Leusen, J.H.W., Valerius, T., 2021. The selection of variable regions affects effector mechanisms of IgA antibodies against CD20. *Blood Adv.* 5, 3807–3820. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004598>
- Evers, M., Ten Broeke, T., Jansen, J.H.M., Nederend, M., Hamdan, F., Reiding, K.R., Meyer, S., Moerer, P., Brinkman, I., Rösner, T., Lebbink, R.J., Valerius, T., Leusen, J.H.W., 2020. Novel chimerized IgA CD20 antibodies: Improving neutrophil activation against CD20-positive malignancies. *mAbs* 12, 1795505. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1795505>
- Fantini, J., Yahj, N., Baghdiguian, S., Chermann, J.C., 1992. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J. Virol.* 66, 580–585.

- Fanucchi, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Mhlanga, M.M., 2021. The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. *Immunity* 54, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.011>
- Farfan-Morales, C.N., Cordero-Rivera, C.D., Osuna-Ramos, J.F., Monroy-Muñoz, I.E., De Jesús-González, L.A., Muñoz-Medina, J.E., Hurtado-Monzón, A.M., Reyes-Ruiz, J.M., del Ángel, R.M., 2021a. The antiviral effect of metformin on zika and dengue virus infection. *Sci. Rep.* 11, 8743. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87707-9>
- Farfan-Morales, C.N., Cordero-Rivera, C.D., Reyes-Ruiz, J.M., Hurtado-Monzón, A.M., Osuna-Ramos, J.F., González-González, A.M., De Jesús-González, L.A., Palacios-Rápalo, S.N., del Ángel, R.M., 2021b. Anti-flavivirus Properties of Lipid-Lowering Drugs. *Front. Physiol.* 12.
- Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O.G., Lemey, P., 2014. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.1256739>
- Farley, S.E., Kyle, J.E., Leier, H.C., Bramer, L.M., Weinstein, J.B., Bates, T.A., Lee, J.-Y., Metz, T.O., Schultz, C., Tafesse, F.G., 2022. A global lipid map reveals host dependency factors conserved across SARS-CoV-2 variants. *Nat. Commun.* 13, 3487. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31097-7>
- Fellay, J., Shianna, K.V., Ge, D., Colombo, S., Ledergerber, B., Weale, M., Zhang, K., Gumbs, C., Castagna, A., Cossarizza, A., Cozzi-Lepri, A., De Luca, A., Easterbrook, P., Francioli, P., Mallal, S., Martinez-Picado, J., Miro, J.M., Obel, N., Smith, J.P., Wyniger, J., Descombes, P., Antonarakis, S.E., Letvin, N.L., McMichael, A.J., Haynes, B.F., Telenti, A., Goldstein, D.B., 2007. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 317, 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1143767>
- Fernandes, Q., Inchakalody, V.P., Merhi, M., Mestiri, S., Taib, N., Moustafa Abo El-Ella, D., Bedhiafi, T., Raza, A., Al-Zaidan, L., Mohsen, M.O., Yousuf Al-Nesf, M.A., Hssain, A.A., Yassine, H.M., Bachmann, M.F., Uddin, S., Dermime, S., 2022. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann. Med.* 54, 524–540. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2031274>
- Fernández de Castro, I., Tenorio, R., Risco, C., 2021. Virus Factories. *En cycl. Virol.* 495–500. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00001-1>
- Ferre, A.L., Hunt, P.W., Critchfield, J.W., Young, D.H., Morris, M.M., Garcia, J.C., Pollard, R.B., Yee, H.F., Martin, J.N., Deeks, S.G., Shacklett, B.L., 2009. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 113, 3978–3989. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-182709>
- Ferre, A.L., Lemongello, D., Hunt, P.W., Morris, M.M., Garcia, J.C., Pollard, R.B., Yee, H.F., Martin, J.N., Deeks, S.G., Shacklett, B.L., 2010. Immunodominant HIV-specific CD8+ T-cell responses are common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers. *J. Virol.* 84, 10354–10365. <https://doi.org/10.1128/JVI.00803-10>
- Fiege, J.K., Thiede, J.M., Nanda, H.A., Matchett, W.E., Moore, P.J., Montanari, N.R., Thielen, B.K., Daniel, J., Stanley, E., Hunter, R.C., Menachery, V.D., Shen, S.S., Bold, T.D., Langlois, R.A., 2021. Single cell resolution of SARS-CoV-2 tropism, antiviral responses, and susceptibility to therapies in primary human airway epithelium. *PLoS Pathog.* 17, e1009292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009292>
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nri723>
- Flores-Villanueva, P.O., Yunis, E.J., Delgado, J.C., Vittinghoff, E., Buchbinder, S., Leung, J.Y., Ugialoro, A.M., Clavijo, O.P., Rosenberg, E.S., Kalams, S.A., Braun, J.D., Boswell, S.L., Walker, B.D., Goldfeld, A.E., 2001. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4

- homozygosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5140–5145.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.071548198>
- Forthal, D.N., Landucci, G., Bream, J., Jacobson, L.P., Phan, T.B., Montoya, B., 2007. FcγRIIIa Genotype Predicts Progression of HIV Infection. *J. Immunol.* 179, 7916–7923.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7916>
- Foss, S., Bottermann, M., Jonsson, A., Sandlie, I., James, L.C., Andersen, J.T., 2019. TRIM21-From Intracellular Immunity to Therapy. *Front. Immunol.* 10, 2049.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02049>
- Foss, S., Watkinson, R., Sandlie, I., James, L.C., Andersen, J.T., 2015. TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity. *Immunol. Rev.* 268, 328–339.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12363>
- Fourcade, L., Poudrier, J., Roger, M., 2018. Natural Immunity to HIV: A Template for Vaccine Strategies. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10040215>
- Franco, A., Damdinsuren, B., Ise, T., Dement-Brown, J., Li, H., Nagata, S., Tolnay, M., 2013. Human Fc receptor-like 5 binds intact IgG via mechanisms distinct from those of Fc receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 5739–5746. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202860>
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 176, 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T., Hayami, M., 1988. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* 333, 457–461. <https://doi.org/10.1038/333457a0>
- Gall, V.A., Philips, A.V., Qiao, N., Clise-Dwyer, K., Perakis, A.A., Zhang, M., Clifton, G.T., Sukhumalchandra, P., Ma, Q., Reddy, S.M., Yu, D., Mouldrem, J.J., Peoples, G.E., Alatrash, G., Mittendorf, E.A., 2017. Trastuzumab Increases HER2 Uptake and Cross-Presentation by Dendritic Cells. *Cancer Res.* 77, 5374–5383. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2774>
- Ganor, Y., Real, F., Sennepin, A., Dutertre, C.-A., Prevedel, L., Xu, L., Tudor, D., Charmeteau, B., Couedel-Courteille, A., Marion, S., Zenak, A.-R., Jourdain, J.-P., Zhou, Z., Schmitt, A., Capron, C., Eugenin, E.A., Cheynier, R., Revol, M., Cristofari, S., Hosmalin, A., Bomsel, M., 2019. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat. Microbiol.* 4, 633–644. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0335-z>
- Ganor, Y., Zhou, Z., Bodo, J., Tudor, D., Leibowitch, J., Mathez, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Revol, M., Bomsel, M., 2013. The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages. *Mucosal Immunol* 6, 776–86.  
<https://doi.org/10.1038/mi.2012.116>
- Ganor, Y., Zhou, Z., Tudor, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Gibault, L., Thiounn, N., Tomasini, J., Wolf, J.P., Bomsel, M., 2010. Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. *Mucosal Immunol* 3, 506–22.  
<https://doi.org/10.1038/mi.2010.32>
- Gassen, N.C., Papies, J., Bajaj, T., Emanuel, J., Dethloff, F., Chua, R.L., Trimpert, J., Heinemann, N., Niemeyer, C., Weege, F., Hönzke, K., Aschman, T., Heinz, D.E., Weckmann, K., Ebert, T., Zellner, A., Lennarz, M., Wyler, E., Schroeder, S., Richter, A., Niemeyer, D., Hoffmann, K., Meyer, T.F., Heppner, F.L., Corman, V.M., Landthaler, M., Hocke, A.C., Morkel, M., Osterrieder, N., Conrad, C., Eils, R., Radbruch, H., Gialisco, P., Drosten, C., Müller, M.A., 2021. SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals. *Nat. Commun.* 12, 3818. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24007-w>
- Gaudieri, S., Nolan, D., McKinnon, E., Witt, C.S., Mallal, S., Christiansen, F.T., 2005. Associations between KIR epitope combinations expressed by HLA-B/-C haplotypes found in an HIV-1 infected study

- population may influence NK mediated immune responses. *Mol. Immunol.* 42, 557–560. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.041>
- Gayet, R., Michaud, E., Nicoli, F., Chanut, B., Paul, M., Rochereau, N., Guillon, C., He, Z., Papagno, L., Bioley, G., Cortes, B., Paul, S., 2020. Impact of IgA isoforms on their ability to activate dendritic cells and to prime T cells. *Eur. J. Immunol.* 50, 1295–1306. <https://doi.org/10.1002/eji.201948177>
- Gb, C., Rt, G., Dm, D., O, M., Bk, C., JI, S., D, B., 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80065-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80065-5)
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–97.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., Monteiro, R.C., 2001. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which. *J Immunol* 166, 346–52.
- Genovese, L., Nebuloni, M., Alfano, M., 2013. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load. *Front. Immunol.* 4, 86. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00086>
- Getahun, A., Cambier, J.C., 2015. Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol. Rev.* 268, 66–73. <https://doi.org/10.1111/imr.12336>
- Gill, P.S., Ozment, T.R., Lewis, N.H., Sherwood, E.R., Williams, D.L., 2022. Trained Immunity Enhances Human Monocyte Function in Aging and Sepsis. *Front. Immunol.* 13.
- Gómez-Román, V.R., Florese, R.H., Patterson, L.J., Peng, B., Venzon, D., Aldrich, K., Robert-Guroff, M., 2006. A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 308, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.09.018>
- Gondois-Rey, F., Chéret, A., Granjeaud, S., Mallet, F., Bidaut, G., Lécuroux, C., Ploquin, M., Müller-Trutwin, M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoël, V., Moretta, A., Pialoux, G., Goujard, C., Meyer, L., Olive, D., 2017. NKG2C+ memory-like NK cells contribute to the control of HIV viremia during primary infection: Optiprim-ANRS 147. *Clin. Transl. Immunol.* 6, e150. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.22>
- Gong, S., Lakhashe, S.K., Hariraju, D., Scinto, H., Lanzavecchia, A., Cameroni, E., Corti, D., Ratcliffe, S.J., Rogers, K.A., Xiao, P., Fontenot, J., Villinger, F., Ruprecht, R.M., 2021. Cooperation Between Systemic IgG1 and Mucosal Dimeric IgA2 Monoclonal Anti-HIV Env Antibodies: Passive Immunization Protects Indian Rhesus Macaques Against Mucosal SHIV Challenges. *Front. Immunol.* 12.
- Gonzalez, S.M., Aguilar-Jimenez, W., Su, R.-C., Rugeles, M.T., 2019. Mucosa: Key Interactions Determining Sexual Transmission of the HIV Infection. *Front. Immunol.* 10.
- Gonzalez, S.M., Zapata, W., Rugeles, M.T., 2016. Role of Regulatory T Cells and Inhibitory Molecules in the Development of Immune Exhaustion During Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Viral Immunol.* 29, 2–10. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0066>
- Gribble, J., Stevens, L.J., Agostini, M.L., Anderson-Daniels, J., Chappell, J.D., Lu, X., Pruijssers, A.J., Routh, A.L., Denison, M.R., 2021. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. *PLOS Pathog.* 17, e1009226. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009226>
- Grivel, J.-C., Shattock, R.J., Margolis, L.B., 2011. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J. Transl. Med.* 9, S6. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-S1-S6>
- Grootemaat, A.E., van der Niet, S., Scholl, E.R., Roos, E., Schurink, B., Bugiani, M., Miller, S.E., Larsen, P., Pankras, J., Reits, E.A., van der Wel, N.N., 2022. Lipid and Nucleocapsid N-Protein Accumulation in COVID-19 Patient Lung and Infected Cells. *Microbiol. Spectr.* 10, e01271-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01271-21>

- Gross, A.S., Zimmermann, A., Pendl, T., Schroeder, S., Schoenlechner, H., Knittelfelder, O., Lamplmayr, L., Santiso, A., Aufschneider, A., Waltenstorfer, D., Ortonobes Lara, S., Stryeck, S., Kast, C., Ruckstuhl, C., Hofer, S.J., Michelitsch, B., Woelflingseder, M., Müller, R., Carmona-Gutierrez, D., Madl, T., Büttner, S., Fröhlich, K.-U., Shevchenko, A., Eisenberg, T., 2019. Acetyl-CoA carboxylase 1-dependent lipogenesis promotes autophagy downstream of AMPK. *J. Biol. Chem.* 294, 12020–12039. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007020>
- Gruell, H., Klein, F., 2018. Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection. *Retrovirology* 15. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0455-9>
- Gruell, H., Schommers, P., 2022. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 and concepts for application. *Curr. Opin. Virol.* 54, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101211>
- Gunst, J.D., Pahus, M.H., Rosás-Umbert, M., Lu, I.-N., Benfield, T., Nielsen, H., Johansen, I.S., Mohey, R., Østergaard, L., Klastrop, V., Khan, M., Schleimann, M.H., Olesen, R., Støvring, H., Denton, P.W., Kinloch, N.N., Copertino, D.C., Ward, A.R., Alberto, W.D.C., Nielsen, S.D., Puertas, M.C., Ramos, V., Reeves, J.D., Petropoulos, C.J., Martinez-Picado, J., Brumme, Z.L., Jones, R.B., Fox, J., Tolstrup, M., Nussenzweig, M.C., Caskey, M., Fidler, S., Søgaard, O.S., 2022. Early intervention with 3BNC117 and romidepsin at antiretroviral treatment initiation in people with HIV-1: a phase 1b/2a, randomized trial. *Nat. Med.* 28, 2424–2435. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02023-7>
- Guo, Z., Jin, Q., Li, P., Xing, G., Lu, Q., Zhang, G., 2023. Potential cross-species transmission risks of emerging swine enteric coronavirus to human beings. *J. Med. Virol.* 95, e28919. <https://doi.org/10.1002/jmv.28919>
- Gupta, R.K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L.E., Mok, H.P., Peppas, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A.M.J., Lee, H., Grant, P., Nastouli, E., Lambert, J., Pace, M., Salasc, F., Monit, C., Innes, A.J., Muir, L., Waters, L., Frater, J., Lever, A.M.L., Edwards, S.G., Gabriel, I.H., Olavarria, E., 2019. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 568, 244–248. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- Hajjar, L.A., Costa, I.B.S. da S., Rizk, S.I., Biselli, B., Gomes, B.R., Bittar, C.S., de Oliveira, G.Q., de Almeida, J.P., de Oliveira Bello, M.V., Garzillo, C., Leme, A.C., Elena, M., Val, F., de Almeida Lopes, M., Lacerda, M.V.G., Ramires, J.A.F., Kalil Filho, R., Teboul, J.-L., Landoni, G., 2021. Intensive care management of patients with COVID-19: a practical approach. *Ann. Intensive Care* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00820-w>
- Halper-Stromberg, A., Lu, C.L., Klein, F., Horwitz, J.A., Bournazos, S., Nogueira, L., Eisenreich, T.R., Liu, C., Gazumyan, A., Schaefer, U., Furze, R.C., Seaman, M.S., Prinjha, R., Tarakhovskiy, A., Ravetch, J.V., Nussenzweig, M.C., 2014. Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* 158, 989–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.043>
- Handen, J.S., Rosenberg, H.F., 1997. Suppression of HIV-1 transcription by β-chemokines RANTES, MIP1-α, and MIP-1β is not mediated by the NFAT-1 enhancer element. *FEBS Lett.* 410, 301–302. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00654-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00654-6)
- Hansen, I.S., Hoepel, W., Zaat, S.A.J., Baeten, D.L.P., den Dunnen, J., 2017. Serum IgA Immune Complexes Promote Proinflammatory Cytokine Production by Human Macrophages, Monocytes, and Kupffer Cells through FcαRI-TLR Cross-Talk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 199, 4124–4131. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700883>
- Hansen, I.S., Krabbendam, L., Bernink, J.H., Loayza-Puch, F., Hoepel, W., van Burgsteden, J.A., Kuijper, E.C., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Zaat, S.A.J., Agami, R., Vidarsson, G., van den Brink, G.R., de Jong, E.C., Wildenberg, M.E., Baeten, D.L.P., Everts, B., den Dunnen, J., 2018. FcαRI co-stimulation converts human intestinal CD103+ dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic reprogramming. *Nat. Commun.* 9, 863. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03318-5>

- Haque, Ashwaq, O., Sarief, A., Azad John Mohamed, A.K., 2020. A comprehensive review about SARS-CoV-2. *Future Virol.* 15, 625–648. <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0124>
- Harms, M., Smith, N., Han, M., Groß, R., von Maltitz, P., Stürzel, C., Ruiz-Blanco, Y.B., Almeida-Hernández, Y., Rodriguez-Alfonso, A., Cathelin, D., Caspar, B., Tahar, B., Sayettat, S., Bekaddour, N., Vanshylla, K., Kleipass, F., Wiese, S., Ständker, L., Klein, F., Lagane, B., Boonen, A., Schols, D., Benichou, S., Sanchez-Garcia, E., Herbeuval, J.-P., Münch, J., 2023. Spermine and spermidine bind CXCR4 and inhibit CXCR4- but not CCR5-tropic HIV-1 infection. *Sci. Adv.* 9, eadf8251. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf8251>
- Hartigan-O'Connor, D.J., Hirao, L.A., McCune, J.M., Dandekar, S., 2011. Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 221–227. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32834577b3>
- Hasselrot, K., Bratt, G., Hirbod, T., Säberg, P., Ehnlund, M., Lopalco, L., Sandström, E., Broliden, K., 2010. Orally exposed uninfected individuals have systemic anti-HIV responses associating with partners' viral load. *AIDS Lond. Engl.* 24, 35–43. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283329853>
- Haynes, B.F., Burton, D.R., Mascola, J.R., 2019. Multiple roles for HIV broadly neutralizing antibodies. *Sci. Transl. Med.* 11, eaaz2686. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz2686>
- Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., Liao, H.-X., DeVico, A.L., Lewis, G.K., Williams, C., Pinter, A., Fong, Y., Janes, H., DeCamp, A., Huang, Y., Rao, M., Billings, E., Karasavvas, N., Robb, M.L., Ngauy, V., de Souza, M.S., Paris, R., Ferrari, G., Bailer, R.T., Soderberg, K.A., Andrews, C., Berman, P.W., Frahm, N., De Rosa, S.C., Alpert, M.D., Yates, N.L., Shen, X., Koup, R.A., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Rerks-Ngarm, S., Michael, N.L., Kim, J.H., 2012. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *N. Engl. J. Med.* 366, 1275–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113425>
- Haynes, B.F., Wiehe, K., Borrow, P., Saunders, K.O., Korber, B., Wagh, K., McMichael, A.J., Kelsoe, G., Hahn, B.H., Alt, F., Shaw, G.M., 2023. Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 23, 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00753-w>
- Heemskerk, N., Grujijns, M., Temming, A.R., Heineke, M.H., Gout, D.Y., Hellingman, T., Tuk, C.W., Winter, P.J., Lissenberg-Thunnissen, S., Bentlage, A.E., de Donatis, M., Bögels, M., Rösner, T., Valerius, T., Bakema, J.E., Vidarsson, G., van Egmond, M., 2021. Augmented antibody-based anticancer therapeutics boost neutrophil cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 131, 134680. <https://doi.org/10.1172/JCI134680>
- Heineke, M.H., Egmond, M. van, 2017. Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse? *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 184–192. <https://doi.org/10.1111/eci.12716>
- Hendel, H., Caillat-Zucman, S., Lebuane, H., Carrington, M., O'Brien, S., Andrieu, J.M., Schächter, F., Zagury, D., Rappaport, J., Winkler, C., Nelson, G.W., Zagury, J.F., 1999. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 6942–6946.
- Henriquez, S., Lécuroux, C., Bitu, M., Avettand-Fenoel, V., Churaqui, F., Catalan, P., Chéret, A., Boufassa, F., Saez-Cirion, A., Monceaux, V., Meyer, L., Goujard, C., Lambotte, O., Bourgeois, C., ANRS CO6 PRIMO, the ANRS CO21 CODEX cohorts, 2019. The proportion of CD57+ cells among effector CD8+ T cells is lower in HIV controllers compared with antiretroviral therapy-treated patients. *AIDS Lond. Engl.* 33, 2137–2147. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002342>
- Herr, A.B., Ballister, E.R., Bjorkman, P.J., 2003. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcαRI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* 423, 614–620. <https://doi.org/10.1038/nature01685>
- Hessell, A.J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C.E., Beurskens, F.J., Bakker, J.M., Lanigan, C.M., Landucci, G., Forthal, D.N., Parren, P.W., Marx, P.A., Burton, D.R., 2007. Fc receptor but not

- complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449, 101–4. <https://doi.org/10.1038/nature06106>
- Hessell, A.J., Rakasz, E.G., Poignard, P., Hangartner, L., Landucci, G., Forthal, D.N., Koff, W.C., Watkins, D.I., Burton, D.R., 2009. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog* 5, e1000433. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000433>
- Ho, D.D., Huang, Y., Yu, J., 2018. Bispecific HIV-1 neutralizing antibodies. US9884905B2.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.-M., Moog, C., 2006. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J. Virol.* 80, 6177–6181. <https://doi.org/10.1128/JVI.02625-05>
- Hou, P., Wang, X., Wang, H., Wang, T., Yu, Z., Xu, C., Zhao, Yudong, Wang, W., Zhao, Yong, Chu, F., Chang, H., Zhu, H., Lu, J., Zhang, F., Liang, X., Li, X., Wang, S., Gao, Y., He, H., 2023. The ORF7a protein of SARS-CoV-2 initiates autophagy and limits autophagosome-lysosome fusion via degradation of SNAP29 to promote virus replication. *Autophagy* 19, 551–569. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2084686>
- Hou, P., Wang, X., Wang, H., Wang, T., Yu, Z., Xu, C., Zhao, Yudong, Wang, W., Zhao, Yong, Chu, F., Chang, H., Zhu, H., Lu, J., Zhang, F., Liang, X., Li, X., Wang, S., Gao, Y., He, H., 2022. The ORF7a protein of SARS-CoV-2 initiates autophagy and limits autophagosome-lysosome fusion via degradation of SNAP29 to promote virus replication. *Autophagy* 1–19. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2084686>
- Houzet, L., Matusali, G., Dejuq-Rainsford, N., 2014. Origins of HIV-infected Leukocytes and Virions in Semen. *J. Infect. Dis.* 210, S622–S630. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu328>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., Shi, Z.-L., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, W.-S., Hughes, S.H., 2012. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006882. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Hübner, W., McNerney, G.P., Chen, P., Dale, B.M., Gordon, R.E., Chuang, F.Y.S., Li, X.-D., Asmuth, D.M., Huser, T., Chen, B.K., 2009. Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science* 323, 1743–1747. <https://doi.org/10.1126/science.1167525>
- Hui, X., Zhang, L., Cao, L., Huang, K., Zhao, Y., Zhang, Y., Chen, X., Lin, X., Chen, M., Jin, M., 2021. SARS-CoV-2 promote autophagy to suppress type I interferon response. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 180. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00574-8>
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., Blau, I.W., Hofmann, W.K., Thiel, E., 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360, 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., Mulkerrin, M.G., 2001. Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement. *J. Immunol.* 166, 2571–2575. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2571>
- Iqbal, S.M., Ball, T.B., Kimani, J., Kiama, P., Thottingal, P., Embree, J.E., Fowke, K.R., Plummer, F.A., 2005. Elevated T Cell Counts and RANTES Expression in the Genital Mucosa of HIV-1–Resistant Kenyan Commercial Sex Workers. *J. Infect. Dis.* 192, 728–738. <https://doi.org/10.1086/432482>

- Itami, H., Hara, S., Samejima, K., Tsushima, H., Morimoto, K., Okamoto, K., Kosugi, T., Kawano, T., Fujiki, K., Kitada, H., Hatakeyama, K., Tsuruya, K., Ohbayashi, C., 2020. Complement activation is associated with crescent formation in IgA nephropathy. *Virchows Arch.* <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02800-0>
- Iwasaki, S., Masuda, S., Baba, T., Tomaru, U., Katsumata, K., Kasahara, M., Ishizu, A., 2011. Plasma-dependent, antibody- and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry A* 79A, 46–56. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20984>
- Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Contreras, F.-X., Rodriguez-Plata, M.T., Glass, B., Erkizia, I., Prado, J.G., Casas, J., Fabriàs, G., Kräusslich, H.-G., Martinez-Picado, J., 2012. Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1. *PLOS Biol.* 10, e1001315. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001315>
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B., Choe, H., 2022. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jagannathan, P., Osborne, C.M., Royce, C., Manion, M.M., Tilton, J.C., Li, L., Fischer, S., Hallahan, C.W., Metcalf, J.A., McLaughlin, M., Pipeling, M., McDyer, J.F., Manley, T.J., Meier, J.L., Altman, J.D., Hertel, L., Davey, R.T., Connors, M., Migueles, S.A., 2009. Comparisons of CD8+ T cells specific for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus reveal differences in frequency, immunodominance, phenotype, and interleukin-2 responsiveness. *J. Virol.* 83, 2728–2742. <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-08>
- Jain, S., Rosenthal, K.L., 2011. The gp41 epitope, QARVLAVERY, is highly conserved and a potent inducer of IgA that neutralizes HIV-1 and inhibits viral transcytosis. *Mucosal Immunol.* 4, 539–553. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.21>
- James, L.C., Keeble, A.H., Khan, Z., Rhodes, D.A., Trowsdale, J., 2007. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6200–6205. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609174104>
- Jansson, M., Popovic, M., Karlsson, A., Cocchi, F., Rossi, P., Albert, J., Wigzell, H., 1996. Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15382–15387. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15382>
- Johnson, B.A., Xie, X., Bailey, A.L., Kalveram, B., Lokugamage, K.G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J.K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Winkler, E.S., Swetnam, D., Plante, J.A., Aguilar, P., Plante, K.S., Popov, V., Lee, B., Weaver, S.C., Suthar, M.S., Routh, A.L., Ren, P., Ku, Z., An, Z., Debbink, K., Diamond, M.S., Shi, P.-Y., Freiberg, A.N., Menachery, V.D., 2021. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature* 591, 293–299. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03237-4>
- Jolly, C., Kashafi, K., Hollinshead, M., Sattentau, Q.J., 2004. HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J. Exp. Med.* 199, 283–293. <https://doi.org/10.1084/jem.20030648>
- Joseph, J., 2022. Harnessing Nasal Immunity with IgA to Prevent Respiratory Infections. *Immuno* 2, 571–583. <https://doi.org/10.3390/immuno2040036>
- Jusforgues-Saklani, H., Uhl, M., Blachère, N., Lemaître, F., Lantz, O., Bousso, P., Braun, D., Moon, J.J., Albert, M.L., 2008. Antigen Persistence Is Required for Dendritic Cell Licensing and CD8+ T Cell Cross-Priming. *J. Immunol.* 181, 3067–3076. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3067>
- Kamen, L., Myneni, S., Langsdorf, C., Kho, E., Ordonia, B., Thakurta, T., Zheng, K., Song, A., Chung, S., 2019. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *J. Immunol. Methods* 468, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.03.001>
- Kaneko, S., Nukui, Y., Arashiro, T., Aiso, Y., Sugii, M., Hadano, Y., Nagata, K., Taki, R., Ueda, K., Hanada, S., Suzuki, S., Harada, N., Yamaguchi, Y., Nakanishi, H., Kurosaki, M., Nagasawa, M., Izumi, N., 2021.

- Clinical validation of an immunochromatographic SARS-Cov-2 IgM/IgG antibody assay with Japanese cohort. *J. Med. Virol.* 93, 569–572. <https://doi.org/10.1002/jmv.26363>
- Kaneko, Y., 2006. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* 313, 670–673. <https://doi.org/10.1126/science.1129594>
- Kapur, R., Kustiawan, I., Vestrheim, A., Koeleman, C.A.M., Visser, R., Einarsdottir, H.K., Porcelijn, L., Jackson, D., Kumpel, B., Deelder, A.M., Blank, D., Skogen, B., Killie, M.K., Michaelsen, T.E., de Haas, M., Rispens, T., van der Schoot, C.E., Wuhrer, M., Vidarsson, G., 2014. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood* 123, 471–480. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-527978>
- Kara, S., Amon, L., Lühr, J.J., Nimmerjahn, F., Dudziak, D., Lux, A., 2020. Impact of Plasma Membrane Domains on IgG Fc Receptor Function. *Front. Immunol.* 11.
- Katz, J.D., Mitsuyasu, R., Gottlieb, M.S., Lebow, L.T., Bonavida, B., 1987. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. II. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 139, 55–60.
- Katz, J.D., Nishanian, P., Mitsuyasu, R., Bonavida, B., 1988. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-mediated destruction of human immunodeficiency virus (HIV)-coated CD4+ T lymphocytes by acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) effector cells. *J. Clin. Immunol.* 8, 453–458. <https://doi.org/10.1007/BF00916950>
- Kaul, R., Plummer, F.A., Kimani, J., Dong, T., Kiama, P., Rostron, T., Njagi, E., MacDonald, K.S., Bwayo, J.J., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2000. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 1602–1611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1602>
- Ke, P.-Y., 2018. The Multifaceted Roles of Autophagy in Flavivirus-Host Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3940. <https://doi.org/10.3390/ijms19123940>
- Kerr, M.A., 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 271, 285–296. <https://doi.org/10.1042/bj2710285>
- Khamassi, M., Xu, L., Rey, J., Duchemin, M., Bouceba, T., Tuffery, P., Tudor, D., Bomsel, M., 2020. The CH1 $\alpha$  domain of mucosal gp41 IgA contributes to antibody specificity and antiviral functions in HIV-1 highly exposed Sero-Negative individuals. *PLOS Pathog.* 16, e1009103. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009103>
- Kikuno, K., Kang, D.-W., Tahara, K., Torii, I., Kubagawa, H.M., Ho, K.J., Baudino, L., Nishizaki, N., Shibuya, A., Kubagawa, H., 2007. Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc $\alpha$ / $\mu$  receptor. *Eur. J. Immunol.* 37, 3540–3550. <https://doi.org/10.1002/eji.200737655>
- King, H.W., Orban, N., Riches, J.C., Clear, A.J., Warnes, G., Teichmann, S.A., James, L.K., 2021. Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Sci. Immunol.* 6, eabe6291. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe6291>
- Klein, M.R., Miedema, F., 1995. Long-term survivors of HIV-1 infection. *Trends Microbiol.* 3, 386–391. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)88984-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)88984-2)
- Klein, M.R., van der Burg, S.H., Hovenkamp, E., Holwerda, A.M., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Miedema, F., 1998. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 9), 2191–2201. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-9-2191>
- Ko, S.-Y., Pegu, A., Rudicell, R.S., Yang, Z., Joyce, M.G., Chen, X., Wang, K., Bao, S., Kraemer, T.D., Rath, T., Zeng, M., Schmidt, S.D., Todd, J.-P., Penzak, S.R., Saunders, K.O., Nason, M.C., Haase, A.T., Rao, S.S., Blumberg, R.S., Mascola, J.R., Nabel, G.J., 2014. Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature* 514, 642–645. <https://doi.org/10.1038/nature13612>

- Koenderman, L., 2019. Inside-Out Control of Fc-Receptors. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00544>
- Koepke, L., Hirschenberger, M., Hayn, M., Kirchhoff, F., Sparrer, K.M., 2021. Manipulation of autophagy by SARS-CoV-2 proteins. *Autophagy* 17, 2659–2661. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1953847>
- Kobic, G., Hillen, H.S., Tegunov, D., Dienemann, C., Seitz, F., Schmitzova, J., Farnung, L., Siewert, A., Höbartner, C., Cramer, P., 2021. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat. Commun.* 12, 279. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>
- Kong, R., Louder, M.K., Wagh, K., Bailer, R.T., deCamp, A., Greene, K., Gao, H., Taft, J.D., Gazumyan, A., Liu, C., Nussenzweig, M.C., Korber, B., Montefiori, D.C., Mascola, J.R., 2014. Improving Neutralization Potency and Breadth by Combining Broadly Reactive HIV-1 Antibodies Targeting Major Neutralization Epitopes. *J. Virol.* 89, 2659–2671. <https://doi.org/10.1128/JVI.03136-14>
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., Mizushima, N., 2013. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* 9, 1491–1499. <https://doi.org/10.4161/auto.25529>
- Kumamoto, Y., Iwasaki, A., 2012. Unique features of antiviral immune system of the vaginal mucosa. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.006>
- Kumar, A.V., Mills, J., Lapierre, L.R., 2022. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front. Cell Dev. Biol.* 10.
- Kwon, Y., Kaake, R.M., Echeverria, I., Suarez, M., Karimian Shamsabadi, M., Stoneham, C., Ramirez, P.W., Kress, J., Singh, R., Sali, A., Krogan, N., Guatelli, J., Jia, X., 2020. Structural basis of CD4 downregulation by HIV-1 Nef. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 822–828. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0463-z>
- Kwon, Y.D., Georgiev, I.S., Ofek, G., Zhang, B., Asokan, M., Bailer, R.T., Bao, A., Caruso, W., Chen, X., Choe, M., Druz, A., Ko, S.-Y., Louder, M.K., McKee, K., O'Dell, S., Pegu, A., Rudicell, R.S., Shi, W., Wang, K., Yang, Y., Alger, M., Bender, M.F., Carlton, K., Cooper, J.W., Blinn, J., Eudailey, J., Lloyd, K., Parks, R., Alam, S.M., Haynes, B.F., Padte, N.N., Yu, J., Ho, D.D., Huang, J., Connors, M., Schwartz, R.M., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2016. Optimization of the Solubility of HIV-1-Neutralizing Antibody 10E8 through Somatic Variation and Structure-Based Design. *J. Virol.* 90, 5899–5914. <https://doi.org/10.1128/JVI.03246-15>
- Lajoie, J., Juno, J., Burgener, A., Rahman, S., Mogk, K., Wachihi, C., Mwanjewe, J., Plummer, F.A., Kimani, J., Ball, T.B., Fowke, K.R., 2012. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol.* 5, 277–287. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.7>
- Lakhashe, S.K., Amacker, M., Hariraju, D., Vyas, H.K., Morrison, K.S., Weiner, J.A., Ackerman, M.E., Roy, V., Alter, G., Ferrari, G., Montefiori, D.C., Tomaras, G.D., Sawant, S., Yates, N.L., Gast, C., Fleury, S., Ruprecht, R.M., 2022. Cooperation Between Systemic and Mucosal Antibodies Induced by Virosomal Vaccines Targeting HIV-1 Env: Protection of Indian Rhesus Macaques Against Low-Dose Intravaginal SHIV Challenges. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.788619>
- Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Delfraissy, J.F., 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23, 897–906. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328329f97d>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., Wang, X., 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Landais, E., Moore, P.L., 2018. Development of broadly neutralizing antibodies in HIV-1 infected elite neutralizers. *Retrovirology* 15, 61. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0443-0>

- Lee, J.S., Park, S., Jeong, H.W., Ahn, J.Y., Choi, S.J., Lee, H., Choi, B., Nam, S.K., Sa, M., Kwon, J.-S., Jeong, S.J., Lee, H.K., Park, S.H., Park, S.-H., Choi, J.Y., Kim, S.-H., Jung, I., Shin, E.-C., 2020. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 5, eabd1554. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd1554>
- Lee, S., Yoon, G.Y., Myoung, J., Kim, S.-J., Ahn, D.-G., 2020. Robust and persistent SARS-CoV-2 infection in the human intestinal brush border expressing cells. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 2169–2179. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1827985>
- León, B., Ballesteros-Tato, A., Randall, T.D., Lund, F.E., 2014. Prolonged antigen presentation by immune complex-binding dendritic cells programs the proliferative capacity of memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 211, 1637–1655. <https://doi.org/10.1084/jem.20131692>
- Lewis, G.K., Ackerman, M.E., Scarlatti, G., Moog, C., Robert-Guroff, M., Kent, S.J., Overbaugh, J., Reeves, R.K., Ferrari, G., Thyagarajan, B., 2019. Knowns and Unknowns of Assaying Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Against HIV-1. *Front. Immunol.* 10, 1025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01025>
- Li, B., Xu, L., Tao, F., Xie, K., Wu, Z., Li, Y., Li, J., Chen, K., Pi, C., Mendelsohn, A., Larrick, J.W., Gu, H., Fang, J., 2017. Simultaneous exposure to FcγR and FcαR on monocytes and macrophages enhances antitumor activity in vivo. *Oncotarget* 8, 39356. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17000>
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. (Yijuan), Kiss, R., Amanullah, A., 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* 2, 466–479. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>
- Li, W., Hulswit, R.J.G., Kenney, S.P., Widjaja, I., Jung, K., Alhamo, M.A., van Dieren, B., van Kuppeveld, F.J.M., Saif, L.J., Bosch, B.-J., 2018. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5135–E5143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802879115>
- Li, X., Hou, P., Ma, W., Wang, Xuefeng, Wang, H., Yu, Z., Chang, H., Wang, T., Jin, S., Wang, Xue, Wang, W., Zhao, Yudong, Zhao, Yong, Xu, C., Ma, X., Gao, Y., He, H., 2022. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy. *Cell. Mol. Immunol.* 19, 67–78. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00807-4>
- Liang, H., Luo, D., Liao, H., Li, S., 2022. Coronavirus Usurps the Autophagy-Lysosome Pathway and Induces Membranes Rearrangement for Infection and Pathogenesis. *Front. Microbiol.* 13.
- Lin, F., Shen, K., 2020. Type I interferon: From innate response to treatment for COVID-19. *Pediatr. Investig.* 4, 275–280. <https://doi.org/10.1002/ped4.12226>
- Lippai, M., Löw, P., 2014. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014, e832704. <https://doi.org/10.1155/2014/832704>
- Liu, H., Hong, K., Ma, J., Yuan, L., Liu, S., Chen, J., Zhang, Y., Ruan, Y., Xu, J., Shao, Y., 2006. Identification of HIV-1 specific T lymphocyte responses in highly exposed persistently seronegative Chinese. *Chin. Med. J. (Engl.)* 119, 1616–1621.
- Liu, H., Su, X., Si, L., Lu, L., Jiang, S., 2018. The development of HIV vaccines targeting gp41 membrane-proximal external region (MPER): challenges and prospects. *Protein Cell* 9, 596–615. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0534-7>
- Liu, J., Yu, J., McMahan, K., Jacob-Dolan, C., He, X., Giffin, V., Wu, C., Sciacca, M., Powers, O., Nampanya, F., Miller, J., Lifton, M., Hope, D., Hall, K., Hachmann, N.P., Chung, B., Anioke, T., Li, W., Muench, J., Gamblin, A., Boursiquot, M., Cook, A., Lewis, M.G., Andersen, H., Barouch, D.H., 2022. CD8 T cells contribute to vaccine protection against SARS-CoV-2 in macaques. *Sci. Immunol.* 7, eabq7647. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq7647>
- Liu, X., Lu, L., Yang, Z., Palaniyandi, S., Zeng, R., Gao, L.-Y., Mosser, D.M., Roopenian, D.C., Zhu, X., 2011. The neonatal FcR-mediated presentation of immune-complexed antigen is associated with

- endosomal and phagosomal pH and antigen stability in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4674–4686. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003584>
- Liu, Y., Goroshko, S., Leung, L.Y.T., Dong, S., Khan, S., Campisi, P., Propst, E.J., Wolter, N.E., Grunebaum, E., Ehrhardt, G.R.A., 2020. FCRL4 Is an Fc Receptor for Systemic IgA, but Not Mucosal Secretory IgA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 205, 533–538. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000293>
- Lohse, S., Loew, S., Kretschmer, A., Jansen, J.H.M., Meyer, S., Broeke, T. ten, Rösner, T., Dechant, M., Derer, S., Klausz, K., Kellner, C., Schwanbeck, R., French, R.R., Tipton, T.R.W., Cragg, M.S., Schewe, D.M., Peipp, M., Leusen, J.H.W., Valerius, T., 2018a. Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. *Br. J. Haematol.* 181, 413–417. <https://doi.org/10.1111/bjh.14624>
- Lohse, S., Loew, S., Kretschmer, A., Jansen, J.H.M., Meyer, S., ten Broeke, T., Rösner, T., Dechant, M., Derer, S., Klausz, K., Kellner, C., Schwanbeck, R., French, R.R., Tipton, T.R.W., Cragg, M.S., Schewe, D.M., Peipp, M., Leusen, J.H.W., Valerius, T., 2018b. Effector mechanisms of IgA antibodies against CD20 include recruitment of myeloid cells for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity. *Br. J. Haematol.* 181, 413–417. <https://doi.org/10.1111/bjh.14624>
- Lohse, S., Meyer, S., Meulenbroek, L.A.P.M., Jansen, J.H.M., Nederend, M., Kretschmer, A., Klausz, K., Möglinger, U., Derer, S., Rösner, T., Kellner, C., Schewe, D., Sondermann, P., Tiwari, S., Kolarich, D., Peipp, M., Leusen, J.H.W., Valerius, T., 2016. An Anti-EGFR IgA That Displays Improved Pharmacokinetics and Myeloid Effector Cell Engagement *In Vivo*. *Cancer Res.* 76, 403–417. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1232>
- Lombana, T.N., Rajan, S., Zorn, J.A., Mandikian, D., Chen, E.C., Estevez, A., Yip, V., Bravo, D.D., Phung, W., Farahi, F., Viajar, S., Lee, S., Gill, A., Sandoval, W., Wang, J., Ciferri, C., Boswell, C.A., Matsumoto, M.L., Spiess, C., 2019. Production, characterization, and in vivo half-life extension of polymeric IgA molecules in mice. *mAbs* 11, 1122–1138. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1622940>
- Lopalco, L., Barassi, C., Pastori, C., Longhi, R., Burastero, S.E., Tambussi, G., Mazzotta, F., Lazzarin, A., Clerici, M., Siccardi, A.G., 2000. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 *In vitro*. *J Immunol* 164, 3426–33.
- Lopez, J., Mommert, M., Mouton, W., Pizzorno, A., Brengel-Pesce, K., Mezidi, M., Villard, M., Lina, B., Richard, J.-C., Fassier, J.-B., Cheynet, V., Padey, B., Duliere, V., Julien, T., Paul, S., Bastard, P., Belot, A., Bal, A., Casanova, J.-L., Rosa-Calatrava, M., Morfin, F., Walzer, T., Trouillet-Assant, S., 2021. Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *J. Exp. Med.* 218, e20211211. <https://doi.org/10.1084/jem.20211211>
- López, M., Soriano, V., Peris-Pertusa, A., Rallón, N., Restrepo, C., Benito, J.M., 2011. Elite controllers display higher activation on central memory CD8 T cells than HIV patients successfully on HAART. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, 157–165. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0107>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond. Engl.* 395, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lundberg, K., Rydnert, F., Broos, S., Andersson, M., Greiff, L., Lindstedt, M., 2016. Allergen-Specific Immunotherapy Alters the Frequency, as well as the FcR and CLR Expression Profiles of Human Dendritic Cell Subsets. *PLOS ONE* 11, e0148838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148838>

- Luo, J., Yang, H., Song, B.-L., 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 225–245. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>
- Luu, R., Valdebenito, S., Scemes, E., Cibelli, A., Spray, D.C., Rovegno, M., Tichauer, J., Cottignies-Calamarte, A., Rosenberg, A., Capron, C., Belouzard, S., Dubuisson, J., Annane, D., de la Grandmaison, G.L., Cramer-Bordé, E., Bomsel, M., Eugenin, E., 2021. Pannexin-1 channel opening is critical for COVID-19 pathogenesis. *iScience* 24, 103478. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103478>
- Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>
- Lyerly, H.K., Reed, D.L., Matthews, T.J., Langlois, A.J., Ahearne, P.A., Petteway, S.R., Jr., Weinhold, K.J., 1987. Anti-GP 120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3, 409–22. <https://doi.org/10.1089/aid.1987.3.409>
- Mabuka, J., Nduati, R., Odem-Davis, K., Peterson, D., Overbaugh, J., 2012. HIV-Specific Antibodies Capable of ADCC Are Common in Breastmilk and Are Associated with Reduced Risk of Transmission in Women with High Viral Loads. *PLoS Pathog.* 8, e1002739. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002739>
- MacLeod, D.T., Choi, N.M., Briney, B., Garces, F., Ver, L.S., Landais, E., Murrell, B., Wrin, T., Kilembe, W., Liang, C.-H., Ramos, A., Bian, C.B., Wickramasinghe, L., Kong, L., Eren, K., Wu, C.-Y., Wong, C.-H., Kosakovsky Pond, S.L., Wilson, I.A., Burton, D.R., Poignard, P., Price, M.A., Gilmour, J., Fast, P., Kamali, A., Sanders, E.J., Anzala, O., Allen, S., Hunter, E., Karita, E., Kilembe, W., Lakhi, S., Inambao, M., Edward, V., Bekker, L.-G., 2016. Early Antibody Lineage Diversification and Independent Limb Maturation Lead to Broad HIV-1 Neutralization Targeting the Env High-Mannose Patch. *Immunity* 44, 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.016>
- Magerus-Chatinet, A., Bomsel, M., 2004. Galactosyl Ceramide is a common mucosal dendritic and epithelial cell receptor for HIV-1 and mediates raft-dependent entry of HIV-1 across mucosa. *Immun. Rev.* 57–68.
- Malbec, M., Porrot, F., Rua, R., Horwitz, J., Klein, F., Halper-Stromberg, A., Scheid, J.F., Eden, C., Mouquet, H., Nussenzweig, M.C., Schwartz, O., 2013. Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J Exp Med* 210, 2813–21. <https://doi.org/10.1084/jem.20131244>
- Mancardi, D., Daëron, M., 2014. Fc Receptors in Immune Responses. *Ref. Module Biomed. Sci.* B978-0-12-801238-3.00119-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00119-7>
- Margolis, L., Shattock, R., 2006. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved? *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 312–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1387>
- Mascola, J.R., Haynes, B.F., 2013. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature’s pathways. *Immunol. Rev.* 254, 225–244. <https://doi.org/10.1111/imr.12075>
- Masquelier, C., Servais, J.-Y., Rusanganwa, E., Roman, F., Havuga, E., Servais, J., Tuyizere, S., Omes, C., Karasi, J.-C., Coruteille, O., Karita, E., Allen, S., Schmit, J.-C., Arendt, V., 2007. A novel 24-base pair deletion in the coding region of CCR5 in an African population. *AIDS Lond. Engl.* 21, 111–113. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000254687.86122.fa>
- Masuda, S., Iwasaki, S., Tomaru, U., Sato, J., Kawakami, A., Ichijo, K., Sogo, S., Baba, T., Katsumata, K., Kasahara, M., Ishizu, A., 2012. Mechanism of Fcγ Receptor-Mediated Trogocytosis-Based False-Positive Results in Flow Cytometry. *PLOS ONE* 7, e52918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052918>
- Mattu, T.S., Pleass, R.J., Willis, A.C., Kilian, M., Wormald, M.R., Lellouch, A.C., Rudd, P.M., Woof, J.M., Dwek, R.A., 1998. The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N-Glycosylation on Fcα Receptor Interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 2260–2272. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2260>
- Mayr, L.M., Su, B., Moog, C., 2017. Non-Neutralizing Antibodies Directed against HIV and Their Functions. *Front. Immunol.* 8, 1590. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01590>

- Mazzoli, S., Lopalco, L., Salvi, A., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Semplici, F., Biasin, M., Bl, C., Cosma, A., Pastori, C., Meacci, F., Mazzotta, F., Villa, M.L., Siccardi, A.G., Clerici, M., 1999. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis* 180, 871–5.
- Mazzoli, S., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Blé, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R., Fusi, M.L., Tofani, N., Biasin, M., Villa, M.L., Mazzotta, F., Clerici, M., 1997a. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat. Med.* 3, 1250–1257. <https://doi.org/10.1038/nm1197-1250>
- Mazzoli, S., Trabattoni, D., Lo Caputo, S., Piconi, S., Ble, C., Meacci, F., Ruzzante, S., Salvi, A., Semplici, F., Longhi, R., Fusi, M.L., Tofani, N., Biasin, M., Villa, M.L., Mazzotta, F., Clerici, M., 1997b. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med* 3, 1250–7.
- McBride, C.E., Machamer, C.E., 2010. Palmitoylation of SARS-CoV S protein is necessary for partitioning into detergent-resistant membranes and cell–cell fusion but not interaction with M protein. *Virology* 405, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.031>
- Mechetina, L.V., Najakshin, A.M., Volkova, O.Y., Guselnikov, S.V., Faizulin, R.Z., Alabyev, B.Y., Chikaev, N.A., Vinogradova, M.S., Taranin, A.V., 2002. FCRL, a novel member of the leukocyte Fc receptor family possesses unique structural features. *Eur. J. Immunol.* 32, 87–96. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200201\)32:1<87::AID-IMMU87>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200201)32:1<87::AID-IMMU87>3.0.CO;2-#)
- Meissner, M.E., Talledge, N., Mansky, L.M., 2022. Molecular Biology and Diversification of Human Retroviruses. *Front. Virol.* 2.
- Mendonça, L., Howe, A., Gilchrist, J.B., Sheng, Y., Sun, D., Knight, M.L., Zanetti-Domingues, L.C., Bateman, B., Krebs, A.-S., Chen, L., Radecke, J., Li, V.D., Ni, T., Kounatidis, I., Koronfel, M.A., Szykiewicz, M., Harkiolaki, M., Martin-Fernandez, M.L., James, W., Zhang, P., 2021. Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress. *Nat. Commun.* 12, 4629. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24887-y>
- Mes, L., Steffen, U., Chen, H.-J., Veth, J., Hoepel, W., Griffith, G.R., Schett, G., den Dunnen, J., 2023. IgA2 immune complexes selectively promote inflammation by human CD103+ dendritic cells. *Front. Immunol.* 14, 1116435. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1116435>
- Mesquita, F.S., Abrami, L., Sergeeva, O., Turelli, P., Qing, E., Kunz, B., Raclot, C., Paz Montoya, J., Abriata, L.A., Gallagher, T., Dal Peraro, M., Trono, D., D’Angelo, G., van der Goot, F.G., 2021. S-acylation controls SARS-CoV-2 membrane lipid organization and enhances infectivity. *Dev. Cell* 56, 2790–2807.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.09.016>
- Miao, G., Zhao, H., Li, Y., Ji, M., Chen, Y., Shi, Y., Bi, Y., Wang, P., Zhang, H., 2021. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. *Dev. Cell* 56, 427–442.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.12.010>
- Migueles, S.A., Laborico, A.C., Shupert, W.L., Sabbaghian, M.S., Rabin, R., Hallahan, C.W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., Connors, M., 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* 3, 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/ni845>
- Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., Connors, M., 2000. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2709–2714. <https://doi.org/10.1073/pnas.050567397>
- Miller, M.L., Finn, O.J., 2020. Chapter Twenty-Two - Flow cytometry-based assessment of direct-targeting anti-cancer antibody immune effector functions, in: Galluzzi, L., Rudqvist, N.-P. (Eds.), *Methods in Enzymology, Tumor Immunology and Immunotherapy – Cellular Methods Part B*. Academic Press, pp. 431–456. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.026>

- Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S.P., Goodall, M., Jefferis, R., 2001. Role of Oligosaccharide Residues of IgG1-Fc in FcγRIIb Binding. *J. Biol. Chem.* 276, 45539–45547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107478200>
- Mishra, H.K., Pore, N., Michelotti, E.F., Walcheck, B., 2018. Anti-ADAM17 monoclonal antibody MEDI3622 increases IFNγ production by human NK cells in the presence of antibody-bound tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 67, 1407–1416. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2193-1>
- Miyazawa, M., Lopalco, L., Mazzotta, F., Lo Caputo, S., Veas, F., Clerici, M., 2009. The “immunologic advantage” of HIV-exposed seronegative individuals. *Aids* 23, 161–175. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283196a80>
- Molina, J.-M., Capitant, C., Spire, B., Pialoux, G., Cotte, L., Charreau, I., Tremblay, C., Le Gall, J.-M., Cua, E., Pasquet, A., Raffi, F., Pintado, C., Chidiac, C., Chas, J., Charbonneau, P., Delaugerre, C., Suzan-Monti, M., Loze, B., Fonsart, J., Peytavin, G., Cheret, A., Timsit, J., Girard, G., Lorente, N., Préau, M., Rooney, J.F., Wainberg, M.A., Thompson, D., Rozenbaum, W., Doré, V., Marchand, L., Simon, M.-C., Etien, N., Aboulker, J.-P., Meyer, L., Delfraissy, J.-F., ANRS IPERGAY Study Group, 2015. On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 373, 2237–2246. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506273>
- Montealegre, S., van Endert, P.M., 2019. Endocytic Recycling of MHC Class I Molecules in Non-professional Antigen Presenting and Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 9, 3098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03098>
- Montomoli, E., Apolone, G., Manenti, A., Boeri, M., Suatoni, P., Sabia, F., Marchianò, A., Bollati, V., Pastorino, U., Sozzi, G., 2021. Timeline of SARS-CoV-2 Spread in Italy: Results from an Independent Serological Retesting. *Viruses* 14, 61. <https://doi.org/10.3390/v14010061>
- Montoya, C.J., Velilla, P.A., Chougnet, C., Landay, A.L., Rugeles, M.T., 2006. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 120, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.02.008>
- Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., Lazar, G.A., 2010. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs* 2, 181–189. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.2.11158>
- Moreira, D., Silvestre, R., Cordeiro-Da-Silva, A., Estaquier, J., Foretz, M., Viollet, B., 2016. AMP-activated protein kinase as a target for pathogens: friends or foes? *Curr. Drug Targets* 17, 942–953.
- Mouquet, H., Scheid, J.F., Zoller, M.J., Krogsgaard, M., Ott, R.G., Shukair, S., Artyomov, M.N., Pietzsch, J., Connors, M., Pereyra, F., Walker, B.D., Ho, D.D., Wilson, P.C., Seaman, M.S., Eisen, H.N., Chakraborty, A.K., Hope, T.J., Ravetch, J.V., Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., 2010. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heteroligation. *Nature* 467, 591–5. <https://doi.org/10.1038/nature09385>
- Muntjewerff, E.M., Meesters, L.D., van den Bogaart, G., 2020. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front. Immunol.* 11.
- Myers, R.W., Guan, H.-P., Ehrhart, J., Petrov, A., Prahallada, S., Tozzo, E., Yang, X., Kurtz, M.M., Trujillo, M., Gonzalez Trotter, D., Feng, D., Xu, S., Eiermann, G., Holahan, M.A., Rubins, D., Conarello, S., Niu, X., Souza, S.C., Miller, C., Liu, J., Lu, K., Feng, W., Li, Y., Painter, R.E., Milligan, J.A., He, H., Liu, F., Ogawa, A., Wisniewski, D., Rohm, R.J., Wang, L., Bunzel, M., Qian, Y., Zhu, W., Wang, H., Bennet, B., LaFranco Scheuch, L., Fernandez, G.E., Li, C., Klimas, M., Zhou, G., van Heek, M., Biftu, T., Weber, A., Kelley, D.E., Thornberry, N., Erion, M.D., Kemp, D.M., Sebhat, I.K., 2017. Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy. *Science* 357, 507–511. <https://doi.org/10.1126/science.aah5582>
- Mysore, V., Cullere, X., Mears, J., Rosetti, F., Okubo, K., Liew, P.X., Zhang, F., Madera-Salcedo, I., Rosenbauer, F., Stone, R.M., Aster, J.C., von Andrian, U.H., Lichtman, A.H., Raychaudhuri, S., Mayadas, T.N., 2021. FcγR engagement reprograms neutrophils into antigen cross-presenting cells

- that elicit acquired anti-tumor immunity. *Nat. Commun.* 12, 4791.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24591-x>
- Nakagawa, K., Lokugamage, K.G., Makino, S., 2016. Viral and Cellular mRNA Translation in Coronavirus-Infected Cells. *Adv. Virus Res.* 96, 165–192. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.001>
- Naranjo-Gomez, M., Lambour, J., Piechaczyk, M., Pelegrin, M., 2018. Neutrophils are essential for induction of vaccine-like effects by antiviral monoclonal antibody immunotherapies. *JCI Insight* 3, e97339, 97339. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97339>
- Nardacci, R., Colavita, F., Castilletti, C., Lapa, D., Matusali, G., Meschi, S., Del Nonno, F., Colombo, D., Capobianchi, M.R., Zumla, A., Ippolito, G., Piacentini, M., Falasca, L., 2021. Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. *Cell Death Dis.* 12, 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-03527-9>
- Naso, M.F., Tam, S.H., Scallon, B.J., Raju, T.S., 2010. Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *mAbs* 2, 519–527. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.13078>
- Nasr, N., Lai, J., Botting, R.A., Mercier, S.K., Harman, A.N., Kim, M., Turville, S., Center, R.J., Domagala, T., Gorry, P.R., Olbourne, N., Cunningham, A.L., 2014. Inhibition of two temporal phases of HIV-1 transfer from primary Langerhans cells to T cells: the role of langerin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 2554–2564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400630>
- Natarajan, H., Crowley, A.R., Butler, S.E., Xu, S., Weiner, J.A., Bloch, E.M., Littlefield, K., Wieland-Alter, W., Connor, R.I., Wright, P.F., Benner, S.E., Bonny, T.S., Laeyendecker, O., Sullivan, D., Shoham, S., Quinn, T.C., Larman, H.B., Casadevall, A., Pekosz, A., Redd, A.D., Tobian, A.A.R., Ackerman, M.E., 2021. Markers of Polyfunctional SARS-CoV-2 Antibodies in Convalescent Plasma. *mBio* 12, e00765-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00765-21>
- Neidich, S.D., Fong, Y., Li, S.S., Geraghty, D.E., Williamson, B.D., Young, W.C., Goodman, D., Seaton, K.E., Shen, X., Sawant, S., Zhang, L., deCamp, A.C., Blette, B.S., Shao, M., Yates, N.L., Feely, F., Pyo, C.W., Ferrari, G., Team, H., Frank, I., Karuna, S.T., Swann, E.M., Mascola, J.R., Graham, B.S., Hammer, S.M., Sobieszczyk, M.E., Corey, L., Janes, H.E., McElrath, M.J., Gottardo, R., Gilbert, P.B., Tomaras, G.D., 2019. Antibody Fc effector functions and IgG3 associate with decreased HIV-1 risk. *J Clin Invest* 129, 4838–4849. <https://doi.org/10.1172/JCI126391>
- Ng, P.M.L., Kaliaperumal, N., Lee, C.Y., Chin, W.J., Tan, H.C., Au, V.B., Goh, A.X.-H., Tan, Q.W., Yeo, D.S.G., Connolly, J.E., Wang, C.-I., 2019. Enhancing Antigen Cross-Presentation in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by Recruiting the Intracellular Fc Receptor TRIM21. *J. Immunol.*  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800462>
- Nguyen, S., Deleage, C., Darko, S., Ransier, A., Truong, D.P., Agarwal, D., Japp, A.S., Wu, V.H., Kuri-Cervantes, L., Abdel-Mohsen, M., Del Rio Estrada, P.M., Ablanedo-Terrazas, Y., Gostick, E., Hoxie, J.A., Zhang, N.R., Naji, A., Reyes-Terán, G., Estes, J.D., Price, D.A., Douek, D.C., Deeks, S.G., Buggert, M., Betts, M.R., 2019. Elite control of HIV is associated with distinct functional and transcriptional signatures in lymphoid tissue CD8+ T cells. *Sci. Transl. Med.* 11, eaax4077.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax4077>
- Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T.-W., Sadjadpour, R., Foulds, K.E., Shingai, M., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Donaldson, M., Donau, O.K., Plishka, R.J., Buckler-White, A., Seaman, M.S., Lifson, J.D., Koup, R.A., Fauci, A.S., Nussenzweig, M.C., Martin, M.A., 2017. Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature* 543, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature21435>
- Niu, M., Wong, Y.C., Wang, H., Li, X., Chan, C.Y., Zhang, Q., Ling, L., Cheng, L., Wang, R., Du, Y., Yim, L.Y., Jin, X., Zhang, H., Zhang, L., Chen, Z., 2021. Tandem bispecific antibody prevents pathogenic SHIVSF162P3CN infection and disease progression. *Cell Rep.* 36.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109611>

- Noailly, B., Yaugel-Novoa, M., Werquin, J., Jospin, F., Drocourt, D., Bourlet, T., Rochereau, N., Paul, S., 2022. Antiviral Activities of HIV-1-Specific Human Broadly Neutralizing Antibodies Are Isotype-Dependent. *Vaccines* 10, 903. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060903>
- Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., Berraondo, P., 2017. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol. Cell Biol.* 95, 347–355. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.6>
- Ohara, R.A., Murphy, K.M., 2023. Recent progress in type 1 classical dendritic cell cross-presentation - cytosolic, vacuolar, or both? *Curr. Opin. Immunol.* 83, 102350. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102350>
- Okulicz, J.F., Grandits, G.A., Weintrob, A.C., Landrum, M.L., Ganesan, A., Crum-Cianflone, N.F., Agan, B.K., Marconi, V.C., 2010. CD4 T cell count reconstitution in HIV controllers after highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1187–1191. <https://doi.org/10.1086/651421>
- Om, K., Paquin-Proulx, D., Montero, M., Peachman, K., Shen, X., Wiczorek, L., Beck, Z., Weiner, J.A., Kim, D., Li, Y., Mdluli, T., Shubin, Z., Bryant, C., Sharma, V., Tokarev, A., Dawson, P., White, Y., Appelbe, O., Klatt, N.R., Tovanabutra, S., Estes, J.D., Matyas, G.R., Ferrari, G., Alving, C.R., Tomaras, G.D., Ackerman, M.E., Michael, N.L., Robb, M.L., Polonis, V., Rolland, M., Eller, M.A., Rao, M., Bolton, D.L., 2020. Adjuvanted HIV-1 vaccine promotes antibody-dependent phagocytic responses and protects against heterologous SHIV challenge. *PLoS Pathog.* 16, e1008764. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008764>
- Oortwijn, B.D., Roos, A., Royle, L., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Eijgenraam, J.W., Dwek, R.A., Daha, M.R., Rudd, P.M., van Kooten, C., 2006. Differential glycosylation of polymeric and monomeric IgA: a possible role in glomerular inflammation in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17, 3529–39. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006040388>
- Øynebråten, I., 2020. Involvement of autophagy in MHC class I antigen presentation. *Scand. J. Immunol.* 92, e12978. <https://doi.org/10.1111/sji.12978>
- Pancera, M., Changela, A., Kwong, P.D., 2017. How HIV-1 entry mechanism and broadly neutralizing antibodies guide structure-based vaccine design. *Curr. Opin. HIV AIDS* 12, 229–240. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000360>
- Parsons, M.S., Chung, A.W., Kent, S.J., 2018. Importance of Fc-mediated functions of anti-HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology* 15, 58. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0438-x>
- Parthasarathy, H., Tandel, D., Siddiqui, A.H., Harshan, K.H., 2023. Metformin suppresses SARS-CoV-2 in cell culture. *Virus Res.* 323, 199010. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199010>
- Pastori, C., Barassi, C., Piconi, S., Longhi, R., Villa, M.L., Siccardi, A.G., Clerici, M., Lopalco, L., 2000. HIV neutralizing IgA in exposed seronegative subjects recognise an epitope within the gp41 coiled-coil pocket. *J Biol Regul Homeost Agents* 14, 15-21.
- Pedersen, J., Koumakpayi, I.H., Babuadze, G., Baz, M., Ndiaye, O., Faye, Oumar, Diagne, C.T., Dia, N., Naghibosadat, M., McGeer, A., Muberaka, S., Moukandja, I.P., Ndidi, S., Tauil, C.B., Lekana-Douki, J.-B., Loucoubar, C., Faye, Ousmane, Sall, A., Magalhães, K.G., Weis, N., Kozak, R., Kobinger, G.P., Fausther-Bovendo, H., 2022. Cross-reactive immunity against SARS-CoV-2 N protein in Central and West Africa precedes the COVID-19 pandemic. *Sci. Rep.* 12, 12962. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17241-9>
- Pedro, K.D., Henderson, A.J., Agosto, L.M., 2019. Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. *Virus Res.* 265, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.014>
- Pekar, J., Worobey, M., Moshiri, N., Scheffler, K., Wertheim, J.O., 2020. Timing the SARS-CoV-2 Index Case in Hubei Province. <https://doi.org/10.1101/2020.11.20.392126>

- Perdikari, T.M., Murthy, A.C., Ryan, V.H., Watters, S., Naik, M.T., Fawzi, N.L., 2020. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase-separates with RNA and with human hnRNPs. *EMBO J.* 39, e106478. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106478>
- Pereira, N.A., Chan, K.F., Lin, P.C., Song, Z., 2018. The “less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *mAbs* 10, 693–711. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1466767>
- Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D.J., Maamary, J., Wang, T.T., Dahan, R., Fiebiger, B.-M., Ravetch, J.V., 2014. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 15, 707–716. <https://doi.org/10.1038/ni.2939>
- Pinto, D., Fenwick, C., Caillat, C., Silacci, C., Guseva, S., Dehez, F., Chipot, C., Barbieri, S., Minola, A., Jarrossay, D., Tomaras, G.D., Shen, X., Riva, A., Tarkowski, M., Schwartz, O., Bruel, T., Dufloo, J., Seaman, M.S., Montefiori, D.C., Lanzavecchia, A., Corti, D., Pantaleo, G., Weissenhorn, W., 2019. Structural Basis for Broad HIV-1 Neutralization by the MPER-Specific Human Broadly Neutralizing Antibody LN01. *Cell Host Microbe* 26, 623-637.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.016>
- Pinto, L.A., Sullivan, J., Berzofsky, J.A., Clerici, M., Kessler, H.A., Landay, A.L., Shearer, G.M., 1995. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J. Clin. Invest.* 96, 867–876. <https://doi.org/10.1172/JCI118133>
- Pohlmyer, C.W., Bullen, C.K., Martin, A.R., Laird, G.M., Chioma, S.U., Walker-Sperling, V.E.K., Blankson, J.N., 2017. Characterization of Elite Suppressors Cell-Associated HIV-1 mRNA at Baseline and with T Cell Activation. *Yale J. Biol. Med.* 90, 331–336.
- Politch, J.A., Marathe, J., Anderson, D.J., 2014. Characteristics and Quantities of HIV Host Cells in Human Genital Tract Secretions. *J. Infect. Dis.* 210, S609–S615. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu390>
- POLITCH, J.A., MAYER, K.H., WELLES, S.L., O'BRIEN, W.X., XU, C., BOWMAN, F.P., ANDERSON, D.J., 2012. Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men. *AIDS Lond. Engl.* 26, 1535–1543. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328353b11b>
- Pollack, H., Zhan, M.X., Safrit, J.T., Chen, S.H., Rochford, G., Tao, P.Z., Koup, R., Krasinski, K., Borkowsky, W., 1997. CD8+ T-cell-mediated suppression of HIV replication in the first year of life: association with lower viral load and favorable early survival. *AIDS Lond. Engl.* 11, F9-13. <https://doi.org/10.1097/00002030-199701000-00002>
- Pollara, J., Hart, L., Brewer, F., Pickeral, J., Packard, B.Z., Hoxie, J.A., Komoriya, A., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Roederer, M., Huang, Y., Weinhold, K.J., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., Montefiori, D.C., Ferrari, G., 2011. High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 79, 603–612. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21084>
- Pollara, J., Orlandi, C., Beck, C., Edwards, R.W., Hu, Y., Liu, S., Wang, S., Koup, R.A., Denny, T.N., Lu, S., Tomaras, G.D., DeVico, A., Lewis, G.K., Ferrari, G., 2018. Application of area scaling analysis to identify natural killer cell and monocyte involvement in the GranToxiLux antibody dependent cell-mediated cytotoxicity assay. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 93, 436–447. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23348>
- Ponnan, S.M., Thiruvengadam, K., Kathirvel, S., Shankar, J., Rajaraman, A., Mathaiyan, M., Dinesha, T.R., Poongulali, S., Saravanan, S., Murugavel, K.G., Swaminathan, S., Tripathy, S.P., Neogi, U., Velu, V., Hanna, L.E., 2021. Elevated Numbers of HIV-Specific Poly-Functional CD8+ T Cells With Stem Cell-Like and Follicular Homing Phenotypes in HIV-Exposed Seronegative Individuals. *Front. Immunol.* 12.
- Porter, R.R., 1959. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119–126. <https://doi.org/10.1042/bj0730119>

- Presta, L.G., 1992. Antibody engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 593–596.  
[https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90091-K](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90091-K)
- Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A., et al., 1994. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1651–8.
- Pyzik, M., Sand, K.M.K., Hubbard, J.J., Andersen, J.T., Sandlie, I., Blumberg, R.S., 2019. The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01540>
- Qiao, S.-W., Kobayashi, K., Johansen, F.-E., Sollid, L.M., Andersen, J.T., Milford, E., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., Blumberg, R.S., 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9337–9342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801717105>
- Qu, Y., Wang, W., Xiao, M.Z.X., Zheng, Y., Liang, Q., 2023. The interplay between lipid droplets and virus infection. *J. Med. Virol.* 95, e28967. <https://doi.org/10.1002/jmv.28967>
- Qu, Y., Wang, X., Zhu, Y., Wang, W., Wang, Y., Hu, G., Liu, C., Li, J., Ren, S., Xiao, M.Z.X., Liu, Z., Wang, C., Fu, J., Zhang, Y., Li, P., Zhang, R., Liang, Q., 2021. ORF3a-Mediated Incomplete Autophagy Facilitates Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Replication. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 716208. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716208>
- Ramasamy, S., Subbian, S., 2021. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 34, 10.1128/cmr.00299-20.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00299-20>
- Ramdas, P., Sahu, A.K., Mishra, T., Bhardwaj, V., Chande, A., 2020. From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1. *Front. Microbiol.* 11.
- Rantalainen, K., Berndsen, Z.T., Antanasijevic, A., Schiffner, T., Zhang, X., Lee, W.-H., Torres, J.L., Zhang, L., Irimia, A., Copps, J., Zhou, K.H., Kwon, Y.D., Law, W.H., Schramm, C.A., Verardi, R., Krebs, S.J., Kwong, P.D., Doria-Rose, N.A., Wilson, I.A., Zwick, M.B., Yates, J.R., Schief, W.R., Ward, A.B., 2020. HIV-1 Envelope and MPER Antibody Structures in Lipid Assemblies. *Cell Rep.* 31, 107583.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107583>
- Raux, M., Finkielstejn, L., Salmon-Ceron, D., Bouchez, H., Excler, J.L., Dulioust, E., Grouin, J.M., Sicard, D., Blondeau, C., 1999. Comparison of the distribution of IgG and IgA antibodies in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15, 1365–76.
- Real, F., Capron, C., Sennepin, A., Arrigucci, R., Zhu, A., Sannier, G., Zheng, J., Xu, L., Massé, J.-M., Greffe, S., Cazabat, M., Donoso, M., Delobel, P., Izopet, J., Eugenin, E., Gennaro, M.L., Rouveix, E., Cramer Bordé, E., Bomsel, M., 2020. Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4+ T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. *Sci. Transl. Med.* 12, eaat6263. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat6263>
- Real, F., Ganor, Y., Bomsel, M., 2022. Experimental Models to Study HIV Latency Reversal from Male Genital Myeloid Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2407, 189–204. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1871-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1871-4_14)
- Real, Fernando, Sennepin, A., Ganor, Y., Schmitt, A., Bomsel, M., 2018. Live Imaging of HIV-1 Transfer across T Cell Virological Synapse to Epithelial Cells that Promotes Stromal Macrophage Infection. *Cell Rep.* 23, 1794–1805. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.028>
- Real, F., Sennepin, A., Ganor, Y., Schmitt, A., Bomsel, M., 2018. Live Imaging of HIV-1 Transfer across T Cell Virological Synapse to Epithelial Cells that Promotes Stromal Macrophage Infection. *Cell Rep* 23, 1794–1805. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.028>
- Repp, R., Valerius, T., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., Platzer, E., 1991. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 78, 885–889.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P.,

- Stablein, D., Bix, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kunasol, P., Kim, J.H., Investigators, M.-T., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361, 2209–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908492>
- Richardson, S.I., Crowther, C., Mkhize, N.N., Morris, L., 2018. Measuring the ability of HIV-specific antibodies to mediate trogocytosis. *J. Immunol. Methods* 463, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.09.009>
- Richardson, S.I., Lambson, B.E., Crowley, A.R., Bashirova, A., Scheepers, C., Garrett, N., Karim, S.A., Mkhize, N.N., Carrington, M., Ackerman, M.E., Moore, P.L., Morris, L., 2019. IgG3 enhances neutralization potency and Fc effector function of an HIV V2-specific broadly neutralizing antibody. *PLOS Pathog.* 15, e1008064. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008064>
- Robert-Guroff, M., Brown, M., Gallo, R.C., 1985. HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* 316, 72–74. <https://doi.org/10.1038/316072a0>
- Rochereau, N., Pavot, V., Verrier, B., Ensinas, A., Genin, C., Corthésy, B., Paul, S., 2015. Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells. *Eur. J. Immunol.* 45, 773–779. <https://doi.org/10.1002/eji.201444816>
- Rochereau, N., Pavot, V., Verrier, B., Jospin, F., Ensinas, A., Genin, C., Corthésy, B., Paul, S., 2016. Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 214–222.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.042>
- Roghani, A., Stopforth, R.J., Dahal, L.N., Cragg, M.S., 2018. New revelations from an old receptor: Immunoregulatory functions of the inhibitory Fc gamma receptor, FcγRIIB (CD32B). *J. Leukoc. Biol.* 103, 1077–1088. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MIR0917-354R>
- Rosás-Umbert, M., Gunst, J.D., Pahus, M.H., Olesen, R., Schleimann, M., Denton, P.W., Ramos, V., Ward, A., Kinloch, N.N., Copertino, D.C., Escribà, T., Llano, A., Brumme, Z.L., Brad Jones, R., Mothe, B., Brander, C., Fox, J., Nussenzweig, M.C., Fidler, S., Caskey, M., Tolstrup, M., Søggaard, O.S., 2022. Administration of broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies at ART initiation maintains long-term CD8+ T cell immunity. *Nat. Commun.* 13, 6473. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34171-2>
- Rostamzadeh, D., Kazemi, T., Amirghofran, Z., Shabani, M., 2018. Update on Fc receptor-like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 22, 487–502. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472768>
- Rowland-Jones, S., Dong, T., Krausa, P., Sutton, J., Newell, H., Ariyoshi, K., Gotch, F., Sabally, S., Corrah, T., Kimani, J., MacDonald, K., Plummer, F., Ndinya-Achola, J., Whittle, H., McMichael, A., 1998. The role of cytotoxic T-cells in HIV infection. *Dev. Biol. Stand.* 92, 209–214.
- Rowland-Jones, S., Sutton, J., Ariyoshi, K., Dong, T., Gotch, F., McAdam, S., Whitby, D., Sabally, S., Gallimore, A., Corrah, T., 1995. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat. Med.* 1, 59–64. <https://doi.org/10.1038/nm0195-59>
- Roy, A., Nair, S., Sen, N., Soni, N., Madhusudhan, M.S., 2017. In silico methods for design of biological therapeutics. *Methods, Systems Approaches for Identifying Disease Genes and Drug Targets* 131, 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.09.008>
- Royle, L., Roos, A., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Gijlswijk-Janssen, D.V., Redwan, E.-R.M., Wilson, I.A., Daha, M.R., Dwek, R.A., Rudd, P.M., 2003. Secretory IgA N- and O-Glycans Provide a Link between the Innate and Adaptive Immune Systems. *J. Biol. Chem.* 278, 20140–20153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301436200>
- Ruiz, M.J., Siracusano, G., Cottignies-Calamarte, A., Tudor, D., Real, F., Zhu, A., Pastori, C., Capron, C., Rosenberg, A.R., Temperton, N., Cantoni, D., Liao, H., Ternette, N., Moine, P., Godement, M., Geri, G., Chiche, J.-D., Annane, D., Cramer Bordé, E., Lopalco, L., Bomsel, M., 2022. Persistent but dysfunctional mucosal SARS-CoV-2-specific IgA and low lung IL-1β associate with COVID-19 fatal

- outcome: A cross-sectional analysis. *Front. Immunol.* 13, 842468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842468>
- Rujas, E., Insausti, S., Leaman, D.P., Carravilla, P., González-Resines, S., Monceaux, V., Sánchez-Eugenia, R., García-Porras, M., Iloro, I., Zhang, L., Elortza, F., Julien, J.-P., Saéz-Ciri6n, A., Zwick, M.B., Eggeling, C., Ojida, A., Domene, C., Caaveiro, J.M.M., Nieva, J.L., 2020. Affinity for the Interface Underpins Potency of Antibodies Operating In Membrane Environments. *Cell Rep.* 32, 108037. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108037>
- Ruprecht, R.M., Marasini, B., Thippeshappa, R., 2019. Mucosal Antibodies: Defending Epithelial Barriers against HIV-1 Invasion. *Vaccines* 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040194>
- S6az-Ciri6n, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barr6-Sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A., 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6776–6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., 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, 722–725. <https://doi.org/10.1038/382722a0>
- Santra, S., Tomaras, G.D., Warrier, R., Nicely, N.I., Liao, H.X., Pollara, J., Liu, P., Alam, S.M., Zhang, R., Cocklin, S.L., Shen, X., Duffy, R., Xia, S.M., Schutte, R.J., Pemble Iv, C.W., Dennison, S.M., Li, H., Chao, A., Vidnovic, K., Evans, A., Klein, K., Kumar, A., Robinson, J., Landucci, G., Forthal, D.N., Montefiori, D.C., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Robb, M.L., Michael, N.L., Kim, J.H., Soderberg, K.A., Giorgi, E.E., Blair, L., Korber, B.T., Moog, C., Shattock, R.J., Letvin, N.L., Schmitz, J.E., Moody, M.A., Gao, F., Ferrari, G., Shaw, G.M., Haynes, B.F., 2015. Human Non-neutralizing HIV-1 Envelope Monoclonal Antibodies Limit the Number of Founder Viruses during SHIV Mucosal Infection in Rhesus Macaques. *PLoS Pathog* 11, e1005042. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005042>
- Sarma, J.V., Ward, P.A., 2011. The complement system. *Cell Tissue Res.* 343, 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dum6nil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., Amigorena, S., 2006. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.035>
- Scallon, B.J., Tam, S.H., McCarthy, S.G., Cai, A.N., Raju, T.S., 2007. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol.* 44, 1524–1534. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.005>
- Scavone, C., Brusco, S., Bertini, M., Sportiello, L., Rafaniello, C., Zoccoli, A., Berrino, L., Racagni, G., Rossi, F., Capuano, A., 2020. Current pharmacological treatments for COVID-19: What’s next? *Br. J. Pharmacol.* 177, 4813–4824. <https://doi.org/10.1111/bph.15072>
- Scherer, K.M., Mascheroni, L., Carnell, G.W., Wunderlich, L.C.S., Makarchuk, S., Brockhoff, M., Mela, I., Fernandez-Villegas, A., Barysevich, M., Stewart, H., Suau Sans, M., George, C.L., Lamb, J.R., Kaminski-Schierle, G.S., Heeney, J.L., Kaminski, C.F., 2022. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein adheres to replication organelles before viral assembly at the Golgi/ERGIC and lysosome-mediated egress. *Sci. Adv.* 8, eabl4895. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl4895>
- Schols, D., Proost, P., Van Damme, J., De Clercq, E., 1997. RANTES and MCP-3 inhibit the replication of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (SF-2, MN, and HE). *J. Virol.* 71, 7300–7304. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.10.7300-7304.1997>

- Schroeder, S., Pott, F., Niemeyer, D., Veith, T., Richter, A., Muth, D., Goffinet, C., Müller, M.A., Drosten, C., 2021. Interferon antagonism by SARS-CoV-2: a functional study using reverse genetics. *Lancet Microbe* 2, e210–e218. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00027-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00027-6)
- Schulze Zur Wiesch, J., Thomssen, A., Hartjen, P., Tóth, I., Lehmann, C., Meyer-Olson, D., Colberg, K., Frerk, S., Babikir, D., Schmiedel, S., Degen, O., Mauss, S., Rockstroh, J., Staszewski, S., Khaykin, P., Strasak, A., Lohse, A.W., Fätkenheuer, G., Hauber, J., van Lunzen, J., 2011. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J. Virol.* 85, 1287–1297. <https://doi.org/10.1128/JVI.01758-10>
- Scott, L.J., 2017. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* 77, 1865–1879. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0829-7>
- Scott-Algara, D., Truong, L.X., Versmisse, P., David, A., Luong, T.T., Nguyen, N.V., Theodorou, I., Barré-Sinoussi, F., Pancino, G., 2003. Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 5663–5667. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5663>
- Sharma, A., Anand, S.K., Singh, N., Dwivedi, U.N., Kakkar, P., 2023. AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. *Exp. Cell Res.* 428, 113614. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113614>
- Shaw, G.M., Hunter, E., 2012. HIV Transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006965. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Shen, L., Fanger, M.W., 1981. Secretory IgA antibodies synergize with IgG in promoting ADCC by human polymorphonuclear cells, monocytes, and lymphocytes. *Cell. Immunol.* 59, 75–81.
- Shen, Q., Wu, C., Freniere, C., Tripler, T.N., Xiong, Y., 2021. Nuclear Import of HIV-1. *Viruses* 13, 2242. <https://doi.org/10.3390/v13112242>
- Shen, R., Richter, H.E., Clements, R.H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P.R., Smythies, L.E., Smith, P.D., 2009. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 83, 3258–3267. <https://doi.org/10.1128/JVI.01796-08>
- Sherif, Z.A., Gomez, C.R., Connors, T.J., Henrich, T.J., Reeves, W.B., RECOVER Mechanistic Pathway Task Force, 2023. Pathogenic mechanisms of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC). *eLife* 12, e86002. <https://doi.org/10.7554/eLife.86002>
- Shieh, B., Yan, Y.P., Ko, N.Y., Liao, Y.E., Liu, Y.C., Lin, H.H., Chen, P.P., Li, C., 2001a. Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 33, 273–279. <https://doi.org/10.1086/321871>
- Shieh, B., Yan, Y.P., Ko, N.Y., Liao, Y.E., Liu, Y.C., Lin, H.H., Chen, P.P., Li, C., 2001b. Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 33, 273–279. <https://doi.org/10.1086/321871>
- Sholukh, A.M., Watkins, J.D., Vyas, H.K., Gupta, S., Lakhashe, S.K., Thorat, S., Zhou, M., Hemashettar, G., Bachler, B.C., Forthal, D.N., Villinger, F., Sattentau, Q.J., Weiss, R.A., Agatic, G., Corti, D., Lanzavecchia, A., Heeney, J.L., Ruprecht, R.M., 2015. Defense-in-depth by mucosally administered anti-HIV dimeric IgA2 and systemic IgG1 mAbs: complete protection of rhesus monkeys from mucosal SHIV challenge. *Vaccine* 33, 2086–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.020>
- Sholukh, Anton M., Watkins, J.D., Vyas, H.K., Gupta, S., Lakhashe, S.K., Thorat, S., Zhou, M., Hemashettar, G., Bachler, B.C., Forthal, D.N., Villinger, F., Sattentau, Q.J., Weiss, R.A., Agatic, G., Corti, D., Lanzavecchia, A., Heeney, J.L., Ruprecht, R.M., 2015. Defense-in-depth by mucosally administered

- anti-HIV dimeric IgA2 and systemic IgG1 mAbs: Complete protection of rhesus monkeys from mucosal SHIV challenge. *Vaccine* 33, 2086–2095. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.020>
- Showers, W.M., Leach, S.M., Kechris, K., Strong, M., 2021. Analysis of SARS-CoV-2 Mutations Over Time Reveals Increasing Prevalence of Variants in the Spike Protein and RNA-Dependent RNA Polymerase. <https://doi.org/10.1101/2021.03.05.433666>
- Siedlar, M., Strach, M., Bukowska-Strakova, K., Lenart, M., Szaflarska, A., Węglarczyk, K., Rutkowska, M., Baj-Krzyworzeka, M., Pituch-Noworolska, A., Kowalczyk, D., Grodzicki, T., Ziegler-Heitbrock, L., Zembala, M., 2011. Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 139, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.01.002>
- Sips, M., Krykbaeva, M., Diefenbach, T.J., Ghebremichael, M., Bowman, B.A., Dugast, A.-S., Boesch, A.W., Streeck, H., Kwon, D.S., Ackerman, M.E., Suscovich, T.J., Brouckaert, P., Schacker, T.W., Alter, G., 2016. Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal Immunol.* 9, 1584–1595. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.12>
- Smith, N., Possémé, C., Bondet, V., Sugrue, J., Townsend, L., Charbit, B., Rouilly, V., Saint-André, V., Dott, T., Pozo, A.R., Yatim, N., Schwartz, O., Cervantes-Gonzalez, M., Ghosn, J., Bastard, P., Casanova, J.L., Szwebel, T.-A., Terrier, B., Conlon, N., O’Farrelly, C., Cheallaigh, C.N., Bourke, N.M., Duffy, D., 2022. Defective activation and regulation of type I interferon immunity is associated with increasing COVID-19 severity. *Nat. Commun.* 13, 7254. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34895-1>
- Smith, T.F., Srinivasan, A., Schochetman, G., Marcus, M., Myers, G., 1988. The phylogenetic history of immunodeficiency viruses. *Nature* 333, 573–575. <https://doi.org/10.1038/333573a0>
- Snijder, E.J., Limpens, R.W.A.L., Wilde, A.H. de, Jong, A.W.M. de, Zevenhoven-Dobbe, J.C., Maier, H.J., Faas, F.F.G.A., Koster, A.J., Bárcena, M., 2020. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLOS Biol.* 18, e3000715. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000715>
- Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., Schrader, C.E., 2008. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 261–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Steffen, U., Koeleman, C.A., Sokolova, M.V., Bang, H., Kleyer, A., Rech, J., Unterweger, H., Schicht, M., Garreis, F., Hahn, J., Andes, F.T., Hartmann, F., Hahn, M., Mahajan, A., Paulsen, F., Hoffmann, M., Lochnit, G., Muñoz, L.E., Wuhrer, M., Falck, D., Herrmann, M., Schett, G., 2020. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat. Commun.* 11, 120. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13992-8>
- Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claër, L., Quentric, P., Fadlallah, J., Devilliers, H., Ghillani, P., Gunn, C., Hockett, R., Mudumba, S., Guihot, A., Luyt, C.-E., Mayaux, J., Beurton, A., Fourati, S., Bruel, T., Schwartz, O., Lacorte, J.-M., Yssel, H., Parizot, C., Dorgham, K., Charneau, P., Amoura, Z., Gorochov, G., 2021. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd2223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>
- Su, B., Dispinseri, S., Iannone, V., Zhang, T., Wu, H., Carapito, R., Bahram, S., Scarlatti, G., Moog, C., 2019. Update on Fc-Mediated Antibody Functions Against HIV-1 Beyond Neutralization. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02968>
- Sugawara, S., Reeves, R.K., Jost, S., 2022. Learning to Be Elite: Lessons From HIV-1 Controllers and Animal Models on Trained Innate Immunity and Virus Suppression. *Front. Immunol.* 13, 858383. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858383>

- Sundquist, W.I., Krausslich, H.-G., 2012. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006924–a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Tabata, K., Prasad, V., Paul, D., Lee, J.-Y., Pham, M.-T., Twu, W.-I., Neufeldt, C.J., Cortese, M., Cerikan, B., Stahl, Y., Joecks, S., Tran, C.S., Lüchtenborg, C., V'kovski, P., Hörmann, K., Müller, A.C., Zitzmann, C., Haselmann, U., Beneke, J., Kaderali, L., Erfle, H., Thiel, V., Lohmann, V., Superti-Furga, G., Brügger, B., Bartenschlager, R., 2021. Convergent use of phosphatidic acid for hepatitis C virus and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Nat. Commun.* 12, 7276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27511-1>
- Taks, E.J.M., Moorlag, S.J.C.F.M., Netea, M.G., van der Meer, J.W.M., 2022. Shifting the Immune Memory Paradigm: Trained Immunity in Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* 9, 469–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-072546>
- Tang-Huau, T.-L., Gueguen, P., Goudot, C., Durand, M., Bohec, M., Baulande, S., Pasquier, B., Amigorena, S., Segura, E., 2018. Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat. Commun.* 9, 2570. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04985-0>
- Tanner, J.E., Alfieri, C., 2021. The Fatty Acid Lipid Metabolism Nexus in COVID-19. *Viruses* 13, 90. <https://doi.org/10.3390/v13010090>
- Taus, E., Hofmann, C., Ibarrondo, F.J., Hausner, M.A., Fulcher, J.A., Krogstad, P., Ferbas, K.G., Tobin, N.H., Rimoin, A.W., Aldrovandi, G.M., Yang, O.O., 2022. Dominant CD8+ T Cell Nucleocapsid Targeting in SARS-CoV-2 Infection and Broad Spike Targeting From Vaccination. *Front. Immunol.* 13, 835830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835830>
- Tay, M.Z., Liu, P., Williams, L.D., McRaven, M.D., Sawant, S., Gurley, T.C., Xu, T.T., Dennison, S.M., Liao, H.-X., Chenine, A.-L., Alam, S.M., Moody, M.A., Hope, T.J., Haynes, B.F., Tomaras, G.D., 2016. Antibody-Mediated Internalization of Infectious HIV-1 Virions Differs among Antibody Isotypes and Subclasses. *PLOS Pathog.* 12, e1005817. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005817>
- Tay, M.Z., Wiehe, K., Pollara, J., 2019. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Front. Immunol.* 10, 332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00332>
- Temming, A.R., Dekkers, G., van de Bovenkamp, F.S., Plomp, H.R., Bentlage, A.E.H., Szittner, Z., Derksen, N.I.L., Wuhrer, M., Rispiens, T., Vidarsson, G., 2019. Human DC-SIGN and CD23 do not interact with human IgG. *Sci. Rep.* 9, 9995. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46484-2>
- Tolnay, M., 2022. Lymphocytes sense antibodies through human FCRL proteins: Emerging roles in mucosal immunity. *J. Leukoc. Biol.* 111, 477–487. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RU0221-102RR>
- Tomaras, G. D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., Poling, B., Nicholson, C.O., Zhang, R., Lu, X., Parks, R., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Gilbert, P.B., Kim, J.H., Michael, N.L., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., 2013. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9019–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301456110>
- Tomaras, Georgia D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.-X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., Poling, B., Nicholson, C.O., Zhang, R., Lu, X., Parks, R., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Gilbert, P.B., Kim, J.H., Michael, N.L., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., 2013. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9019–9024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301456110>
- Tomescu, C., Abdulhaqq, S., Montaner, L.J., 2011. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN): Innate and adaptive immunity in HESN subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04379.x>

- Tomescu, C., Duh, F.-M., Lanier, M.A., Kapalko, A., Mounzer, K.C., Martin, M.P., Carrington, M., Metzger, D.S., Montaner, L.J., 2010. Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1 exposed, uninfected intravenous drug users. *AIDS Lond. Engl.* 24, 2151–2160. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833dfc20>
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>
- Tran, A.C., Diogo, G.R., Paul, M.J., Copland, A., Hart, P., Mehta, N., Irvine, Edward.B., Mussá, T., Drake, P.M.W., Ivanyi, J., Alter, G., Reljic, R., 2020. Mucosal Therapy of Multi-Drug Resistant Tuberculosis With IgA and Interferon- $\gamma$ . *Front. Immunol.* 11.
- Treffers, L.W., ten Broeke, T., Rösner, T., Jansen, J.H.M., van Houdt, M., Kahle, S., Schornagel, K., Verkuijlen, P.J.J.H., Prins, J.M., Franke, K., Kuijpers, T.W., van den Berg, T.K., Valerius, T., Leusen, J.H.W., Matlung, H.L., 2020. IgA-Mediated Killing of Tumor Cells by Neutrophils Is Enhanced by CD47–SIRP $\alpha$  Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunol. Res.* 8, 120–130. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0144>
- Treffers, L.W., van Houdt, M., Bruggeman, C.W., Heineke, M.H., Zhao, X.W., van der Heijden, J., Nagelkerke, S.Q., Verkuijlen, P.J.J.H., Geissler, J., Lissenberg-Thunnissen, S., Valerius, T., Peipp, M., Franke, K., van Bruggen, R., Kuijpers, T.W., van Egmond, M., Vidarsson, G., Matlung, H.L., van den Berg, T.K., 2018. Fc $\gamma$ RIIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. *Front. Immunol.* 9, 3124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03124>
- Trombetta, C.M., Marchi, S., Viviani, S., Manenti, A., Casa, E., Dapporto, F., Remarque, E.J., Bollati, V., Manini, I., Lazzeri, G., Montomoli, E., 2022. A serological investigation in Southern Italy: was SARS-CoV-2 circulating in late 2019? *Hum. Vaccines Immunother.* 18, 2047582. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2047582>
- Tseng, D., Volkmer, J.-P., Willingham, S.B., Contreras-Trujillo, H., Fathman, J.W., Fernhoff, N.B., Seita, J., Inlay, M.A., Weiskopf, K., Miyanishi, M., Weissman, I.L., 2013. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11103–11108. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305569110>
- Tudor, D., Derrien, M., Diomedede, L., Drillet, A.-S., Houimel, M., Moog, C., Reynes, J.-M., Lopalco, L., Bomsel, M., 2009. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4+ cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* 2, 412–426. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.89>
- Tudor, D., Yu, H., Maupetit, J., Drillet, A.-S., Bouceba, T., Schwartz-Cornil, I., Lopalco, L., Tuffery, P., Bomsel, M., 2012. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12680–12685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200024109>
- Tudor, Daniela, Yu, H., Maupetit, J., Drillet, A.-S., Bouceba, T., Schwartz-Cornil, I., Lopalco, L., Tuffery, P., Bomsel, M., 2012. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12680–12685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200024109>
- Twu, W.-I., Lee, J.-Y., Kim, H., Prasad, V., Cerikan, B., Haselmann, U., Tabata, K., Bartenschlager, R., 2021. Contribution of autophagy machinery factors to HCV and SARS-CoV-2 replication organelle formation. *Cell Rep.* 37, 110049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110049>
- Valadés-Alcaraz, A., Reinosa, R., Holguín, Á., 2022. HIV Transmembrane Glycoprotein Conserved Domains and Genetic Markers Across HIV-1 and HIV-2 Variants. *Front. Microbiol.* 13.
- van der Haar Àvila, I., Marmol, P., Kiessling, R., Pico de Coaña, Y., 2019. Evaluating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity by Chromium Release Assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1913, 167–179. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8979-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8979-9_12)

- van Kessel, K.P., Bestebroer, J., van Strijp, J.A., 2014. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* 5, 467. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00467>
- Veazey, R.S., Marx, P.A., Lackner, A.A., Challacombe, S.J., Sweet, S.P., 2001. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* 22, 626–33.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014a. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014b. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vidarsson, G., Stemmerding, A.M., Stapleton, N.M., Spliethoff, S.E., Janssen, H., Rebers, F.E., de Haas, M., van de Winkel, J.G., 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 108, 3573–3579. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024539>
- Vidarsson, G., van der Pol, W.-L., van den Elsen, J.M.H., Vilé, H., Jansen, M., Duijs, J., Morton, H.C., Boel, E., Daha, M.R., Corthésy, B., van de Winkel, J.G.J., 2001. Activity of Human IgG and IgA Subclasses in Immune Defense Against *Neisseria meningitidis* Serogroup B. *J. Immunol.* 166, 6250–6256. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.10.6250>
- Vieira, V.A., Adland, E., Malone, D.F.G., Martin, M.P., Groll, A., Ansari, M.A., Garcia-Guerrero, M.C., Puertas, M.C., Muenchhoff, M., Guash, C.F., Brander, C., Martinez-Picado, J., Bamford, A., Tudor-Williams, G., Ndung'u, T., Walker, B.D., Ramsuran, V., Frater, J., Jooste, P., Peppas, D., Carrington, M., Goulder, P.J.R., 2021. An HLA-I signature favouring KIR-educated Natural Killer cells mediates immune control of HIV in children and contrasts with the HLA-B-restricted CD8+ T-cell-mediated immune control in adults. *PLoS Pathog.* 17, e1010090. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010090>
- Villinger, F., Mayne, A.E., Bostik, P., Mori, K., Jensen, P.E., Ahmed, R., Ansari, A.A., 2003. Evidence for antibody-mediated enhancement of simian immunodeficiency virus (SIV) Gag antigen processing and cross presentation in SIV-infected rhesus macaques. *J. Virol.* 77, 10–24. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.10-24.2003>
- Viox, E.G., Hoang, T.N., Upadhyay, A.A., Nchioua, R., Hirschenberger, M., Strongin, Z., Tharp, G.K., Pino, M., Nguyen, K., Harper, J.L., Gagne, M., Marciano, S., Boddapati, A.K., Pellegrini, K.L., Pradhan, A., Tisoncik-Go, J., Whitmore, L.S., Karunakaran, K.A., Roy, M., Kirejczyk, S., Curran, E.H., Wallace, C., Wood, J.S., Connor-Stroud, F., Voigt, E.A., Monaco, C.M., Gordon, D.E., Kasturi, S.P., Levit, R.D., Gale, M., Vanderford, T.H., Silvestri, G., Busman-Sahay, K., Estes, J.D., Vaccari, M., Douek, D.C., Sparrer, K.M.J., Johnson, R.P., Kirchhoff, F., Schreiber, G., Bosinger, S.E., Paiardini, M., 2023. Modulation of type I interferon responses potently inhibits SARS-CoV-2 replication and inflammation in rhesus macaques. *Sci. Immunol.* 8, eadg0033. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.adg0033>
- Vitiello, L., Gatta, L., Ilari, S., Bonassi, S., Cristina, M., Ciatti, F., Fini, M., Proietti, S., Russo, P., Tomino, C., Limongi, D., 2022. Long Lasting Cellular Immune Response Induced by mRNA Vaccination: Implication for Prevention Strategies. *Front. Immunol.* 13, 836495. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836495>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Vrignaud, L.-L., Schwartz, O., Bruel, T., 2023. Polyfunctionality of broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Curr. Opin. HIV AIDS* 18, 178–183. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000799>
- Wagh, K., Seaman, M.S., Zingg, M., Fitzsimons, T., Barouch, D.H., Burton, D.R., Connors, M., Ho, D.D., Mascola, J.R., Nussenzweig, M.C., Ravetch, J., Gautam, R., Martin, M.A., Montefiori, D.C., Korber, B., 2018. Potential of conventional & bispecific broadly neutralizing antibodies for prevention of

- HIV-1 subtype A, C & D infections. *PLoS Pathog.* 14, e1006860.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006860>
- Walls, A.C., Tortorici, M.A., Frenz, B., Snijder, J., Li, W., Rey, F.A., DiMaio, F., Bosch, B.-J., Veerler, D., 2016. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 899–905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3293>
- Walsh, E.E., Frenck, R.W., Falsey, A.R., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Mulligan, M.J., Bailey, R., Swanson, K.A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.-Y., Türeci, Ö., Tompkins, K.R., Lyke, K.E., Raabe, V., Dormitzer, P.R., Jansen, K.U., Şahin, U., Gruber, W.C., 2020. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N. Engl. J. Med.* 383, 2439–2450. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>
- Wang, E.Y., Mao, T., Klein, J., Dai, Y., Huck, J.D., Jaycox, J.R., Liu, F., Zhou, T., Israelow, B., Wong, P., Coppi, A., Lucas, C., Silva, J., Oh, J.E., Song, E., Perotti, E.S., Zheng, N.S., Fischer, S., Campbell, M., Fournier, J.B., Wyllie, A.L., Vogels, C.B.F., Ott, I.M., Kalinich, C.C., Petrone, M.E., Watkins, A.E., Yale IMPACT Team, Dela Cruz, C., Farhadian, S.F., Schulz, W.L., Ma, S., Grubaugh, N.D., Ko, A.I., Iwasaki, A., Ring, A.M., 2021. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature* 595, 283–288. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y>
- Wang, Q., Finzi, A., Sodroski, J., 2020. The Conformational States of the HIV-1 Envelope Glycoproteins. *Trends Microbiol.* 28, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.007>
- Wang, R., Chen, Y.Q., 2022. Protein Lipidation Types: Current Strategies for Enrichment and Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2365. <https://doi.org/10.3390/ijms23042365>
- Wang, W., Qu, Y., Wang, X., Xiao, M.Z.X., Fu, J., Chen, L., Zheng, Y., Liang, Q., 2023. Genetic variety of ORF3a shapes SARS-CoV-2 fitness through modulation of lipid droplet. *J. Med. Virol.* 95, e28630. <https://doi.org/10.1002/jmv.28630>
- Wang, Y., Grunewald, M., Perlman, S., 2020. Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2203, 1–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2_1)
- Watanabe, Y., Allen, J.D., Wrapp, D., McLellan, J.S., Crispin, M., 2020. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* 369, 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Watkins, J.D., Siddappa, N.B., Lakhashe, S.K., Humbert, M., Sholukh, A., Hemashettar, G., Wong, Y.L., Yoon, J.K., Wang, W., Novembre, F.J., Villinger, F., Ibegbu, C., Patel, K., Corti, D., Agatic, G., Vanzetta, F., Bianchi, S., Heeney, J.L., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Ruprecht, R.M., 2011. An Anti-HIV-1 V3 Loop Antibody Fully Protects Cross-Clade and Elicits T-Cell Immunity in Macaques Mucosally Challenged with an R5 Clade C SHIV. *PLoS ONE* 6, e18207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018207>
- Weisbart, R.H., Kacena, A., Schuh, A., Golde, D.W., 1988. GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature* 332, 647–648. <https://doi.org/10.1038/332647a0>
- Wen, Z., Yuan, Y., Zhao, Y., Wang, H., Han, Z., Li, M., Yuan, J., Sun, C., 2023. Enhancement of SARS-CoV-2 N Antigen-Specific T Cell Functionality by Modulating the Autophagy-Mediated Signal Pathway in Mice. *Viruses* 15, 1316. <https://doi.org/10.3390/v15061316>
- Wilkinson, R.W., Lee-MacAry, A.E., Davies, D., Snary, D., Ross, E.L., 2001. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a flow cytometry-based assay using fluorophores. *J. Immunol. Methods* 258, 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00474-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00474-4)
- Wills, S., Hwang, K.-K., Liu, P., Dennison, S.M., Tay, M.Z., Shen, X., Pollara, J., Lucas, J.T., Parks, R., Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayapan, S., Kaewkungwal, J., Thomas, R., Kim, J.H., Michael, N.L., Robb, M.L., McRaven, M., Montefiori, D.C., Hope, T.J., Liao, H.-X., Moody, M.A., Ferrari, G., Haynes, B.F., Alam, S.M., Bonsignori, M., Tomaras, G.D., 2018. HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. *J. Virol.* 92. <https://doi.org/10.1128/JVI.01552-17>

- Wilson, T.J., Fuchs, A., Colonna, M., 2012. Human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 4741–4745. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102651>
- Worley, M.J., Fei, K., Lopez-Denman, A.J., Kelleher, A.D., Kent, S.J., Chung, A.W., 2018. Neutrophils mediate HIV-specific antibody-dependent phagocytosis and ADCC. *J Immunol Methods* 457, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.007>
- Wren, L.H., Chung, A.W., Isitman, G., Kelleher, A.D., Parsons, M.S., Amin, J., Cooper, D.A., ADCC study collaboration investigators, Stratov, I., Navis, M., Kent, S.J., 2013. Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* 138, 116–123. <https://doi.org/10.1111/imm.12016>
- Wu, X., Guo, J., Niu, M., An, M., Liu, L., Wang, Hui, Jin, X., Zhang, Q., Lam, K.S., Wu, T., Wang, Hua, Wang, Q., Du, Y., Li, J., Cheng, L., Tang, H.Y., Shang, H., Zhang, L., Zhou, P., Chen, Z., 2018. Tandem bispecific neutralizing antibody eliminates HIV-1 infection in humanized mice. *J. Clin. Invest.* 128, 2239–2251. <https://doi.org/10.1172/JCI96764>
- Wuhrer, M., Porcelijn, L., Kapur, R., Koeleman, C.A.M., Deelder, A.M., de Haas, M., Vidarsson, G., 2009. Regulated Glycosylation Patterns of IgG during Alloimmune Responses against Human Platelet Antigens. *J. Proteome Res.* 8, 450–456. <https://doi.org/10.1021/pr800651j>
- Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- Xian, H., Liu, Y., Rundberg Nilsson, A., Gatchalian, R., Crother, T.R., Tourtellotte, W.G., Zhang, Y., Aleman-Muench, G.R., Lewis, G., Chen, W., Kang, S., Luevanos, M., Trudler, D., Lipton, S.A., Soroosh, P., Teijaro, J., de la Torre, J.C., Arditi, M., Karin, M., Sanchez-Lopez, E., 2021. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation. *Immunity* 54, 1463-1477.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.004>
- Xu, L., Pegu, A., Rao, E., Doria-Rose, N., Beninga, J., McKee, K., Lord, D.M., Wei, R.R., Deng, G., Louder, M., Schmidt, S.D., Mankoff, Z., Wu, L., Asokan, M., Beil, C., Lange, C., Leuschner, W.D., Kruij, J., Sendak, R., Do Kwon, Y., Zhou, T., Chen, X., Bailer, R.T., Wang, K., Choe, M., Tartaglia, L.J., Barouch, D.H., O’Dell, S., Todd, J.-P., Burton, D.R., Roederer, M., Connors, M., Koup, R.A., Kwong, P.D., Yang, Z., Mascola, J.R., Nabel, G.J., 2017. Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science* 358, 85–90. <https://doi.org/10.1126/science.aan8630>
- Yada, A., Ebihara, S., Matsumura, K., Endo, S., Maeda, T., Nakamura, A., Akiyama, K., Aiba, S., Takai, T., 2003. Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcγRIIb- and FcγRI/III-mediated immune complex uptake. *Cell. Immunol.* 225, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2003.09.008>
- Yahi, N., Spitalnik, S.L., Stefano, K.A., De Micco, P., Gonzalez-Scarano, F., Fantini, J., 1994. Interferon-gamma decreases cell surface expression of galactosyl ceramide, the receptor for HIV-1 GP120 on human colonic epithelial cells. *Virology* 204, 550–557. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1568>
- Yates, N.L., Liao, H.-X., Fong, Y., deCamp, A., Vandergrift, N.A., Williams, W.T., Alam, S.M., Ferrari, G., Yang, Z., Seaton, K.E., Berman, P.W., Alpert, M.D., Evans, D.T., O’Connell, R.J., Francis, D., Sinangil, F., Lee, C., Nitayaphan, S., Rerks-Ngarm, S., Kaewkungwal, J., Pitisuttithum, P., Tartaglia, J., Pinter, A., Zolla-Pazner, S., Gilbert, P.B., Nabel, G.J., Michael, N.L., Kim, J.H., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Tomaras, G.D., 2014. Vaccine-induced Env V1-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination. *Sci. Transl. Med.* 6, 228ra39. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007730>
- Yu, X., Duval, M., Lewis, C., Gawron, M.A., Wang, R., Posner, M.R., Cavacini, L.A., 2013. Impact of IgA Constant Domain on HIV-1 Neutralizing Function of Monoclonal Antibody F425A1g8. *J. Immunol.* 190, 205–210. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201469>

- Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., Desjarlais, J.R., 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* 28, 157–159. <https://doi.org/10.1038/nbt.1601>
- Zauner, G., Selman, M.H.J., Bondt, A., Rombouts, Y., Blank, D., Deelder, A.M., Wuhrer, M., 2013. Glycoproteomic Analysis of Antibodies. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 856–865. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026005>
- Zhang, B., Moorlag, S.J., Dominguez-Andres, J., Bulut, Ö., Kilic, G., Liu, Z., van Crevel, R., Xu, C.-J., Joosten, L.A., Netea, M.G., Li, Y., 2022. Single-cell RNA sequencing reveals induction of distinct trained-immunity programs in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 132, e147719. <https://doi.org/10.1172/JCI147719>
- Zhang, Chen, Y., Li, Y., Huang, F., Luo, B., Yuan, Y., Xia, B., Ma, X., Yang, T., Yu, F., Liu, J., Liu, B., Song, Z., Chen, J., Yan, S., Wu, L., Pan, T., Zhang, X., Li, R., Huang, W., He, X., Xiao, F., Zhang, J., Zhang, H., 2021. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, e2024202118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024202118>
- Zhang, N., Gao, P., Yin, B., Li, Jiahe, Wu, T., Kuang, Y., Wu, W., Li, Jinxiang, 2019. Cathepsin L promotes secretory IgA response by participating in antigen presentation pathways during *Mycoplasma Hypopneumoniae* infection. *PLoS ONE* 14, e0215408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215408>
- Zhang, Q., Chen, Z., Huang, C., Sun, J., Xue, M., Feng, T., Pan, W., Wang, K., Dai, J., 2021. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Membrane (M) and Spike (S) Proteins Antagonize Host Type I Interferon Response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 766922. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.766922>
- Zhang, Y., Liu, S., Xu, Q., Li, H., Lu, K., 2022. Cleavage of the selective autophagy receptor SQSTM1/p62 by the SARS-CoV-2 main protease NSP5 prevents the autophagic degradation of viral membrane proteins. *Mol. Biomed.* 3, 17. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00083-2>
- Zhong, P., Agosto, L.M., Ilinskaya, A., Dorjbal, B., Truong, R., Derse, D., Uchil, P.D., Heidecker, G., Mothes, W., 2013. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PloS One* 8, e53138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053138>
- Zhou, H., Hu, Z., Castro-Gonzalez, S., 2023. Bidirectional interplay between SARS-CoV-2 and autophagy. *mBio* 0, e01020-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.01020-23>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q.-J., Deng, F., Liu, L.-L., Yan, B., Zhan, F.-X., Wang, Y.-Y., Xiao, G.-F., Shi, Z.-L., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, A., Real, F., Capron, C., Rosenberg, A.R., Silvin, A., Dunsmore, G., Zhu, J., Cottoignies-Callamarte, A., Massé, J.-M., Moine, P., Bessis, S., Godement, M., Geri, G., Chiche, J.-D., Valdebenito, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., Lorin de la Grandmaison, G., Chevret, S., Ginhoux, F., Eugenin, E.A., Annane, D., Bordé, E.C., Bomsel, M., 2022. Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 365. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04318-x>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., Ho, D.D., 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594–597. <https://doi.org/10.1038/35400>

## **ANNEXES**

**Annexe 1 : Optimisation des fonctions de protections d' anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1 par génie génétique**

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

Élément sous droit, diffusion non autorisée.

## Annexe 2 : Liste des publications réalisées au cours de la thèse

- Duchemin, M., Tudor, D., **Cottignies-Calamarte, A.**, Bomsel, M., 2020. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis of HIV-1-Infected Cells Is Efficiently Triggered by IgA Targeting HIV-1 Envelope Subunit gp41. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01141>
- Luu, R., Valdebenito, S., Scemes, E., Cibelli, A., Spray, D.C., Rovegno, M., Tichauer, J., **Cottignies-Calamarte, A.**, Rosenberg, A., Capron, C., Belouzard, S., Dubuisson, J., Annane, D., de la Grandmaison, G.L., Cramer-Bordé, E., Bomsel, M., Eugenin, E., 2021. Pannexin-1 channel opening is critical for COVID-19 pathogenesis. *iScience* 24, 103478. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103478>
- Ruiz, M.J., Siracusano, G., **Cottignies-Calamarte, A.**, Tudor, D., Real, F., Zhu, A., Pastori, C., Capron, C., Rosenberg, A.R., Temperton, N., Cantoni, D., Liao, H., Ternette, N., Moine, P., Godement, M., Geri, G., Chiche, J.-D., Annane, D., Cramer Bordé, E., Lopalco, L., Bomsel, M., 2022. Persistent but dysfunctional mucosal SARS-CoV-2-specific IgA and low lung IL-1 $\beta$  associate with COVID-19 fatal. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.842468/full>
- Zhu, A., Real, F., Capron, C., Rosenberg, A.R., Silvin, A., Dunsmore, G., Zhu, J., **Cottignies-Calamarte, A.**, Massé, J.-M., Moine, P., Bessis, S., Godement, M., Geri, G., Chiche, J.-D., Valdebenito, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., Lorin de la Grandmaison, G., Chevret, S., Ginhoux, F., Eugenin, E.A., Annane, D., Bordé, E.C., Bomsel, M., 2022. Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 365. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04318-x>
- **Cottignies-Calamarte, A.**, Tudor, D., Bomsel, M., 2023. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Front. Immunol.* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1037033/full>
- **Cottignies-Calamarte, A.**, He, F., Zhu, A., Real, F., Bomsel, M., 2023a. Protocol to detect infectious SARS-CoV-2 at low levels using in situ hybridization techniques. *STAR Protoc.* 4, 102593. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102593>

## LISTE DES ELEMENTS SOUS DROIT

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse  
faute d'en détenir les droits

**Document à intégrer dans la version partielle de la thèse**

### Articles, chapitres, entretiens cliniques...

Titre du document	N° (si numéroté)	Page(s) dans la thèse
Mansucrit 1		117 - 167
Manuscrit 2		193 - 245
Annexe 1		311 - 318