



**HAL**  
open science

# Complexité des relations entre le VIH-1 et les sous-types de cellules dendritiques du sang : de la réponse antivirale à la réplication virale

Flavien Brouiller

## ► To cite this version:

Flavien Brouiller. Complexité des relations entre le VIH-1 et les sous-types de cellules dendritiques du sang : de la réponse antivirale à la réplication virale. Immunologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS314 . tel-03550909

**HAL Id: tel-03550909**

**<https://theses.hal.science/tel-03550909>**

Submitted on 1 Feb 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et Thérapeutique - ED394

*Unité INSERM U932 – Immunité et Cancer*

*Équipe Cellule myéloïdes et immunité innée*

*Institut Curie*

# Complexité des relations entre le VIH-1 et les sous-types de cellules dendritiques du sang : de la réponse antivirale à la réplication virale

Par Flavien BROUILLER

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Philippe BENAROCH

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2021

Devant un jury composé de :

Dr DREUX Marlène	Rapporteuse
Dr JOUVENET Nolwenn	Rapporteuse
Dr APPAY Victor	Examineur
Dr BOISSONNAS Alexandre	Examineur
Dr BENAROCH Philippe	Directeur de thèse





## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALIX : *ALG-2 interacting protein X*

APC : Cellule présentatrice d'antigène – *Antigen presenting cell*

APOBEC3G : *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic subunit 3G*

ARN : *Acide ribonucléique*

ART : Thérapie antirétroviral - *Antiretroviral therapy*

ATAC-seq : *Assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing*

AXL : *AXL receptor tyrosine kinase*

AZT : azidothymidine

BST-2 : *Bone marrow stromal antigen 2*

CA : Capside

CADM1 : *Cell adhesion molecule 1*

CBA : *Cytometric bead array system*

CCL : *C-C motif chemokine ligand*

CCR : *C-C chemokine receptor*

CD : *Cluster Differentiation*

cDC1 : Cellule dendritique conventionnelle de type 1 – *conventional DC 1*

cDC2 : Cellule dendritique conventionnelle de type 2 – *conventional DC 2*

cDNA : ADN complémentaire – *complementary DNA*

cGAMP : *Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*

cGAS : *Cyclic GMP-AMP synthase*

CLEC9A : *C-type lectin domain containing 9A*

CLR : *C-type lectin receptor*

CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité

CXCL : *C-X-C motif chemokine ligand*

CXCR : *C-X-C chemokine receptor*

DAMP : Motif moléculaire associé aux dégâts – *Damage associated molecular pattern*

DC : Cellule Dendritique

DC-SIGN : *Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DNA : *Deoxyribonucleic acid*

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

dsDNA : ADN double brin – *double-stranded DNA*

Env : Enveloppe

ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport*

FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*

FLT3-L : *Fms related receptor tyrosine kinase 3 ligand*

Gag : *Group-specific antigen*

GAS : *Gamma interferon activated sites*

GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HIV : *Human immunodeficiency virus*

HTLV : Virus T-lymphotrope humain – *Human T-lymphotropic virus*

IFITM : *Interferon-induced transmembrane*

IFN : Interféron

IFNAR : *Interferon receptor*

IKKe : *Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon*

IL : Interleukine

IN : Intégrase

IPSC : *Induced pluripotent stem cell*

IRF : *Interferon regulatory factors*

ISG : *Interferon stimulated gene*

ISGF3 : *Interferon stimulated gene factor 3*

ISRE : *interferon-sensitive response element*

JAK : *Janus Kinase*

LPS : lipopolysaccharides

LTR : *Long Terminal Repeat*

MA : Matrice

MAVS : *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA5 : *Melanoma differentiation-associated protein 5*

MDDC : *Monocyte-derived dendritic cell*

MDM : *Monocyte derived macrophage*

MHC : *Major histocompatibility Complex*

MIP1 $\alpha$  : *Macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MLR : *Mixed lymphocytes reaction*

MOI : *Multiplicity of infection*

MPS : *Mononuclear phagocyte system*

mRNA : ARN messenger – *messenger RNA*

MX1 : *MX dynamin like GTPase 1*

MX2 : *MX dynamin like GTPase 2*

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response 88*

NC : Nucléocapside

Nef : *Negative factor*

NFkB : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NVP : Névérapine

OAS : *2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1*

ORF : Cadre ouvert de lecture – *Open reading frame*

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes – *Pathogen associated molecular pattern*

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde – *plasmacytoïde DC*

PIC : Complexe pré-intégration – *Pre-integration complex*

PR : Protéase

pre-DC : précurseur de DC – *DC precursor*

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires – *Pattern recognition receptor*

RANTES : *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

RIG-I : *Retinoic acid-inducible gene 1*

RLR : *RIG-I like receptor*

RNA : *ribonucleic acid*

RNAseq : séquençage ARN – *RNA sequencing*

RT : rétrotranscriptase

SAMHD1 : *SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate*

SCF : *Stem cell factor*

scRNAseq : séquençage ARN au niveau de la cellule unique – *single-cell RNA sequencing*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

Siglec-1 : *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins 1*

SIV : *Simian immunodeficiency virus*

ssDNA : ADN simple brin – *single-stranded DNA*

STAT1 : *Signal transducer and activator of transcription 1*

STAT2 : *Signal transducer and activator of transcription 2*

STING : *Stimulator of interferon genes*

TBK1 : *Tank binding kinase 1*

TCR : Récepteur de lymphocyte T – *T cell receptor*

TLR : *Toll-like receptor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

TRIM5 $\alpha$  : *Tripartite motif-containing protein 5 alpha*

TYK : *Tyrosine Kinase*

VCC : *Virus containing compartment*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIS : Virus de l'immunodéficience simienne

VLP : *Viral like particule*

Vpr : *Viral protein R*

Vpu : *Viral protein U*

Vpx : *Viral protein X*

XCR1 : *X-C motif chemokine receptor 1*

## Table des matières

INTRODUCTION.....	11
<b>I. Le système immunitaire inné et sa réponse .....</b>	<b>13</b>
1. Barrières physique et cellulaire du système immunitaire inné.....	13
a. La peau et les muqueuses.....	13
b. Cellules du système immunitaire inné : les cellules myéloïdes.....	14
2. Détection de pathogènes par le système immunitaire inné .....	14
a. PAMP et DAMP.....	15
b. PRR impliqués dans la détection des virus .....	15
i. TLR : Toll-Like Receptors .....	16
ii. RLR : RIG-I-Like Receptors.....	17
iii. Voie de signalisation cGAS/STING.....	18
3. Réponses immunitaires innées enclenchées par les PRR.....	19
a. Réponse inflammatoire activée par NFkB .....	19
b. Réponse interféron antivirale et le rôle des ISG.....	20
<b>II. Les cellules dendritiques .....</b>	<b>22</b>
1. Origine et classification des cellules dendritiques.....	22
a. Découverte des DC.....	22
b. Système de phagocyte mononucléaire .....	23
c. Moyens d'étude de l'hétérogénéité des DC.....	23
2. Diversité des cellules dendritiques humaines .....	24
a. Cellules de Langerhans et DC de la peau et des muqueuses .....	24
b. DC du sang.....	25
i. DC conventionnelles de type 1 et de type 2.....	25
ii. DC plasmacytoïdes .....	26
iii. Axl <sup>+</sup> DC .....	26
c. DC dérivées de monocytes et les DC inflammatoires.....	27
3. Ontogénie des DC.....	28
4. Rôle des cellules dendritiques dans le système immunitaire .....	30

a.	Réponse immunitaire innée des sous-types de DC .....	31
b.	Présentation antigénique par les DC .....	32
<b>III.</b>	<b>Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : le VIH.....</b>	<b>35</b>
1.	Passé, présent et futur du VIH .....	35
2.	Différents virus du VIH : VIH-1 et VIH-2 .....	36
3.	Pathogénèse du VIH-1.....	37
a.	Cellules cibles de l'infection .....	37
b.	Phases de l'infection .....	37
4.	Structure et génome du VIH-1 .....	39
a.	Structure de la particule virale.....	39
b.	Génome et protéines du VIH-1 .....	40
c.	Tropisme et corécepteurs du VIH-1.....	41
5.	Réplication et assemblage du VIH-1 .....	42
a.	Cycle viral du VIH-1 .....	42
b.	Facteurs de restrictions : rôle de SAMHD1.....	44
c.	Assemblage des virus : les VCC dans les macrophages .....	45
6.	Réponse immunitaire antivirale : action et régulation.....	46
a.	Réponse IFN à l'infection par le VIH-1 .....	46
b.	Détection de l'ARN viral .....	47
c.	Détection de l'ADN viral .....	48
d.	Régulation et évasion de la réponse innée par le VIH-1 .....	48
<b>IV.</b>	<b>Cellules dendritiques et VIH-1.....</b>	<b>49</b>
1.	Participation des DC aux phases précoces de l'infection par le VIH-1.....	50
a.	Faible Susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1.....	50
b.	Rôle des DC au niveau des sites d'infection .....	51
2.	Transmission et dissémination du VIH-1 par les DC .....	52
a.	Capture et transfert du VIH : la trans-infection.....	53
b.	Rôle controversé de DC-SIGN dans la trans-infection.....	53
c.	Mécanismes de trans-infection via Siglec-1 .....	54
d.	Cis-infection après réplication virale .....	55
3.	Détection et réponse au VIH-1 dans les DC.....	55

a. Détection du virus par les TLR : rôle des pDC.....	56
b. Détection des particules cytosoliques .....	57
4. Importance de la diversité des DC vis-à-vis de l'exposition au VIH.....	59
a. DC conventionnelles.....	59
b. pDC et Axl <sup>+</sup> DC .....	60
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTATS 1 .....</b>	<b>64</b>
<b>L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE SIGLEC-1 CONFÈRE AU AXL<sup>+</sup> DC (PRÉ-DC) DES CAPACITÉS D'INFECTION ET DE TRANSMISSION DU VIH-1.....</b>	<b>64</b>
I. Résumé .....	65
II. Article.....	68
III. Informations Supplémentaires.....	77
<b>RESULTATS 2 .....</b>	<b>85</b>
<b>L'EXPOSITION DES AXL<sup>+</sup> DC AU VIH-1 ACTIVE DES VOIES DE DÉTECTION VIRALE DIFFÉRENTES QUI RÉVÈLENT UNE DIVERSITÉ FONCTIONNELLE .....</b>	<b>85</b>
I. Résumé .....	86
II. Abstract.....	89
III. Introduction .....	90
IV. Results.....	91
V. Discussion .....	98
VI. Materials and methods .....	103
VII. References .....	110



VIII. Figures and legends.....	114
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>134</b>
1. Spécificités d’infection, de transmission et de réponse des Axl <sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 136	
2. Capture des particules virales par les Axl <sup>+</sup> DC .....	137
a. Rôle de Siglec-1 .....	137
b. Rôle d’AXL.....	138
3. Fusion du VIH-1 dans les sous-types de DC.....	139
4. Détection précoce des particules virales par les Axl <sup>+</sup> DC .....	140
a. Détection par les TLR .....	140
b. Rôle de STING dans la détection précoce.....	142
5. Détection du virus après intégration .....	143
6. Assemblage viral dans les Axl <sup>+</sup> DC.....	144
7. Réponses des Axl <sup>+</sup> DC après exposition et infection par le VIH-1 .....	145
a. Sécrétion de cytokines par les Axl <sup>+</sup> DC.....	145
b. Les Axl <sup>+</sup> DC partagent des caractéristiques fonctionnelles avec les pDC.....	146
c. Absence de prédisposition fonctionnelle des Axl <sup>+</sup> DC.....	147
8. Devenir des Axl <sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 .....	148
9. Perspectives.....	150
<b>REFERENCES.....</b>	<b>152</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>183</b>

# **INTRODUCTION**

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes qui permettent à un organisme de se défendre et de maintenir son intégrité. Il existe deux types de système immunitaire : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. La détection d'un pathogène déclenche l'activation des deux systèmes et la réponse immunitaire.

L'organisation du système immunitaire adaptatif repose sur la reconnaissance d'antigènes spécifiques par les récepteurs des lymphocytes T et des lymphocytes B. Chaque lymphocyte possède un récepteur spécifique d'un antigène. Le système immunitaire adaptatif est dès lors composé d'un vaste répertoire de récepteurs. La liaison du récepteur à son antigène déclenche l'activation des lymphocytes et leur prolifération ; ce processus est appelé expansion clonale. Celle-ci est essentielle pour la mise en place de la réponse immunitaire. Cependant elle nécessite du temps et ne serait pas assez rapide pour combattre un pathogène (Janeway, 1992).

A l'inverse, le système immunitaire inné est une première ligne de défense rapide. Il repose sur une variété de cellules qui perçoivent la présence de pathogènes grâce à des mécanismes moléculaires moins spécifiques que les récepteurs du système adaptatif. En effet, les récepteurs du système immunitaire inné reconnaissent des signaux conservés dans l'évolution issus de pathogènes ou de dégâts cellulaires. On appelle ces récepteurs les PRR pour *Pattern Recognition Receptor*.

Une des nombreuses fonctions des PRR est de rapidement détecter la présence d'un virus dans l'organisme. Plusieurs cellules du système immunitaire inné sont capables de détecter les infections en fonction des PRR qu'elles expriment. Les cellules myéloïdes, en particulier les cellules dendritiques (DC), sont spécialisées dans la détection de pathogènes et donc des virus. Il existe différents sous-types de DC qui possèdent chacun des fonctions précises vis-à-vis des infections virales : les pDC, les cDC1, les cDC2 et les Axl<sup>+</sup> DC.

Mes travaux de thèse visent à analyser la complexité des relations entre les différents sous-types de DC exposées à un virus, le VIH-1. Nous avons étudié la susceptibilité des sous-types de DC à l'infection par le VIH-1 ainsi que leurs capacités à détecter le virus et activer une réponse immunitaire innée.

Pour expliquer le contexte de mes travaux de recherche, nous introduirons dans un premier temps les mécanismes du système immunitaire inné importants dans la détection virale, puis les caractéristiques fonctionnelles des DC et du VIH-1 avant de présenter les spécificités de la relation entre les DC et le VIH-1. Les mécanismes et processus décrits ci-après ne sont pas

exhaustifs mais s'attachent aux éléments essentiels à la compréhension de mes travaux de recherche.

## **I. Le système immunitaire inné et sa réponse**

Les fonctions du système immunitaire inné reposent sur une organisation spatio-temporelle précise à l'échelle des organes, des cellules ou des mécanismes moléculaires, qui définit les différentes étapes dans la protection de l'organisme.

### **1. Barrières physique et cellulaire du système immunitaire inné**

La peau est souvent considérée comme l'élément premier de notre défense puisqu'elle constitue une barrière physique qui limite l'accès des pathogènes à nos tissus. De fait, tous les tissus en contact avec le milieu extérieur, donc les muqueuses et leurs sécrétions, participent à cette défense. La présence de cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif dans la peau et les muqueuses complète efficacement l'action des barrières physiques.

#### **a. La peau et les muqueuses**

L'organisation compacte des cellules de la couche externe de la peau, les cornéocytes, explique son rôle de barrière contre l'invasion d'agents pathogènes (Nguyen and Soulika, 2019). L'expression de nombreuses molécules d'adhésion à la surface des cornéocytes et la présence de jonctions intracellulaires serrées assurent les fonctions de protection de la peau. Les jonctions intracellulaires, serrées ou d'adhérence, sont également essentielles à la structure des épithéliums des muqueuses des systèmes digestifs ou respiratoires par exemple (Garcia et al., 2018 ; Groeger and Meyle, 2019). Les épithéliums des muqueuses comportent des cellules qui sécrètent du mucus. Le mucus possède des propriétés physico-chimiques importantes pour la défense de l'organisme. C'est une barrière physique qui recouvre les épithéliums et les protège en piégeant les pathogènes avant qu'ils ne parviennent jusqu'au tissu (Bakshani et al., 2018). Le mucus est aussi composé de protéines ou peptides aux

propriétés antimicrobiennes qui éliminent les pathogènes ou activent une réponse inflammatoire.

Outre les cellules épithéliales, les différentes couches de la peau et des muqueuses renferment également des cellules du système immunitaire inné.

#### **b. Cellules du système immunitaire inné : les cellules myéloïdes**

Le système immunitaire inné repose sur différents types de cellules qui réagissent toutes rapidement lorsqu'elles perçoivent la présence d'un pathogène (Nowarski et al., 2013). Les cellules myéloïdes sont particulièrement importantes aux fonctions du système immunitaire inné. Elles participent à la détection et à l'élimination des pathogènes. Elles comportent notamment les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les monocytes.

Les macrophages sont présents dans la majorité des tissus de l'organisme. Ils possèdent une origine embryonnaire mais peuvent être renouvelés dans les tissus à partir de la différenciation de monocytes (Ginhoux and Guilliams, 2016 ; Guilliams et al., 2020).

Les macrophages possèdent une capacité de phagocytose remarquable qui leur permet d'ingérer des débris cellulaires, des cellules mortes ou des pathogènes ( Davies et al., 2013 ; Kaufmann, 2019). Ces propriétés leur permettent d'assurer le maintien de l'intégrité des tissus à l'état basal ou leur réparation après un endommagement.

Nous retrouvons les DC dans le sang et dans de nombreux autres tissus tels que les organes lymphoïdes secondaires, les muqueuses intestinales et respiratoires, ou la peau. Malgré leur faible représentation (1% des cellules mononuclées du sang), cette variété de localisation en fait des partenaires indispensables du système immunitaire inné. En effet, elles expriment une variété de récepteurs qui permettent la détection de pathogènes viraux ou bactériens.

## **2. Détection de pathogènes par le système immunitaire inné**

Le système immunitaire inné est caractérisé par sa réponse rapide à une agression par un pathogène. La rapidité de la réponse est permise grâce à l'expression de PRR (*Pattern Recognition Receptor*) par les cellules comme les DC. Les PRR existent en nombre limité, sont conservés dans l'évolution et reconnaissent une variété de motifs structuraux des pathogènes.

### **a. PAMP et DAMP**

Les PRR reconnaissent des PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) (Medzhitov, 2002), qui sont conservés au sein d'une même classe de pathogènes et possèdent des fonctions essentielles pour la survie des virus ou des bactéries. On retrouve dans les PAMP des motifs de la paroi ou des flagelles bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) ou la flagelline ainsi que les acides nucléiques qui codent l'information génétique des virus. Une mutation ou une perte du PAMP entraînerait la mort du pathogène et diminuerait fortement sa virulence. Ils ne sont donc pas soumis à une pression de sélection (Medzhitov, 2017).

En plus des PAMP, le système immunitaire inné est capable de détecter des signaux de danger ou de dégâts appelés DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*). Ceux-ci comportent en outre des molécules relâchées par les cellules après infection, inflammation ou mort (Bianchi, 2007).

Ce sont les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des PAMP qui ont permis aux PRR d'évoluer pour reconnaître une grande variété de pathogènes et de dangers. C'est une combinaison de localisation cellulaire et d'origine du PAMP ou DAMP qui dictent l'engagement du PRR et son activation.

### **b. PRR impliqués dans la détection des virus**

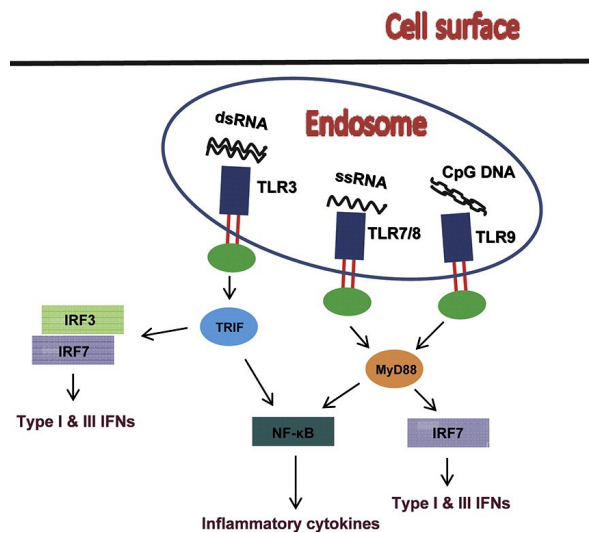
Les PRR peuvent reconnaître différents motifs des pathogènes viraux. L'organisation spatiale des PRR est importante pour détecter les virus à chaque étape de leur cycle de réplication, de l'entrée à la production virale.

Certains récepteurs, comme les CLR (C-type Lecin Receptor) se lient aux résidus de fucose ou de mannose présents sur les protéines d'enveloppe à la surface des virus. Ils permettent à la fois la capture des virus et l'activation d'une réponse immunitaire (leur rôle dans la réponse est résumé dans la revue suivante et ne sera pas détaillé : Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

D'autres récepteurs sont spécialisés dans la détection d'acides nucléiques viraux. Ils incluent les TLR (*Toll-Like Receptors*), les RLR (*RIG-I-Like Receptors*) ou les senseurs d'ADN cytosolique comme cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*). Les TLR et RLR sont conservés dans l'évolution puisqu'on retrouve des gènes orthogues chez des organismes invertébrés comme la drosophile ou l'huitre (Takeda et al., 2003 ; Zhang et al., 2014).

Les TLR, RLR et cGAS sont impliqués dans la reconnaissance des virus à différentes étapes du cycle viral. Les TLR sont capables de détecter des virus en dehors des cellules ou dans les endosomes. En revanche, les RLR et cGAS reconnaissent des acides nucléiques viraux dans le cytosol de la cellule infectée.

i. TLR : *Toll-Like Receptors*



**Figure 1 : Signalisation simplifiée des TLR endosomaux (Adapté de Lester and Li, 2014)**

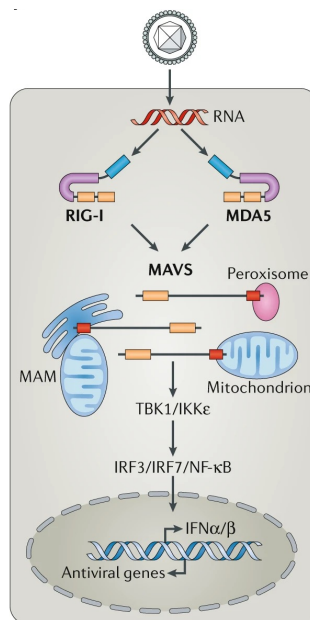
Les récepteurs *Toll* ont été décrits pour la première fois chez la drosophile où ils jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire (Hashimoto et al., 1988). Ils sont également importants pour la défense des drosophiles contre des infections d'origine bactériennes ou fongiques (Lemaitre et al., 1996 ; Rutschmann et al., 2002). La signalisation des *Toll* implique le facteur de transcription NFκB et possède des similarités avec la voie de sécrétion d'IL-1 chez les mammifères (Takeda et al., 2003). Ces observations ont permis l'identification de protéines humaines homologues : les TLR (Medzhitov et al., 1997 ; Rock et al., 1998).

Il existe 10 TLR humains différents dont l'expression est plus ou moins spécifique à certaines populations de cellules. Dans le système immunitaire, on retrouve des profils d'expression de TLR, notamment dans les cellules myéloïdes comme les DC ou les macrophages mais également dans les lymphocytes B (Kawai and Akira, 2007). Les TLR peuvent être classés en fonction de leur localisation : les TLR de surface et les TLR endosomaux. On retrouve dans les endosomes les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9. Le TLR3 détecte l'ARN double brins (dsRNA). Les

TLR7 et TLR8 détectent l'ARN simple brin (ssRNA), tandis que le TLR9 détecte l'ADN non méthylé CpG (Carty et al., 2021). Ainsi, la localisation des TLR endosomaux et leur capacité à reconnaître des acides nucléiques en font des récepteurs de choix dans la détection virale.

Après liaison avec leur ligand, tous les TLR endosomaux recrutent MyD88 sauf TLR3 qui recrute TRIF (Yamamoto et al., 2002). Le recrutement de MyD88 ou TRIF entraîne l'activation de voies de signalisation dépendantes de NFκB, IRF3 et IRF7 (Lester and Li, 2014) (Figure 1). L'activation de NFκB déclenche préférentiellement l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires (Kawai and Akira, 2007) alors que celle des IRF contrôle notamment les sécrétions d'interférons de type I (IFN-I) et type III (IFN-III) (Honda et al., 2005).

## ii. RLR : *RIG-I-Like Receptors*



**Figure 2 : Signalisation de RIG-I et MDA5 (Adapté de Rehwinkel and Gack, 2020)**

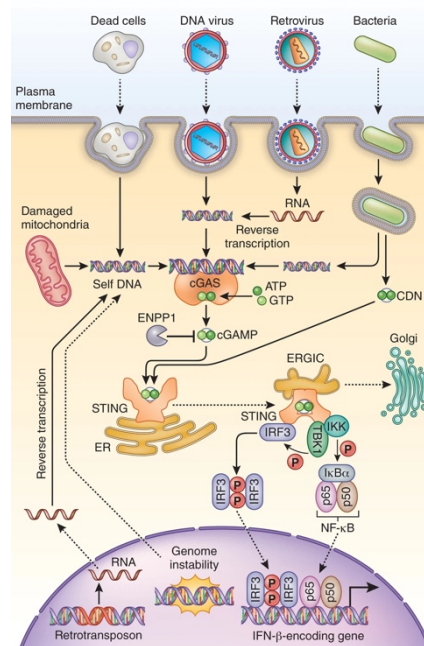
A l'inverse des TLR dont l'expression est restreinte à certaines cellules, les RLR sont exprimés de façon constitutive dans la majorité des types cellulaires.

Les RLR sont une famille de récepteur cytoplasmiques à ARN et jouent donc un rôle dans la détection des virus à ARN comme le VIH-1. La famille des RLR comprend notamment RIG-I et MDA5 (Yoneyama et al., 2004 ; Andrejeva et al., 2004). Après avoir détecté la présence d'ARN viral dans le cytosol, RIG-I et MDA5 recrutent et interagissent avec MAVS, une protéine associée à la mitochondrie (Figure 2). Cette interaction permet l'activation de TBK1/IKKe et ensuite de NFκB et des IRF. Les facteurs de transcription NFκB et IRF sont transloqués dans le noyau et



enclenchent l'expression des gènes d'interférons (IFN) et antiviraux (Rehwinkel and Gack, 2020) (Figure 2). RIG-I et MDA5 sont impliqués dans la réponse antivirale contre de multiples virus à ARN comme les flavivirus, le virus de l'hépatite C ou le VIH (Rehwinkel and Gack, 2020).

### iii. Voie de signalisation cGAS/STING



**Figure 3 : Voie de signalisation de cGAS/STING (Adapté de Chen et al., 2016)**

L'essentiel de l'ADN se trouve dans le noyau et les mitochondries mais est exclu du cytoplasme. La détection de l'ADN dans le cytoplasme active une réponse immunitaire innée. L'enzyme cGAS est le principal senseur d'ADN cytosolique. Après détection d'ADN, d'origine pathogène ou cellulaire, cGAS synthétise le second messager cGAMP, un ligand de STING (Sun et al., 2013 ; Wu et al., 2013) (Figure 3). STING est une protéine transmembranaire résidente du réticulum endoplasmique qui, une fois activée, enclenche une voie de signalisation dépendante de TBK1 et IRF3 (Ishikawa and Barber, 2008). La phosphorylation d'IRF3 par TBK1 permet la transcription de gènes d'IFN et une réponse antivirale (Ishikawa et al., 2009 ; Hopfner and Hornung, 2020) (Figure 3). Dans une moindre mesure, l'activation de STING par cGAMP induit également une translocation de NFκB dans le noyau (de Oliveira Mann et al., 2019). L'activation de NFκB par la voie STING n'est pas encore entièrement établie. Elle dépendrait de l'action redondante de TBK1 et d'IKKe (Balka et al., 2020). En effet, la diminution de TNF sécrété par des macrophages après stimulation de STING n'est montrée qu'après un double *knock-out*

de TBK1 et IKKε. Cependant, l'inhibition de ces kinases par des inhibiteurs chimiques n'a que peu d'effet sur la sécrétion de cytokines dépendantes de NFκB ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes.

Des mécanismes indépendants de cGAS ou de TBK1 ont été mis en évidence après l'activation de STING par des cassures d'ADN ou dans l'inhibition de la réplication de virus à ARN par STING (Dunphy et al., 2018 ; Franz et al., 2018). La description précise de ces voies d'activation reste cependant encore à établir.

Le système immunitaire inné comporte donc de multiples outils pour détecter l'entrée des virus dans les cellules ou leur réplication. Ces voies activent des facteurs de transcription essentiels pour l'établissement de réponses inflammatoires ou antivirales.

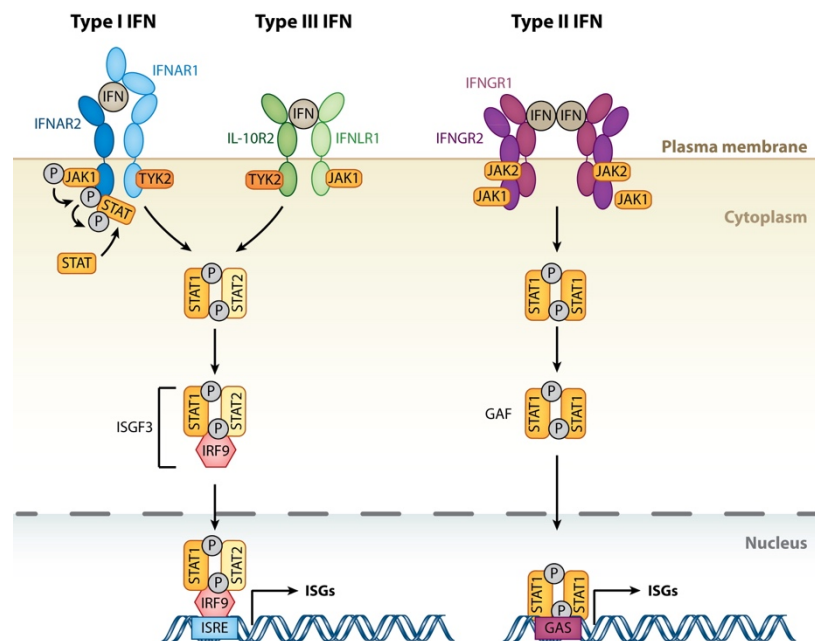
### **3. Réponses immunitaires innées enclenchées par les PRR**


#### **a. Réponse inflammatoire activée par NFκB**

Après détection d'acides nucléiques viraux, les TLR et STING peuvent activer le facteur de transcription NFκB. Ce dernier est important dans l'établissement d'une réponse immunitaire innée. En effet, NFκB contrôle l'expression de nombreux gènes dont des récepteurs nécessaires à l'activation des cellules, des molécules impliquées dans la présentation d'antigènes ou des cytokines et chimiokines (Ghosh et al., 1998). NFκB stimule notamment la production d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNFα (Akira and Kishimoto<sup>†</sup>, 1992 ; Baldwin, 1996). Ce sont des cytokines aux fonctions pléiotropiques dans la réponse immunitaire qui participent à la résolution de l'infection et au maintien de l'intégrité des tissus (Borish and Steinke, 2003). Par exemple, TNFα présente une action cytotoxique directe ou à travers l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Prévost-Blondel et al., 2000 ; Sedger and McDermott, 2014). De leur côté, IL-1 et IL-6 contribuent entre autres à l'activation et la différenciation des lymphocytes T (Zhu et al., 2010 ; Hunter and Jones, 2015). IL8 recrute et active des neutrophiles au site d'infection (Horuk, 1994 ; Kolaczkowska and Kubes, 2013). Ces cytokines peuvent elles-mêmes activer la voie NFκB, ce qui initie une boucle de signalisation positive (Osborn et al., 1989). NFκB induit également la sécrétion de molécules nécessaires à la prolifération ou différenciation des cellules immunitaires comme l'IL-2 ou le GM-CSF ; ou d'IFN pour une

réponse antivirale (Schreck and Baeuerle, 1990 ; Los et al., 1995 ; Thanos and Maniatis, 1995). Néanmoins, la sécrétion d'IFN reste majoritairement induite par les facteurs de transcriptions IRF.

**b. Réponse interféron antivirale et le rôle des ISG**



 Schneider WM, et al. 2014. Annu. Rev. Immunol. 32:513–45

**Figure 4 : Signalisation des récepteurs à l'interféron (Adapté de Schneider et al., 2014)**

La reconnaissance d'acides nucléiques exogènes dans le cytosol induit l'activation des IRF (*Interferon Regulatory Factor*) et l'expression d'IFN. Les IFN sont des protéines sécrétées qui possèdent de multiples fonctions une fois détectés par les cellules. Il existe trois types d'interférons : les interférons de type I (IFN-I), de type II (IFN-II) et de type III (IFN-III).

Les IFN-I sont les acteurs majeurs de la réponse antivirale et comprennent entre autres les IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  (McNab et al., 2015). Ils possèdent également des fonction de régulation de la réponse immunitaire à travers la modulation de l'expression de certaines cytokines ou d'autres interférons comme l'IL-12, l'IL-15 et l'IFN $\gamma$  (Biron, 2001). Les IFN-I se lient et induisent un signal par un récepteur transmembranaire (IFNAR) composé de deux chaînes, IFNAR1 et IFNAR2, qui est exprimé à la surface des cellules (Figure 4). La reconnaissance de l'IFN-I par IFNAR active une cascade de signalisation dépendante de JAK/STAT (Ivashkiv and Donlin, 2014). Les kinases

JAK et TYK2 phosphorylent STAT1 et STAT2 ce qui induit leur dimérisation. Le dimère STAT1/STAT2 est transloqué dans le noyau et s'associe à IRF9 pour former le complexe ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3) (Darnell et al., 1994). Dans le noyau, ISGF3 reconnaît des séquences d'ADN appelées ISRE (Interferon Sensitive Response Element), présentes dans les régions régulatrices des ISG (Interferon Stimulated Genes). Les ISG sont des gènes aux propriétés antivirales (Schoggins et al., 2011).

Les IFN-I ne sont pas les seuls à induire une réponse ISG. Les IFN-III (IFN $\lambda$ ) activent la même voie de signalisation à partir d'autres récepteurs et sont capables d'induire une réponse antivirale notamment contre le VIH (Zhou et al., 2007 ; Hou et al., 2009).

À travers l'homodimérisation de STAT1, la signalisation par l'IFN $\gamma$  promeut aussi la transcription d'ISG (Lew et al., 1989). Dans ce cas, le complexe transcriptionnel reconnaît des séquences d'ADN dites GAS (*Gamma interferon Activated Sites*) (Schroder et al., 2004) (Figure 4).

La fonction antivirale des ISG se traduit par l'inhibition de différentes étapes des cycles viraux (Schneider et al., 2014).

Par exemple, MX1 et MX2 bloquent les virus après leur entrée dans le cytoplasme. MX1 est capable de séquestrer les nucléocapsides des virus Toxotho et de la grippe dans le cytoplasme, ce qui empêche leur transfert dans le noyau (Kochs and Haller, 1999 ; Xiao et al., 2013). De son côté, MX2 empêchent l'importation du cDNA du VIH-1 dans le noyau grâce à une interaction avec la capsid virale (Goujon et al., 2013 ; Betancor et al., 2019).

L'étape de traduction de l'ARN viral ou de réplication virale peut être impactée par les IFITs, les protéines OAS ou ISG15 (Chakrabarti et al., 2011 ; Schneider et al., 2014). ISG15 est une petite protéine qui se lie de façon covalente à des protéines cibles à travers un processus de modification post-traductionnelle, appelé l'ISGylation

(Zhao et al., 2013). L'ISGylation permet d'accentuer la réponse IFN-I à travers la stabilisation d'IRF3 par exemple (Shi et al., 2010). ISG15 est aussi capable de se lier aux protéines virales, comme la protéine NS1 du virus de la grippe ou Gag du VIH-1, afin de diminuer la réplication virale (Tang et al., 2010 ; Woods et al., 2011). L'ISGylation des protéines virales pourrait perturber leur trafic et impacter l'assemblage des virus.

Certains ISG sont également capables de bloquer les étapes de libération des virus dans le milieu extracellulaire. La téthérine, ou BST-2, possède une topologie unique avec deux motifs d'ancrage aux membranes lipidiques. Cette structure lui permet de retenir les virus, dont le

VIH, par une extrémité tout en étant attaché à la membrane plasmique par l'autre extrémité (Perez-Caballero et al., 2009 ; Swiecki et al., 2013).

De surcroît, les PRR et les molécules de signalisation impliquées dans la détection de pathogènes sont eux-mêmes des ISG. L'expression de RIG-I et STING est, par exemple, augmentée par la signalisation via l'IFN-I (Ma et al., 2015 ; Matikainen et al., 2006). Ce mécanisme permet de renforcer la réponse interféron et la détection de PAMP à chaque étape du cycle de réplication du virus en détectant l'ARN viral après transcription par exemple.

Les cellules myéloïdes sont les principales cellules sécrétrices de cytokines inflammatoires et d'interférons. Parmi elles, les DC sont particulièrement bien équipées pour détecter et répondre aux pathogènes. En effet, elles expriment à la fois les PRR cytosoliques RIG-1 et cGAS et les TLR endosomaux. Elles sont également capables d'internaliser des pathogènes par endocytose ou phagocytose. Elles jouent donc un rôle crucial dans la mise en place de la réponse immunitaire à une infection virale.

## **II. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules capables d'induire une réponse immunitaire innée et sont spécialisées dans la présentation d'antigènes. Elles sont importantes pour faire le lien entre le système immunitaire inné et le système adaptatif (Banchereau et al., 2000). Les DC forment une population hétérogène composée de différents sous-types qui possèdent des spécialisations fonctionnelles.

### **1. Origine et classification des cellules dendritiques**

#### **a. Découverte des DC**

La découverte des cellules dendritiques est attribuée à Ralph Steinman et a été initiée par la nécessité de comprendre quel partenaire cellulaire enclenchait l'activation des lymphocytes T (Steinman, 2012). Elle a été permise grâce à l'analyse de suspension cellulaire de rate de souris, connue pour initier une réponse immunitaire in vitro (Steinman and Cohn,

1973). Cependant, la classification des DC comme une nouvelle population de cellules n'était alors pas précisément établie, les cellules ayant été considérées comme un sous-type de macrophages (Guilliams et al., 2014). Par la suite, les DC ont été caractérisées par une forte expression de molécules de MHC et une capacité supérieure aux macrophages à stimuler la prolifération des lymphocytes en MLR (*Mixed Lymphocyte Reaction*) (Steinman and Witmer, 1978). Ces résultats ont confirmé leur spécificité fonctionnelle et leur identification comme une nouvelle population cellulaire. Ce sont en effet les meilleures cellules présentatrices d'antigènes (APC pour *Antigen Presenting Cell*)

#### **b. Système de phagocyte mononucléaire**

Les DC, les macrophages et les monocytes ont des fonctions semblables et complémentaires pendant la mise en place d'une réponse immunitaire innée. Elles peuvent toutes internaliser des pathogènes et induire une réponse immunitaire innée. Historiquement, ces similarités fonctionnelles ont permis de regrouper ces cellules au sein du MPS (Mononuclear Phagocytes System) (Guilliams et al., 2014). Aujourd'hui, la multiplicité des études qui s'intéressent au rôle de ces cellules du MPS à l'état basal ou après une infection, montre la complexité de leurs relations et rend leur classification compliquée. Il est donc proposé de les classer à la fois par leur origine et par leur localisation. Cette organisation établit l'origine embryonnaire des macrophages résidents des tissus et l'origine hématopoïétique des monocytes et des DC. Les monocytes ont également la capacité de se différencier en cellules dérivées de monocytes aux propriétés semblables à certaines DC, les moDC (Schlitzer et al., 2015a). La population de DC est minoritaire par rapport aux macrophages et aux monocytes mais est particulièrement diversifiée. Les différents sous-types de DC sont caractérisés par une variété d'origines, de fonctions et de localisations (Schlitzer et al., 2015 ; Balan et al., 2019).

#### **c. Moyens d'étude de l'hétérogénéité des DC**

L'étude de l'hétérogénéité des DC est essentielle pour décoder les mécanismes de différenciation, de développement et d'activation des différents sous-types de DC. La compréhension de la complexité des origines et des fonctions des DC permettrait d'envisager la manipulation de ces cellules dans un objectif thérapeutique.

Une des premières observations de l'hétérogénéité des DC a montré l'existence de deux populations de DC, les DC CD8 $\alpha^+$  et les DC CD8 $\alpha^-$  dans le thymus et la rate de souris grâce à l'utilisation de nouvelles techniques d'isolation cellulaire et d'analyses par cytométrie en flux (Vremec et al., 1992 ; Anjuère et al., 1999 ; Steinman, 2012). Il revient à l'étude de l'ontogénie des DC de permettre la description des mécanismes précis de différenciation et de développement des différents sous-types de DC. Elle repose souvent sur l'analyse des populations de cellules et de leurs progéniteurs chez la souris. En effet, la génération de souris transgéniques et la multiplicité des marqueurs qu'il est possible d'analyser par cytométrie en flux ont montré l'importance de la régulation de l'expression des facteurs de transcription et des cytokines dans le développement des DC (Nutt and Chopin, 2020 ; Anderson et al., 2021). Par exemple, la diminution de la population de DC CD8 $\alpha^+$  retrouvées dans la rate de souris *knock-out* pour le facteur de transcription IRF8 montre l'importance de cette protéine dans la différenciation des DC CD8 $\alpha^+$  (Schiavoni et al., 2002 ; Aliberti et al., 2003).

Récemment, le développement de techniques d'analyses à haute définition, comme la cytométrie de masse ou le séquençage de la cellule unique (*scRNAseq*, *Single cell RNA sequencing*), ont permis d'approfondir la compréhension des processus de différenciation des DC (See et al., 2018 ; Dress et al., 2020). Ces techniques permettent notamment de diminuer la quantité de cellules nécessaire à l'analyse et donc de contourner la faible représentation des DC dans le sang et dans les tissus. Leur utilisation s'avère utile pour comparer et transposer les données obtenues chez la souris avec celles de l'homme.

## 2. Diversité des cellules dendritiques humaines

### a. Cellules de Langerhans et DC de la peau et des muqueuses

La première description de cellules morphologiquement semblables aux cellules dendritiques dans la peau remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec l'identification des cellules de Langerhans (LC) (Deckers et al., 2018). Initialement définies comme des DC, leur origine a désormais été identifiée comme étant similaire aux macrophages résidents des tissus. En revanche, elles adoptent des fonctions similaires aux DC, notamment leur capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T (Deckers et al., 2018). Elles sont présentes dans les différents épithéliums de l'organisme comme dans l'épiderme ou dans les muqueuses vaginales et

respiratoires. Les LC sont caractérisées par l'expression à leur surface de la langerine (un CLR) et de CD1a. La présence de compartiments intracellulaires en forme de raquette qui sont identifiables par microscopie ultra-structurale est caractéristique des LC et permet de les distinguer des autres cellules de la peau. On appelle ces compartiments les granules de Birbeck (Mc Dermott et al., 2002).

Des DC exprimant le CD1a ou la langerine sont également retrouvées dans les muqueuses génitales (Pena-Cruz et al., 2018 ; Bertram et al., 2019 ; Wollenberg et al., 1996). L'absence de granules de Birbeck dans leur cytosol en fait des cellules différentes des LC. Enfin, des DC conventionnelles, cDC1 et cDC2, sont retrouvées dans le derme, la couche inférieure de la peau. Elles sont structurellement et fonctionnellement semblables aux DC du sang (Rhodes et al., 2019).

## **b. DC du sang**

Les DC du sang humain sont classiquement séparées en DC myéloïdes (DC conventionnelles de type 1 et de type 2 : cDC1 et cDC2) et DC plasmacytoïdes (pDC) (Balan et al., 2019). Récemment, l'analyse par scRNAseq des populations de DC du sang a révélé l'existence d'une quatrième population, les Axl<sup>+</sup> DC, dont la fonction est encore peu connue (Villani et al., 2017 ; See et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017).

### **i. DC conventionnelles de type 1 et de type 2**

Les cDC1 forment une population homogène caractérisée par l'expression des marqueurs de surface CLEC9A, CADM1, XCR1 et CD141 et sont souvent désignées comme CD141<sup>+</sup> DC. Elles ne représentent qu'une minorité des DC, et sont particulièrement efficaces à la présentation croisée d'antigènes exogènes.

De leur côté les cDC2 sont les DC myéloïdes les plus représentées dans le sang. Elles expriment spécifiquement à leur surface CD1c d'où leur désignation de CD1c<sup>+</sup> DC. A l'inverse des DC1 très homogènes, la population de DC2 est montrée comme hétérogène par des approches de scRNAseq et de cytométrie (Villani et al., 2017 ; Yin et al., 2017a ; Alcántara-Hernández et al., 2017). Les différences d'expression de marqueurs de surface définissent les cDC2-A et cDC2-B (ou DC2 et DC3). Les cDC2-A (DC2) expriment CD32b et plus fortement CD1c, MHC-II et CD5, alors que les cDC2-B (DC3) expriment CD36, CD163 et un set de gènes de la réponse inflammatoire. En cohérence avec l'expression des récepteurs MHC-II, les cDC2-A



seraient plus efficaces que les cDC2-B à induire une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Yin et al., 2017a). La majorité des analyses fonctionnelles des cDC2 a considéré la population comme homogène. Les différences précises de fonctions entre les deux sous-types de cDC2 restent donc à établir.

Les DC conventionnelles ont communément été étudiées comme une même population. On retrouve de nombreuses études les mentionnant comme DC myéloïdes ou DC CD11c<sup>+</sup> pour les différencier des DC plasmacytoïdes.

## ii. DC plasmacytoïdes

Les pDC sont définies par l'expression de CD123, CD45RA et CD303 et par l'absence d'expression des marqueurs des cellules myéloïdes CD11c, CD11b et CD33. Elles sont également caractérisées par leur réticulum endoplasmique rugueux (RER) et appareil de golgi très développés qui sont identifiables en microscopie ultra-structurale (Colonna et al., 2004). Cette spécificité morphologique est en cohérence avec leur forte activité sécrétoire. En effet, les pDC sont spécialisées dans la sécrétion d'IFN-I, notamment après détection de pathogènes viraux (Swiecki and Colonna, 2015).

L'expression différentielle de CD2 à la surface des pDC a suggéré l'existence deux sous-types de cellules : des pDC CD2<sup>hi</sup> et des pDC CD2<sup>lo</sup> (Matsui et al., 2009 ; Zhang et al., 2017). Cette hétérogénéité aurait expliqué les différentes fonctions rapportées dans les pDC. Les pDC CD2<sup>lo</sup> étant meilleures productrices d'IFN-I et les pDC CD2<sup>hi</sup> meilleures pour induire l'activation des lymphocytes (Matsui et al., 2009 ; Zhang et al., 2017). Cependant, les récentes analyses de l'hétérogénéité des DC du sang ont montré que les pDC CD2<sup>hi</sup> étaient finalement un nouveau sous-type de DC : les Axl<sup>+</sup> DC (Villani et al., 2017 ; See et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017).

## iii. Axl<sup>+</sup> DC

Les Axl<sup>+</sup> DC expriment spécifiquement les récepteurs AXL et SIGLEC-6 ce qui leur vaut parfois d'être nommées AS DC (Villani et al., 2017). La forte résolution des analyses par séquençage et cytométrie a permis de définir un programme transcriptomique spécifique des Axl<sup>+</sup> DC. Ces dernières partagent cependant des caractéristiques avec les pDC et les DC conventionnelles (Villani et al., 2017 ; See et al., 2017). En effet, les Axl<sup>+</sup> DC expriment conjointement CD45RA et CD123, des marqueurs de pDC, et CD33 et CD11c typique des DC

conventionnelles. Du fait de ce phénotype hybride entre pDC et cDC2, les Axl<sup>+</sup> DC ont été décrites comme des DC transitionnelles ou tDC (*transitional DC*) chez l'homme et la souris (Leylek et al., 2019). Elles sont morphologiquement similaires aux DC conventionnelles et, à l'instar de ces dernières, sont capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T en MLR. Elles sont cependant incapables de sécréter de l'IFN-I après stimulation des TLR, ce qui en fait une population de DC fonctionnellement distincte des pDC (Villani et al., 2017 ; See et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017).

Les Axl<sup>+</sup> DC sont capables de se différencier en DC conventionnelles, majoritairement en cDC2, dans des conditions in vitro. Elles sont donc parfois appelées pré-DC pour illustrer cette fonction de précurseurs (See et al., 2017). Les Axl<sup>+</sup> DC ont été principalement identifiées dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (Alcántara-Hernández et al., 2017). Du fait de leur mise en évidence récente, leur localisation précise dans les différents tissus de l'organisme reste à établir.

### c. DC dérivées de monocytes et les DC inflammatoires

Des DC dérivées de monocytes (mo-DC) ont été identifiées dans la peau et les ganglions lymphatiques chez la souris à l'état stationnaire ou après infection (León et al., 2007 ; Kool et al., 2008 ; Tamoutounour et al., 2013). De plus en plus de résultats indiquent également l'existence de DC dérivées de monocytes chez l'homme (Coillard and Segura, 2019 ; Villar and Segura, 2020). En effet, la signature transcriptomique de DC SRIP $\alpha^+$  CD103<sup>-</sup> dans l'intestin humain corrèle avec celle des monocytes CD14<sup>+</sup> mais pas avec les cDC1 ou cDC2 du sang, ce qui suggère une origine monocytique de ces cellules (Watchmaker et al., 2014). C'est principalement dans des conditions inflammatoires que l'on retrouve le plus de DC qui partagent des programmes transcriptomiques avec les monocytes. On les appelle les DC inflammatoires. La généralisation des études de scRNAseq a permis d'identifier ces DC inflammatoires dans des prélèvements d'ascites, dans des poumons de patients atteints de cancer, et dans des tissus intestinaux de patients atteints de la maladie de Crohn (Tang-Huau et al., 2018 ; Zilionis et al., 2019 ; Martin et al., 2019). Cependant, aucun lien entre les monocytes et les DC inflammatoires n'a encore été directement établi. D'ailleurs, un lien entre cDC2 et DC inflammatoire est également proposé (Dutertre et al., 2019). En effet, la proportion de DC inflammatoire CD1c<sup>lo</sup> CD14<sup>+</sup> du sang augmente après le traitement des patients par le FLT3-L alors que celle des monocytes diminue. Le FLT3-L est nécessaire à la différenciation des

cDC mais pas des monocytes. Cela suggère une différenciation ou maturation des DC conventionnelles en DC inflammatoire et invalide l'hypothèse d'une provenance des monocytes. En conséquence, l'origine des DC inflammatoire est donc incertaine et reste à précisément établir chez l'homme.

Ces variations d'interprétation peuvent être attribuées au caractère aléatoire de l'analyse des populations de cellules. En effet, les techniques de séquençage et d'immunophénotypage par cytométrie sont limité par la dimension temporelle. Elles ne permettent qu'une analyse à un moment précis d'un processus de différenciation qui est pourtant dynamique et continu.

Pour contourner les limitations techniques de l'analyse de l'origine des DC chez l'homme, l'ontogénie des DC est majoritairement étudiée par l'emploi de différents modèles de souris transgéniques qui peuvent être déficientes pour certains facteurs de transcriptions ou qui peuvent permettre le suivi des cellules in vivo (stratégies de *fate mapping*).

### 3. Ontogénie des DC

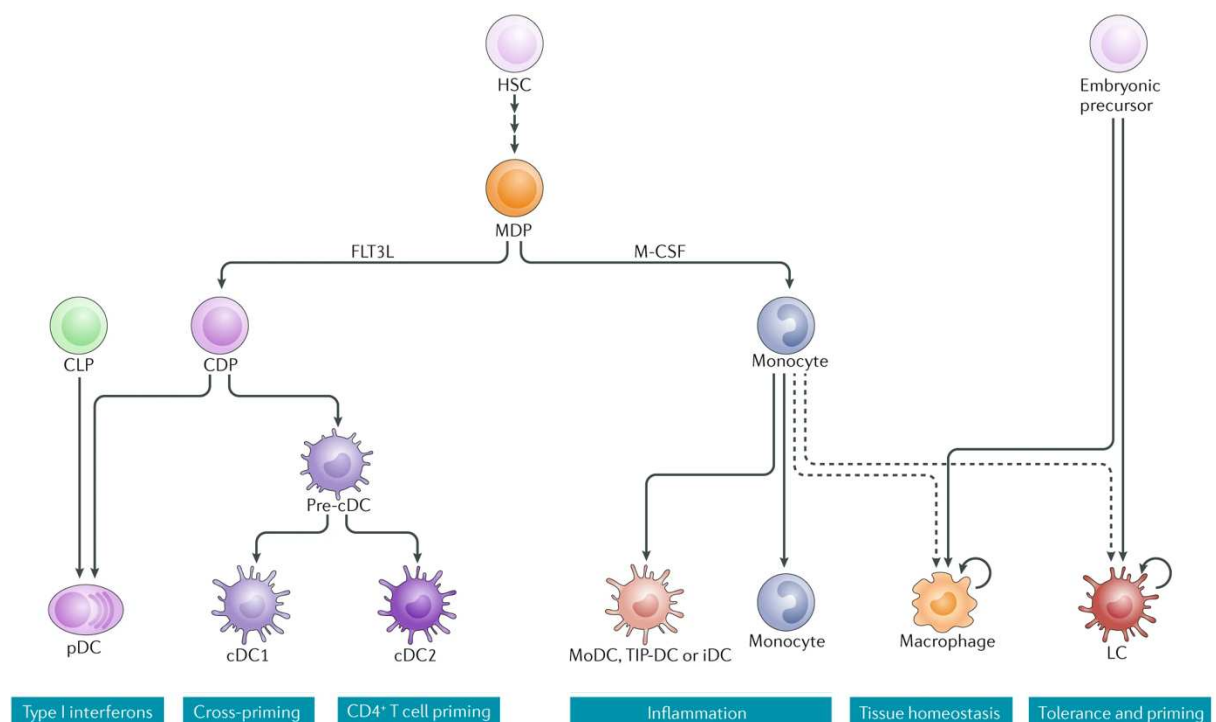


Figure 5 : Schéma simplifié de différenciation des DC et autres cellules myéloïdes (Adapté de Eisenbarth, 2019).

Le développement des DC complètement différenciées est un processus dynamique et graduel qui implique de multiples signaux : il nécessite la combinaison d'expression de facteurs de transcriptions et de récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance. Les données de différenciation des DC chez l'homme sont principalement obtenues par analogie et transposition des mécanismes démontrés chez la souris.

Toutes les DC sont issues d'un progéniteur commun hématopoïétique CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse : les HSC (Hematopoietic Stem Cells, Figure 5), alors que les macrophages résidants des tissus et les LC ont d'abord une origine embryonnaire (Figure 5) (Ginhoux and Guilliams, 2016). Après différentes étapes de prolifération et de différenciation, les HSC se divisent en deux populations de précurseurs : les CLP et les MDP. Les CLP (Common Lymphoid Progenitors) se différencient en lymphocytes et en cellules lymphoïdes innées. Les MDP (Macrophages Dendritic cells Progenitors) sont à l'origine de la majorité des DC, des monocytes et du renouvellement des macrophages (Merad et al., 2013 ; Guilliams et al., 2020).

Toujours dans la moelle osseuse, les MDP se différencient en pré-DC via un progéniteur commun des DC conventionnelles (CDP) et une signalisation par FLT3-ligand (FLT3-L). Chez la souris, les pré-DC adoptent ensuite deux programmes transcriptomiques différents menant à la différenciation complète des cDC1 ou cDC2 par l'intermédiaire de pré-cDC1 ou de pré-cDC2 (Schlitzer et al., 2015b). Les cDC1 sont dépendants de l'activité des facteurs de transcription BATF3 et IRF8 (Grajales-Reyes et al., 2015), alors que les DC2 nécessitent IRF4 et KLF4 pour leur développement complet (Persson et al., 2013 ; Williams et al., 2013 ; Tussiwand et al., 2015 ; Murphy et al., 2016). Les populations de cDC2 ne sont pas totalement éliminées chez les souris qui présentent un *knock-out* d'IRF4 ou de KLF4 ce qui suggère l'implication d'autres facteurs de transcriptions. La population de cDC2 étant hétérogène, ces facteurs de transcription pourraient également n'être nécessaire que pour l'une ou l'autre des populations de DC2. Des analyses de suivi des cDC2 par *fate mapping* chez la souris pourraient permettre de décrire plus précisément leurs mécanismes de différenciation.

La différenciation des pDC s'obtient par l'inhibition du facteur de transcription ID2 ce qui entraîne l'activation de TCF4 (Cisse et al., 2008 ; Ghosh et al., 2010). L'origine des pDC a traditionnellement été attribuée au CDP. En effet, la compétition entre ID2 et TCF4 lors de la différenciation du CDP aurait pu expliquer la divergence des voies cDC et pDC (Naik et al., 2007 ; Ghosh et al., 2010). Cependant, des analyses de scRNAseq et de fate mapping suggèrent que

la majorité des pDC proviennent du précurseur lymphoïde CLP (Rodrigues et al., 2018 ; Dress et al., 2019). Ces résultats pourraient expliquer les différences de proportions entre pDC et DC conventionnelles dans le sang : les pDC y sont plus abondantes ; ainsi que les similarités morphologiques entre pDC et lymphocytes B : les deux cellules présentant un RER et un golgi très développé.

Chez l'homme, les précurseurs CDP et pré-DC ont été mis en évidence dans la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical et le sang périphérique, notamment du fait de l'expression du récepteur FLT3 (Lee et al., 2015 ; Breton et al., 2015). La comparaison d'analyses de scRNAseq du sang humain a permis d'établir une corrélation entre pré-DC et Axl<sup>+</sup> DC, les deux types cellulaires exprimant AXL et SIGLEC6 (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017). En revanche, les capacités de prolifération et de différenciation des Axl<sup>+</sup> DC en DC conventionnelles in vitro ne sont pas clairement établies. Le traitement d'Axl<sup>+</sup> DC in vitro avec des cytokines nécessaires à leur différenciation (FLT3, GM-CSF et SCF) conduit à l'identification de cDC2 et cDC1 en proportions différentes après 5 à 7 jours de culture (Breton et al., 2015 ; See et al., 2017 ; Villani et al., 2017). Les différences de proportions de cDC1 et cDC2 obtenues à partir des pré-DC pourraient illustrer les différences de proportions entre les DC conventionnelles observées dans le sang, mais suggèrent aussi une prédisposition des pré-DC en culture pour les cDC1 ou les cDC2 (See et al., 2017). À l'inverse, la différenciation des AS DC est présentée comme une maturation de ces-dernières en cDC2 (Villani et al., 2017). Les quelques cDC1 obtenues proviendraient d'une contamination lors du tri cellulaire.

Ces différences d'interprétation pourraient être expliquées par les différentes stratégies de tri cellulaire par cytométrie utilisées pour isoler les pré-DC ou AS DC. En effet, la population d'AS DC pourrait exclure des pré-cDC1 CD141<sup>+</sup> nécessaires à la différenciation en cDC1. Ainsi, la contribution des Axl<sup>+</sup> DC au développement des populations de DC conventionnelles n'est pas encore précisément établie chez l'Homme.

#### **4. Rôle des cellules dendritiques dans le système immunitaire**

L'hétérogénéité des DC est essentielle à leur diversité fonctionnelle. En effet, même si les différentes sous-populations de DC partagent des fonctions communes, leur hétérogénéité permet une spécialisation fonctionnelle (Figure 5).

**a. Réponse immunitaire innée des sous-types de DC**

Les DC ont une importance considérable dans la détection de pathogènes grâce à la variété de PRR qu'elles expriment, notamment les TLR endosomaux. Chaque population de DC exprime une combinaison de PRR et de TLR différents. L'activation d'un PRR par un PAMP induit la maturation des DC qui se traduit par l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation et par la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines.

Les cDC1 du sang expriment les TLR endosomaux TLR3 et TLR8 (Hémont et al., 2013 ; Colletti et al., 2016). Les cDC1 sont les principales DC productrices d'IFN $\lambda$ . La stimulation des cDC1 par poly I :C, un ligand de TLR3, ou l'exposition au virus de l'hépatite C, induit l'activation de TRIF, la phosphorylation d'IRF3 et la production d'IFN $\lambda$  (Lauterbach et al., 2010 ; Yoshio et al., 2013 ; Nizzoli et al., 2013). L'activation de TLR3 par le poly I :C induit également la maturation des cellules et la sécrétion d'IFN  $\beta$  et d'IL-12 (Colletti et al., 2016). L'IL-12 est une cytokine importante pour la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. Elle est cependant principalement produite par les cDC2 (Nizzoli et al., 2013 ; Cohn et al., 2013).

Les DC2 expriment une variété de TLR de surface et majoritairement TLR8 dans les endosomes (Hémont et al., 2013). En plus de l'IL-12, elles sécrètent notamment du TNF $\alpha$  et de l'IL-6 après une stimulation par une combinaison de poly I :C et de R848 un ligand des TLR7 et TLR8 (Sittig et al., 2016).

De leur côté, les pDC sont caractérisées par une forte expression des TLR endosomaux TLR7 et TLR9 (Swiecki and Colonna, 2015 ; Hémont et al., 2013). Les pDC sont spécialisées dans la sécrétion d'IFN-I après la détection de multiple virus comme le HCV, le virus de la dengue, ou le VIH (la sécrétion d'IFN-I par les pDC après infection virale est résumée par Reizis, 2019). C'est l'expression constitutive d'IRF7 par les pDC qui permet une signalisation rapide et l'induction de l'IFN-I (Honda et al., 2005). Ce mécanisme est confirmé in vivo chez un patient déficient pour IRF7 dont les pDC infectées par le virus de la grippe ne peuvent pas produire d'IFN-I (Ciancanelli et al., 2015).

TLR9 est également exprimé par les Axl<sup>+</sup> DC. Cependant la stimulation des Axl<sup>+</sup> DC par le CpG-A, un ligand synthétique de TLR9, n'induit pas de sécrétion d'IFN-I contrairement aux pDC (See et al., 2017). Cette absence de production d'IFN-I est probablement due à l'absence d'expression d'IRF7 dans les Axl<sup>+</sup> DC (Villani et al., 2017 ; See et al., 2017). A la manière des DC

conventionnelles, les Axl<sup>+</sup> DC activées sécrètent de l'IL-12 après activation par un ligand de TLR9 (See et al., 2017).

b. Présentation antigénique par les DC

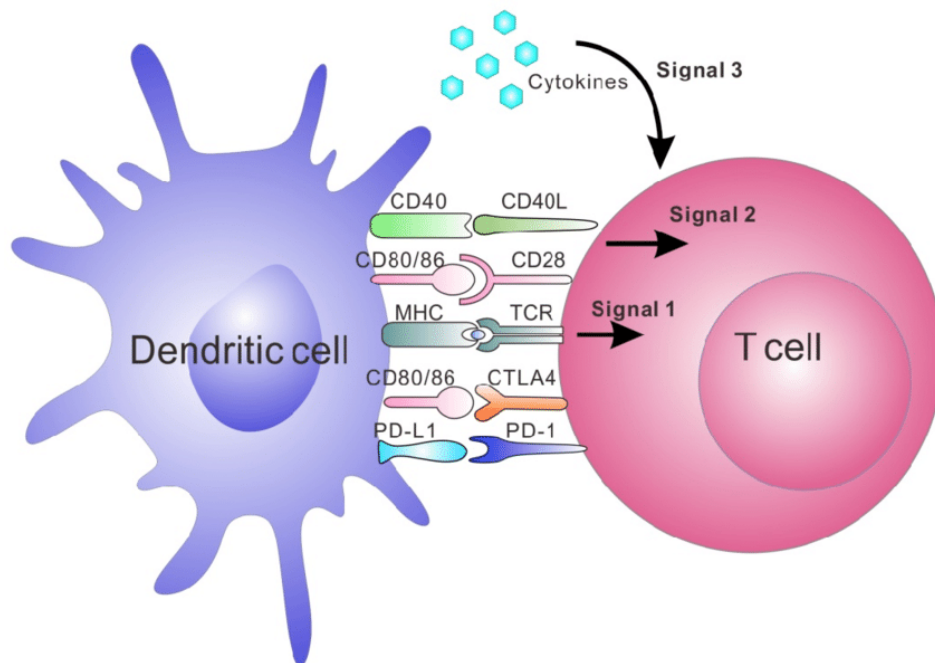


Figure 6 : Schéma simplifié des signaux nécessaires à la présentation antigénique par les DC aux lymphocytes T (Adapté de Wang et al., 2017)

Les cellules dendritiques sont les cellules les plus spécialisées dans la présentation antigénique et sont indispensables à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. L'expansion clonale des lymphocytes T activés par les DC nécessite 3 signaux (Figure 6).

Dans un premier temps, une DC présente un antigène via une molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). L'antigène provient généralement d'un pathogène internalisé par les DC. L'antigène présenté est reconnu spécifiquement par un TCR (*T-Cell Receptor*) à la surface d'un unique lymphocyte T, il s'agit du premier signal.

Le deuxième signal est transmis par l'interaction des molécules de co-stimulation exprimées à la surface des DC et de leurs ligands exprimés à la surface des lymphocytes T. Nous pouvons par exemple citer les couples CD86/CD28 ou CD40/CD40L.

Le troisième et dernier signal est transmis par les cytokines sécrétées par les DC qui vont instruire la différenciation des lymphocytes T comme l'IL-12 par exemple.

Les DC expriment un niveau basal de CMH et de molécules de co-stimulation qui leur procure de fortes capacités de stimulation de la réponse des lymphocytes même au stade immature. Cependant une fois activée cette capacité est accentuée. En effet, les DC patrouillent les tissus en quête de pathogènes. Une fois le pathogène internalisé et détecté, elles activent un processus de maturation qui augmente l'expression des molécules de co-stimulation (comme CD40 ou CD86), des cytokines (comme l'IL-12), mais également de récepteurs aux chimiokines (comme CCR7). L'expression de CCR7 permet aux DC de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où elles rentrent en contact avec de nombreux lymphocytes T (Banchereau et al., 2000).

Les molécules de CMH sont indispensables à la présentation antigénique. Elles se divisent en CMH de classe I (CMH-I) et CMH de classe II (CMH-II). L'expression du CMH-I est ubiquitaire alors que celle du CMH-II est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (les APC). Le CMH-I présente des antigènes endogènes ou pathogènes cytosoliques comme les pathogènes viraux. Il permet la présentation aux Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et active une réponse T cytotoxique. De son côté, le CMH-II présente des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Amigorena, 1999 ; Vyas et al., 2008). Certaines APC sont capables de traiter des antigènes exogènes et de les présenter avec le CMH-I grâce à un mécanisme appelé la présentation croisée (ou *cross-presentation*) (Joffre et al., 2012 ; Bevan, 1976).

Chez l'homme, les cDC1 sont considérées comme des spécialistes de la présentation croisée notamment grâce à leur homologie avec les DC CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> qui assurent cette fonction chez la souris (Haniffa et al., 2012). Des cellules CD141<sup>+</sup> isolées d'explants de peau humaine ont été décrites comme capables de présenter des antigènes exogènes via le CMH-I par l'emploi de peptides spécifiques d'un clone de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> (Haniffa et al., 2012). De plus, les cDC1 expriment XCR1 et CLEC9A dont l'expression est essentielle pour activer la réponse T cytotoxique (T CD8<sup>+</sup>) dans un contexte de co-culture avec des cellules infectées par le VIH ou pour présenter des antigènes provenant de cellules nécrotiques (Crozat et al., 2010 ; Poulin et al., 2010 ; Jongbloed et al., 2010).

De leur côté, les cDC2 participent majoritairement à l'induction de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après une infection bactérienne ou virale. Elles expriment le facteur de transcription IRF4, essentiel à la présentation par le CMH-II chez la souris (Persson et al., 2013 ; Williams et al., 2013). Elles sont par exemple capables, après exposition à un champignon,



d'induire la production d'IL-23 nécessaire à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T auxiliaires Th17 (Schlitzer et al., 2013).

Ces spécialisations fonctionnelles ne sont pas exclusives. Chaque sous-type de DC conventionnelle est par exemple capable d'activer une réponse T auxiliaire Th1 ou Th2 avec plus ou moins d'efficacité (Yu et al., 2014 ; Segura et al., 2012).

Dans un contexte de MLR, les Axl<sup>+</sup> DC sont capables d'activer une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017). En revanche, aucune étude n'a analysé le type de réponse T que les Axl<sup>+</sup> DC pouvaient activer ni si elles possédaient toujours cette aptitude dans un contexte infectieux.

Quelques études rapportent une capacité des pDC immatures à induire la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Grouard et al., 1997 ; Matsui et al., 2009 ; Yu et al., 2015). Cependant, la contribution des pDC immatures à la réponse des lymphocytes T est désormais expliquée par une « contamination » des Axl<sup>+</sup> DC qui expriment aussi CD123, le marqueur utilisé pour isoler les pDC. En effet, les pDC « pures » (AXL négatives) non activées sont incapables d'induire une MLR (See et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017). Ce n'est qu'une fois activées que les pDC peuvent induire une réponse des lymphocytes T. Par exemple, une exposition au virus de la grippe a été démontrée efficace pour induire la maturation d'une population de pDC « pures » aux propriétés communes aux cDC (Alculumbre et al., 2018). Ces pDC activées expriment des molécules de co-stimulation et sont capables d'activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Ainsi, les différentes populations de DC présentent des spécialisations de leurs réponses. Après la rencontre avec un virus, les DC sont capables d'induire une réponse inflammatoire et antivirale. Elles possèdent également un rôle crucial dans l'activation de la réponse des lymphocytes T. Cependant les virus ont développé des propriétés qui leur permettent de contrecarrer les mécanismes de défense du système immunitaire. Le VIH par exemple, cible directement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induit une immunodéficience. L'étude des interactions entre le VIH et les différents acteurs de la réponse immunitaire est donc essentielle pour décrypter les différentes étapes de l'infection.

### **III. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : le VIH**

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est le virus responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). L'infection par le VIH est considérée comme une pandémie et un problème de santé publique majeur. Le virus se transmet exclusivement via des fluides et sécrétions corporelles et est responsable de la diminution drastique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, entraînant l'apparition de maladies opportunistes.

#### **1. Passé, présent et futur du VIH**

En 1981, le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) de Los Angeles décrit pour la première fois un cas d'immunodéficience humaine, après la constatation d'une augmentation d'infections rares au sein de la communauté homosexuelle (pneumonie pneumocystique) (Gottlieb et al., 2010). La prévalence accrue du syndrome, désormais appelé SIDA, chez les personnes homosexuelles et l'absence de données scientifiques et épidémiologiques a entraîné une forte stigmatisation de cette communauté. C'est un an après le rapport du CDC que la transmission virale par voie sanguine a été mise en évidence.

En 1983 en France, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier sont les premiers à identifier un virus T-Lymphotrope (une famille de rétrovirus pathogénique pour l'Homme), le HTLV-III, comme agent causal du SIDA (Barre-Sinoussi et al., 1983). Ces résultats ont été confirmés plus tard par une équipe aux États-Unis (Gallo et al., 1984). Depuis, la taxonomie virale a changé. Le virus est désormais connu comme le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et n'est plus associé à la famille des virus T-Lymphotrope (Coffin et al., 1986). En 2008, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montganier ont obtenu le prix Nobel de Médecine pour leurs travaux.

Il existe deux types de VIH génétiquement différents : le VIH-1 et le VIH-2. Le virus mis en évidence par Barré-Sinoussi et Montagnier correspond aujourd'hui au VIH-1. Quelques années plus tard, un virus ressemblant au VIS (Virus de l'immunodéficience Simienne) a été découvert : le VIH-2 (Clavel et al., 1986).

Le VIH aurait émergé dans les années 1880 en Afrique par transmission du VIS (SIV en anglais) des primates à l'Homme. Précisément, le VIH-1 serait issu d'une transmission du SIVcpz du chimpanzé (Huet et al., 1990), et le VIH-2, du SIVsm du singe vert mangabey (Hirsch et al., 1989).

Aujourd'hui la pandémie liée au VIH affecte encore des millions de personnes. En 2020, 37,6 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde et 1,5 millions de nouveaux cas étaient détectés (source ONUSIDA). Le SIDA était encore responsable de 690 000 décès la même année.

La recherche fondamentale et médicale des dernières décennies a permis le développement de traitements efficaces pour contrôler l'infection. Les thérapies antirétrovirales (ART) ciblent différentes étapes de la réplication virale, et permettent le maintien d'une charge virale indétectable. Ces thérapies permettent aux personnes infectées de ne plus transmettre le virus, et augmentent significativement leur espérance de vie à un niveau similaire à celui d'une personne non-infectée.

Cependant, malgré ces avancées majeures, le nombre de nouveaux cas détectés chaque année reste constant. De nombreuses personnes ne savent pas qu'elles vivent avec le virus et l'accès aux traitements reste difficile pour les populations défavorisées. De plus, il n'existe pas encore de remède contre le VIH permettant l'éradication de l'infection ; les traitements ne font que la contenir. Des réservoirs de virus demeurent dans l'organisme, même en présence de traitements de longue durée. En cas d'interruption du traitement, la réplication et la dissémination du VIH peuvent repartir depuis ces réservoirs. La recherche contre le VIH, tout domaine confondu, est donc encore essentielle et nécessaire pour comprendre comment prévenir efficacement le VIH et traiter l'infection.

## **2. Différents virus du VIH : VIH-1 et VIH-2**

Les deux virus VIH-1 et VIH-2 peuvent causer le développement du SIDA et sont responsables de la pandémie, mais la majorité des cas sont expliqués par une infection au VIH-1. Le VIH-2 est moins pathogène que le VIH-1 (Kanki et al., 1994 ; Marlink et al., 1994). Il est considéré comme endémique et principalement restreint à une région de l'Afrique de l'Ouest. Il est malheureusement plus compliqué d'obtenir des données épidémiologiques robustes sur

les infections par le VIH-2, empêchant une estimation correcte de l'impact du virus au niveau mondial (Rowland-Jones and Whittle, 2007). Les travaux de cette thèse se concentrent sur la réponse immunitaire au VIH-1.

### 3. Pathogénèse du VIH-1

#### a. Cellules cibles de l'infection

Comme son nom l'indique, le VIH est un virus qui s'attaque au système immunitaire. Toutes les cibles du virus sont des cellules immunitaires issues de l'hématopoïèse. Elles expriment le récepteur d'entrée CD4 (Dalglish et al., 1984)(1986), ainsi que les corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Iwamoto et al., 2010). Nous retrouvons l'expression de ces récepteurs dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et dans des cellules myéloïdes : les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont les cibles préférentielles du virus avec le plus fort taux de réplication virale. C'est l'action cytopathique du VIH-1 sur les T CD4<sup>+</sup> qui entraîne la déficience immunitaire. La quantification de ces cellules dans le sang est donc le principal marqueur pour évaluer la progression de l'infection.

#### b. Phases de l'infection

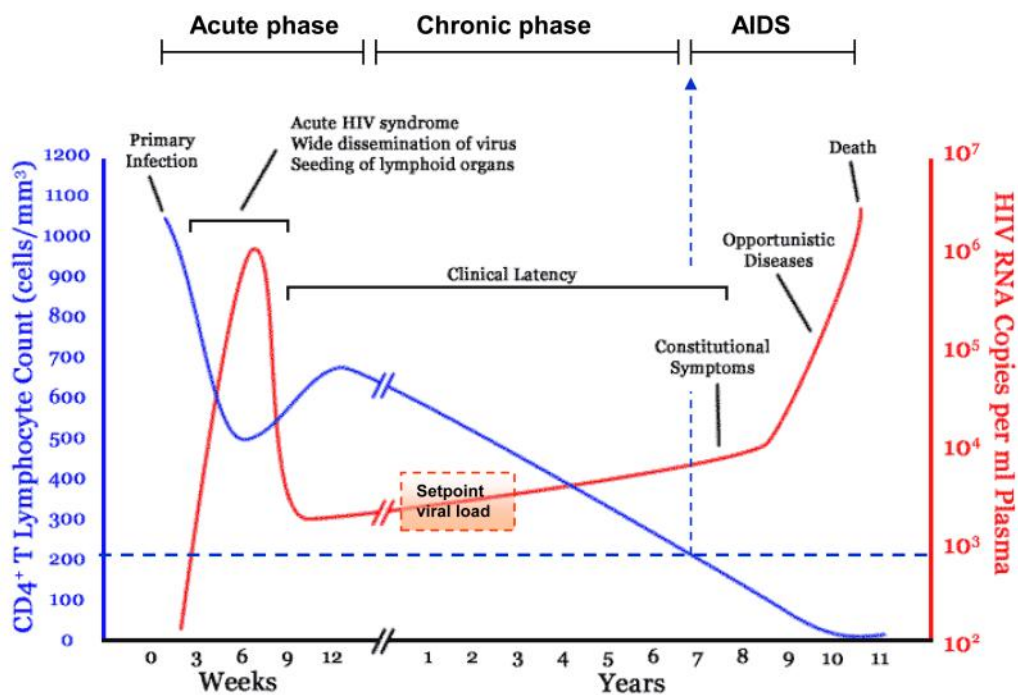


Figure 7 : Les différentes phases de l'infection par le VIH (Adapté de An and Winkler, 2010)

En absence de traitement, l'infection par le VIH se divise en trois phases : la phase primaire, la phase chronique et la phase SIDA (Figure 7).

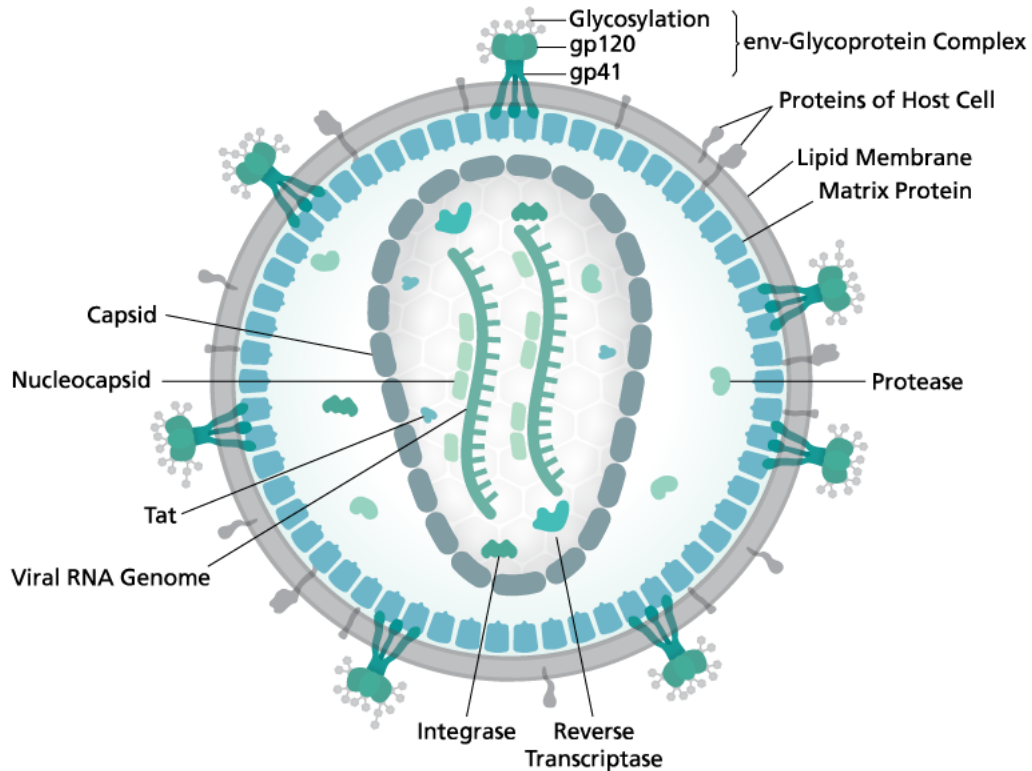
La phase primaire, ou aigüe (acute phase), correspond aux premières semaines d'infection et à la dissémination du virus. Après l'événement d'infection, le plus souvent dans les muqueuses, le virus se propage rapidement vers les organes lymphoïdes riches en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Haase, 2005). Durant cette phase la charge virale devient détectable dans le sang (mesurée par copies d'ARNs viraux) jusqu'à un pic de virémie, probablement le moment où l'individu est le plus contagieux. Elle est également associée à une chute du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sanguins (McCune, 2001). Quelques temps après, une réponse immunitaire se met en place notamment grâce aux cellules myéloïdes et aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Borrow P et al., 1994). Ces cellules vont permettre le contrôle de l'infection avec une diminution de la charge virale et une augmentation du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

La phase chronique qui suit est considérée comme asymptomatique, la charge virale restant basse (Mellors et al., 1996). Néanmoins, même si le taux de réplication du VIH est faible, le virus continue de se répliquer et d'éliminer les cellules CD4<sup>+</sup> (McCune, 2001). Cette phase est également caractérisée par une activation immunitaire chronique et systémique, principalement due à une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale (Brenchley et al., 2006 ; Tincati et al., 2016). Cette activation immunitaire systémique est associée à la diminution du taux de lymphocytes CD4<sup>+</sup> T. On retrouve en effet une plus forte concentration de LPS et d'ADN bactérien dans le sang de patients qui ne répondent pas aux traitements antirétroviraux et qui gardent un faible taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> malgré une diminution de la virémie (Marchetti et al., 2008). La durée de l'infection chronique varie largement en fonction des patients.

Finalement, lorsque le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> devient inférieur à 200 cellules/mL de sang, le patient entre dans la phase SIDA. Ce stade définit la période d'immunodéficience et est caractérisé par l'apparition de maladies opportunistes à cause du faible taux de lymphocytes capables d'induire une réponse immunitaire efficace (Saharia and Koup, 2013).

## 4. Structure et génome du VIH-1

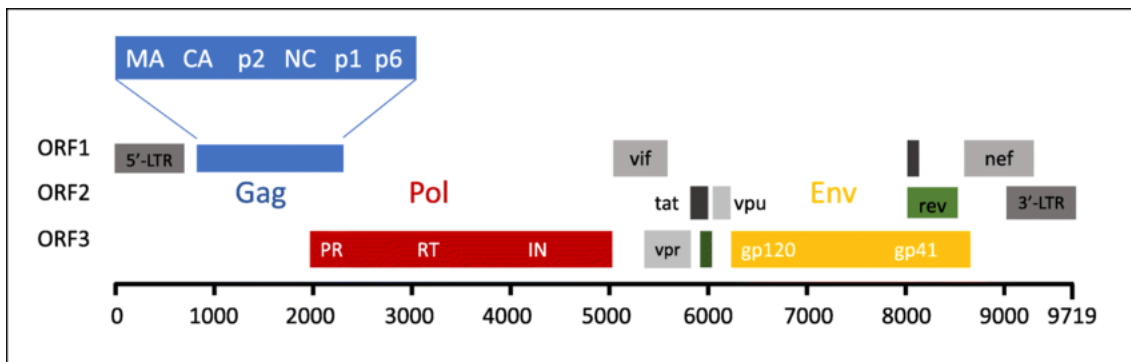
### a. Structure de la particule virale



**Figure 8 : Schéma de la particule de VIH (Adapté de Thomas Spletstoesser)**

Le VIH est un rétrovirus à enveloppe qui appartient au genre des lentivirus. L'information génétique est contenue dans deux brins d'ARN encapsulés dans une capsid (Figure 8). La particule virale utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer, mais empaquette les enzymes nécessaires aux étapes de retro-transcription de l'ARN viral (la reverse-transcriptase : RT), d'intégration dans le génome de la cellule (l'intégrase : IN) et de maturation des nouvelles particules produites (la protéase : PR). L'enveloppe, qui est soutenue par une matrice et entoure le virus, est une bicouche lipidique qui contient des trimères de glycoprotéines d'enveloppe (protéine de surface gp120 et protéine transmembranaire gp41) (German Advisory Committee Blood {Arbeitskreis Blut}, Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood', 2016).

b. Génome et protéines du VIH-1



**Figure 9 : Génome du VIH-1 (Adapté de Cervera et al., 2019)**

Le génome du VIH-1 a une taille d'environ 9.8 kilobases, code pour 9 protéines, et est encadré de chaque côté par des LTRs (Long Terminal Repeats) (Muesing et al., 1985) (Figure 9). Le LTR en 5' contient l'unique promoteur du génome. L'ADN proviral produit un transcrite unique avec de multiples sites d'épissage et de cadres de lecture (ORF : Open Reading Frame). Les protéines générées par l'ADN proviral sont décrites comme appartenant à trois catégories : les protéines de structures, les protéines de régulation et les protéines accessoires.

Les protéines de structure sont codées par les gènes Gag, Pol et Env.

Le clivage de Gag par la protéase codée par Pol entraîne l'expression des protéines matures de la matrice (MA/p17), de la capsid (CA, p24) et de la nucléocapsid (NC, P7 et P6) (Freed, 1998 ; Freed, 2015) (Figure 9).

Le précurseur Pol code pour les enzymes essentielles à la réplication virale : la protéase (PR) qui clive Gag et Pol lui-même ; la retro-transcriptase (RT) qui permet la synthèse de cDNA ; et l'intégrase (IN) indispensable à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte.

Les dernières protéines de structures, seules protéines virales exprimées à la surface du virus, sont codées par Env. Le précurseur gp160 est clivé en gp120 et gp41 par une endopeptidase cellulaire

(Decroly et al., 1994). C'est la gp120 qui est reconnue par le récepteur CD4.

Les protéines de régulation Tat et Rev que code le génome du VIH-1, sont nécessaires à la réplication correcte du virus et agissent au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Ruben S et al., 1989 ; Garcia et al., 1988 ; Behrens et al., 2017).

Enfin, les protéines accessoires Nef, Vpu, Vif et Vpr ne sont pas indispensables à la réplication virale mais ont une importance dans la virulence des particules virales et la réponse

au virus (Malim and Emerman, 2008). Par exemple, Nef induit la diminution d'expression de CD4 et du CMH-I à la surface des cellules entraînant une baisse de la réponse cytotoxique induite par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>(Schwartz et al., 1996).

### c. Tropisme et corécepteurs du VIH-1

CD4 est le récepteur principal du VIH-1

(Maddon et al., 1986). Cependant, l'implication d'autres récepteurs au VIH-1 a été suspectée par l'incapacité du virus à fusionner avec des cellules de souris exprimant le CD4 humain (Weiner et al., 1991). De plus, les protéines RANTES et MIP1 $\alpha$  (CCL5 et CCL3), étaient identifiées comme jouant un rôle dans la protection contre l'infection par le VIH-1 (Cocchi et al., 1995). Ces cytokines sont sécrétées notamment par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> après infection et se lient au récepteur CCR5. Il était également établi que les souches primaires de virus avaient une préférence d'infection envers les lymphocytes T (souches T-tropique), ou envers les macrophages (souches M-tropic) (Collman et al., 1989), deux types de cellules qui expriment CD4.

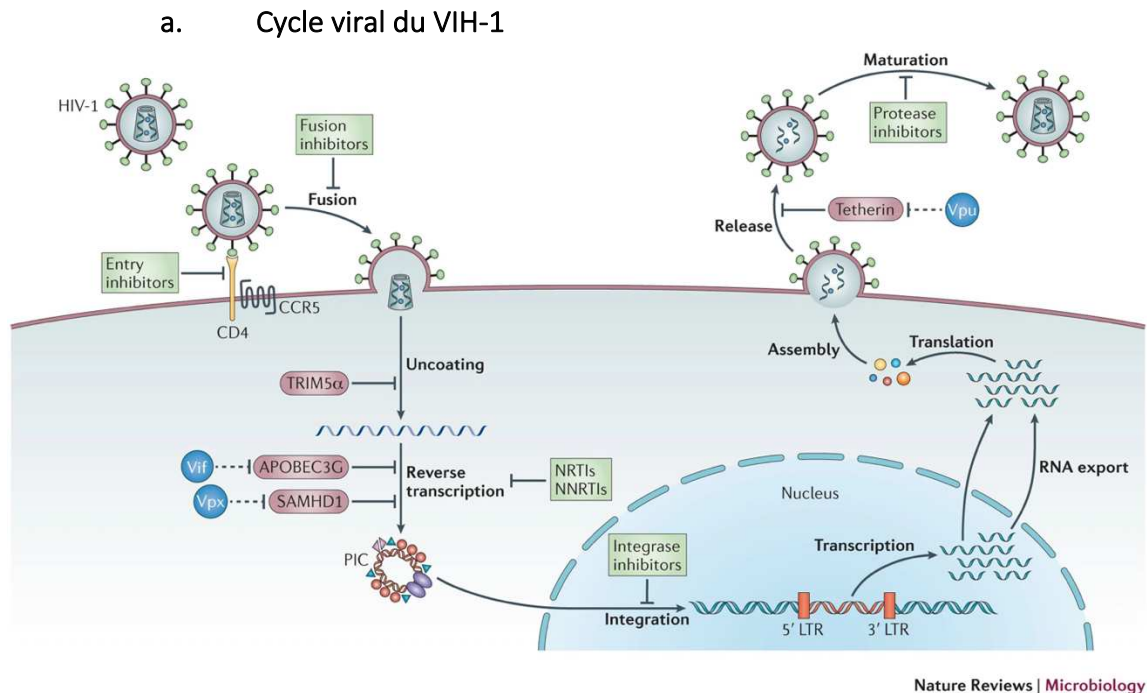
Ainsi, CXCR4 et CCR5 ont été identifiés comme corécepteurs du VIH-1 reconnaissant également la gp120 (Feng et al., 1996 ; Deng et al., 1996). Ils sont indispensables à l'entrée du VIH et permettent de définir des virus X4-tropique (CXCR4) ou R5-tropique (CCR5). Les mutations de la partie variable de la protéine expliquent les différentes affinités pour les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 (Speck R F et al., 1997). Les virus de R5-tropiques sont considérés comme initiateurs de l'infection au niveau des muqueuses. Ce sont les différentes mutations du génome viral induites lors de la réplication du virus qui entraînent l'apparition du tropisme X4

(Connor et al., 1997).

Il existe également des virus au double tropisme X4/R5.



## 5. Réplication et assemblage du VIH-1



**Figure 10 : Cycle viral du VIH-1 simplifié (Adapté de Barré-Sinoussi et al., 2013)**

Le cycle de réplication du VIH-1 peut être divisé en deux phases : une phase précoce et une phase tardive, la dernière commençant après l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (Figure 10).

L'étape initiale du cycle viral est caractérisée par des interactions protéines-protéines et de nombreux changements de conformation. La reconnaissance de la gp120 par CD4 permet l'accessibilité aux sites de liaison des corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Feng et al., 1996 ; Kwong et al., 1998). La liaison des récepteurs et corécepteurs permet l'exposition de la gp41 et la fusion des membranes virales et cellulaires (Nisole and Saïb, 2004).

Après fusion, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme et la rétro-transcription commence. Une fois l'ADN complémentaire synthétisé, le complexe de pré-intégration (PIC) se forme. Le PIC est composé de l'ADN viral, de protéines virales (dont l'intégrase) et de protéines cellulaires (Jayappa et al., 2012). Le PIC est transporté via le réseau de microtubules et entre dans le noyau via les pores nucléaires (McDonald et al., 2002 ; Francis and Melikyan, 2018 ;

Arhel et al., 2007). L'ADN viral est ensuite intégré de façon aléatoire mais préférentiellement dans des régions accessibles de la chromatine (Craigie and Bushman, 2012 ; Schröder et al., 2002). L'intégration de l'ADN proviral finalise la phase précoce et l'infection.

Une décapsidation est nécessaire à l'entrée de l'ARN viral dans le noyau mais les mécanismes responsables de cette étape ne sont pas encore complètement établis. Des capsides intactes sont montrées au niveau des pores nucléaires par analyse ultra-structurale de cellules HeLa infectées par le VIH-1 (Arhel et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'étape de décapsidation a lieu au niveau de l'entrée du noyau et que la capsidite protège l'ARN viral dans le cytoplasme. En effet, seule une mutation de la capsidite du VIH-1 permet la détection du virus avant intégration dans les DC (Lahaye et al., 2013a). À l'inverse, une décapsidation rapide dans le cytoplasme après la fusion est observée par microscopie confocale dans des macrophages et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>infectés par le VIH-1 (Mamede et al., 2017). Ces différences dans la localisation de l'étape de décapsidation pourraient venir des différents modèles cellulaires étudiés.

La phase tardive de l'infection consiste en la production de nouvelles particules virales. Le promoteur présent dans le LTR 5' permet la synthèse d'ARNm viral grâce à la machinerie cellulaire et à la protéine virale Tat (Ruben S et al., 1989 ; Garcia et al., 1988).

Les protéines d'enveloppe (gp120 et gp41) sont traduites et adressées à la membrane plasmique via les voies de sécrétion dépendantes du réticulum endoplasmique et du Golgi. Les précurseurs des protéines virales, Gag et GagPol qui contiennent les protéines CA, MA, NC, IN, RT et PR, sont traduits dans le cytoplasme et adressés à la membrane plasmique tout en recrutant l'ARNm viral (Freed, 2015). Gag se fixe au niveau de zones riches en lipides de la membrane plasmique (lipid rafts) (Nguyen Dzung H. and Hildreth James E. K., 2000 ; Ono and Freed, 2001), ce qu'illustrent les niveaux élevés de cholestérols et de sphingolipides retrouvés dans la membrane virale (Chan Robin et al., 2008 ; Brügger et al., 2006). Gag initie l'assemblage et le bourgeonnement des virus en incorporant Env (Checkley et al., 2011) et en recrutant le complexe ESCRT-ALIX pour un relargage d'une particule virale immature (Ivanenko et al., 2009 ; Ku et al., 2014 ; Morita et al., 2011). Le clivage des précurseurs protéiques Gag et GagPol par la protéase dans le virus enclenche le processus de maturation et la formation de la capsidite virale (Pettit et al., 1994). Cette étape est cruciale. En effet, des mutations dans la protéase sont liées à la production de virus non infectieux (Kaplan A H et al., 1993).

Pour se défendre contre l'infection par le VIH-1 les cellules ont mis en place des mécanismes moléculaires qui contre les différentes étapes du cycle viral.

#### **b. Facteurs de restrictions : rôle de SAMHD1**

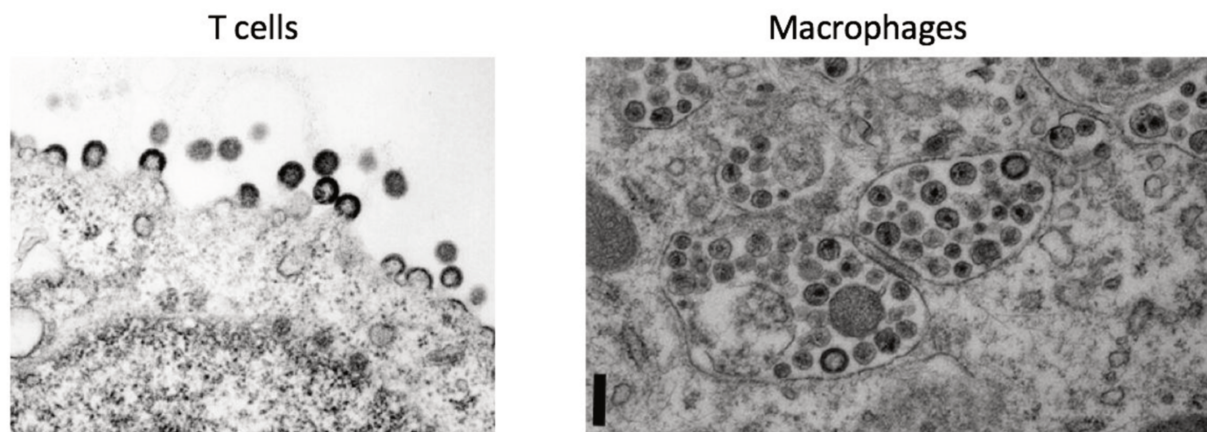
Les facteurs de restrictions sont des protéines impliquées dans des mécanismes de défense contre l'infection. Paradoxalement un facteur de restriction est défini comme une protéine contre laquelle le VIH a mis au point un mécanisme qui lui permet d'échapper à la restriction. Il existe des facteurs de restriction contre la majorité des étapes du cycle viral (Colomer-Lluch et al., 2018)

Comme illustré dans la Figure 10, les facteurs de restrictions jouent un rôle pendant les deux phases de l'infection. TRIM5a, APOBEC3G et SAMHDI permettent par des mécanismes différents d'inhiber la décapsidation ou rétro-transcription (Stremlau et al., 2004 ; Mangeat et al., 2003 ; Laguette et al., 2011), tandis que BST-2 permet l'ancrage des particules sécrétées à la membrane plasmique empêchant leur relargage complet (Neil et al., 2008 ; Perez-Caballero et al., 2009). Le rôle de SAMHD1 (*Sterile Alpha and Histidine-aspartate Domain containing protein 1*) est développé dans cette sous-partie. SAMHD1 est un facteur de restriction essentiel chez les cellules myéloïdes et peut expliquer la faible susceptibilité de ces cellules à l'infection par le VIH-1 (Sonza et al., 1996).

C'est une étude sur l'effet positif du SIVmac dans la transduction du VIH-1 chez les MDDC, résistants à l'infection, qui suggère l'existence d'un nouveau facteur de restriction (Goujon et al., 2006). Cet effet positif du SIVmac provient du rôle de la protéine accessoire Vpx du virus (Goujon et al., 2007). Vpx est une protéine retrouvée dans le SIV et le VIH-2 mais pas dans le génome du VIH-1. Le facteur de restriction SAMHD1 a été identifié comme cible de Vpx par des analyses d'interactions de protéines (Laguette et al., 2011 ; Hrecka et al., 2011). SAMHD1 détruit le pool de dNTP cytoplasmique ce qui empêche une rétro-transcription correcte de l'ARN viral (Lahouassa et al., 2012). Il est régulé par phosphorylation, sa forme non-phosphorylée étant active et principalement présente dans les cellules qui ne se divisent pas (Cribier et al., 2013 ; White et al., 2013 ; Schmidt et al., 2015). Cette caractéristique explique le rôle important de SAMHD1 dans les cellules myéloïdes totalement différenciées qui ne se divisent plus. Enfin, même si SAMHD1 est exprimé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'activation des cellules entraîne une phosphorylation de SAMHD1 et donc une opportunité pour le VIH-1 de rétro-transcrire son ARN (Cribier et al., 2013).

Malgré ces restrictions, le virus est quand même capable de se répliquer dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les macrophages pour produire de nouveaux virus.

**c. Assemblage des virus : les VCC dans les macrophages**



**Figure 11 : Assemblage viral différent entre les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les macrophages (Obtenu par Mabel San Roman)**

Le site d'assemblage viral est une différence majeure entre l'infection chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et chez les macrophages (Figure 11).

Dans les lymphocytes T, le virus bourgeonne directement à la membrane plasmique (Figure 11). Au contraire, dans les macrophages, le bourgeonnement a lieu dans des compartiments apparemment intracellulaires appelés VCC (Virus Containing Compartments) (Jouve et al., 2007 ; Orenstein et al., 1988 ; Rodrigues et al., 2017) (Figure 11). Les VCC sont des invaginations de la membrane plasmique en contact avec le milieu extérieur, comme en témoigne un marquage positif au Rouge de Ruthénium (Deneka et al., 2007). Ces compartiments ont été montrés comme préexistants dans les macrophages par analyse ultra-structurale de cellules non infectées par le VIH-1 (Welsch et al., 2011 ; Hammonds et al., 2017). L'imagerie ultra-structurale a également permis d'observer le bourgeonnement de particules virales matures et immatures qui s'accumulent dans ces compartiments (Raposo et al., 2002 ; Jouve et al., 2007 ; Benaroch et al., 2010 ; Gaudin et al., 2013). Dans des conditions de co-culture de macrophages et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les VCC sont recrutés à proximité du contact cellulaire et jouent un rôle dans la transmission du VIH-1 (Gousset et al., 2008 ; Duncan et al., 2014 ; Hammonds et al., 2017).

Les différentes étapes du cycle virale, de l'entrée du virus à son assemblage, produisent de nombreux PAMP qui peuvent être détectés pour mettre en place une réponse antivirale ou inflammatoire

## **6. Réponse immunitaire antivirale : action et régulation**

La réponse immunitaire antivirale est importante pour apporter une première ligne de défense contre la réplication virale, mais également pour activer la réponse adaptative antigène spécifique.

### **a. Réponse IFN à l'infection par le VIH-1**

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une élévation de la concentration d'IFN-I, notamment l'IFN $\alpha$ , dans la plasma des patients (Hardy et al., 2013 ; Stacey et al., 2009). Elle est également associée à une forte signature ISG chez des patients non traités (Sedaghat et al., 2008).

L'administration d'IFN-I à des patients infectés par le VIH-1 induit une diminution de la virémie et moins de développement du SIDA par rapport à un groupe de patient infectés mais non traités (Lane et al., 1990). De plus, chez les patients infectés par le VIH-1, l'expression d'ISG corrèle avec une réduction de la virémie (Hubbard et al., 2012).

Chez le macaque, l'administration d'un antagoniste d'IFNAR avant infection par le SIVmac entraîne une plus forte virémie et une progression vers le stade SIDA plus rapide que chez des macaques non traités (Sandler et al., 2014). En cohérence, l'administration d'IFN $\alpha$  augmente l'expression d'ISG et la réponse antivirale. Cependant, après quelques semaines de traitement, l'expression des ISG diminue et la virémie devient plus élevée chez les macaques ayant reçu l'IFN $\alpha$  (Sandler et al., 2014). Ces observations suggèrent un rôle bénéfique de l'IFN pendant la phase aiguë de l'infection par le VIH-1, mais désavantageux pendant la phase chronique (Doyle et al., 2015).

En effet, on observe une corrélation entre les niveaux d'IFN $\alpha$  dans le plasma et la virémie chez des patients infectés. De plus, la concentration d'IFN $\alpha$  corrèle à l'inverse avec le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sanguin qui sont caractérisés par une surexpression d'ISG (Sedaghat et al., 2008 ; Rotger et al., 2010 ; Hardy et al., 2013). Le VIH-1 a un fort effet cytopathique sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais peu de lymphocytes sont capables de répliquer le virus. La majorité

d'entre eux présentent une infection avortée (Doitsh et al., 2010). Il se pourrait donc que l'IFN et la réponse ISG pendant la phase chronique jouent un rôle dans l'élimination des lymphocytes.

#### **b. Détection de l'ARN viral**

Le virus du VIH-1 est composé de deux brins d'ARN viraux qui sont considérés comme des PAMP et peuvent être détectés par les senseurs cellulaires comme RIG-I, MDA5 ou TLR7 (Yin et al., 2020). Les macrophages sont d'ailleurs capables d'induire une réponse ISG avant rétro-transcription, ce qui suggère des mécanismes de détection du virus pendant les première phase du cycle de réplication (Decalf et al., 2017).

En effet, TLR7 est rapporté comme essentiel pour la détection de l'ARN viral présent dans les compartiments endocytiques (Heil et al., 2004 ; Meier et al., 2007). Chez les pDC exposées au virus, la détection par TLR7 enclenche une forte sécrétion d'IFN-I (Hardy et al., 2007).

D'autres rapports montrent l'importance de RIG-1 et MDA-5 dans l'activation de la voie IFN chez les macrophages exposées au VIH-1 (Solis et al., 2011). Cependant, l'ARN viral est protégé par la capsid ce qui limite le rôle de ces senseurs (Lahaye et al., 2013a). Les senseurs à ARN cytosolique pourraient cependant être efficaces dans la détection des transcrits viraux nouvellement synthétisés. D'autres hélicases à ARN, comme DDX3, sont capables de lier des fragments d'ARNm viraux issus de la transcription et d'induire une réponse interféron via l'adaptateur MAVS (Gringhuis et al., 2017). Récemment, deux études ont également proposé l'importance des ARN viraux contenant des introns dans l'initiation d'une réponse innée (Akiyama et al., 2018 ; McCauley et al., 2018). Cette réponse est indépendante de RIG-1 et MDA-5, mais serait dépendante de MAVS. La dépendance de MAVS est à interpréter avec précaution. Elle n'est suggérée que dans des macrophages et aucune indication n'indique un lien direct entre l'activité de MAVS et la détection des ARN contenant des introns. L'activité de MAVS pourrait donc être dépendante de la détection d'autres PAMP. Néanmoins ces résultats suggère de nouvelles voies de détection de l'ARN viral qu'il reste à décrire.

### c. Détection de l'ADN viral

Les étapes du cycle de réplication du VIH-1 produisent différents types d'acide nucléiques : cDNA, ssDNA, dsDNA, hybride ADN/ARN, qui peuvent être détectés par les senseurs d'ADN cytosoliques.

Par exemple, IFI16, qui se lie aux résidus de rétro-transcription, est décrit comme capable d'induire une réponse IFN dépendante de STING dans les macrophages (Jakobsen et al., 2013). Cependant les mécanismes d'action d'IFI16 semblent dépendants du type cellulaire engagé. En effet, la détection d'ADN viral par IFI16 chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> entraîne leur mort (Monroe et al., 2014).

cGAS (présenté précédemment) est reconnu comme le senseur préférentiel de l'ADN du VIH-1 et permet l'établissement d'une réponse IFN antivirale via STING (Gao et al., 2013a). cGAS reconnaît préférentiellement une structure tige-boucle de l'ADN viral simple brin (Herzner et al., 2015). L'utilisation d'antirétroviraux ciblant la rétro-transcription a prouvé l'importance de la synthèse de cDNA dans la détection par cGAS et la mise en place d'une réponse interféron complète (Gao et al., 2013a). Le rôle de cGAS dans la détection du VIH-1 sera développé plus précisément dans une partie suivante qui s'intéressera aux relations entre les DC et le VIH-1.

### d. Régulation et évasion de la réponse innée par le VIH-1

Malgré l'efficacité de la détection par la voie cGAS/STING, l'infection par le VIH-1 entraîne également l'activation de facteurs cellulaires qui sont responsables de la régulation négative des voies de détection et qui facilitent la réplication virale. Par exemple, le récepteur de type NOD, NLRX1 séquestre STING, ce qui empêche l'activation d'une réponse antivirale et promeut la réplication du VIH-1 (Guo et al., 2016). Des analyses d'interaction de protéines ont montrés que NLRX1 interagissait avec STING ce qui empêchait la formation du complexe STING/TBK1 nécessaire à l'activation de la réponse IFN. En effet, le *knock-down* de NLRX1 dans une lignée de cellule myéloïdes entraîne une augmentation de l'expression de gènes d'IFN et d'ISG (Guo et al., 2016). De plus, des études *in vivo* sur les macaques ont montré une corrélation inverse entre l'expression de NLRX1 et des ISG, ce qui confirme le rôle de NLRX1 dans l'atténuation de la réponse antivirale (Barouch et al., 2016).

Le VIH-1 lui-même a développé des moyens pour échapper à la détection virale. Les protéines accessoires peuvent induire la dégradation ou l'inhibition des facteurs de restrictions cellulaires. Vpu, par exemple, est capable de recruter un complexe d'ubiquitination qui entraîne la dégradation de BST-2 (Neil et al., 2008). Ce même mécanisme permet la diminution d'expression de CD4 à la surface des cellules infectées et empêche l'activation d'une réponse adaptative (Andrew and Strebel, 2010). Il est également établi que Vpu est capable de contrecarrer la signalisation antivirale dépendante de NFkB (Langer et al., 2019). L'analyse transcriptomique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectées par un virus Vpu-déficient a montré une plus forte expression des gènes de la réponse inflammatoire régulés par NFkB en comparaison à un virus complet (wild-type). Les mécanismes de régulation de la réponse sont complexes et parfois paradoxaux. En effet, Vpr a un effet opposé à Vpu et est impliqué dans l'induction d'une réponse interféron chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Vermeire et al., 2016). Ainsi la modulation de la réponse antivirale par le VIH-1 est multifactorielle. Elle dépend également du type de cellule infectée par le virus.

Les DC sont spécialisées dans la détection des pathogènes. Elles participent à l'établissement des réponses interféron et inflammatoire après avoir rencontré un virus. Paradoxalement, ce sont des cibles de l'infection par le VIH-1. Par conséquent l'étude des relations entre les DC et le VIH-1 revêt un intérêt particulier.

#### **IV. Cellules dendritiques et VIH-1**

Primordiales à l'établissement de la réponse immunitaire, les DC sont impliquées dans la détection rapide de pathogènes, la mise en place de la réponse innée et l'activation de la réponse adaptative. Elles patrouillent continuellement les tissus et les muqueuses et expriment une variété de PRR comme cGAS, les TLR endosomaux ou RIG-I qui leurs confèrent un rôle clé dans la réponse immunitaire contre le VIH-1. Elles sont ainsi en première ligne pour détecter le VIH-1 et réagir rapidement pour contenir l'infection.

Une fois activées, les DC migrent des tissus où elles résident vers les organes lymphoïdes secondaires où elles stimuleront la réponse adaptative spécifique. Le VIH-1 pourrait exploiter



la fonction de migration des DC pour atteindre des zones riches en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et propager l'infection.

Les observations des interactions entre le VIH et les DC ont été largement limitées par le nombre restreint de DC. En effet, Elles ne représentent qu'environ 1% des cellules du sang et des tissus ce qui rend leur isolation compliquée. Pour contourner cette limitation un modèle de DC différenciées de monocyte in vitro a été mis en place : les MDDC (Romani et al., 1994 ; Sallusto and Lanzavecchia, 1994) Les MDDC sont largement utilisées pour étudier l'infection des DC par le VIH-1, la transmission du virus, sa détection dans la cellule et la mise en place d'une réponse immunitaire.

## **1. Participation des DC aux phases précoces de l'infection par le VIH-1**

### **a. Faible Susceptibilité des DC à l'infection par le VIH-1**

Les cellules myéloïdes, dont font partie les DC, expriment à leur surface des récepteurs capables de se lier à la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1, la gp120. Il s'agit du récepteur principal CD4 et des corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Zaitseva et al., 1997). De plus, les cellules myéloïdes possèdent une variété d'autres récepteurs qui reconnaissent différents éléments du VIH-1. C'est le cas du récepteur au mannose (MR / CD206), de DC-SIGN (CD209) ou encore de Siglec-1 (CD169) (Turville et al., 2001 ; Izquierdo-Useros et al., 2014). Ainsi les DC sont particulièrement bien équipées pour permettre au VIH-1 de les infecter.

Malgré ces caractéristiques, les DC s'infectent en proportion bien plus faible que les lymphocytes T CD4 activés, comme l'ont montré des quantifications d'ADN viral dans des DC et des lymphocytes T purifiés à partir de la rate de patients (McIlroy et al., 1995). La quantification d'ADN viral dans des MDDC infectés in vitro confirme la faible répllication du VIH-1 dans ces cellules (Granelli-Piperno et al., 1998). Ces différences sont expliquées par des mécanismes détaillés ci-après.

(i) La densité de récepteur à la gp120 est plus faible à la surface des DC par rapport aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Chauveau et al., 2017 ; Lee et al., 1999). De ce fait, la quantité de récepteurs CD4 présents à la membrane plasmique est un facteur limitant pour l'infection. En effet, la surexpression de CD4 chez les MDDC entraîne une augmentation de la fusion du VIH-1 avec les cellules (Chauveau et al., 2017).

(ii) La majorité des particules virales qui sont internalisées par les DC est rapidement dégradée. La quantification de la concentration de p24 au cours du temps dans des MDDC indique une dégradation du VIH-1 R5-tropique en approximativement vingt-quatre heures après pulsation (Turville et al., 2004). Cette dégradation serait indépendante de la voie lysosomale, en témoigne l'absence de colocalisation entre le VIH-1 et les marqueurs lysosomaux dans les MDDC infectées. Il semblerait que les voies de dégradations soient dépendantes du tropisme du virus. En effet, le traitement à la bafilomycine A (inhibiteur de l'acidification des lysosomes) de MDDC exposées à un virus X4-tropique empêche sa dégradation (Moris et al., 2004).

(iii) Le facteur de restriction SAMHD1 est fortement exprimé dans les cellules myéloïdes où il est particulièrement actif (Schmidt et al., 2015). L'inhibition de SAMHD1 par Vpx permet de rétablir une réplication du VIH-1 dans les MDDC (Laguette et al., 2011 ; Hrecka et al., 2011). Ainsi Vpx représente un moyen d'étudier les effets de la réplication virale chez les DC.

Malgré ces restrictions, la réplication virale est observée *in vitro* chez des DC myéloïdes (CD11c<sup>+</sup>) triées à partir du sang (Loré et al., 2005 ; Smed-Sørensen et al., 2005). De plus, comme mentionné précédemment, des DC infectés sont retrouvées dans la rate de patients infectées par le VIH-1 (McIlroy et al., 1995). Ces études suggèrent donc un rôle des DC dans la physiopathologie de l'infection par le VIH-1.

#### **b. Rôle des DC au niveau des sites d'infection**

Par leur localisation dans les muqueuses et les épithéliums des voies génitales, les DC et LC sont au contact du VIH-1 dans l'éventualité d'une transmission par voie sexuelle.

En plus des récepteurs essentiels à l'infection par le VIH-1, les LC expriment la langerine, un CLR, qui possède une affinité pour la gp120. Elles représentent donc des cibles potentielles du virus (Botting et al., 2017). Les LC seraient susceptibles à une infection productive par le VIH-1 R5-tropique et capable de transmettre le virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Kawamura et al., 2003 ; Nasr et al., 2014). La présence de LC ayant internalisé le VIH-1 a été mise en évidence par microscopie confocale et ultra-structurale d'explants d'épiderme vaginal exposés *ex vivo* au VIH-1 (Hladik et al., 2007). Cette étude suggère donc un rôle des LC au cours des premières étapes de l'infection. Ces résultats sont à interpréter avec précautions. L'utilisation d'anticorps bloquant la langerine n'altère pas les propriétés d'infection des LC et aucun granule de Birbeck (BG) n'est identifié par microscopie, ce qui suggère un rôle d'autres cellules. Les granules de Birbeck (BG) joueraient d'ailleurs un rôle dans l'élimination des particules virales internalisées

par les LC et empêcherait leur infection (Berg et al., 2014). En effet, l'infection des LC par le VIH-1 n'est montrée qu'après une l'inhibition des mécanismes d'endocytose dépendant des calvéolines et des BG (Berg et al., 2014). Ainsi les relations entre les LC et le VIH-1 demeurent controversées. Les différents résultats présentés pourraient également être expliqués par d'autres DC présentes dans l'épiderme de la peau et des muqueuses.

Récemment, deux études ont validé la présence de DC différentes des LC dans les tissus de l'appareil génital humain pouvant interagir avec le VIH-1 (Pena-Cruz et al., 2018 ; Bertram et al., 2019).

Les DC de l'épiderme vaginal (VEDC) expriment CD1a, la langerine, CD4 et CCR5. Elles ne présentent pas de granules de Birbeck, et sont donc des cellules bien distinctes des LC (Pena-Cruz et al., 2018). Les VEDC sont susceptibles à l'infection et produisent des virus qui sont détectés par l'emploi d'un système rapporteur. De plus, l'infection des VEDC in vivo a été validée par la quantification de nombreuses copies d'ADN viral dans des VEDC isolées de patientes infectées (Pena-Cruz et al., 2018).

D'autres DC ont été mises en évidence dans l'épiderme des tissus ano-génitaux. Elles sont CD11c<sup>+</sup> et n'expriment ni CD1a, ni la langerine (Bertram et al., 2019). Ces DC sont décrites comme semblables aux cDC2 du derme par une analyse transcriptomique. Les DC CD11c<sup>+</sup> sont susceptibles à l'infection du VIH-1 in vitro. De plus, l'imagerie confocale d'explants de tissus péniens exposés au VIH-1 a révélé une colocalisation entre les DC CD11c<sup>+</sup> de l'épiderme et l'ARN viral. Il serait intéressant de tester les capacités de transmission de ces cellules à des lymphocytes primaires, et d'évaluer la présence de ces cellules chez des patients infectés.

On retrouve donc des DC susceptibles à l'infection par le VIH-1 au niveau des sites d'infection. Ces DC pourraient jouer un rôle dans la dissémination de l'infection.

## **2. Transmission et dissémination du VIH-1 par les DC**

L'expression de CLR, comme DC-SIGN, à la surface des DC leur permet de capturer le VIH-1 (Wu and KewalRamani, 2006). Les CLR sont capables de se lier à des résidus de mannose et fucose présents sur les protéines d'enveloppe du virus. D'autres récepteurs sont également impliqués dans la liaison du VIH-1, comme Siglec-1 (Izquierdo-Useros et al., 2014). Siglec-1 est un récepteur des gangliosides présents à la surface du virus. La liaison entre Siglec-1 et le VIH se fait indépendamment de l'enveloppe. DC-SIGN et Siglec-1 ont été montrés comme impliqués

dans des mécanismes de *trans*-infection du VIH-1 des MDDC ou des DC aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Martín-Moreno and Muñoz-Fernández, 2019 ; Izquierdo-Useros et al., 2014).

**a. Capture et transfert du VIH : la *trans*-infection**

Il a rapidement été établi que les DC étaient efficaces pour transmettre le VIH-1 aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Cameron et al., 1992). La co-culture de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec des DC pré-exposées au VIH-1 entraîne une plus forte infection des lymphocytes et plus d'effets cytopathiques en comparaison à une exposition directe au virus (Cameron et al., 1992). Dans ce contexte, les DC ne sont pas infectées par le VIH-1, mais transmettent des virus capturés. On appelle ce mécanisme la *trans*-infection.

La transmission peut se faire par un contact cellulaire entre les DC et les lymphocytes (Tsunetsugu-Yokota et al., 1997 ; McDonald, 2003) ou via la sécrétion d'exosomes (Wiley and Gummuluru, 2006). Cette voie de transmission est observée chez les DC immatures mais est plus efficace à partir de DC matures (Geijtenbeek et al., 2000 ; Izquierdo-Useros Nuria et al., 2007). En effet, un traitement des MDDC et des DC myéloïdes (CD1c<sup>+</sup>, actuelles cDC2) au LPS induit une plus forte capture virale et une plus forte transmission du virus aux lymphocytes T.

**b. Rôle controversé de DC-SIGN dans la *trans*-infection**

Des mécanismes de transmission du VIH-1 dépendant de DC-SIGN ont été montrés par l'analyse de co-culture d'une lignée de cellules myéloïdes DC-SIGN<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Geijtenbeek et al., 2000). Chez les MDDC matures, le recrutement de DC-SIGN à la zone de contact entre DC et lymphocytes est nécessaire pour la *trans*-infection. En effet, le *knock-down* de DC-SIGN dans les MDDC empêche la polarisation des particules virales capturées vers la zone de contact et leur transmission (Arrighi et al., 2004).

Cependant la réelle participation de DC-SIGN à la transmission en *trans* du VIH-1 est remise en question. La majorité des études sur DC-SIGN est effectuée dans des MDDC matures ou immatures. Or, même après maturation, DC-SIGN est faiblement exprimé à la surface des DC myéloïdes retrouvées dans le sang ou dans les tissus, alors que ces même cellules sont capables de transmettre le virus en *trans* (Turville et al., 2002 ; Izquierdo-Useros Nuria et al., 2007). De plus l'expression de DC-SIGN semble diminuée à la surface des MDDC matures ce qui va à l'encontre des rapports montrant la capacité accrue des DC matures à transmettre le VIH-1 (Relloso et al., 2002). Enfin, ni le *knock-down* du récepteur, ni l'utilisation d'anticorps

neutralisant DC-SIGN n'abolit la transmission du virus des DC matures aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Izquierdo-Useros Nuria et al., 2007 ; Wang Jian-Hua et al., 2007 ; Boggiano Cesar et al., 2007). Tous ces résultats suggèrent l'existence d'autres récepteurs et mécanismes indépendants de DC-SIGN dans le processus de *trans*-infection.

### c. Mécanismes de *trans*-infection via Siglec-1

Indépendamment des CLR, les DC stimulées par le LPS sont capables de lier le VIH-1 par l'intermédiaire de gangliosides à la surface du virus (Izquierdo-Useros et al., 2012). Siglec-1 est un récepteur de ces gangliosides et un marqueur de maturation des DC. Contrairement à DC-SIGN, son expression augmente à la surface des MDDC et des CD1c<sup>+</sup> DC après stimulation à l'IFN $\alpha$  ou au LPS

(Puryear et al., 2013). Cela pourrait expliquer les meilleures capacités des DC matures à transmettre le virus en *trans*. En effet, la transmission du VIH-1 des DC matures (MDDC et CD11c<sup>+</sup> DC) aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est drastiquement réduite par *knock-down* du récepteur ou par l'emploi d'anticorps bloquant Siglec-1. Siglec-1 joue donc un rôle essentiel dans le mécanisme de *trans*-infection.

La capture du virus par Siglec-1 pourrait entraîner une internalisation et une redistribution du virus vers les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via la voie exosomale. La microscopie confocale a permis de mettre en évidence une colocalisation de VLP<sub>HI</sub>V (Viral like particules) avec la voie exosomale (CD81) mais pas lysosomale (Izquierdo-Useros et al., 2009). Ces particules sont recrutées à la zone de contact entre les MDDC et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (lignée Jurkat) pour un transfert efficace. De plus, pendant la transmission virale, Siglec-1 est également recruté au niveau du contact cellulaire (Izquierdo-Useros et al., 2012b).

Le rôle de Siglec-1 ne se limiterait pas seulement aux DC. Chez les macrophages, un *knock-down* du récepteur par siRNA entraîne une diminution de la taille des VCCs et une réduction de la capture et du transfert des particules virales (Hammonds et al., 2017). Cependant, ces résultats sont à considérer avec précautions. Les temps d'incubations et la pré-infection des macrophages avec le VIH-1 utilisés dans cette étude n'indiqueraient un rôle de Siglec-1 qu'après la mise en place de l'infection.

L'expression de Siglec-1 *in vivo* est montrée par microscopie dans des organes lymphoïdes de patients présentant une inflammation ou dans la muqueuse du col de l'utérus (Pino et al., 2015 ; Perez-Zsolt et al., 2019a). De plus, chez une patiente infectée par le VIH-1 et

avec une virémie détectable, les cellules Siglec-1<sup>+</sup> du col de l'utérus sont positives à un marquage de la p24 (Perez-Zsolt et al., 2019a). Ces particules proviendraient d'une accumulation de virus capturés plutôt que de la production de nouveaux virus. En effet, les images de microscopie des cellules Siglec-1 in vivo corrélaient avec la capture virale observée in vitro. (Izquierdo-Useros et al., 2014 ; Perez-Zsolt et al., 2019b). Ainsi Siglec-1 participerait à la rétention de particules virales dans des compartiments intracellulaires et pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de transmission in vivo.

#### d. *Cis*-infection après réplication virale

Comme mentionné précédemment, les DC sont susceptibles à l'infection par le VIH-1. La production de nouvelles particules virales est validée par l'analyse par cytométrie en flux de DC myéloïdes CD11c<sup>+</sup> isolées du sang et infectées par le VIH qui montre une augmentation de la p24 deux à trois jours après infection (Smed-Sørensen et al., 2005 ; Loré et al., 2005). Ces particules pourraient être transmises à d'autres cellules cibles à travers un mécanisme appelé *cis*-infection. En effet, la co-culture de DC CD1c<sup>+</sup>, préalablement infectées par le VIH-1, et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> révèle la transmission de ces nouvelles particules aux lymphocytes (Nobile et al., 2005). La nécessité de l'infection et donc de la réplication virale pour la transmission en *cis* des DC aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est montrée par l'emploi d'un traitement avec l'antirétroviral AZT, qui bloque la rétro-transcription et qui résulte en l'inhibition les événements de transmission dans une co-culture de DC et de lymphocytes (Nobile et al., 2005).

En conclusion, les DC possèdent des caractéristiques de capture, de stockage et de transmission du VIH-1 qui en fait des intermédiaires importants dans la dissémination du virus. Ces caractéristiques leur permettent également de faciliter la détection du virus et la mise en place d'une réponse immunitaire.

### 3. Détection et réponse au VIH-1 dans les DC

La capture et l'internalisation des particules virales par les DC permettent l'infection des cellules et la transmission du VIH-1. Ces mécanismes sont également essentiels pour la détection du virus et la mise en place d'une réponse antivirale.

**a. Détection du virus par les TLR : rôle des pDC**

Les pDC expriment le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 VIH-1. Elles peuvent donc capturer et internaliser le virus et sont potentiellement susceptibles à l'infection. (Fong Lawrence et al., 2002 ; Silvin et al., 2017). Malgré ces caractéristiques, l'analyse par cytométrie en flux de pDC exposées au VIH-1 ne révèle aucune présence de virus dans les cellules après trois jours d'infection (Bloch et al., 2014). De plus la complémentation avec Vpx n'entraîne pas d'augmentation d'infection significative. Des mécanismes indépendants de l'activité de SAMHD1 seraient responsables de la résistance des pDC à l'infection. Un blocage au niveau de la fusion virale est suggéré par l'emploi de virus possédant un système rapporteur (Silvin et al., 2017).

Comme vu précédemment, les pDC sont spécialisées dans la production d'interféron de type I (IFN-I), notamment grâce à l'expression constitutive d'IRF7 (Izaguirre et al., 2003 ; Villani et al., 2017). Elles expriment également des hauts niveaux de TLR7 et TLR9 en comparaison avec les DC myéloïdes CD11c<sup>+</sup> et seraient donc capable de détecter l'ARN viral du VIH-1 (Kadowaki et al., 2001). En effet, l'exposition des pDC au VIH-1 entraîne la sécrétion d'IFN-I, notamment l'IFN $\alpha$  (Fonteneau Jean-François et al., 2004a ; Yonezawa Akihito et al., 2003). L'emploi d'inhibiteur de la voie de signalisation des TLR révèle que les pDC détectent l'ARN du VIH-1 via les TLR endosomaux (Beignon et al., 2005). La comparaison des réponses des pDC entre une exposition au VIH-1 et des stimulations avec différents ligands de TLR, indique que TLR7 est impliqué dans la détection de l'ARN viral.

Contrairement à l'activation de la sécrétion d'IFN, la détection du VIH-1 via TLR7 dans les pDC induit une faible maturation des cellules. Elles n'expriment que des faibles niveaux de molécules de co-stimulation et de maturation (CD40, CD86 et CCR7) après exposition au virus (O'Brien et al., 2011 ; Silvin et al., 2017). Ces résultats pourraient expliquer la faible capacité des pDC exposés au VIH-1 à induire la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en comparaison aux DC CD11c<sup>+</sup> (Fonteneau Jean-François et al., 2004).

La capacité des pDC à produire de l'IFN-I après exposition au VIH-1 est corrélée avec les analyses de sérums de patients infectés qui contiennent de forts niveaux d'IFN-I et de d'IP-10 (Stylianou et al., 2000). Ce résultat pourrait illustrer l'importance des pDC dans la détection du VIH-1 et leur potentiel rôle in vivo dans la sécrétion d'IFN au cours de l'infection.

En revanche peu d'études s'intéressent aux DC myéloïdes, cDC1 ou cDC2, dans la détection virale via les TLR. Ces DC expriment pourtant TLR8, un senseur d'acide nucléique qui pourrait jouer un rôle dans la réponse au VIH-1.

#### **b. Détection des particules cytosoliques**

Les MDDC ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH-1 et ne répondent pas à l'exposition au virus (Granelli-Piperno et al., 1998 ; Manel et al., 2010). L'utilisation de virus complétés avec Vpx (VIH-1+Vpx) permet l'infection des MDDC et leur maturation. Une fois infectées, les MDDC augmentent l'expression de molécules de co-stimulation (CD86), activent STAT1 par phosphorylation et sécrète de l'IFN-I (Manel et al., 2010). Cette réponse est dépendante de l'intégration du virus, de la synthèse de la protéine Gag et de la liaison de la cyclophiline A (CypA) à la capsid virale. En effet l'inhibition de l'intégration ou des étapes d'assemblage viral empêche la réponse des MDDC (Manel et al., 2010). L'activation des cellules myéloïdes infectées est induite par la détection de l'ADN viral par cGAS et l'activation de STING. cGAMP, le produit de cGAS, est effectivement détecté dans des MDDCs infectées par le VIH-1. De plus, le *knock-down* de cGAS dans des THP-1 ou des MDDC infectées empêche la mise en place d'une réponse par ces cellules (Gao et al., 2013 ; Lahaye et al., 2013). Ainsi, c'est la reconnaissance à la fois de l'ADN viral par cGAS et de la capsid par la cyclophiline A (CypA) qui active la maturation des MDDC infectées par le VIH-1. Cependant, la capsid de la particule virale entrante protège le cDNA d'une détection par cGAS. En effet, une mutation du gène de la capsid du VIH-1 permet l'activation des MDDC même en l'absence de Vpx, et indique une détection du virus sans infection des cellules (Lahaye et al., 2013). cGAS pourrait donc détecter soit le cDNA viral qui ne s'est pas intégré, soit le cDNA directement dans le noyau.

NONO, un nouveau partenaire de la détection du VIH-1, a été montré comme interagissant avec la capsid du virus. La microscopie confocale des MDDC infectées par le VIH-1+Vpx a permis d'observer cGAS, la capsid virale et NONO dans le noyau des cellules (Lahaye et al., 2018). Le *knock-down* de NONO dans des MDDC réduit la maturation et la réponse ISG après l'infection au VIH-1+Vpx. L'interaction de NONO avec la capsid en plus de la détection de l'ADN proviral par cGAS dans le noyau enclencherait une réponse interféron chez les MDDC. Le rôle de NONO est confirmé dans des cDC2 du sang et des macrophages ce qui suggère un mécanisme commun entre les cellules myéloïdes infectées par le VIH-1.



D'autres études suggèrent une détection du virus en deux temps dans les MDDC exposées au VIH-1. Les MDDC seraient capables de détecter le VIH-1 avant l'étape d'intégration. En effet, l'emploi d'un inhibiteur de l'intégration virale (le Raltégravir) réduit l'activation des MDDC mais n'abolit pas complètement les réponses IFN et de maturation (Johnson et al., 2018). En revanche, un *knock-down* de cGAS ou de STING empêche toute maturation des MDDC exposées au VIH-1+Vpx ce qui montre un rôle de cGAS dans la détection du virus avant l'intégration. Plus précisément, l'analyse par ATAC-Seq de la chromatine des MDDC infectées et traitées au Raltégravir révèle une accessibilité préférentielle de la chromatine à des loci qui correspondent aux ISG (Johnson et al., 2018). Ainsi, la détection de l'ADN viral par cGAS avant son intégration permettrait d'amorcer une réponse interféron qui sera ensuite amplifiée après synthèse virale grâce à un remodelage de la chromatine et à la détection de cDNA du VIH-1 par cGAS. L'interprétation de ces données est à considérer avec précaution. En effet, le traitement au Raltégravir n'abolit pas complètement l'infection des MDDC. La réponse observée avant intégration pourrait donc être due à la détection par cGAS d'un résidu d'infection par le VIH-1.

Récemment, la régulation des réponses des MDDC infectées par le VIH-1 a été étudiée précisément (Johnson et al., 2020). Cette étude a montré, par une combinaison d'approches d'accessibilité de la chromatine et de transcriptomique, que la réponse interféron enclenchée par l'infection des MDDC était nécessaire mais insuffisante à la maturation des cellules (Johnson et al., 2020). Une analyse complexe des données *in silico* puis validée *in vitro* décrit le rôle essentiel des facteurs de transcriptions PRDM1 et RARA, en plus de la réponse IFN, dans l'activation de la maturation des MDDC infectées par le VIH-1.

Les études présentées dans cette partie utilisent majoritairement le modèle MDDC. Même si la génération de MDDC permet de contourner la limitation du nombre de DC qu'il est possible d'isoler à partir du sang ou des tissus, les résultats ne sont pas toujours transposables aux DC primaires *ex vivo*. En effet, nous avons illustré dans ce chapitre des différences dans le rôle de DC-SIGN dans la transmission du VIH-1 entre MDDC et DC myéloïdes isolées du sang. Nous avons également mentionné des susceptibilités différentes à l'infection entre ces cellules. Les MDDC ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH-1 sans complémentation avec Vpx alors que des DC infectées *in vivo* sont retrouvées dans la rate ou les muqueuses de patients. Il est donc important d'étudier les mécanismes de détection et de réponse au VIH-1 au sein des DC

primaires tout en prenant en compte la diversité des sous-types de DC pour mettre en évidence de potentielles spécificités cellulaires.

#### **4. Importance de la diversité des DC vis-à-vis de l'exposition au VIH**

La répartition des DC dans les tissus et leur expression de récepteurs au VIH-1 ou de PRR varie en fonction des sous types (Turville et al., 2002 ; Rhodes et al., 2019). Ces différences suggèrent des fonctions potentiellement aussi variées que les populations de DC. Les résultats mentionnés précédemment illustrent par exemple des différences dans la transmission ou l'infection entre les pDC et les DC CD11c<sup>+</sup>. Les limitations technologiques des tris cellulaires magnétiques basés sur un seul marqueur ont sous-estimé l'hétérogénéité des DC. Aujourd'hui, grâce à l'augmentation de la sensibilité des techniques de tri (enrichissement magnétique et tri par cytométrie en flux), il est possible d'étudier individuellement l'impact du VIH-1 sur les différentes DC.

##### **a. DC conventionnelles**

Les cDC2 (CD1c<sup>+</sup>) et les cDC1 (CD141<sup>+</sup>) du sang ont des fonctions différentes vis-à-vis du VIH-1. Les cDC1 sont résistantes à l'infection avec ou sans complémentation par Vpx. À l'inverse, les cDC2 sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 et l'infection est significativement augmentée après complémentation du virus par Vpx, ce qui suggère une activité de SAMHD1 (Silvin et al., 2017). L'exposition au VIH-1+Vpx induit une réponse ISG et une maturation chez les deux types de DC conventionnelles. Les cDC1 exposées au VIH-1 et cultivées avec des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène viral ne sont pas capables d'induire une activation des lymphocytes. En revanche, la co-culture de cDC2 et de cDC1 HLA discordantes et infectées révèle une augmentation significative de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en comparaison aux cDC1 seules (Silvin et al., 2017). Ainsi il semblerait que les sous-types de DC conventionnelles coopèreraient pour induire une réponse T. Les cDC1 sont spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes de cellules nécrotiques (Segura and Amigorena, 2015). Les cDC1 pourraient donc être capables d'internaliser des antigènes viraux provenant de la mort de cDC2 infectées.

## **b. pDC et Axl<sup>+</sup> DC**

Les pDC sont spécialisées dans la sécrétion d'IFN-I après exposition au VIH-1. Différentes études leur prêtent également des fonctions caractéristiques des DC conventionnelles après exposition au virus comme la présentation d'antigènes (Simmons et al., 2012 ; Sandgren et al., 2013) ou la transmission de virus capturés (Loré et al., 2005). En revanche, il faut désormais pondérer ces résultats suite à la mise en évidence des Axl<sup>+</sup> DC dans le sang. Les Axl<sup>+</sup> DC expriment des marqueurs de surface et des facteurs de transcriptions similaires aux pDC comme CD123 et TCF4 (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017). En revanche, nous avons vu qu'elles partagent des fonctions avec les DC conventionnelles. Les Axl<sup>+</sup> DC ont donc pu contaminer la population de pDC. En effet, le tri des pDC est principalement basé sur une sélection des cellules CD123<sup>+</sup> alors que les Axl<sup>+</sup> DC expriment aussi CD123. Cette contamination pourrait expliquer les capacités de présentation d'antigène observée chez les pDC exposées au VIH-1.

Le rôle des Axl<sup>+</sup> DC dans la réponse, l'infection et la transmission du VIH-1 reste à définir. Cette caractérisation est nécessaire pour comprendre la fonction de chaque DC dans les différentes étapes de l'infection par le VIH-1.

Les relations entre les DC primaires et le VIH-1 sont donc complexes. Mes travaux de thèse ont permis de décrire plus précisément le rôle de chaque population, en particulier celui des Axl<sup>+</sup> DC, après exposition au VIH-1. Nous avons montré que la population d'Axl<sup>+</sup> DCs possédait des spécificités dans la transmission et la réponse au VIH-1. Ces spécificités seront exposées dans les chapitres suivants.

# **PROBLEMATIQUE**

Les DC sont des cellules spécialisées dans la détection de pathogènes qui jouent un double rôle quand elles rencontrent le VIH-1. Elles participent à la fois à la propagation du virus et à l'activation d'une réponse antivirale.

La population de DC est hétérogène. Dans le sang, elle est composée des pDC, des cDC1, des cDC2 et des Axl<sup>+</sup> DC nouvellement décrites. La fonction de ces dernières dans un contexte infectieux n'a pas encore été établie. Elles expriment constitutivement Siglec-1, un récepteur impliqué dans la capture et la transmission du VIH-1, et pourraient donc jouer un rôle important dans l'infection par le virus. Une seule étude avait analysé en parallèle la fonction de chaque sous-type de DC vis-à-vis du VIH-1 mais à l'époque les Axl<sup>+</sup> DC n'étaient pas encore découvertes (Silvin et al., 2017). La majorité des études publiées sur les relations entre les DC et le VIH-1 a utilisé un modèle de DC différenciées in vivo (les MDDCs) ou des DC myéloïdes du sang CD11c<sup>+</sup> qui sont un mélange de cDC2, cDC1 et Axl<sup>+</sup> DC. Il y a donc un manque de connaissance sur le rôle précis de chaque sous-type de DC dans les différentes étapes de l'infection par le VIH-1.

Notre laboratoire étudie depuis longtemps les relations entre le VIH-1, le VIH-2 et les cellules myéloïdes, en particulier les macrophages. Nous avons participé à approfondir les connaissances sur la description des VCC dans les macrophages infectés par le VIH, sur la transmission du VIH par les macrophages aux autres cellules, et sur la réponse induite par la détection du virus dans les macrophages (Jouve et al., 2007 ; Gaudin et al., 2012 ; Gaudin et al., 2013 ; Decalf et al., 2017 ; Gea-Mallorquí et al., 2020). Notre laboratoire a également participé à la description des Axl<sup>+</sup> DC (ou pré-DC)(See et al., 2017).

L'absence d'analyse fonctionnelle des Axl<sup>+</sup> DC, leur expression constitutive de Siglec-1 et l'expertise de notre laboratoire dans les interactions entre cellules myéloïdes et VIH-1 nous ont incité à étudier les relations entre les Axl<sup>+</sup> DC et le VIH-1 en comparaison de celles des autres sous-types de DC. Nous avons évalué ainsi comment les Axl<sup>+</sup> DC pouvaient participer à l'infection et la transmission du VIH-1 mais également leur capacité à détecter la présence du virus et à développer une réponse innée antivirale.

Pour réaliser nos études, nous avons mis au point une stratégie de tri cellulaire complexe combinant enrichissement par billes magnétiques et cytométrie en flux pour isoler les 4 sous populations de DC d'un même donneur. Cela nous a permis d'analyser en parallèle

les différents types de DC et d'illustrer la complexité des relations entre les DC et le VIH-1, et en particulier le rôle des Axl<sup>+</sup> DC.

Dans un premier temps, nous avons montré que les Axl<sup>+</sup> DC étaient capables de capturer le virus, susceptibles à l'infection, capables de produire des virus, et qu'elles pouvaient jouer un rôle dans la transmission du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Ensuite, nous avons évalué la capacité des Axl<sup>+</sup> DC à détecter le VIH-1 et à développer une réponse immunitaire après reconnaissance du virus. Nous avons également cherché à décrire au niveau de la cellule unique les différents types de réponses que les Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1 étaient capables d'établir. La plupart du temps, nous avons comparé les résultats obtenus avec les Axl<sup>+</sup> DCs et ceux des autres sous-types de DC.

## **RESULTATS 1**

L'expression constitutive de Siglec-1 confère au Axl<sup>+</sup> DC (pré-DC) des capacités d'infection et de transmission du VIH-1.

## I. Résumé

### **L'expression constitutive de Siglec-1 confère au Axl<sup>+</sup> DC (pré-DC) des capacités d'infection et de transmission du VIH-1.**

Les DC sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 mais dans une moindre mesure que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou les macrophages. Néanmoins, elles participent à la propagation de l'infection grâce à leurs capacités à transmettre le VIH-1 aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les DC peuvent transmettre en *cis* les nouveaux virus infectieux qu'elles produisent. En absence de réplication virale, elles sont également capables de capturer les particules virales et de les transmettre aux lymphocytes à travers un mécanisme appelé *trans*-infection. La *trans*-infection implique notamment le récepteur Siglec-1 (ou CD169) qui reconnaît des gangliosides présents dans la membrane du VIH-1.

La population de DC est hétérogène et est composée de DC plasmacytoïdes (pDC) et de DC conventionnelles de type 1 ou de type 2, les cDC1 ou cDC2. Une analyse précise de la population de DC du sang a récemment montré la présence d'un nouveau sous-type de DC, les Axl<sup>+</sup> DC (aussi appelé pré-DC ou AS DC).

Chaque population de DC possède une spécialisation fonctionnelle vis-à-vis du VIH-1. Les pDC sont résistantes à l'infection mais produisent de grandes quantités d'IFN-I après détection virale. Les cDC1 sont résistantes à l'infection du fait de l'inhibition de la fusion virale, mais sont capables d'amorcer une réponse des lymphocytes T après internalisation de débris de cellules infectées. A l'inverse des pDC et cDC1, les cDC2 sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 quand le facteur de restriction SAMHD1 est neutralisé par exemple par Vpx et produisent de nouveaux virus. En revanche, La fonction des Axl<sup>+</sup> DC dans un contexte infectieux n'a pas encore été établie. L'expression constitutive de Siglec-1 à leur surface nous a incité à évaluer les spécificités fonctionnelles des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 par rapport aux autres DC.

Nous avons mis au point un protocole de purification qui permet d'isoler les 4 sous-populations de DC du sang humain : les pDC, les cDC2, les cDC1 et les Axl<sup>+</sup> DC (ou pré-DC). L'exposition *in vitro* des DC au VIH-1 utilisant le corécepteur R5 (R5-tropique) montre que les Axl<sup>+</sup> DC sont plus susceptibles que les cDC2 à l'infection. Les Axl<sup>+</sup> DC sont également les seules



DC infectées par le VIH-1 qui utilisent le récepteur X4 (X4-tropique). Dans ce cas, l'infection nécessite le récepteur Siglec-1 alors que l'infection par un virus R5-tropique n'est que partiellement dépendante de Siglec-1. Siglec-1 participe donc à la capture du VIH-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC et favorise la fusion virale. La faible susceptibilité des cellules myéloïdes au VIH-1 a été attribuée, entre autres, à l'expression du facteur de restriction SAMHD1. Nous avons montré que l'utilisation de la protéine du VIH-2/SIVmac Vpx, qui inhibe SAMHD1, permet d'augmenter significativement l'infection des Axl<sup>+</sup> DC, ce qui suggère une activité de SAMHD1 également dans ces cellules. Néanmoins, les Axl<sup>+</sup> DC et les cDC2 infectées avec Vpx sont toutes les deux capables de produire de nouveaux virus et de les libérer dans le milieu extérieur. Cependant, le bourgeonnement des nouvelles particules du VIH-1 s'opère dans des sites de production distincts dans les deux types de DC. En effet, une approche ultra-structurale a montré que dans les Axl<sup>+</sup> DC les particules virales bourgeonnaient au niveau de la membrane limitante de compartiments d'apparence intracellulaire semblables aux VCCs (« *virus-containing compartments* ») observées chez les macrophages infectés par le VIH-1. A l'inverse, la production de nouveaux virus dans les DC2 est polarisée et a lieu à la membrane plasmique, à la manière des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Aussi, les virus X4-tropiques produits par les Axl<sup>+</sup> DC sont infectieux et peuvent être transmis *in cis* au lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans des conditions de co-culture *in vitro*.

L'activation des Axl<sup>+</sup> DC avec un ligand de TLR9 induit un état antiviral qui entraîne une inhibition totale de la fusion du VIH-1 avec les cellules. Le mécanisme responsable de cette inhibition demeure à élucider mais pourrait être lié à l'expression de RAB15, une protéine précédemment décrite comme impliquée dans l'inhibition de la fusion du VIH-1 avec les pDC et les cDC1. Malgré l'absence de fusion et de réplication virale dans les Axl<sup>+</sup> DC activées, Siglec-1 demeure capable de capturer le VIH-1. La capture du virus par Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC activées permet la transmission du virus *in trans* à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro*. Les cDC2 activées par un ligand de TLR7 sont également capables d'effectuer la *trans*-infection mais grâce à un mécanisme indépendant de Siglec-1 qui reste à définir.

Ainsi, en employant le VIH-1 comme modèle, notre étude montre pour la première fois une caractérisation des fonctions des Axl<sup>+</sup> DC exposées à un pathogène et leur spécificité par rapport aux autres populations de DC. Notamment, l'expression constitutive de Siglec-1

confère aux Axl<sup>+</sup> DC leurs propriétés spécifiques concernant l'infection par le VIH-1 et sa transmission.

J'ai rejoint le projet sur la caractérisation des Axl<sup>+</sup> DC au début de ma thèse et ai participé à sa finalisation. J'ai majoritairement contribué à l'isolation des DC, à leur infection et l'évaluation de leurs capacités de transmissions du virus. Ces travaux m'ont permis d'être co-auteur sur la publication ci-après acceptée dans *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* (PNAS) en Novembre 2019.

II. Article

# Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors

Nicolas Ruffin<sup>a</sup>, Ester Gea-Mallorqui<sup>a</sup>, Flavien Brouiller<sup>a</sup>, Mabel Jouve<sup>b</sup>, Aymeric Silvin<sup>a,c</sup>, Peter See<sup>c</sup>, Charles-Antoine Dutertre<sup>c,d</sup>, Florent Ginhoux<sup>c,1</sup>, and Philippe Benaroch<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Institut Curie, Paris Sciences et Lettres (PSL\*) Research University, INSERM U932, Paris, France; <sup>b</sup>Institut Curie, PSL\* Research University, CNRS UMR3215, Paris, France; <sup>c</sup>Singapore Immunology Network, A\*STAR, 138648 Singapore, Singapore; and <sup>d</sup>Program in Emerging Infectious Disease, Duke–National University of Singapore Medical School, 169857 Singapore

Edited by Dan R. Littman, New York University Medical Center, New York, NY, and approved September 13, 2019 (received for review June 28, 2019)

**The human dendritic cell (DC) lineage has recently been unraveled by high-dimensional mapping, revealing the existence of a discrete new population of blood circulating DC precursors (pre-DCs). Whether this new DC population possesses specific functional features as compared to the other blood DC subset upon pathogen encounter remained to be evaluated. A unique feature of pre-DCs among blood DCs is their constitutive expression of the viral adhesion receptor Siglec-1. Here, we show that pre-DCs, but not other blood DC subsets, are susceptible to infection by HIV-1 in a Siglec-1-dependent manner. Siglec-1 mediates pre-DC infection of CCR5- and CXCR4-tropic strains. Infection of pre-DCs is further enhanced in the presence of HIV-2/SIVmac Vpx, indicating that Siglec-1 does not counteract restriction factors such as SAMHD1. Instead, Siglec-1 promotes attachment and fusion of viral particles. HIV-1-infected pre-DCs produce new infectious viral particles that accumulate in intracellular compartments reminiscent of the virus-containing compartment of macrophages. Pre-DC activation by toll-like receptor (TLR) ligands induces an antiviral state that inhibits HIV-1 fusion and infection, but Siglec-1 remains functional and mediates replication-independent transfer of HIV-1 to activated primary T lymphocytes. Altogether, Siglec-1-mediated susceptibility to HIV-1 infection of pre-DCs constitutes a unique functional feature that might represent a preferential relationship of this emerging cell type with viruses.**

blood dendritic cells | pre-DC | HIV-1 | Siglec-1 | virus-containing compartments

**D**endritic cells (DCs) are professional pathogen-sensing and antigen-presenting cells that are central to the initiation and regulation of immune responses (1). The DC population is classified into 2 lineages: plasmacytoid DC (pDC) and conventional DC (cDC), the latter comprising cDC1 and cDC2 subpopulations (2). Recently, DC ontogeny has been the object of intensive work using new high-dimensional approaches, including single-cell level in mice (3) and in humans (4–6). Our study identified a population of precursors of DC (pre-DCs) that originate from bone marrow and circulate in the blood before reaching tissues where they can differentiate into conventional DCs (5). Although human pre-DCs share many markers with pDCs, they are clearly different morphologically, phenotypically, and functionally (5).

DCs are targets for HIV-1, although with lower efficiency than activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and macrophages (7, 8). DCs are thought to participate in the establishment of the infection due to the expression of lectin-like receptors, allowing them to capture and transfer HIV-1 to CD4<sup>+</sup> T cells (9, 10). Since the seminal study of Steinman and coworkers, it is clear that DCs possess the capacity to capture and transfer HIV particles with a high efficiency to T cells (7). The process called *trans*-infection involves the lectin-like receptor Siglec-1 (CD169) present on the surface of DCs but still remains incompletely understood and essentially documented with *in vitro*-derived DCs from monocytes.

The capacity of the various DC subsets to initiate antiviral T cell responses through antigen presentation and to respond to infection is highly organized in space and time (11). pDCs detect

viruses, rapidly respond by producing large amounts of type I IFN, and may be, at least partially, responsible for the high levels of IFN $\alpha$  measured during the acute phase of HIV-1 infection (12). cDC1s are resistant to HIV-1 infection, but can uptake HIV-1-infected cells to prime specific T cell responses (11). In contrast to pDCs and cDC1s, cDC2s are susceptible to HIV-1 infection *in vitro* and may thus provide, after dying and being phagocytosed, a source of viral antigens for cDC1 leading to cross-presentation (11).

Whether the recently discovered pre-DC subset is endowed with specific functions as compared to the other DC subsets upon pathogen encounter remained to be determined. Importantly, Siglec-1 is one of the very few specific and constitutive markers of pre-DCs (4, 13). Siglec-1 is an IFN-induced receptor that can bind gangliosides, including GM3 that is part of the HIV-1 membrane and mediate efficient viral capture and transmission to T cells *in vitro* (14–18). Marginal zone macrophages also express Siglec-1 and can mediate retroviral transfer to target cells *in vivo* (19). Hence pre-DCs appear as a potentially critical population of cells with regards to HIV-1, prompting us to study its relationship to this virus as compared to the other blood DC subsets. We found that pre-DCs are susceptible to infection by R5- and X4-tropic HIV-1. Notably, HIV-1 capture by pre-DCs and HIV-1 infection of pre-DCs are Siglec-1 dependent. Upon TLR-mediated activation, pre-DCs up-regulate RAB15 expression and

## Significance

**Human blood dendritic cells (DCs) are composed of different subsets endowed with specific and complementary functions in the course of an immune response against pathogens such as viruses. A new population of circulating precursors of DCs (pre-DCs) has been recently identified by high-dimensional approaches. Besides their role in DC ontogeny, pre-DCs remained uncharacterized upon pathogen encounter. Here we show that their constitutive expression of Siglec-1, a receptor known to bind HIV-1 particles, confers them with a unique set of properties with regards to HIV-1, including viral capture, infection, and transfer. Thus, circulating pre-DCs may contribute to the antiviral immune response by providing a source of viral antigens to other DC populations.**

Author contributions: N.R., F.G., and P.B. designed research; N.R., E.G.-M., F.B., M.J., A.S., P.S., and C.-A.D. performed research; P.S., C.-A.D., and F.G. contributed new reagents/analytic tools; N.R., E.G.-M., M.J., C.-A.D., and P.B. analyzed data; and N.R., C.-A.D., F.G., and P.B. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

Data deposition: Microarray dataset is deposited in the Gene Expression Omnibus under accession no. GSE80171.

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: Florent\_Ginhoux@immunol.a-star.edu.sg or philippe.benaroch@curie.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1911007116/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1911007116/-DCSupplemental).

First published October 7, 2019.

become resistant to HIV-1 fusion and thus to infection. Importantly, activated pre-DCs switch to a replication-independent mechanism of virus transfer to activated primary T lymphocytes mediated by Siglec-1. These results show that constitutive expression of Siglec-1 by freshly isolated pre-DCs appears to be critical for the replication cycle of HIV-1 in these cells, from the capture of the viruses to the localization of the production of new viral progeny or to virus transfer.

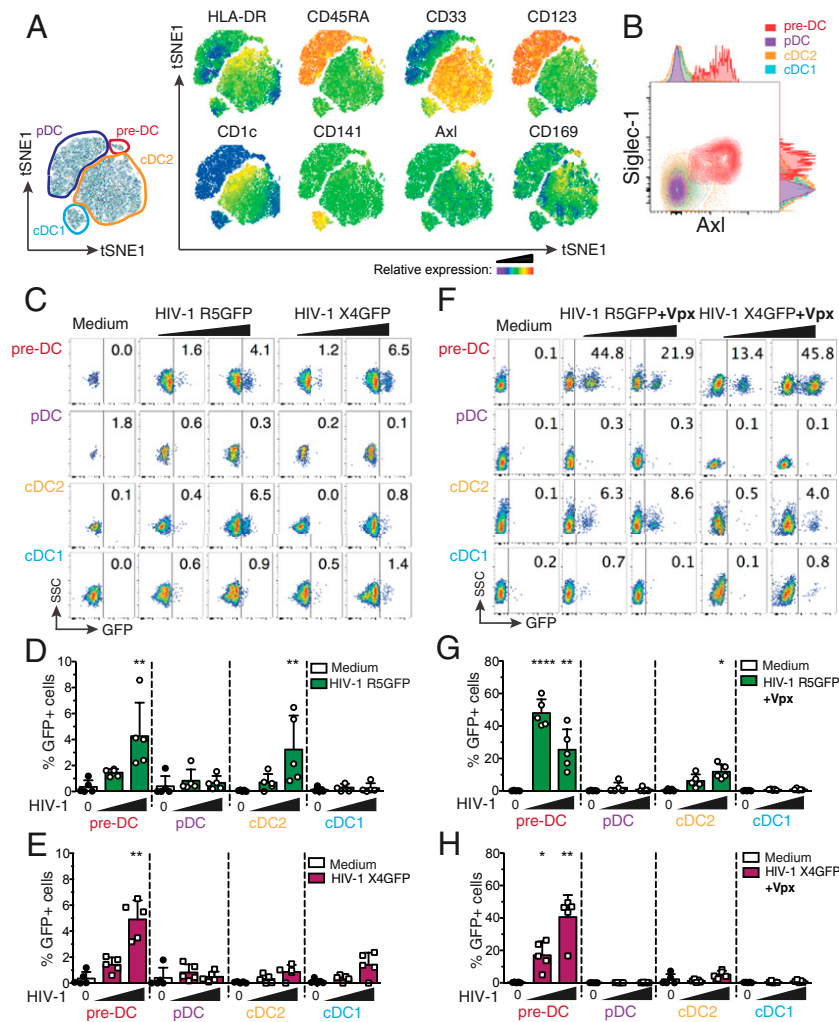
**Results**

**Pre-DC Subset Is Susceptible to HIV-1 Infection.** We first set up an isolation strategy of the 4 blood DC subsets: pre-DC, pDC, cDC1, and cDC2, by a combination of magnetic bead negative selection and flow cytometry sorting (SI Appendix, Fig. S1A). The sorted populations had the expected (4, 5) frequency and morphology at the ultrastructural level (SI Appendix, Fig. S1 B–D). Among the specific markers of pre-DCs, Axl and Siglec-1 stand out as the 2

most discriminative between DC subsets (Fig. 1 A and B and refs. 4 and 5).

Given that Siglec-1 can bind HIV particles, we evaluated pre-DC susceptibility to HIV-1 infection as compared to the other blood DC populations purified from healthy donor blood. When exposed to a CCR5-tropic HIV-1 encoding GFP (HIV-1 R5GFP), pre-DCs and cDC2s were infected to a similar extent (mean ± SD 4.2 ± 2.5% and 3.2 ± 2.6% of infected cells, respectively, after 48 h), while cDC1s and pDCs remained refractory to infection (Fig. 1 C and D). Interestingly, a CXCR4-tropic HIV-1 (HIV-1 X4GFP) yielded higher rates of infection with pre-DCs (4.9 ± 1.4%) compared with any of the other subsets, including cDC2, which all remained very low (Fig. 1 C and E).

The low susceptibility of DCs to HIV-1 infection has been linked to the presence of SAMHD1, a restriction factor that degrades cytosolic dNTPs, thus limiting the retrotranscription of the viral RNA and the infection rates (20–22). However, no difference in SAMHD1 mRNA level was detected among all DC



**Fig. 1.** Comparative analysis of human blood DC subsets for their susceptibility to HIV-1 strains. (A) Representative tSNE plots of flow cytometry data from HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>(CD3/CD14/CD16/CD19/CD34)<sup>-</sup> PBMCs, showing gates defining the indicated DC subsets and relative expression of the indicated markers. (B) Representative dot plot of Siglec-1 and Axl expression on pre-DCs (HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>CD33<sup>int</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>), pDCs (HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>), cDC2s (HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>CD1c<sup>+</sup>), and cDC1s (HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>CD141<sup>+</sup>). (C) GFP expression in blood DC subsets sorted and infected for 48 h with HIV-1 R5GFP or X4GFP. Freshly prepared viral preparations used for the experiments depicted from C to H were titrated on GHOST reporter cells in parallel and used at a MOI of 0.994 ± 0.112 (mean ± SEM). Representative dot plot analyses are presented with the percentages of GFP<sup>+</sup> cells indicated in each dot plot. (D) Quantification with HIV-1 R5GFP infection or (E) with HIV-1 X4GFP as in C, n = 5 independent donors combined from 3 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean ± SD. (F) As in C using the indicated viruses complemented with Vpx. (G) Quantification of infection with HIV-1 R5GFP or (H) with HIV-1 X4GFP, both supplemented with Vpx, n = 5 independent donors combined from 2 to 4 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean ± SD. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.0001.



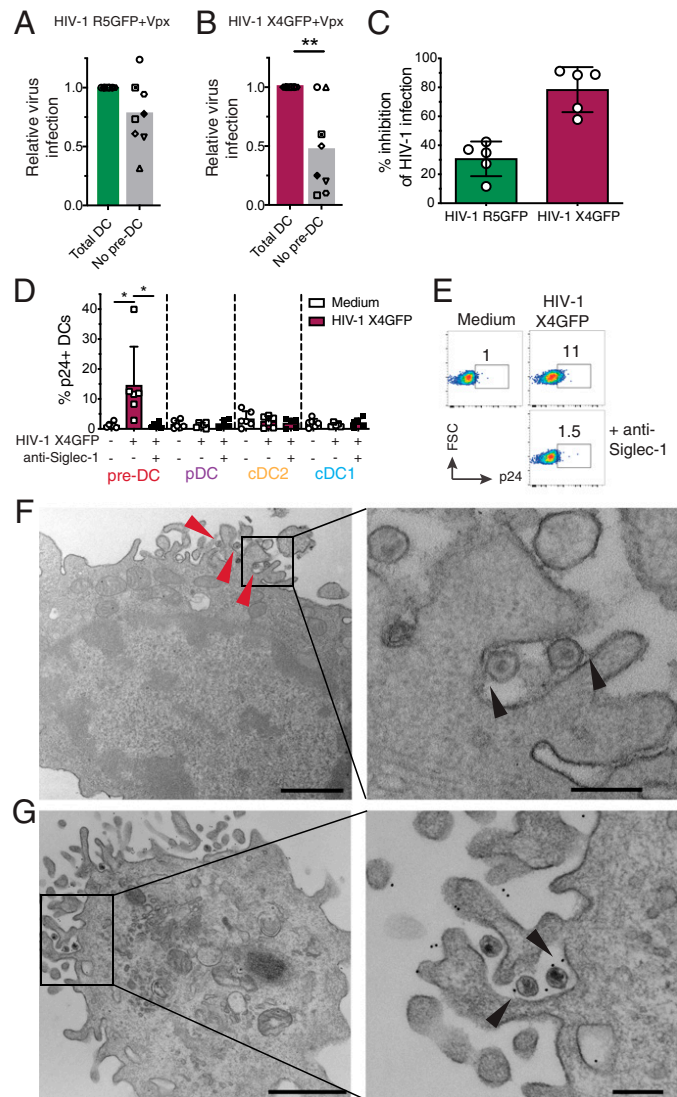
subsets, including pre-DC (SI Appendix, Fig. S24). Due to the very low numbers of pre-DCs isolated, we were unable to follow SAMHD1 phosphorylation that negatively regulates its activity (22, 23). Nevertheless, SAMHD1 activity can be efficiently counteracted by the accessory protein Vpx from HIV-2 (20–22, 24). Accordingly, complementation of our HIV-1 strains with Vpx (using a Vpr–Vpx fusion construct) highly increased the rates of infection that reached up to 60% for pre-DCs and ~18% for cDC2s with HIV-1 R5GFP (Fig. 1 F and G), establishing that SAMHD1 remains in part active in these 2 populations, as observed with monocyte-derived macrophages (MDMs) (20). Interestingly, with HIV-1 X4GFP complemented with Vpx, pre-DC was the only population infected (up to 49.5%, Fig. 1 F and H). Of note, monocyte-derived DCs (MDDCs) remained resistant to both viruses, and only slightly susceptible to HIV-1 R5GFP when complemented with Vpx (SI Appendix, Fig. S2 B and C), as previously shown (7, 25, 26).

We noticed that even in the presence of Vpx when using a R5-tropic HIV-1, cDC2s remained much less susceptible to the infection than pre-DCs under the same conditions (up to 18% versus 60%, respectively) (Fig. 1G), suggesting that besides SAMHD1, other mechanisms might limit the infection of cDC2s.

**Specific Siglec-1 Expression by Pre-DCs Confers an Advantage over Other DC Subsets for HIV-1 Capture and Infection.** The constitutive expression of Siglec-1 by pre-DCs raised the question of their capacity to compete with the other blood DC subsets and to catch circulating viral particles. To approach this point in vitro, total DCs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by enrichment using the pan-DC magnetic sorting procedure followed by flow cytometry sorting of all Lin<sup>−</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cells that were used as “total DC,” or further sorted to obtain a DC population called “no pre-DC,” by excluding pre-DCs based on their expression of CD123 and Axl. Both populations were exposed either to HIV-1 R5GFP or to HIV-1 X4GFP complemented with Vpx in order to maximize the detection of infected cells. The rates of infection, as measured at 48 h postinfection by GFP expression, were reduced in the absence of pre-DCs by 22.5% with the R5-tropic virus ( $n = 8$ , Fig. 2A). The reduction was even more pronounced with the X4-tropic virus: an average decrease of 53.3% of DC infection in the absence of pre-DCs (Fig. 2B). These data indicated that despite pre-DC low representation among blood DCs, this cell population has a better capacity to capture HIV-1 and to get efficiently infected.

To evaluate the potential role of Siglec-1 on pre-DC infection, pre-DCs were exposed to Siglec-1-specific antibody prior to infection. This blockade prevented HIV-1 infection of pre-DCs by R5-tropic viruses to some extent (35% inhibition) but more extensively for X4-tropic ones (roughly 85% inhibition, Fig. 2C). Together these data suggested that Siglec-1 expression may endow pre-DCs to better capture HIV-1 particles and stabilize their interaction leading to better rates of infection.

Thus, we first compared the various DC subsets for their capacity to capture HIV-1. Sorted DC populations were exposed to HIV-1 for 2 h at 37 °C, washed, and stained for p24 before analysis by flow cytometry. Among the 4 subsets, only freshly isolated pre-DCs were able to capture HIV-1 (Fig. 2D). Pretreatment of pre-DCs with an anti-Siglec-1 antibody totally prevented capture of HIV-1 (Fig. 2D and E). Moreover, electron microscopy (EM) ultrastructural analysis of pre-DCs exposed to HIV-1 for 2 h revealed the presence of HIV-1 particles tightly bound to microvilli at the pre-DC plasma membrane (Fig. 2F). Analysis of ultrathin immunolabeled sections revealed that Siglec-1 protein was localized at the ultrastructural level in the immediate vicinity of both viral particles and the plasma membrane (Fig. 2G). Given the very large size of the highly glycosylated Siglec-1 protein (1,709 amino acids), these images are highly suggestive



**Fig. 2.** Pre-DC preferential infection is associated with Siglec-1-mediated capture of HIV-1. (A) Quantification of relative infection of total DCs (CD45<sup>+</sup>Lin<sup>−</sup>(CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD34)<sup>−</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) or total DCs depleted of pre-DCs (CD33<sup>+</sup>CD45RA<sup>int</sup>CD123<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup>) exposed to HIV-1 R5GFP + Vpx or (B) to HIV-1 X4GFP + Vpx. GFP expression was analyzed 48 h postinfection. (C) Relative quantification of the inhibition of the HIV-1 infection by preincubation with an anti-Siglec-1 mAb. Pre-DCs, preincubated with an anti-Siglec-1 mAb or not before, were infected for 48 h with HIV-1 X4GFP or R5GFP. Infection rates were quantified by following GFP expression. (D) Quantification of HIV-1 capture by the 4 DC subsets. Sorted DCs were preincubated for 30 min with an anti-Siglec-1 mAb or not, then exposed or not to HIV-1 X4GFP for 2 h at 37 °C, washed, stained for p24 to detect bound particles, and assayed by flow cytometry (HIV-1 X4GFP viral particles are not GFP<sup>+</sup> by themselves),  $n = 5$  or 6 independent donors combined in 5 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (E) Representative dot plot analysis of HIV-1 capture by pre-DCs performed as in D. (F) Ultrastructural analysis of pre-DCs exposed for 2 h to HIV-1 R5GFP, washed, and processed for EM. An epon section is presented, with a magnified view on the Right. Arrowheads point to virions captured by pre-DCs. On the magnified view, arrowheads point to protein linking the virions to the plasma membrane of the cells. (Scale bar, 2  $\mu$ m [Left image] and 0.5  $\mu$ m for the magnified view.) (G) Immuno-EM analysis of pre-DCs exposed to HIV-1 R5GFP for 2 h fixed and stained for Siglec-1 with a mAb revealed by protein A gold coupled to 5 nm gold particles before embedding (Materials and Methods). An epon section is presented, with a magnified view. Arrowheads point to Siglec-1-specific staining at the interface between virions and plasma membrane invaginations. (Scale bar, 2  $\mu$ m [Left image] and 0.5  $\mu$ m for the magnified view.) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

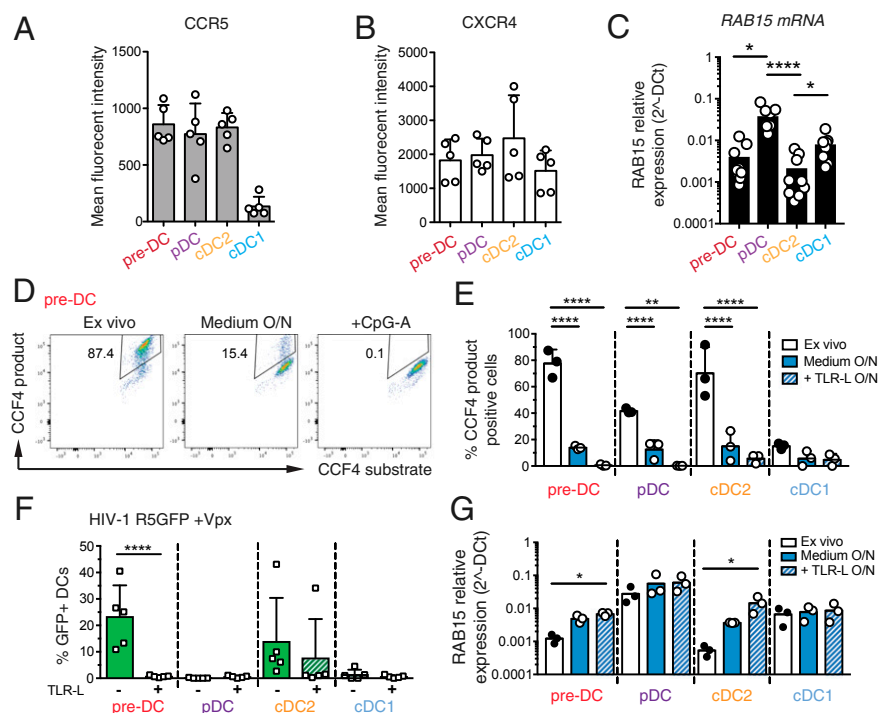
of Siglec-1 bridging the plasma membrane of pre-DC to HIV-1 particles. Thus, among blood DCs, pre-DCs are uniquely equipped with Siglec-1 that mediates efficient HIV-1 capture and infection.

**TLR Activation of Pre-DCs Induces RAB15 Up-Regulation and Prevents HIV-1 Fusion and Infection.** To identify other factors that may contribute to the preferential susceptibility of pre-DCs to HIV-1 as compared to other DC subsets, we first evaluated the expression levels of HIV-1 coreceptors on the various DC subsets. However, CCR5 and CXCR4 expression levels were similar among pre-DCs, cDC2s, and pDCs (Fig. 3A and B). The molecular basis for the resistance of cDC1s and pDCs to HIV-1 infection at steady state has recently been attributed to their higher expression of the small GTPase RAB15 (11). Accordingly, we found that both HIV-1-susceptible subsets, pre-DC and cDC2, exhibited similar low levels of RAB15 mRNA, while these levels were higher in HIV-1-resistant cells, i.e., pDCs and cDC1s (Fig. 3C). Since RAB15 expression has been proposed to inhibit HIV-1 infection by blocking viral fusion (11), we measured viral fusion using a  $\beta$ -lactamase (BlaM)-Vpr assay in the 4 DC subsets purified ex vivo (Fig. 3D and E). Strikingly, pre-DCs and cDC2s exhibited a high capacity to fuse with HIV-1 (close to 80% of the cells) while the 2 HIV-1-resistant DC subsets, pDC and cDC1, had lower capacity (40% and less than 20%, respectively). Thus, rates of viral fusion were higher than rates of infection for each of the 4 subsets purified ex vivo.

We next asked whether TLR-mediated activation of DCs could impact their susceptibility to viral fusion. Strikingly, while overnight culture already substantially reduced the fusion rates, overnight TLR activation induced a total block in HIV-1 fusion for all DC subsets (Fig. 3E). Indeed, overnight TLR activation abolished infection of pre-DCs and of cDC2s (in 4 out of 5 patients), while pDCs and cDC1s remained resistant to HIV-1 (Fig. 3F). Accordingly, overnight culture induced the expression of RAB15 mRNA in both pre-DCs and cDC2s, which was further increased following TLR activation.

We concluded that TLR activation completely switches pre-DC phenotype from highly susceptible to total resistance to HIV-1 infection. This phenotypic change is accompanied by an increased expression of RAB15 and a complete resistance to HIV-1 fusion.

**HIV-1 Replicates in Pre-DCs in Apparently Internal Compartments.** Siglec-1 has been proposed to contribute to the particular localization of viral assembly and storage in HIV-1-infected macrophages that take place in apparently internal compartments termed virus-containing compartments (VCCs) (27). To evaluate whether Siglec-1 could have a similar role in pre-DCs, pre-DCs and cDC2s infected for 48 h with HIV-1 R5 + Vpx were analyzed by EM (Fig. 4A and B and *SI Appendix, Fig. S3*). Strikingly, pre-DCs exhibited typical VCCs similar to the ones observed in HIV-1-infected MDMs (28–30). Viral budding profiles were mostly absent from the plasma membrane but were clearly observed at the limiting membrane of the compartment, indicating de novo

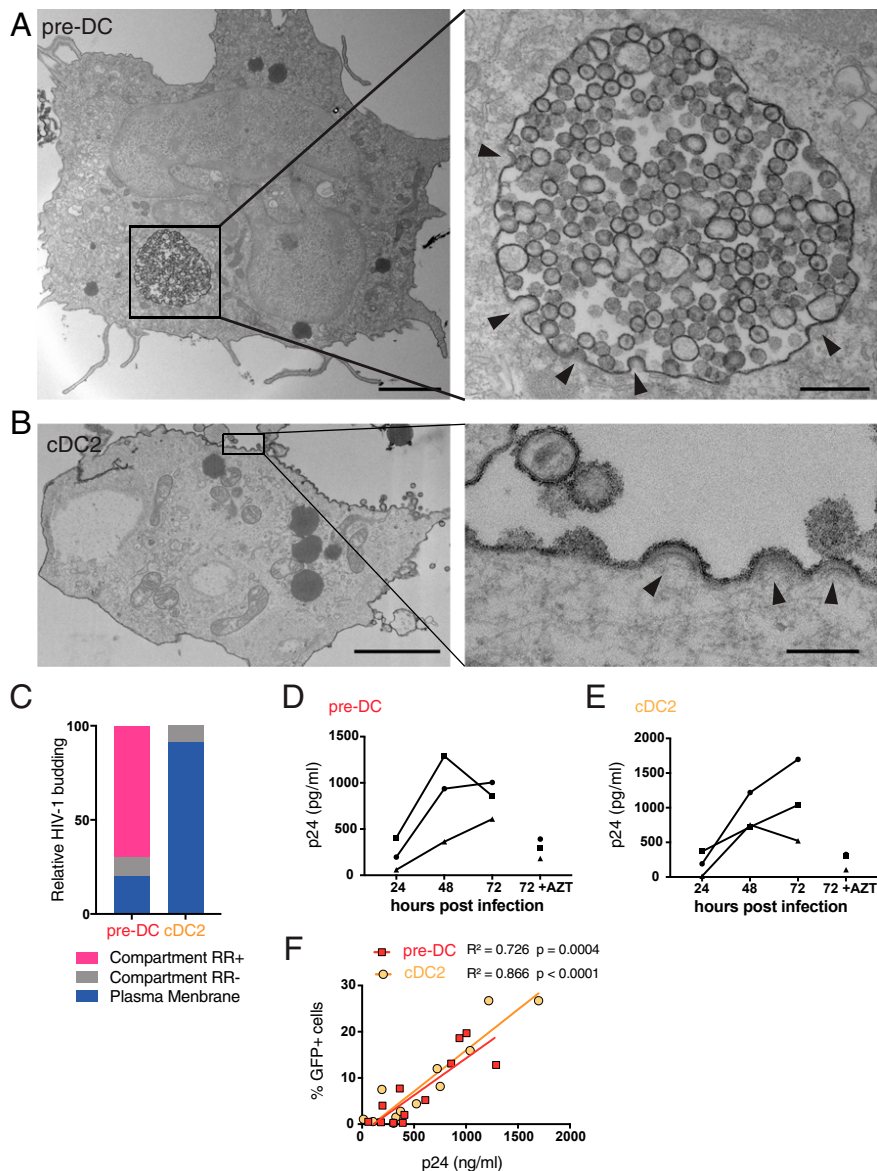


**Fig. 3.** Pre-DCs high capacity to fuse with HIV-1 and to get infected is lost upon activation and is associated with increased expression levels of RAB15. (A) Surface expression levels of CCR5 and (B) CXCR4 on the 4 freshly sorted DC subsets determined by flow cytometry,  $n = 5$  independent donors combined in 2 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (C) RAB15 mRNA expression levels among the 4 DC subsets freshly sorted, measured by qPCR,  $n = 9$  independent donors combined in 3 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (D) Representative dot plot of viral fusion revealed by CCF4 fluorescence in sorted pre-DCs after infection with HIV-1 R5GFP containing a BlaM-Vpr fusion protein directly ex vivo or after an overnight culture with medium alone or in the presence of CpG-A. Fluorescence of the CCF4 product indicates viral fusion with target cells as a result of cleavage of the cell-loaded CCF4 substrate by the virus-contained BlaM. (E) Quantification of viral fusion revealed by CCF4 fluorescence after infection with HIV-1 R5GFP containing a BlaM-Vpr fusion protein directly ex vivo or after an overnight culture with medium alone or in the presence of TLR-L (CpG-A for pre-DCs and pDCs, or CL264 for cDC2s and cDC1s) for the 4 sorted DC populations,  $n = 3$  donors combined from 2 independent experiments. (F) Quantification of DC infection with HIV R5GFP + Vpx directly ex vivo or following overnight (O/N) incubation with TLR ligands (CpG-A for pre-DCs and pDCs; CL264 for cDC2s and cDC1s). GFP expression was measured at 48 h postinfection,  $n = 5$  from 3 independent experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (G) RAB15 mRNA levels among the 4 DC subsets freshly sorted, measured by pPCR in DC subsets, ex vivo or after an overnight culture in medium alone or supplemented with TLR-L as in E,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

production of viral particles. These profiles exhibited a dark molecular coat typical of Gag precursor assembly (31, 32), that budded toward the lumen of the compartments in which numerous immature and mature viral particles accumulated (*SI Appendix, Fig. S3A*). A specific feature of the VCCs from macrophages is their accessibility to the external medium that can be evaluated by adding ruthenium red (RR), a membrane impermeant dye, during fixation (33, 34). Ruthenium red was visible in pre-DC VCCs as a dark and fuzzy shade at the limiting membrane of the VCCs and on the viral membranes (*Fig. 4A* and *SI Appendix, Fig. S3A*), demonstrating that these compartments are connected to the external medium. Interestingly, similar internal compartments preexist to the infection in MDMs (29, 35) and

are hijacked by HIV-1 for its assembly, leading to their conversion into VCCs.

In sharp contrast, infected cDC2s were free of VCCs, and viral budding only occurred in a polarized manner at the plasma membrane (*Fig. 4B* and *SI Appendix, Fig. S3B*), as previously observed in infected T lymphocytes and cell lines (36). In cDC2s, ruthenium red stained only the plasma membrane and the released viral particles. Quantification of compartments accessible to ruthenium red that exhibited viral buds and particles confirmed the striking differences between the 2 subsets (*Fig. 3C*). Thus, our results further support the idea that Siglec-1 plays a role in the VCC formation (27). Moreover, pre-DCs and cDC2s, although related through their precursor-to-progeny relationship



**Fig. 4.** HIV-1-infected pre-DCs, but not cDC2s, produce new virions in apparently intracellular compartments. (A) Epon sections from sorted pre-DCs and (B) cDC2s infected with HIV-1 R5GFP + Vpx for 48 h and analyzed by EM. Cells were fixed in the presence of ruthenium red to label surface and surface-connected compartments. Arrowheads point to nascent viral buds. (Scale bar, 2  $\mu$ m [Left images] and 0.15  $\mu$ m for magnified views.) (C) Quantification of the location of viral budding profiles observed in HIV-1-infected pre-DCs ( $n = 11$ ) and cDC2s ( $n = 22$ ). Of note, some internal compartments containing viruses were observed in infected cDC2s; they were however unlabeled by RR and did not exhibit viral budding profiles at their limiting membranes. Rather than VCCs, they probably represent endosomes having internalized viral particles secreted by neighboring cells. (D) Kinetics of production of p24 by sorted pre-DCs and (E) cDC2s infected with HIV-1 R5GFP + Vpx measured by CBA (*Materials and Methods*). The RT inhibitor AZT was used as a control for the viral input remaining at the end of the assay,  $n = 3$  independent donors combined in 2 experiments. Individual donors are displayed. (F) Correlation between the levels of infection of pre-DCs (red) and cDC2s (yellow) measured by GFP expression and the quantification of p24 in supernatants as in D and E.



as pre-DCs, can give rise to cDC2s (4, 5), exhibit different susceptibility to infection and completely different locations of viral assembly.

The EM profiles indicated that active viral replication can take place in both cell types. We compared their production after pre-DC and cDC2 exposure to HIV-1 R5GFP. Given the low numbers of pre-DC purification yield, we complemented the virus with Vpx to maximize the viral replication and be able to detect their eventual production. Both infected DC subsets released in their culture supernatant increasing amounts of p24 overtime (Fig. 4 D and E) that correlated with the rates of infection (Fig. 4F), indicating that HIV-1 can replicate in both subsets.

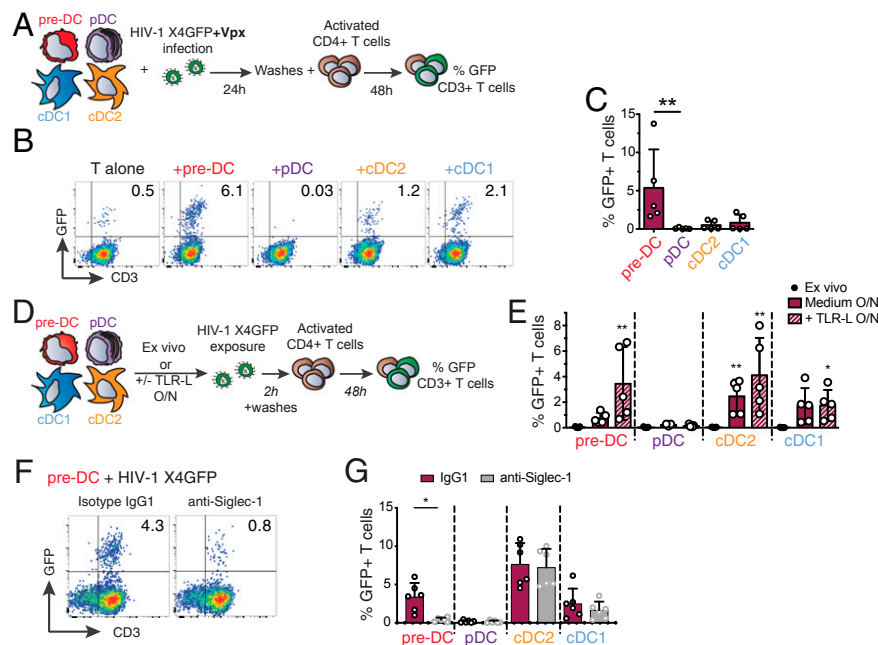
**Pre-DCs Can Transmit HIV-1 to CD4<sup>+</sup> T Cells *In Cis* or *Trans* Depending on Their Activation State.** The infectious capacity of the viral particles produced by HIV-1-infected pre-DCs was evaluated on primary activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 5A). In line with their preferential infection with X4-tropic virus, HIV-1-infected pre-DCs were the most efficient subset in transmitting the infection *in cis* to activated primary CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 5B and C). These results establish that the viral progeny of infected pre-DCs is infectious.

Given that TLR stimulation induced a state of resistance to HIV-1 infection, we evaluated the capacity of DC populations activated or not to perform HIV-1 *trans*-infection of T cells (Fig. 5D). First, none of the ex vivo sorted DC populations, including pre-DC, was able to transmit HIV-1 to activated CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 5E). However, after overnight culture, pre-DCs, cDC1s, and cDC2s performed *trans*-infection to CD4<sup>+</sup> T cells, which was further increased upon TLR activation (Fig. 5E). Similarly, MDDCs cultured overnight in the presence or absence of lipopolysaccharides (LPS) performed *trans*-infection of T cells (SI

Appendix, Fig. S4A). Thus, following TLR activation, both pre-DCs and cDC2s performed HIV-1 *trans*-infection to CD4<sup>+</sup> T cells to similar levels, while cDC1s did poorly and pDCs did not (Fig. 5E). Finally, preincubation of TLR-activated DC subsets with anti-Siglec-1 antibody strongly inhibited pre-DCs' but not cDC2s' capacity to perform *trans*-infection (Fig. 5F and G). Anti-Siglec-1 treatment also reduced HIV-1 *trans*-infection to CD4<sup>+</sup> T cells by MDDCs exposed to LPS (SI Appendix, Fig. S4B). We concluded that TLR-activated pre-DCs can perform genuine *trans*-infection, capturing HIV-1 without being infected (Fig. 3F) and transmitting the virus efficiently to activated CD4<sup>+</sup> T cells. The fact that ex vivo-sorted unstimulated pre-DCs are unable to perform *trans*-infection to T cells, despite their high levels of surface Siglec-1, indicates that activation of pre-DCs induces the acquisition of this capacity through a still unknown mechanism.

## Discussion

The recent identification of the human blood pre-DC population was based on single-cell data analysis using unsupervised clustering approaches (4, 5). Here we show that pre-DCs, as compared to the other blood DC subsets, exhibit a unique set of properties regarding HIV-1 that are linked to their constitutive Siglec-1 expression (SI Appendix, Fig. S5). Indeed, we show first that Siglec-1 is pivotal for the unique capacity of pre-DCs to capture HIV-1. In addition, among freshly sorted blood DC subsets, pre-DC stands out as the only subset susceptible to infection by both types of HIV-1: CCR5-tropic and CXCR4-tropic viruses. The CXCR4-tropic viruses are unable to infect any other DC subtype, even when the SAMHD1 restriction factor is counteracted (ref. 11 and Fig. 1). Despite their low frequency among blood DCs, pre-DCs were able to outcompete other DCs and get preferentially infected in a Siglec-1-dependent manner.



**Fig. 5.** Infected pre-DCs and activated noninfected pre-DCs can both transmit HIV-1 to activated CD4<sup>+</sup> T cells. (A) *Cis*-infection of T cells, outline of the experiment. (B) GFP expression in CD3<sup>+</sup> T cells cocultured with HIV-1-infected DC subsets or not, as explained in A. Representative dot plots are presented. (C) Quantification of GFP expression in CD3<sup>+</sup> T cells as in B,  $n = 5$  independent donors combined from 2 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (D) *Trans*-infection of T cells, outline of the experiment. (E) GFP expression in activated T cells cocultured directly with ex vivo DCs or following overnight culture in medium or in the presence of TLR-L (CpG-A for pre-DCs and pDCs, CL264 for cDCs). Prior to CD4<sup>+</sup> T cell coculture, DC populations were exposed to HIV-1 X4GFP (without Vpx) for 2 h and washed. Quantification of GFP<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>) was performed by flow cytometry after a 48-h coculture,  $n = 5$  independent donors combined in 2 experiments. Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. (F) GFP expression by CD3<sup>+</sup> T cells. TLR-activated pre-DCs were preincubated with anti-Siglec-1 antibody or with an isotype control antibody (IgG1) before performing the *trans*-infection assay as in E. (G) Quantification as in F with the indicated DC populations. ( $n = 6$  independent donors combined in 3 experiments). Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



Stabilization of the interaction between HIV-1 and pre-DCs via Siglec-1 may increase the probability of the Env-mediated fusion to occur, a rather slow process (37, 38). It may also account for pre-DCs' preferential susceptibility to X4 viruses as compared to other blood DC populations that do not express Siglec-1, despite their common low levels of expression of the coreceptor CXCR4. Regarding CCR5-tropic viruses, we observed that both pre-DCs and cDC2s had a high capacity to fuse with this type of virus (around 80%). However, cDC2s exhibited a much lower infection rate than pre-DCs, even when the SAMHD1 restriction factor was counteracted (roughly 20% versus 50%). On the same line, while pDCs are totally resistant to infection by R5 HIV-1, 40% of them were susceptible to viral fusion as judged using the BLam-Vpr assay. The discrepancies between the rates of fusion and infection, even when SAMHD1 was counteracted, suggest that additional unknown mechanisms are at work in cDC2s and pDCs.

RAB15 high expression has been associated to resistance to viral fusion of cDC1s and thus to infection (11). We confirmed and extended these data documenting high levels of RAB15 transcripts in pDCs and cDC1s and low levels in cDC2s and pre-DCs at the steady state. Importantly, we further established that TLR activation up-regulates these levels in all DC subsets and confers to all of them full resistance to fusion and infection. More work is needed to understand the molecular mechanism involved but the comparison of the various DC subsets may represent a valuable approach for this purpose.

Our data also indicate that surface Siglec-1 on pre-DCs facilitates pre-DC infection, allowing for production of infectious particles. Infection leads to viral production and accumulation in apparently intracellular compartments termed VCCs. Of note, Siglec-1 is also present at the VCC limiting membrane of infected MDMs (27) and thus in the HIV-1 particles they produce (39). Therefore, Siglec-1 expression by pre-DCs might be implicated in HIV-1 assembly at the VCC level. VCCs have been initially observed in tissue macrophages from infected patients in a variety of tissues, see ref. 31, and were then essentially studied in *in vitro*-derived and infected MDMs (30). A recent study identified urethral macrophages from an individual under combined antiretroviral therapy containing infectious particles in VCCs, suggesting that such tissue macrophages can represent a viral reservoir (40). In contrast, HIV assembly at the plasma membrane, as observed here in primary cDC2s, has been largely documented in activated CD4<sup>+</sup> T cells. The different location of viral assembly between pre-DCs and cDC2s is compelling since pre-DCs can give rise to cDC2s. Comparison between the 2 DC subtypes should help to approach the molecular basis for VCC formation and the potential role of Siglec-1 in this process, as previously proposed (41).

When activated, pre-DCs are no longer susceptible to infection but can perform efficient *trans*-infection to CD4<sup>+</sup> T cells, again in a fully Siglec-1-dependent manner. We thus confirm with primary pre-DCs what has been established with LPS-stimulated MDDCs, i.e., the existence of this mode of transmission to T cells via non-infected DCs. The fact that *ex vivo* purified pre-DCs were unable to perform HIV-1 *trans*-infection suggests that DC activation is necessary. In contrast to a previous study performed with LPS-stimulated cDC2s (15), we observed that TLR7-activated cDC2s performed *trans*-infection independently of Siglec-1. The impact of different TLR stimulations of DCs on the HIV-1 *trans*-infection process remains to be established. In addition, innate immune responses, including to TLR ligands, can be modulated by Axl (42, 43), a receptor tyrosine kinase well expressed by pre-DCs. Axl has also been implicated in the susceptibility to viral infections (44, 45), opening the possibility that Axl on pre-DCs plays a role in their susceptibility and response to HIV-1.

Our results indicate that, stimulated or not, pre-DCs could contribute to viral spreading through *trans*- or *cis*-infection, re-

spectively. How pre-DCs integrate in the highly organized share of work between the various DC subsets to face or contribute to the HIV infection remains to be established. Recent work of Silvin et al. (11) points out that cDC2s get infected by HIV-1, whereas cDC1s are in a resistant state that allows them to cross-present viral antigens from dead infected cDC2 cells. As pre-DCs can secrete IL-12 and support mixed-lymphocyte reactions (4, 5), it will be of interest to determine whether pre-DCs possess the hybrid capacity of both cDC1s and cDC2s to initiate an anti-HIV-1 response.

Interestingly, Siglec-1<sup>+</sup> macrophages from the spleen marginal zone have been shown in the vesicular stomatitis virus (VSV) mouse model to support a locally restricted enforced viral replication by down-modulating type I IFN responsiveness thus providing a source of viral antigen required to elicit a protective immune response (46). Moreover, Siglec-1<sup>+</sup> macrophages can transfer viral antigens to cDC1s which in turn cross-prime CD8<sup>+</sup> T cell responses (47). Importantly, this antigen transfer was mediated by Siglec-1 on the macrophages interacting with sialylated proteins present on cDC1 cell surface (47). Thus, Siglec-1 expression may also confer blood pre-DCs the capacity to recruit and instruct the help of cross-presenting cDC1s. Future studies will certainly address this important hypothesis, since manipulation of pre-DCs response or protection against HIV-1 may represent new approaches to promote a better immune control of the infection.

## Materials and Methods

**Isolation of Cells.** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats from healthy human donors (approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ethics committee and the Health Sciences Authorities [Singapore]) with Ficoll-Paque PLUS (GE). Informed consent was obtained from all donors, and samples were deidentified prior to use in the study. Total blood DCs were enriched with EasySep human pan-DC pre-enrichment kit (Stemcell Technologies). DC-enriched fractions were stained with antibodies specific for HLA-DR APCeFluor780, CD1c PerCpFluor710 (eBioscience), CD123 Viogreen, CD141 Vioblue (Miltenyi), CD33 APC, CD45RA PE (BD), and with a mixture of antibodies against lineage markers CD19 (Miltenyi), CD3, CD14, CD16, and CD34 (BD) in the FITC channel. Alternatively, DC-enriched fractions were stained with HLA-DR APCeFluor780, CD1c PerCpFluor710, CD123 Viogreen, CD45RA Vioblue (Miltenyi), CD33 PE-CF594, and Clec-9A PE (BD) with lineage markers in the FITC channel. Pre-DCs were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>int</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD123<sup>+</sup>. pDCs were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup>. cDC2s were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD1c<sup>+</sup>. cDC1s were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD141<sup>+</sup>/Clec9A<sup>+</sup>.

For pre-DC depletion, DC-enriched fractions were stained with antibodies specific for HLA-DR APCeFluor780 with a mixture of antibodies against lineage markers CD19, CD3, CD14, CD16, and CD34 in the FITC channel or with the addition of CD123 Viogreen, Siglec-1 PE-Vio770 (Miltenyi), and Axl PE (clone 108724, R&D Systems). Total DCs were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup>. Alternatively, Pre-DCs (Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> Siglec-1<sup>+</sup> Axl<sup>+</sup>) were excluded from Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup>.

All cells were sorted on a FACSAria (BD) using Diva software (BD) in 5-mL polypropylene round-bottom tubes containing 1 mL X-VIVO-15 media (Lonza BE04-418F). Postsort cell purity after gating on live cells by FCS/SSC was routinely between 92 and 99%.

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs by negative selection using the CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi 130-096-533). CD14<sup>+</sup> monocytes were obtained by positive selection from PBMCs using CD14 Microbeads (Miltenyi 130-050-20).

**DC Phenotype by Flow Cytometry.** Enriched DCs obtained as described were stained with HLA-DR APCeFluor780, CD1c PerCpFluor710, CD123 Viogreen, CD45RA Vioblue, CD33 PE-CF594, CD141 BV711 (BD), Axl PE, and Siglec-1 PE-Vio770 with lineage markers in the FITC channel. Cells were acquired on a FACS Verse and data analyzed using FlowJo 10 (Tree Star, Inc.). After compensation, tSNE representation of gated Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> cells were generated. Siglec-1 and Axl expression were evaluated on gated pre-DCs, pDCs, cDC1s, and cDC2s as described (5).

Alternatively, PBMCs were stained as described previously (5) with DC lineage markers in addition to Siglec-1 (BD), CXCR4 (Biolegend), and CCR5 (BD) and analyzed by flow cytometry. FCS files compensated for spillover between channels were exported using FlowJo v10 (Tree Star, Inc.) and

CXCR4 and CCR5 expressions were measured on gated pre-DCs, pDCs, cDC1s, and cDC2s as described.

**Cell Culture.** For lentiviral infections of sorted DCs, cells were cultured in X-VIVO-15 complemented with penicillin/streptomycin (Thermo Fisher 10378-016). For capture experiments, DCs were cultured in RPMI medium 1640, GlutaMAX (Thermo Fisher 61870-010) complemented with FBS 10% (Thermo Fisher 10270-106), and penicillin/streptomycin.

T cells were cultured in RPMI medium 1640, GlutaMAX complemented with FBS 10% and penicillin/streptomycin at  $10^6$  cells/mL in the presence of 5  $\mu$ g/mL PHA (lectin from *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin; Sigma L2769) and 50 U/mL of IL-2 (eBioscience). On day 2 of culture, cells were washed and additionally cultured with IL-2.

Purified CD14<sup>+</sup> cells were cultured at 0.8  $10^6$  cells/mL in complete RPMI supplemented with GM-CSF at 100 ng/mL and IL-4 (Miltenyi) at 50 ng/mL for 4 d to obtain MDDCs.

HEK293FT cells were cultured in DMEM, GlutaMAX (Thermo Fisher 61965-026) complemented with FBS 10%, and penicillin/streptomycin. GHOST X4R5 cells were cultured in DMEM, GlutaMAX complemented with FBS 10%, and penicillin/streptomycin. All cells were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Plasmids.** The proviral plasmid HIV-1 R5GFP was derived from NL4-3 with Bal env,  $\Delta$ nef, and GFP in nef (48, 49). HIV-1 X4GFP corresponded to NL4-3,  $\Delta$ nef, and GFP in nef. pIRES2EGFP-VPXanyVPR plasmid was used to complement some of the viral preparations with Vpx (50) and pMM310 (BlaM-Vpr) to complement the viral preparations with BlaM to measure the fusion of virions (51).

**HIV-1 Production and Titration.** Viral particles were produced by transfection of HEK293FT cells in 6-well plates with 3  $\mu$ g DNA and 8  $\mu$ L TransIT-293 (Mirus Bio) per well. For HIV-1 R5GFP and HIV-1 X4GFP, 3  $\mu$ g of HIV plasmid was used. For HIV-1 virus containing Vpx and BlaM, 0.75  $\mu$ g pIRES2EGFP-VPXanyVPR or pMM310, respectively, and 2.25  $\mu$ g HIV plasmid were used. Sixteen hours after transfection, media were removed, and fresh X-VIVO-15 or RPMI medium was added. Viral supernatants were harvested 36 h later, filtered at 0.45  $\mu$ M, used freshly or aliquoted, and frozen at -80 °C. Viral titers were determined on GHOST X4R5 cells as described (50) and multiplicity of infection (MOI) ranged from 0.04 to 1.99, mean = 0.99, SD = 0.49 for DC infection displayed in Fig. 1.

**HIV Infection of DCs and Stimulations.** Sorted cells were pelleted and resuspended in complete X-VIVO-15 or RPMI media at 0.4  $10^6$  cells/mL, and 50  $\mu$ L was seeded in round-bottom 96-well plates. In some experiments anti-Siglec-1 mAb (clone 7-239) or mlgG1 isotype control (Miltenyi) were added at 20  $\mu$ g/mL and cells were incubated for 30 min at 37 °C before adding the virus. Azidothymidine (AZT; Sigma) was used at 25- $\mu$ M final concentration, and nevirapin (Sigma) was used at 5  $\mu$ M. CpG-A (ODN2216, Invivogen) was used at 5  $\mu$ g/mL and CL264 (Invivogen) at 10  $\mu$ g/mL. For infections, 150  $\mu$ L of media or dilutions (150  $\mu$ L or 50  $\mu$ L) of viral supernatants were added. In the experiments depicted in Fig. 1, infections were spinoculated for 2 h at 800  $\times$  g at 25 °C.

For total DCs or pre-DC-depleted DCs, cells were resuspended at 2.10<sup>6</sup> cells/mL and 2.10<sup>5</sup> cells were cultured in the presence of 450  $\mu$ L mock medium or HIV-1 R5GFP viruses in X-VIVO-15.

Forty-eight hours after infection, cell culture supernatants were harvested and cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences) in PBS prior to analysis on a FACSVerse flow cytometer (BD). Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac (GraphPad).

**Electron Microscopy.** For routine embedding into Epon, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer pH 7.4 for 1 h, postfixed for 1 h with 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol solution, and then embedded in epoxy resin as described (34). Electron micrographs were acquired on a Tecnai Spirit electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a 4k CCD camera (EMSIS GmbH, Münster, Germany). For pre-embedding immunogold labeling, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature (RT), quenched in PBS-glycine, and blocked with 1% BSA-PBS. Primary antibody anti-Siglec-1 mAb (Miltenyi) was diluted to 1:50 in 1% BSA-PBS and incubated with cells for 1 h. Cells were extensively washed prior to addition of protein A gold (EM laboratory, Utrecht University) and routine embedding in Epon.

For RR stain, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M ice-cold Na-cacodylate buffer (pH 7.4) containing 0.15% RR overnight at 4 °C. Cells

were then washed with 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2), postfixed with 1.3% OsO<sub>4</sub> in the same buffer containing 0.15% RR for 2 h at room temperature, dehydrated in a graded series of ethanol solution, and then embedded in epoxy resin.

**HIV Capture and Trans-Infection of Activated CD4<sup>+</sup> T Cells.** Sorted cells were pelleted and resuspended in complete X-VIVO-15 media at 0.4  $10^6$  cells/mL and 50  $\mu$ L were seeded in round-bottom 96-well plates. In some experiments anti-Siglec-1 mAb or mlgG1 isotype control were added at 20  $\mu$ g/mL and cells were incubated for 30 min at 37 °C before adding the virus. HIV-1 X4GFP was added onto the cells (150  $\mu$ L/well of HEK293FT culture supernatant) and incubated for 2 h at 37 °C. Cells were washed extensively and fixed in 4% PFA in PBS. p24 staining was performed using KC-57 RD1 mAb (Beckman Coulter, 6604667). For trans-infection experiments, sorted DCs were washed extensively after the 2-h culture with HIV-1 X4GFP and activated CD4<sup>+</sup> T cells were added at a ratio of 1:1. Alternatively, CpG-A was added at 5  $\mu$ g/mL, CL264 was added at 10  $\mu$ g/mL onto DCs, and cells were incubated overnight before the addition of HIV-1 X4GFP. Cells were then washed and activated CD4<sup>+</sup> T cells added. After 48 h, cells were fixed in 2% PFA in PBS. Cells were then stained with PE-Cy7 anti-CD3 (BD) and analyzed on a FACS Verse (BD). Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac (GraphPad).

**HIV-1 Fusion Assay.** DC infection was performed as described with 150  $\mu$ L BlaM-containing viral supernatant and cells were spinoculated for 2 h at 800  $\times$  g, 25 °C. Cells were additionally incubated for 3 h at 37 °C, washed 3 times with CO<sub>2</sub> independent medium (Thermo Fisher 18045-054), loaded with CCF4-AM dye (dilution 1/400) in CO<sub>2</sub> independent medium complemented with solution B (dilution 1/125) for 1 h at RT. Cells were washed 2 times with CO<sub>2</sub> independent medium and resuspended in 100  $\mu$ L of CO<sub>2</sub> independent medium complemented with 10% FBS and 2.5 mM probenecid. Cells were incubated for 12 h at RT, washed with CO<sub>2</sub> independent medium, and fixed with 1% PFA in PBS before acquisition on a FACS Verse. Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac.

**Microarray Analysis.** Total RNA was isolated from FACS-sorted blood pre-DC and DC subsets using a RNeasy Micro kit (Qiagen). Total RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyzer (Agilent) and the RNA integrity number (RIN) was calculated. All RNA samples had a RIN  $\geq$  7.1. Biotinylated cRNA was prepared using an Epicentre TargetAmp 2-Round Biotin-aRNA Amplification Kit 3.0 according to the manufacturer's instructions, using 500 pg of total RNA starting material. Hybridization of the cRNA was performed on an Illumina Human-HT12 Version 4 chip set (Illumina). Microarray data were exported from GenomeStudio (Illumina) without background subtraction. Probes with detection *P* values  $>$  0.05 were considered as not being detected in the sample, and were filtered out. Expression values for the remaining probes were log<sub>2</sub> transformed and quantile normalized. The microarray dataset is deposited in the Gene Expression Omnibus under accession no. GSE80171.

**RAB15 Gene Expression.** A total of 4.10<sup>5</sup> sorted DCs were used ex vivo or treated as described. Cells were lysed, RNA was extracted using an RNeasy micro kit (Qiagen), and reverse transcription was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) by following the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed using SYBR Green I Master (Roche) with the following primers (Eurogentec): RAB15-forward: 5'-CAGCAGCTGGCGAAGGAG-3' and RAB15-reverse: 5'-GTTGGTGCAGGCACTTCTTC-3'. RPS18 gene was used as a housekeeping gene with the following primers: RPS18-forward: 5'-CTGCCATTAAGGGTGTGG-3', RPS18-reverse: 5'-TCAATGTCTGCTTCTCTCAAC-3'. The relative quantity of RAB15 mRNAs was calculated between RAB15 RNA Cp and RPS18 Cp by the 2- $\Delta$ Ct method.

**Measure of p24 by Cytometric Bead Assay.** In-house p24 cytometric bead assay (CBA) was used to quantify p24 concentration in the supernatant of HIV-1-infected DCs. Dilutions of virus-like particles with known concentration of p24 were used to establish a standard curve. A total of 300 beads/sample were acquired on a FACS Verse. Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac.

**Statistical Analysis.** Data were analyzed using Prism v7 for Mac (GraphPad). A Friedman test was used followed by Dunn's multiple comparisons tests, and a *P* value lower than 0.05 was considered as significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001).

**ACKNOWLEDGMENTS.** We acknowledge Nicolas Manel at Institut Curie for fruitful discussions, reagents, and critical reading of the manuscript. We also thank Ana-Maria Lennon-Dumenil, François-Xavier Gobert, Julie Helft, Constance Delaugerre, and Sebastian Amigorena for discussions. We acknowledge the “plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire Biolumaging de l'Institut Curie” (PICT-IBISA) for access to the imaging facilities and the flow cytometry facilities at Institut Curie and Institut Cochin (“plateforme Cytométrie et Immunobiologie”; CYBIO). This work was supported by grants from Agence

Nationale de Recherche contre le SIDA et les hépatites virales (ANRS), Ensemble contre le SIDA (Sidaction), Laboratoire d'Excellence (Labex) DCBIOL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-11-LABX-0043) to P.B., and Singapore Immunology Network (SIgN) core funding to F.G. Our work also benefitted from France-Biolumaging, ANR-10-INSB-04, and CellTisPhyBio Labex (ANR-10-LBX-0038) part of the Initiative D'EXcellence (Idex) PSL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). N.R. and E.G.-M. were supported by fellowships from ANRS, Sidaction, and Fondation pour la Recherche Médicale.

- A. Schlitzer, N. McGovern, F. Ginhoux, Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 9–22 (2015).
- M. Williams *et al.*, Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* **45**, 669–684 (2016).
- A. Schlitzer *et al.*, Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **16**, 718–728 (2015).
- A.-C. Villani *et al.*, Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).
- P. See *et al.*, Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* **356**, eaag3009 (2017).
- G. Breton *et al.*, Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD11c<sup>+</sup> or CD141<sup>+</sup>-DCs. *J. Exp. Med.* **213**, 2861–2870 (2016).
- A. Granelli-Piperno, E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, R. M. Steinman, Immature dendritic cells selectively replicate macrophage-tropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* **72**, 2733–2737 (1998).
- D. McIlroy *et al.*, Infection frequency of dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* **69**, 4737–4745 (1995).
- F. Hladik, M. J. McElrath, Setting the stage: Host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 447–457 (2008).
- L. Wu, V. N. KewalRamani, Dendritic-cell interactions with HIV: Infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 859–868 (2006).
- A. Silvin *et al.*, Constitutive resistance to viral infection in human CD141<sup>+</sup> dendritic cells. *Sci. Immunol.* **2**, eaai8071 (2017).
- M. Müller-Trutwin, A. Hosmalin, Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 578–583 (2005).
- C.-A. Dutertre *et al.*, Single-cell analysis of human mononuclear phagocytes reveals subset-defining markers and identifies circulating inflammatory dendritic cells. *Immunity*, S1074-7613(19)30334-6 (2019).
- E. Garcia *et al.*, HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**, 488–501 (2005).
- N. Izquierdo-Useros *et al.*, Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol.* **10**, e1001448 (2012).
- N. Izquierdo-Useros *et al.*, Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* **113**, 2732–2741 (2009).
- W. B. Puryear, X. Yu, N. P. Ramirez, B. M. Reinhard, S. Gummuluru, HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for capture by mature dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7475–7480 (2012).
- W. B. Puryear *et al.*, Interferon-inducible mechanism of dendritic cell-mediated HIV-1 dissemination is dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog.* **9**, e1003291 (2013).
- X. Sewald *et al.*, Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. *Science* **350**, 563–567 (2015).
- K. Hrecka *et al.*, Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* **474**, 658–661 (2011).
- N. Laguette *et al.*, SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654–657 (2011).
- A. Cribier, B. Descours, A. L. C. Valadão, N. Laguette, M. Benkirane, Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep.* **3**, 1036–1043 (2013).
- L. H. Arnold *et al.*, Phospho-dependent regulation of SAMHD1 oligomerisation couples catalysis and restriction. *PLoS Pathog.* **11**, e1005194 (2015).
- H. Lahouassa *et al.*, SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* **13**, 223–228 (2012).
- Y. Bakri *et al.*, The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J. Immunol.* **166**, 3780–3788 (2001).
- P. U. Cameron *et al.*, Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* **257**, 383–387 (1992).
- J. E. Hammonds *et al.*, Siglec-1 initiates formation of the virus-containing compartment and enhances macrophage-to-T cell transmission of HIV-1. *PLoS Pathog.* **13**, e1006181 (2017).
- J. Tan, Q. J. Sattentau, The HIV-1-containing macrophage compartment: A perfect cellular niche? *Trends Microbiol.* **21**, 405–412 (2013).
- P. Mlcochova, A. Pelchen-Matthews, M. Marsh, Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol.* **11**, 89 (2013).
- V. Rodrigues, N. Ruffin, M. San-Roman, P. Benaroch, Myeloid cell interaction with HIV: A complex relationship. *Front. Immunol.* **8**, 1698 (2017).
- J. M. Orenstein, M. S. Meltzer, T. Phipps, H. E. Gendelman, Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: An ultrastructural study. *J. Virol.* **62**, 2578–2586 (1988).
- G. Raposo *et al.*, Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**, 718–729 (2002).
- M. Deneka, A. Pelchen-Matthews, R. Byland, E. Ruiz-Mateos, M. Marsh, In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* **177**, 329–341 (2007).
- M. Jouve, N. Sol-Foulon, S. Watson, O. Schwartz, P. Benaroch, HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. *Cell Host Microbe* **2**, 85–95 (2007).
- S. Bérre *et al.*, CD36-specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to T cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2523–2538 (2013).
- E. O. Freed, HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 484–496 (2015).
- D. M. Jones, S. Padilla-Parra, Imaging real-time HIV-1 virion fusion with FRET-based biosensors. *Sci. Rep.* **5**, 13449 (2015).
- K. Miyachi, Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov, G. B. Melikyan, HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**, 433–444 (2009).
- E. Chertova *et al.*, Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* **80**, 9039–9052 (2006).
- Y. Ganor *et al.*, HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat. Microbiol.* **4**, 633–644 (2019).
- H. Akiyama, N.-G. P. Ramirez, M. V. Gudheti, S. Gummuluru, CD169-mediated trafficking of HIV to plasma membrane invaginations in dendritic cells attenuates efficacy of anti-gp120 broadly neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* **11**, e1004751 (2015).
- C. V. Rothlin, S. Ghosh, E. I. Zuniga, M. B. A. Oldstone, G. Lemke, TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124–1136 (2007).
- D. P. Strange *et al.*, Axl promotes zika virus entry and modulates the antiviral state of human sertoli cells. *MBio* **10**, e01372-19 (2019).
- E. T. Schmid *et al.*, AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *elife* **5**, e12414 (2016).
- L. Meertens *et al.*, Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep.* **18**, 324–333 (2017).
- N. Honke *et al.*, Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nat. Immunol.* **13**, 51–57 (2011).
- D. van Dinther *et al.*, Functional CD169 on macrophages mediates interaction with dendritic cells for CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming. *Cell Rep.* **22**, 1484–1495 (2018).
- K. Oswald-Richter *et al.*, HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol.* **2**, E198 (2004).
- K. Oswald-Richter *et al.*, Identification of a CCR5-expressing T cell subset that is resistant to R5-tropic HIV infection. *PLoS Pathog.* **3**, e58 (2007).
- N. Manel *et al.*, A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* **467**, 214–217 (2010).
- M. Cavrois, C. De Noronha, W. C. Greene, A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1151–1154 (2002).

### III. Informations Supplémentaires



Supplementary Information for

**Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of  
human dendritic cell precursors**

Nicolas Ruffin<sup>a</sup>, Ester Gea-Mallorquí<sup>a</sup>, Flavien Brouiller<sup>a</sup>, Mabel Jouve<sup>b</sup>, Aymeric Silvin<sup>a,c</sup>, Peter See<sup>c</sup>, Charles-Antoine Dutertre<sup>c,d</sup>, Florent Ginhoux<sup>c,1</sup>, and Philippe Benaroch<sup>a,1</sup>

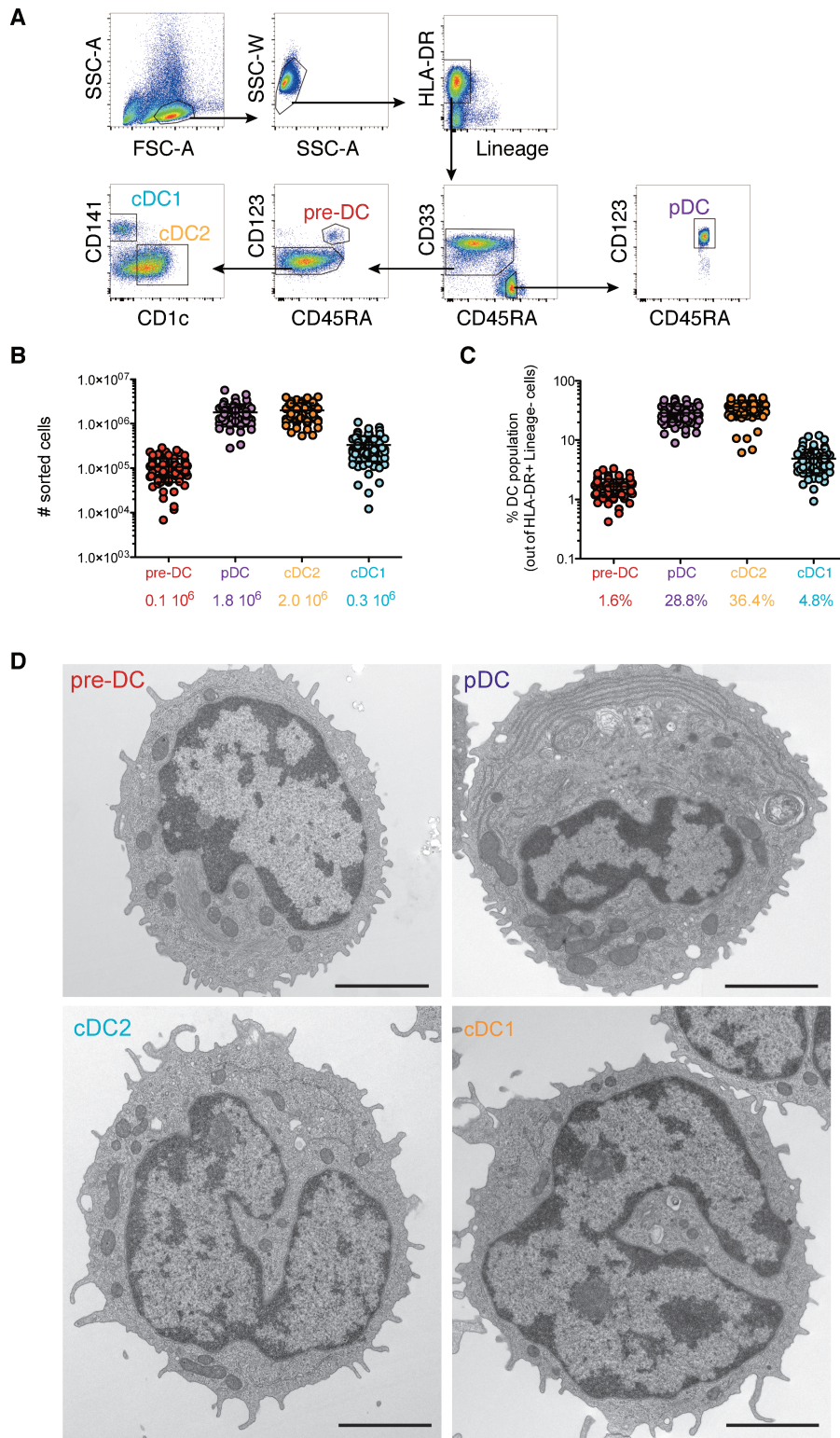
Correspondence to Florent Ginhoux, and Philippe Benaroch

email: [Florent\\_Ginhoux@immunol.a-star.edu.sg](mailto:Florent_Ginhoux@immunol.a-star.edu.sg), [philippe.benaroch@curie.fr](mailto:philippe.benaroch@curie.fr)

**This PDF file includes:**

Figures S1 to S5





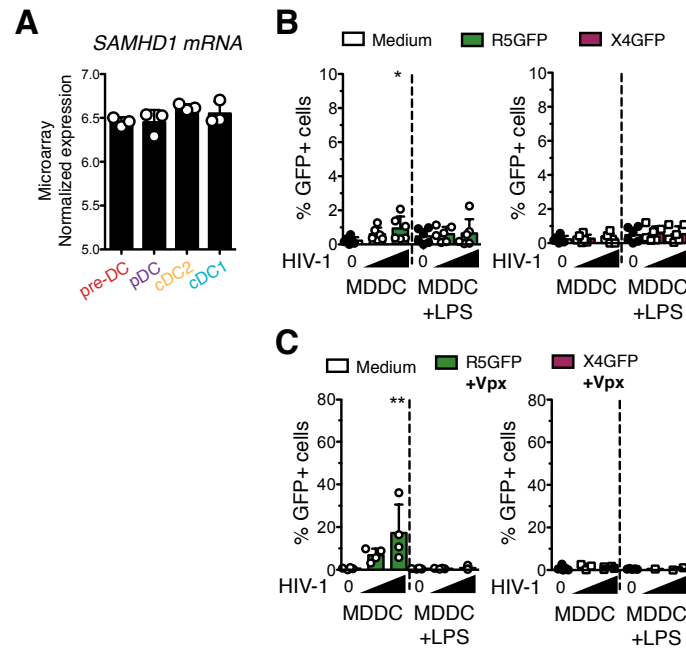
**Fig. S1.** Related to Figure 1. **Characterization of the sorted blood DC populations.**

(A) Gating strategy used to purify the four populations of DCs from the blood after magnetic bead-enrichment of pan-DC from PBMCs.

(B) Absolute numbers of cells obtained after sorting for each of the four DC subsets (n= 84 donors). Data represent individual donors with mean  $\pm$  S.D.

(C) Percentages of the different subsets among total HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> DCs (n=84 donors). Data represent individual donors with mean  $\pm$  S.D.

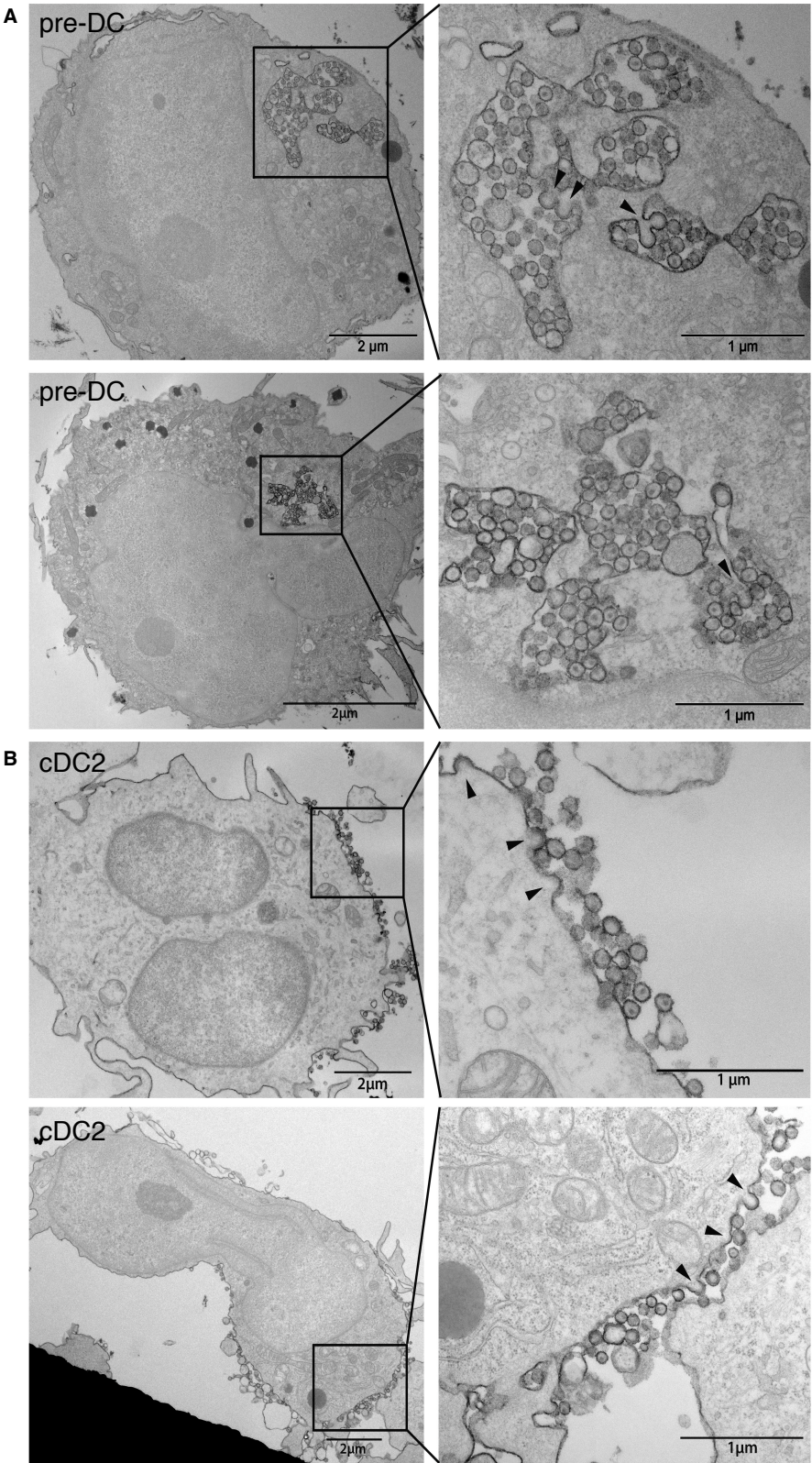
(D) Electron microscopy analysis of the four DC subsets freshly sorted from blood. Representative epon sections are presented. Bar scale: 2  $\mu$ M.



**Fig. S2.** Related to Figure 1. **Susceptibility of MDDCs to HIV-1 infection.**

(A) mRNA levels of SAMHD1 in the freshly sorted DC subsets, measured by RNA seq, (n=3 independent donors combined in 1 experiment). Individual donors are displayed with bars representing mean  $\pm$  S.D.

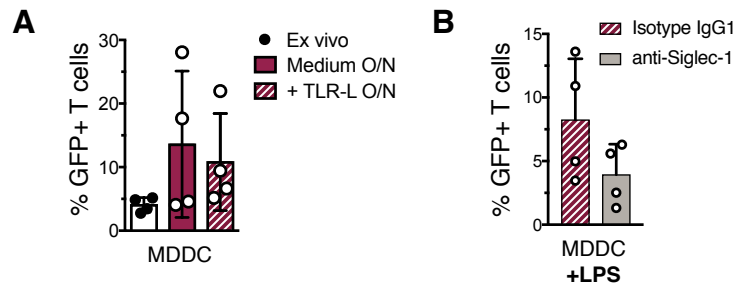
(B) Quantification of GFP expression in MDDCs and LPS-activated MDDCs infected for 48 h with HIV-1 R5GFP or X4GFP alone or (C) supplemented with Vpx, n=4 from 4 independent experiments.



**Fig. S3.** Related to Figure 4. **Ultrastructural analysis of HIV-1-infected pre-DCs and cDC2s.**



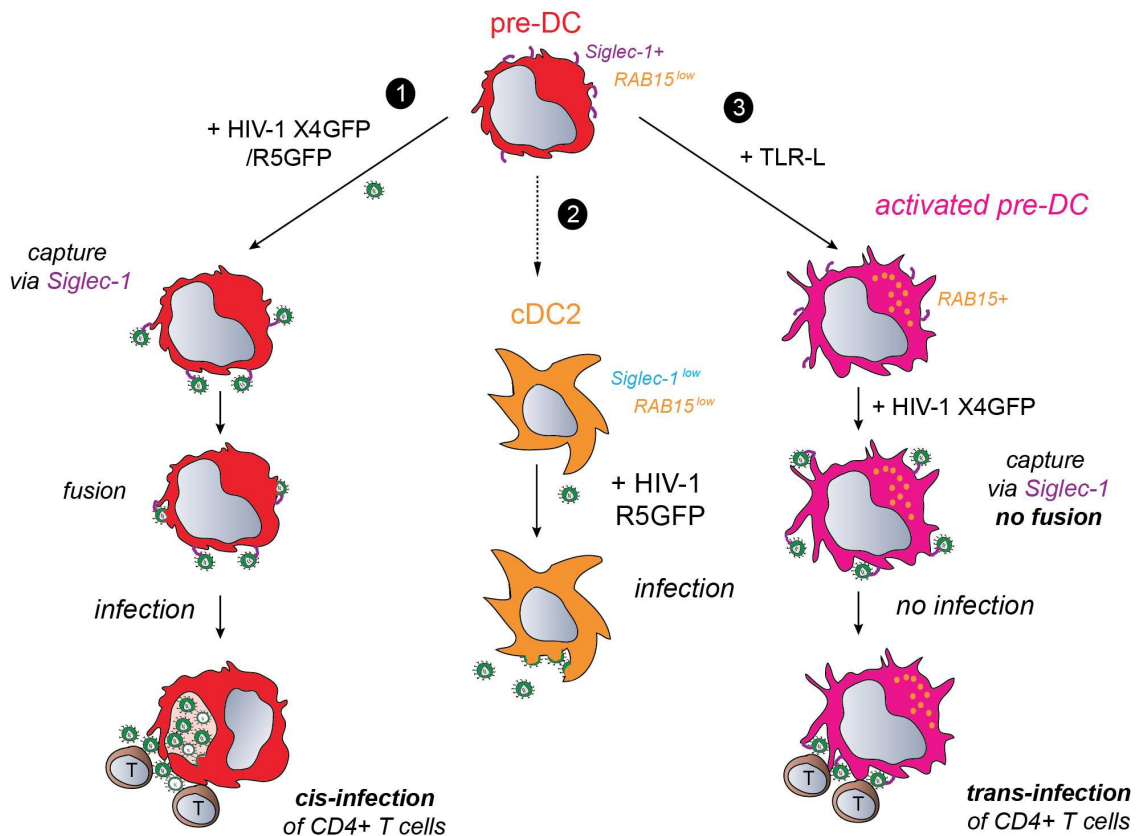
(A) EM profiles of sorted pre-DCs or (B) cDC2s that were infected for 48 h with HIV-1 R5 + Vpx. Samples were prepared and processed for EM analysis as in Fig. 4A and B. Immature virions possess a darker periphery and an electron lucent centre while mature virions contain an electron dense zone in their centre (30, 31) revealing the presence of the capsid shell with sometimes its typical conical shape depending on the angle of cut in pre-DC VCC.



**Fig. S4.** Related to Figure 5. **Activated MDDCs transmit HIV-1 in *trans* to activated CD4<sup>+</sup>T cells through Siglec-1.**

(A) MDDCs were assayed for *trans*-infection as in Fig. 5A. GFP expression in activated T cells co-cultured directly with MDDCs or following overnight culture in medium or in the presence of LPS. Prior to CD4<sup>+</sup> T cell co-culture, DC populations were exposed to HIV-1 X4GFP (without Vpx) for 2 h and washed.

(B) GFP expression in activated T cells co-cultured with LPS-activated MDDCs. Prior to CD4<sup>+</sup>T cell co-culture, MDDC populations were exposed to an anti-Siglec-1 mAb or its isotype control for 30 min and then exposed to HIV-1 X4GFP (without Vpx) for 2 h and washed. For A and B, quantification of GFP<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>) was performed by flow cytometry after a 48h co-culture, n=4 independent donors. Individual donors are displayed with bars representing mean ± S.D.



**Fig. S5. Graphical Abstract. pre-DCs are endowed with unique properties with regards to HIV-1**

(1) pre-DC can capture HIV-1 via their surface *Siglec-1* leading to fusion and infection. They produce new viral particles in apparently intracellular virus-containing compartment and can transmit the infection in *cis* to activated T cells. (2) pre-DC can differentiate into cDC2 that are susceptible to HIV-1 R5-tropic viral infection. HIV-1-infected cDC2 produce viral particles at their plasma membrane. (3) Activated pre-DCs can capture HIV-1 via *Siglec-1* and efficiently transfer in *trans* viral particles to activated T cells, which become infected while activated pre-DCs are resistant to viral fusion and infection, in association with their increased *RAB15* expression.

## **RESULTATS 2**

L'exposition des Axl<sup>+</sup> DC au VIH-1 active des voies de détection virale différentes qui révèlent une diversité fonctionnelle

## I. Résumé

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle essentiel dans la détection des pathogènes et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Dans le contexte d'une infection par le VIH-1, les DC sont également importantes pour l'établissement et la dissémination de l'infection. Elles participent donc à la fois à l'activation d'une réponse antivirale et à la transmission du VIH-1.

Les analyses multidimensionnelles à haute résolution de l'hétérogénéité de la population de DC du sang ont permis d'identifier un nouveau sous-type de DC, les Axl<sup>+</sup> DC. Nous avons précédemment démontré que l'expression spécifique et constitutive de Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC leur conférait des caractéristiques uniques vis-à-vis du VIH-1. En effet, Siglec-1 permet la capture du VIH-1 et favorise l'infection des cellules. De plus, la capture du virus par des Axl<sup>+</sup> DC activées et résistantes à l'infection permet la transmission du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro* à travers un processus de *trans*-infection. Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient ainsi participer à la dissémination et la propagation du VIH-1. En revanche, la capacité des Axl<sup>+</sup> DC à détecter le virus et à mettre en place une réponse immunitaire n'a pas encore été déterminée. Dans cette étude nous évaluons les spécificités des Axl<sup>+</sup> DC dans la détection du VIH-1 et dans l'instauration d'une réponse immunitaire par des approches transcriptomiques et de validations fonctionnelles *in vitro*.

L'analyse par séquençage du transcriptome des cDC2 et des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 montre que ces-dernières présentent une réponse au virus plus ample que celle des cDC2. Après détection du virus, les Axl<sup>+</sup> DC activent une réponse interféron et une réponse inflammatoire qui sont illustrées respectivement par l'expression de nombreux ISGs (« *Interferon-stimulated genes* ») et des gènes d'IFN-I ou de molécules de co-stimulation et de cytokines. Ces réponses sont observées même après inhibition de la rétro-transcription par des antirétroviraux mais leur ampleur est accentuée par la réplication virale. A l'inverse, l'exposition des cDC2 au VIH-1 induit essentiellement une expression plus faible d'ISGs et est dépendante de la réplication virale car elle nécessite la présence de Vpx. De plus, la réponse observée dans les cDC2 est quantitativement plus faible que celle des Axl<sup>+</sup> DC.

Le séquençage transcriptomique au niveau de la cellule unique des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 a confirmé que les cellules activaient une réponse interféron et une réponse

inflammatoire mais précise qu'elles ont lieu dans des cellules différentes. Ces analyses nous ont également permis de montrer que des facteurs de transcriptions différents étaient responsables de l'induction des deux réponses. En effet, une majorité des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 présente une expression d'ISGs dépendante de STAT1/STAT2 et des IRFs. En parallèle, une autre partie des cellules active la voie NFκB qui va induire leur maturation et la sécrétion de cytokines inflammatoires. L'activation de ces deux réponses est indépendante de la rétro-transcription. En revanche, après intégration et production de nouveaux virus les Axl<sup>+</sup> DC présentent à la fois une activité des facteurs de transcriptions STATs et de NFκB. Ce sont d'ailleurs les cellules infectées par le virus qui produisent la majorité de l'IFN-I sécrété. Au demeurant, les Axl<sup>+</sup> DC sont les seules DC avec les pDC à produire de l'IFN-I après infection par le VIH-1. L'hétérogénéité de réponse observée chez les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 ne semble pas due à une hétérogénéité préexistante mais plutôt à des mécanismes de détection des particules virales différents. La forte corrélation des programmes transcriptionnels des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 ou stimulées avec un ligand de TLR9 suggère que la réponse NFκB est enclenché par la détection du VIH-1 avant la fusion du virus avec la cellule. A l'inverse, la réponse ISG est dépendante de STING avant et après rétro-transcription. Elle est donc probablement due à une reconnaissance d'acides nucléiques viraux dans le cytoplasme des Axl<sup>+</sup> DC.

Enfin, nous montrons que l'activation des Axl<sup>+</sup> DC par le VIH-1 se traduit par la capacité des cellules à induire une prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs dans des conditions de co-culture *in vitro*.

En plus de leurs spécificités liées à la transmission et à la réplication virale, les Axl<sup>+</sup> DC sont également différentes des autres DC dans leur capacité à détecter et à répondre au virus. Les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 sont plus efficaces que les cDC2 à induire une réponse inflammatoire et IFN-I. Elles sont aussi capables d'induire une activation des lymphocytes T. Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient donc avoir une importance considérable dans la mise en place d'une réponse antivirale.

Cette étude correspond au projet principal de mon doctorat. C'est un travail en collaboration avec un chercheur post-doctorant du laboratoire et un ingénieur en bio-informatique. Au cours du développement du projet, j'ai à la fois participé à la conception et la

réalisation des expériences *in vitro* mais également à l'analyse d'un des jeux de données de séquençage transcriptomique. Ces travaux ont mené à la rédaction d'un manuscrit présenté ci-après et en cours de soumission.

## Axl<sup>+</sup> DCs exposure to HIV-1 activates dual sensing mechanisms revealing functional diversity

**Authors:** Nicolas Ruffin<sup>1#</sup>, Flavien Brouiller<sup>1,2#</sup>, Francesca Nadalin<sup>1</sup>, Ouardia Aït Mohamed<sup>1</sup> and Philippe Benaroch<sup>1\*</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Institut Curie, PSL\* Research University, INSERM U 932, F-75005, Paris, France ; <sup>2</sup>Sorbonne Université, ED394, Paris, France

#contributed equally. \*Correspondence to: philippe.benaroch@curie.fr

### II. Abstract

Sensing of incoming viruses represents one of the pivotal tasks of dendritic cells (DCs). Human primary blood DCs encompass various subsets that are diverse in their susceptibility and response to HIV-1. The recent identification of Axl<sup>+</sup> DC, a new blood DC subset, endowed with unique capacities to bind, replicate, and transmit HIV-1 prompted us to evaluate the type of response these cells can mount against HIV-1. Using an unbiased approach by total RNAseq to compare Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 (both subsets are susceptible to HIV-1), we showed that Axl<sup>+</sup> DC generated a broad and intense response to HIV-1 exposure, while cDC2 response was much weaker and restricted. Using single cell RNAseq, we were able to distinguish cells that have received genomic viral RNA from cells actively replicating the virus based on the quantification of viral transcripts. Looking at the cellular transcripts we observed two main transcriptional programs induced in different cells by HIV-1. One is mediated by the activation of NF-κB and leads to DC maturation and CD4<sup>+</sup> T cell activation. The other one is initiated before retrotranscription by the activation of STAT1/STAT2 and thus activates type I IFN and an ISG response. This program becomes more intense and diverse upon active viral replication. Axl<sup>+</sup> DC therefore stands out among blood DC populations for its multifaceted relationship with HIV-1.

#### **Keywords**

Dendritic cells, primary DC, Axl<sup>+</sup> DC, AS-DC, HIV-1, STING, TLR, sensing, NFκB



### III. Introduction

Dendritic cells (DCs) are crucial for the recognition of pathogens and the initiation of adaptive immune responses (Schlitzer et al., 2015a). In addition, DCs are thought to be important for the establishment and the dissemination of HIV-1 in the host and thus play a role both in antiviral immunity and HIV-1 transmission (Martín-Moreno and Muñoz-Fernández, 2019).

While most of the studies of HIV-1 innate sensing by myeloid cells have been performed using *in vitro* differentiated DC and macrophages (Yin et al., 2020), only a few studies have been performed with primary human DCs (Silvin et al., 2017). Early studies on monocyte-derived DC (MDDC) demonstrated that HIV-1 retro-transcription is necessary to induce cell maturation, as judged by expression of the costimulatory molecule CD86 (Manel et al., 2010).

Yet, myeloid cells express the SAM domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1), a well-characterised restriction factor for HIV-1 infection. SAMHD1 acts by degrading cytosolic dNTPs, thus limiting the retro-transcription of the viral RNA and the infection rates (Lahouassa et al., 2012). SAMHD1 activity can be efficiently counteracted by the accessory protein Vpx from HIV-2 (Hrecka et al., 2011 ; Laguette et al., 2011 ; Cribier et al., 2013) which allows viral retro-transcription and, consequently, active HIV-1 replication in myeloid cells.

Thus, upon MDDCs exposure to HIV-1 in the presence of Vpx, there is retro-transcription and viral replication leading to the activation of the cGAS – STING pathway (Manel et al., 2010 ; Lahaye et al., 2013). This in turn leads to the induction of an interferon response and the maturation of DC (Johnson et al., 2020).

Single-cell techniques have been pivotal to identify dendritic cell (DC) populations at high resolution, to establish new molecular cell markers, and to possibly infer their ontogeny (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017) .In particular, a new DC population, called AS DC for AXL<sup>+</sup>Siglec-6<sup>+</sup> DC, was identified (Villani et al., 2017).AS DC have been proposed to give rise to the two conventional DC populations, cDC1 and cDC2, and, as such, named dendritic cell precursors (pre-DC) (See et al., 2017). Here, for the sake of simplicity and to avoid ascribing them with a unique function, they will be referred to as Axl<sup>+</sup> DC (Alcántara-Hernández et al., 2017).

We have previously established that Siglec-1, one of the few specific Axl<sup>+</sup> DC markers, mediates HIV-1 capture and infection in Axl<sup>+</sup> DC (Ruffin et al., 2019). The addition of Vpx onto HIV-1 viral particles increases the levels of Axl<sup>+</sup> DC infection (Ruffin et al., 2019). Infected Axl<sup>+</sup> DC were efficient at transmitting newly formed HIV-1 infectious particles to activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. In addition, whereas Axl<sup>+</sup> DC activation through toll-like receptor (TLR) inhibits their infection by preventing viral fusion, activated Axl<sup>+</sup> DC still support HIV-1 transmission to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes via Siglec-1 (Ruffin et al., 2019), in a process called *transinfection* (Izquierdo-Useros et al., 2014). Axl<sup>+</sup> DC may thus participate to HIV-1 establishment and spreading into the host.

Given the complex role of DC populations in HIV-1 infection which can favor the initial phases of the infection but also, can elicit anti-viral innate and adaptative responses (Rhodes et al., 2019), it was of interest to evaluate the Axl<sup>+</sup> DC response to incoming HIV-1 particles which very efficiently fuse with these cells (Ruffin et al., 2019). Here, we investigated the transcriptional response of *ex vivo* isolated Axl<sup>+</sup> DC upon HIV-1 exposure, the pathways activated by viral sensing, and the impact of HIV-1 on Axl<sup>+</sup> DC capacity to activate CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. We discovered that sensing of HIV-1 is set up by Axl<sup>+</sup> DC ahead of viral replication and that two independent responses are triggered in different cells. The main response of Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1 includes the activation of the STAT and IRF transcription factors, responsible for ISG expression. The second response is characterised by the activation of NFκB transcription factor that leads to the maturation of Axl<sup>+</sup> DC. Interestingly, both responses are activated simultaneously in Axl<sup>+</sup> DC that replicate HIV-1. Such responses were characterised computationally using independent approaches and validated *in vitro*.

## IV. Results

**Among the blood DC subsets, Axl<sup>+</sup> DC exhibit the stronger and wider response to HIV-1 exposure**

To better characterize the interplay between HIV-1 and primary DCs that are susceptible to viral infection, we investigated transcriptional responses of sorted cDC2 and Axl<sup>+</sup> DC following HIV-1(NL-AD8) exposure by bulk RNA sequencing (RNAseq) (Figure 1A). While

levels of HIV-1 transcripts were similar in both subsets (Figure 1B), changes in gene expression were more pronounced and more numerous in Axl<sup>+</sup> DC as compared to cDC2 (Figure 1A and C). The presence of Vpx into the viral particles induced higher viral replication, particularly in Axl<sup>+</sup> DC (Figure 1B), and led to bigger changes in gene expression in both cell types (Figure 1C and S1A-C). Inflammatory cytokines CCL3 and CXCL10 and interferon-stimulated genes (ISGs) were similarly impacted in cDC2 and Axl<sup>+</sup> DC. In contrast, genes of the NFκB pathway (CD40, CD80, CD86, NFκB, and REL) were only induced in Axl<sup>+</sup> DC upon HIV-1(AD8) exposure, in the presence or absence of Vpx, and even in the presence of azidothymidine (AZT) and nevirapin (NVP), which inhibit retroviral transcription (Figure 1A and C). We confirmed at the protein level the preferential activation of ISG and inflammatory pathways of Axl<sup>+</sup> DC as compared to cDC2 by measuring the expression of MX1/CXCL10(IP-10)/CCL3(MIP1α) and CD86/IL-8 respectively, by flow cytometry (Figure S1D and E). GSEA analyses of ranked differentially expressed genes (DEGs) revealed that IFN responses and TNFα signalling were induced by HIV-1 in Axl<sup>+</sup> DC independently of viral retrotranscription or replication, whereas for cDC2 those responses were Vpx-dependent (Figure 1D and E). KEGG pathway analyses was performed on DEGs from HIV-1-exposed Axl<sup>+</sup> DC vs non infected cells (Figure 1F). The analysis confirmed the expression of genes involved in the cytosolic RNA sensor RIG-1 pathway (retinoic acid-induced gene I) and in DNA cytosolic sensing pathway (including ISGs), as well as in NFκB and TLR sensing pathways (Figure 1F). REACTOME analysis revealed enrichment in similar pathways (Figure S1F) These results indicate that Axl<sup>+</sup> DC are unique among DC subsets in the magnitude and amplitude of their response to HIV-1 exposure, and that this response includes activation of several sensors and signalling pathways.

### **HIV-1 exposure activates two responses in Axl<sup>+</sup> DC**

To analyse the relation between the different sensors and signalling pathways activated following HIV-1 exposure of Axl<sup>+</sup> DC, we performed single-cell RNAseq (scRNAseq) using a droplet-based single-cell 3' assay (10x genomics). We cultured Axl<sup>+</sup> DC isolated from a healthy donor with or without HIV-1(NLAD8) for 12 h or 24 h, or with Vpx-complemented HIV-1(NLAD8) in the presence or not of AZT/NVP for 24 h. From these 5 samples, we obtained sequences of a total of 2983 cells after exclusion of doublets, debris and a small cluster of 58 cells. Analysis of the viral gene transcripts in the 24-HIV sample (Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1(NL-AD8)+Vpx for

24h) revealed a bimodal distribution (Figure 2A) allowing to distinguish productively infected cells (i.e., cells with a viral UMI fraction > 1.58%) containing both viral mRNA and genomic RNA, from the other cells that only contained viral genomic RNA from up taken virions. Importantly, scRNAseq data was consistent with the levels of *gag*-encoded protein p24 in Axl<sup>+</sup> DC measured by flow cytometry at 48 h p.i. (Figure 2B). Spliced viral sequences (Figure S2A) were exclusively observed among cells with high proportion of viral transcripts, further supporting that viral replication had taken place in these cells. The relative contribution of each HIV-1 gene to the total viral transcripts across the productively infected cells was similar, and thus was not dependent on the amount of viral mRNA in the cell (Figure S2A). Our results show that cells containing incoming viral particles can be distinguished from cells experiencing active viral replication by scRNAseq.

Analysis of the cellular transcripts from the pooled 5 Axl<sup>+</sup> DC samples identified 4 clusters of cells based on the most significant principal components ( $p$ -value <  $10^{-5}$ , 22 PCs) computed on the most variable genes ( $n=403$ ) (Figure 2C and S2B). Axl<sup>+</sup> DC cultured for 12 or 24 h in the mock condition clustered together with the majority of the cells exposed to HIV-1 for 12 h (cluster 1, Figure S2B). In contrast, all Axl<sup>+</sup> DC responded to HIV-1 after 24 h and distributed in 3 different clusters independently of the presence of RT inhibitors. Although cell clustering was performed independently of viral transcripts, most of productively infected cells were found in cluster 4 (Figures 2D and S2C). Thus, Axl<sup>+</sup> DC established 3 distinct transcriptional programs in response to HIV-1 exposure, including an early response starting at 12 h (cluster 2). We ruled out that this early response was due to a higher viral uptake by Axl<sup>+</sup> DC since there was no clear difference in the viral transcript fraction between clusters 1 and 2 from Axl<sup>+</sup> DC cultured with HIV-1 for 12 h (Figure S2D). The presence of AZT/NVP did not modify the transcriptional response of HIV-1-exposed Axl<sup>+</sup> DC, which remained grouped in clusters 2 and 3 (Figure 2C and S2B), suggesting that Axl<sup>+</sup> DC can respond to incoming viral particles independently of retro-transcription. While the majority of productively infected Axl<sup>+</sup> DC were found in cluster 4, the remaining ones were mostly included in cluster 3, with no appreciable difference in viral gene expression (Figure S2C/S2E), possibly reflecting a temporal difference in the initiation of the cellular response.

Thus, the response of Axl<sup>+</sup> DC to HIV-1 appears heterogeneous. Viral exposure activates two distinct transcriptional programs in a RT-independent manner, whereas productive HIV-1 replication triggers another specific program.

Next, we compared the gene expression profiles of clusters 2, 3 and 4 with cluster 1 that essentially contains uninfected cells. Among the DEGs specific for cluster 2, markers of DC maturation (CCR7, CD83, CD70) and activation (CCL17, CCL22) were up-regulated (Figures 2G and S2F volcano plots). The transcription factors NFKB1, NFKB2, RELA and REL were also specifically expressed in cluster 2, consistent with the strong signature of genes involved in T-cell help (Figure 2E/2G and S2F).

In contrast, HIV-1 exposed Axl<sup>+</sup> DC cluster 3 exhibited an increased expression of 48 genes classified as ISG (Kane et al., 2016), including *IFI6*, *IFI44L*, *MX1*, *BST2* and the transcription factor *STAT1* (Figures 2F/2G, S2F and S3B/S3C). These ISGs were also expressed at increased levels in cluster 4 as compared to cluster 1, together with 53 additional ISGs (Figure 2F/2G, S2F and S3A/S3C). The inflammatory cytokine CCL3 was specifically secreted by Axl<sup>+</sup> DC when cultured with HIV-1(NL-AD8) + Vpx, together with CCL4 and IL1 $\beta$  (Figure 2G and S2F). Moreover, and the transcription factors STAT1 and STAT2 among the top DEGs specific for cluster 4 (Figure 2H). NFKB1 transcripts were also found in cluster 4, together with genes involved in DC maturation (e.g., CCR7 and CD83) (Figure 2G and S2F/S3A)

While the activation of type I IFN pathways was among the top pathways upregulated in Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1 (Figure 1 and S1), levels of ISGs and type I IFN were higher in cluster 4 as compared to cluster 2 and 3 (Figure 2F/2G and S2F/S3B/S3C). Accordingly, *IFNB1* was only present in the DEG of cluster 4, even though it was expressed by a limiting number of cells (Figure S3E).

These results were consistent with our bulk RNAseq analyses (Figure 1). They showed that HIV-1 incoming particles were sensed by Axl<sup>+</sup> DC leading to the activation of two main pathways of DC maturation and ISG response probably regulated via NF $\kappa$ B and STAT1/STAT2, respectively. Importantly, both responses took place in different cells and were RT-independent. In contrast, Axl<sup>+</sup> DC experiencing HIV-1 replication exhibited a stronger and broader ISG response, as well as the activation of the NF $\kappa$ B pathway, resulting in activation of both pathways in the same cells.

### Identification of key transcription factors involved in the Axl<sup>+</sup> DC innate response to HIV-1

To determine the key transcription factors (TF) involved in Axl<sup>+</sup> DC responses to HIV-1, we subjected our scRNA-seq dataset to gene network inference analysis using the SCENIC method (Aibar et al., 2017). The resulting clustering was very similar to the one independently obtained using principal components directly computed on gene expression (Figures 2H, top colors of the heatmap), further validating our analyses. Cluster 2 displayed a high expression of both canonical (*NFKB1* and *REL* regulons) and non-canonical (*NFKB2* and *RELB* regulons) NFκB pathways (Figure 2H and S3D), as well as genes regulated by *ETV3* and *KLF6*. Cluster 2 expressed the highest levels of these transcription factors, yet they were also found to be upregulated in cluster 4, with the notable exception of *NFKB2* and *RELB* (Figure 2G/2H). HIV-1 entry induced therefore the activation of both canonical and non-canonical NFκB pathways in a RT-independent manner, whereas HIV-1 replication led to the sole activation of the canonical NFκB pathway (*NFKB1* and *REL*). The regulons expressed in cluster 3 were also found in cluster 4 and covered genes regulated by *STAT1*, *STAT2* and *IRF8*, with the *STAT1* regulon encompassing the highest number of genes (481 genes) (Figure 2H).

Thus, two different transcriptional programs were observed following Axl<sup>+</sup> DC exposure to HIV-1. First, a response driven by NFκB pathways, leading to genes involved in DC maturation and T-cell help (cluster 2). The second response was present in Axl<sup>+</sup> DC showing active HIV-1 replication (cluster 4), but also in some of the cells exposed to HIV-1 + AZT/NVP (cluster 3). This response was characterised by *STAT1*/*STAT2* and *IRF* activation and led to the induction of ISG expression (Figure 2F and S3B). These results suggest a dual sensing of HIV-1 by Axl<sup>+</sup> DC leading to the activation of different signalling pathways.

To evaluate the impact of Vpx in Axl<sup>+</sup> DC responses, we performed a second scRNAseq experiment on Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1(NL-AD8) in the absence or presence of Vpx for 24 h. Using the cmap algorithm (Lamb et al., 2006), the new scRNA-seq data set was projected onto the clusters previously obtained. HIV-1 + Vpx induced in Axl<sup>+</sup> DC the 3 different transcriptional programs that matched the ones observed in the first experiment (Figures S3F). Notably, similar results were obtained with cells exposed to HIV-1 without Vpx (Figure S3F). Of note, a very small number of Axl<sup>+</sup> DC were left unassigned with this method.

### **Axl<sup>+</sup> DC response to HIV-1 is independent of CD11c expression**

Axl<sup>+</sup> DC have been proposed to represent a mix of cells sharing characteristics closer to cDC2 or pDC based on the presence or absence of CD11c expression (Villani et al., 2017 ; Leylek et al., 2019). To determine whether the dual responses we observed in Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1 comes from this heterogeneity, Axl<sup>+</sup> DC were sorted into CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> cells, cultured for 24 h with HIV-1 and analyzed by RNAseq (Figure S4A). The vast majority of DEGs specific for cells exposed to HIV-1 vs mock control, were shared among the two cell populations (Figure S4C). PCA analyses of gene expression revealed undistinguishable responses to HIV-1 exposure in both cell populations (Figure S4B). Further enrichment analyses of DEGs by Gene Ontology, Reactome or KEGG pathways showed that both CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> Axl<sup>+</sup> DC responded to HIV-1 by inducing the expression of genes involved in type-I IFN signalling and TNF signalling (Figure S4D) as shown above (Figures 1 and 2). Thus, the dual response observed following Axl<sup>+</sup> DC culture with HIV-1 is unlikely to arise from differences in CD11c expression.

### **HIV-1 sensing by Axl<sup>+</sup> DC activates the NFκB pathway possibly via TLR triggering**

Our results pointed to the involvement of TLR signalling in the response of Axl<sup>+</sup> DC to HIV-1 (Figures 1 and 2). A new analysis of our scRNA-seq dataset including this time 2 additional samples of Axl<sup>+</sup> DC stimulated with a TLR9-ligand (CpG-A) for 12 and 24 h generated 2 new clusters in addition to the 4 previously obtained (Figure 2C). Most cells from the two CpG samples clustered in cluster 5, excepted for a minor part of Axl<sup>+</sup> DC stimulated by CpG-A for 24 h that was found in cluster 6 (Figure 3B/3C). Notably, we observed a highly similar gene expression profiles between clusters 6 and 2 and both were engaged in a DC maturation program (Figure 3A). Axl<sup>+</sup> DC stimulated by CpG-A for 24h highly expressed the maturation markers CCR7, CD83, CD40 and the cytokines CCL17 and CCL22, all involved in T-cell priming and also found upregulated in cluster 2. Indeed, log<sub>2</sub>FC of DEGs obtained from cells in cluster 6 and cluster 2 versus cluster 1 exhibited a positive correlation, whereas DEGs comparison between cluster 3 and cluster 6 versus cluster 1 did not lead to a positive correlation (Figure 3D). Gene inference pathway analysis confirmed that NFκB-regulated genes were specifically

induced in both cluster 2 and 6, and the extent of the response was highly similar between the two clusters (Figure 3E).

Thus, the transcriptional response observed in Axl<sup>+</sup> DC following 12 and 24 hr culture with HIV-1 suggest that HIV-1 activates TLR signaling in a fraction of the cells.

### **STING activation is central for the induction of ISG in Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1**

Consistent with our previous results (See et al., 2017), CpG-A stimulation of pDC and Axl<sup>+</sup> DC, raised high levels of *IFNB1* transcripts in pDC but no detectable levels in Axl<sup>+</sup> DC, confirming the absence of contamination by pDC in our Axl<sup>+</sup> DC preparation, and validating thus our purification strategy (Figure 4A). In contrast, upon HIV-1 exposure Axl<sup>+</sup> DC expressed type I IFN as seen by scRNAseq (Figure S3E). We confirmed by qPCR that *IFNB* mRNA levels were increased in Axl<sup>+</sup> DC by exposure to HIV-1 (Figure 4A/4C). Of note, the levels of IFN $\beta$  induced by HIV-1 were nearly similar between Axl<sup>+</sup> DC and pDC, in contrast to cDCs for which *IFNB* expression was absent (Figure 4A). We also confirmed that type I IFN plays a role in the induction of ISG following HIV-1 sensing. The use of an Ab cocktail against IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\alpha\beta$  receptor led to a decrease in MX1 expression induced by HIV-1, independently of viral replication (Figure 4B). The induction of *IFNB* gene expression itself was also prevented by IFN blocking cocktail in Axl<sup>+</sup> DC with active HIV-1 replication (Figure 4C). The IFN and ISG response observed after HIV-1 exposure in Axl<sup>+</sup> DC suggest the involvement of STING (Ishikawa and Barber, 2008).

In Axl<sup>+</sup> DC cultured with HIV-1 in the presence or not of Vpx, the inhibition of STING led to a decrease of MX1 expression as well as lower CXCL10 (IP-10) and CCL3(MIP1 $\alpha$ )(Figure 4F/4H/4I). Levels of infected cells, CD86 expression and CCL8 remained unaffected by STING-inhibition (Figures 4D/4E/4G). Similarly, MX1 reduced expression was also observed in Axl<sup>+</sup> DC cultured in the presence of AZT/NVP and STING inhibitors (Figure 3J-L). These results confirmed that Axl<sup>+</sup> DC sense viral incoming particles independently of retro-transcription. They also indicate that following HIV-1 sensing, STING is key in inducing ISG expression, which are further enhanced by IFN-I production. Thus, our results suggest that cytosolic RNA sensors could play a role in HIV-1 detection by Axl<sup>+</sup> DC before retrotranscription takes place.



### **Priming of CD4<sup>+</sup> T cells by HIV-1-exposed Axl<sup>+</sup> DC**

To evaluate at the functional level, the impact of HIV-1 on Axl<sup>+</sup> DC, we tested their capacity to prime T cells in co-culture experiments. To bypass the problem of MHC restriction with human cells, we used the superantigen TSST-1 (toxic shock syndrome toxin (TSST1) that binds to a constant region of the MHC class II b chain present on DC and can stimulate roughly 15% of human blood T cells via their TCR providing they express V $\beta$ 2 and that DC provide an efficient co-stimulatory signal. Comparing blood DC subsets upon addition of TSST1, Axl<sup>+</sup> DC were able to stimulate IL2 production by CD4<sup>+</sup> T cell although at slightly lower levels than cDC2 (Figure 5A-C). Exposure of Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 to HIV-1+Vpx further enhanced the IL-2 secretion by T cells (Figure 5A). Moreover, proliferation of activated CD4<sup>+</sup> T cell assessed by CFSE and CD25 was increased when T cells were co-cultured with HIV-1 exposed Axl<sup>+</sup> DC or cDC. (Figure 5C). However, proliferation levels are not significantly upregulated, this is probably due to the role of TSST1 and the fact that Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 have a strong basal T cell priming activity. These results are consistent with the higher DC maturation program induced by HIV-1 observed at the mRNA and protein levels in Axl<sup>+</sup> DC as compared to cDC2 (Figure 1 and S1).

## **V. Discussion**

Here, we set out to comprehensively study the response to HIV-1 of the recently identified Axl<sup>+</sup> DC population as compared to other blood human DC subsets. We showed by RNAseq analysis that Axl<sup>+</sup> DC exhibit an IFN and inflammatory responses. These responses are broader and stronger compared to cDC2 even though they are also susceptible to HIV-1 infection. Indeed, cDC2 but not Axl<sup>+</sup> DC, response was in large part dependent of SAMHD1 inhibition by Vpx as judged by RNAseq.

Further analysis of Axl<sup>+</sup> DC response to HIV-1 at the single cell level by scRNAseq allowed to distinguish cells replicating the virus from the ones that only received genomic viral RNA by quantification of viral transcripts. Moreover, we showed that the inflammatory and ISG transcriptional programs activated after HIV-1 exposure are induced in different Axl<sup>+</sup> DC. Interestingly, a large part of these programs is independent of retrotranscription. This raises

the question of how exposure of Axl<sup>+</sup> DC to a single pathogen, i.e. HIV-1, can generate a diversification of the response leading in the 2 main responses.

Hypotheses to address this question can be grouped in three categories. Hypotheses relying on two sensing mechanisms specific for different PAMPs produced during the HIV-1 cycle and inducing each its own response. Alternatively, the Axl<sup>+</sup> DC population could be heterogenous with cells intrinsically able to engage in one type of response or the other. Finally, as documented in pDC which respond to TLR7 stimulation by engaging into a progressive diversification leading to 3 populations of cells with specific responses (Alcumbre et al., 2018), HIV-1 may induce in Axl<sup>+</sup> DC a progressive response switching from one transcriptional program to another.

One program we named “T cell help” (cluster 2 in Figure 2), which is engaged relatively rapidly in a RT-independent manner, involves the TFs *NFKB1*, *NFKB2*, *REL* and *RELB*, and confers the cells the capacity to better stimulate a superantigen specific CD4<sup>+</sup> T cell response. We show by scRNAseq analysis that this response is highly similar to the one induced by CpGA in Axl<sup>+</sup> DC. However, we could not formally prove that TLR9 was involved in this response due to the extreme paucity of the Axl<sup>+</sup> DC blood population and thus our impossibility to perform genetic manipulations, combined with the lack of specificity of commercially available antagonists of human TLRs in our hands.

HIV-1 entry takes place mainly at the plasma membrane but may also take place in the phagosomal pathway in myeloid cells. Since HIV-1 induces two transcription programs in the presence of RT inhibitors in Axl<sup>+</sup> DC, it is possible that cells which engage rapidly into a NFkB program have detected the virus via endocytosis or phagocytosis. Another possibility is that cells from cluster 2 responded to HIV-1-induced dead cells and their products present in the culture which may trigger endosomal nucleic acid sensors.

We validated the capacity of HIV-1 exposed Axl<sup>+</sup> DC to prime T cells by using the superantigen TSST1. We showed that Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV1(Vpx) stimulate naïve CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of TSST1 better than uninfected Axl<sup>+</sup> DC when looking at IL-2 production. However, the percentage of T cells that had proliferated (%CD25<sup>+</sup> CFSE low T cells) were similar in both conditions. Nonetheless, this suggested that the T cell help response induced by HIV-1 in Axl<sup>+</sup> DC could promote stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells specific for HIV-1 antigens. While pDC exposed to HIV-1 had no ability to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells in this assay, cDC1 appeared inefficient

in promoting IL-2 production. Interestingly, cDC2 exhibited a similar phenotype as Axl<sup>+</sup> DC in this TSST1 assay. The only previous study evaluating human blood DC subsets ability to prime T lymphocytes after HIV-1 infection did not include the Axl<sup>+</sup> DC subset (Silvin et al., 2017). They showed that cDC1 resist to the infection but are able to cross-present viral antigens, provided by infected cDC2, to a HIV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cell clone. They propose that there is a division of labor between DC subsets. cDC2, being susceptible to many cytopathic infections, can fuel cDC1, that are resistant to infections, with viral antigens that they can cross-present to cytotoxic T cells. We observe that some Axl<sup>+</sup> DC which do not replicate HIV-1 can engage into a T cell help program allowing them to efficiently stimulate CD4<sup>+</sup>T cells. The productively infected Axl<sup>+</sup> DC can in theory present HIV-1 antigens on their MHC molecules since they produce the viral proteins. This is supported by the fact that regulons driven by *NFKB* and *REL* are active in cells from cluster 4 that replicates HIV-1 (Figure 2H). Therefore, considering the whole Axl<sup>+</sup> DC population exposed to HIV-1, it may have the potential to stimulate both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell anti-viral responses. Overall, the T cell help response is compatible with the endosomal sensing of HIV-1 in Axl<sup>+</sup> DC that we suggest, but more work is needed to validate this hypothesis.

The second program induced is an interferon response with ISG expression. This response is activated in Axl<sup>+</sup> DC before retrotranscription but shows a higher intensity after viral replication (Figure 2). Gene inference analysis of the scRNAseq dataset reveals that cluster 3 and cluster 4 express in common the regulons driven by *STAT1*, *STAT2* and *IRF8*, while cluster 4 activates regulon driven by *JUNB*, *IRF1*, *FOS*, *JUN* and *ATF3*. All the ISG produced in cluster 3 were also induced in cluster 4, suggesting that sensing of incoming virions may activate similar pathway(s) in both clusters (Fig S3C). However, progression in the viral cycle towards production of new viral progeny leads to the wider and stronger response observed in cluster 4.

The retrotranscription independent response that we describe may be related to the response observed in primary monocyte derived macrophages (MDM) which occurs upon fusion of HIV-1 and is characterized by an ISG response induced by low levels of type I IFN. (Decalf et al., 2017). In a context of influenza infection of BMDM, this response is dependent on STING which fits with what we describe using a STING antagonist (Holm et al., 2016).

Studies on viral responses have been performed with human MDDCs rather than with blood DC subsets. Sensing of HIV-1 in MDDC only occurs with Vpx complementation and is

dependent on integration of the provirus, neosynthesis of the Gag protein and cGAS/STING activity (Manel et al., 2010 ; Gao et al., 2013 ; Lahaye et al., 2013). Another study in MDDC suggested that sensing of HIV-1(Vpx) occurs in two steps; before integration of proviral DNA with an IFN sensitization and after integration with a stronger IFN and ISG response, both steps being dependent of the cGAS/STING pathway and retrotranscription (Johnson et al., 2018). In our hands, Axl<sup>+</sup> DC activate the interferon response even in absence of retro-transcription and appear therefore more sensitive and responsive to HIV-1 than MDDC, at least before retrotranscription takes place. Moreover, we show that the early interferon response is dependent on STING, but the sensor implicated in activating STING remains to be described. It is unlikely that cGAS plays a role due to the absence of cDNA, but we cannot rule out that retrotranscription might start inside a fraction of particles before we add them to the target cells thus delivering small amount of viral cDNA. Nonetheless, more reports are describing cGAS independent STING pathways during viral infections (Nazmi et al., 2012) or DNA breaks (Dunphy et al., 2018) that might suggest similar mechanisms in HIV-1 infected Axl<sup>+</sup> DC.

We observe a stronger response in Axl<sup>+</sup> DCs after HIV-1 replication that might be due to sensing of newly synthesized viral nucleic acids in the cytosol. Indeed, the RNA sensor RIG-I is upregulated in Axl<sup>+</sup> DCs infected with HIV-1 and could therefore be involved in this process (Figure 1A and S2F). Another potential HIV-1 PAMP has been proposed in two studies performed in human MDDC and MDM and reporting that intron-containing HIV-1 RNA were sensed in these cells (Akiyama et al., 2018 ; McCauley et al., 2018). However, the sensor involved has still to be identified and does not appear to involve cGAS/STING, at least in MDM (McCauley et al., 2018), suggesting that detection of intronic sequences cannot be responsible for the interferon response we observe in Axl<sup>+</sup> DC. Nonetheless, this mechanism might be involved in the sustained inflammatory response (measured by CD86 and IL-8) that we observe after STING inhibition.

In MDDCs, neosynthesis of HIV cDNA during infection with HIV-1(Vpx) is not sufficient for immune activation and requires association with the Capsid protein to be detected (Lahaye et al., 2018). In the nucleus cGAS forms a complex with NONO which detects first the presence of incoming viral capsid protein, and then allows cGAS to detect the Capsid-associated HIV cDNA. Importantly, this mechanism takes place not only in MDDC but also in cDC2 and in MDM when exposed to HIV-2 or HIV-1(Vpx) (Lahaye et al., 2018). It is therefore likely that this sensing mechanism is implicated in the response of Axl<sup>+</sup> DC that replicate HIV-1 (cluster 4).

Therefore, Axl<sup>+</sup> DC may share some characteristics with MDDCs in their response to HIV-1 (Vpx) with an initial production of low levels of IFN type I which sensitizes the cells allowing later on, when viral replication starts, activation of a stronger and wider IFN and inflammatory response. However, it remains to be explained why the ISG response is not more protective at the level of the Axl<sup>+</sup> DC culture. Complex combination of the kinetics of IFN production, induction of ISG and HIV-1 progression in its cycle may result in the diversity of the response observed in the Axl<sup>+</sup> DC culture that is represented by the three clusters defined by scRNAseq.

Axl<sup>+</sup> DC have been reported to express different levels of CD11c and therefore might be a heterogeneous population (Alcántara-Hernández et al., 2017 ; (Leylek et al., 2019). We show that sorted CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> Axl<sup>+</sup> DC populations do not exhibit differences in their response to HIV-1, as judged by RNAseq. These results further support the idea that the Axl<sup>+</sup> DC dual responses to HIV-1 are not due to their heterogeneity but rather to access of viral particles or products to different sensors. pDC have been showed to develop consecutive responses after exposure to influenza viruses (Alculumbre et al., 2018). Even though pDC and Axl<sup>+</sup> DC are functionally different, analyzing the kinetics of responses in HIV-1 exposed Axl<sup>+</sup> DC might provide useful information regarding the development of the diversity of responses we observe.

Overall, our data are rather in support of two different sensing mechanisms that may take place in different intracellular locations. One would take place in the phago-lysosomal pathway inducing a NFκB response leading to T cell help. The second mechanism would occur through activation of STING pathway in the cytosol before and after retro-transcription and induce an interferon response. This STING activity is probably independent of cGAS before retro-transcription. We previously showed that Axl<sup>+</sup> DC possess a high capacity to capture HIV-1 via Siglec-1, to get infected, to produce infectious viruses in apparently internal compartments, and to transmit their viral progeny to activated T lymphocytes (Ruffin et al., 2019). Our present study further extends their functional characterization and shows that they share features with pDC, by producing of type I IFN and inducing ISGs; with macrophages, by assembling new virions in apparently internal compartments; and with cDC2, by being able to get productively infected and to stimulate antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses. Because of their presence in the blood Axl<sup>+</sup> DC may have specific features linked to their capacity to rapidly

reach most of the tissues. Their capacity to sense HIV-1 and elicit an innate IFN and inflammatory response may have been selected during evolution. On the other hand, HIV-1 may have selected Axl<sup>+</sup> DC to replicate the virus and promote its spreading.

## VI. Materials and methods

### Isolation of cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats from healthy human donors (approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ethics committee) with Ficoll-Paque PLUS (GE). Informed consent was obtained from all donors, and samples were de-identified prior to use in the study. Total blood DC were enriched with EasySep human pan-DC pre-enrichment kit (Stemcell Technologies 19251). DC enriched fraction were stained with antibodies specific for HLA-DR APCeFluor780, CD1c PerCPeFluor710 (eBioscience), CD123 Viogreen, CD45RA Vioblue (Miltenyi), Axl PE (Clone #108724, R&D Systems) CD33 PE-CF594, Clec-9A PE (BD) and with a cocktail of antibodies against lineage markers CD19 (Miltenyi), CD3, CD14, CD16 and CD34 (BD) in the FITC channel. Axl<sup>+</sup> DC were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>int</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD123<sup>+</sup> Axl<sup>+</sup>. pDC were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> Axl<sup>-</sup>. cDC2 were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup> CD1c<sup>+</sup>. cDC1 were sorted as Lin<sup>-</sup> HLADR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup> Clec9A<sup>+</sup>. For the isolation of CD11<sup>hi</sup> and CD11c<sup>low</sup> Axl<sup>+</sup> DC, CD11c APC was added to the antibody cocktail prior to FACS-sorting.

All cells were sorted on a FACS Aria (BD) using Diva software (BD) in 5mL polypropylene round-bottom tubes containing 1mL X-VIVO-15 media (Lonza BE04-418F). Post-sort cell purity after gating on live cells by FCS/SSC was routinely between 90 and 99%.

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMC by negative selection using naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi 130-094-131).

### Cell Culture

For lentiviral infections of sorted DC, cells were cultured in X-VIVO-15 complemented with Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher 10378-016).

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in RPMI medium 1640, GlutaMAX complemented with FBS 10%, Gentamicin and HEPES.

HEK293FT and GHOSTX4R5 cells were cultured in DMEM medium, GlutaMAX (Thermo Fisher 61965-026) complemented with FBS 10% and Penicillin/Streptomycin.

All cells were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### **HIV-1 production and titration**

Viral particles were produced by transfection of HEK293FT cells in 6-well plates with 3µg DNA and 8µL TransIT-293 (Mirus Bio) per well. For HIV-1(NL-AD8) (described in (Freed et al., 1995)), 3µg of HIV plasmid were used. For HIV-1(NL-AD8) virus containing Vpx, 0.5µg pIRES2EGFP-VPXanyVPR and 2.5µg HIV plasmid were used. 16h after transfection, media was removed, and fresh X-VIVO-15 was added. Viral supernatants were harvested 36h later, filtered at 0.45µM, aliquoted and frozen at -80°C.

Viral titers were determined on GHOST X4R5 cells as described (Mörner et al., 1999) .

### **HIV infection of DC and stimulations**

Sorted cells were pelleted and resuspended in complete X-VIVO-15 at 0.4 10<sup>6</sup> cells/mL and 50µL were seeded in round bottom 96-well plates. In some experiments STING antagonist (H-151, Probechem) was added at indicated concentrations and cells incubated for 30 min at 37°C before adding the virus. Azidothymidine (AZT; Sigma) was used at 25 µM final concentration, and nevirapin (NVP; Sigma) was used at 5 µM final concentration. For TLR ligand stimulation, CpG-A (ODN2216, Invivogen) was used at 5µg/mL, CL264 and R848 (Invivogen) at 10µg/mL. IFN blocking cocktail included anti- IFNβ (eBiosciences 16-9978-85), anti IFNα (eBiosciences BMS160) and anti IFNαβ receptor chain 2 (Millipore MAB1155)

For infections, 150µl of media or dilutions of mock or viral supernatants were added. 48hr after infection, cell culture supernatants were harvested, after neutralization with 10% NP40 lysis buffer, for IP-10 (CXCL10), MIP1α (CCL3) and IL-8 (CXCL8) quantification using BD CBA Flex Set Kits. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Sciences) in PBS prior to analysis. Cells were stained with KC57 RD1 (Beckman Coulter 6604667), CD86 FITC (BD 555657) and pure MX1 (abcam ab95926) coupled with a goat anti-rabbit AF647 secondary antibody (Invitrogen A21245) and analyzed on a FACSVerse flow cytometer (BD). Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac (GraphPad).

For RNA sequencing, after 12h or 24h of culture, cells were harvested and processed with the Chromium Controller (For 10X Genomics Single-Cell RNA sequencing) or lysed in Lysis buffer from Single Cell RNA purification Kit (NORGEN) for RNA extraction.

### **Bulk RNA sequencing Analysis**

Total RNA was isolated from FACS-sorted and HIV-1 infected blood Axl<sup>+</sup> DC, Axl<sup>+</sup> CD11c<sup>hi</sup> DC, Axl<sup>+</sup> CD11c<sup>lo</sup> DC and cDC2 using a Single Cell RNA Purification Kit (Norgen 51800). Total RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 pico Kit 5067-1513) and the RIN and DV200 were calculated. All RNA samples had a RIN > 7.0 (except 1 sample at RIN = 6.5). cDNA generation and amplification were performed with SMART-Seq v4 ultra Low Input RNA kit (Takara Bio 634891). Amplified cDNA was purified using AMPure XP Beads (Beckman Coulter A63881). The concentration of cDNA was determined by Qubit (Invitrogen Qubit dsDNA HS Assay kit Q322851) and LabChip electrophoresis (Perkin Elmer). Libraries were generated using the KAPA HyperPlus Kits (ROCHE) and quantified by Qubit. cDNA libraries were subjected to next generation sequencing using an Illumina NovaSeq6000 instrument.

Sequencing reads were aligned to the human genome hg38 with TopHat.

Differential gene expression analysis was performed with R (v 3.5.3) with the DEseq2 and the limma Package to remove batch/donor effect. Gene expression levels were analyzed on a base-2 logarithmic scale. Statistical tests were performed, and the p-values were corrected for multiple testing with the Benjamini Hochberg method. Genes with log<sub>2</sub> fold change > 1 and adjusted-p value < 0.05 were considered differentially expressed genes (DEG). Heatmaps were produced using R packages pheatmap and ComplexHeatmap.

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) was performed using the GSEA Software (v4.1.0) and gene signatures from MSigDB (v7.0). GSEA has been performed with the default parameters of GSEAPreranked analysis (number of permutations = 1000 and number of minimum genes = 15).

Principal component analysis was performed on the TPM transformed counts using R packages DEseq2 and ggplot.

Pathway analysis was performed on filtered DEG with either GeneOntology term (Biological Processes), KEGG or REACTOME databases.



### **Single-cell RNA-Seq library preparation and sequencing**

We performed two distinct scRNAseq analysis. EXP1 refers to Axl+ DC samples infected for 12 or 24h with HIV-1(NL-AD8) + Vpx with or without AZT treatment, or stimulated for 12 or 24h with CpG-A (TLR9 ligand). EXP2 refers to Axl+ DC samples infected for 24h with HIV-1(NL-AD8) or HIV-1(NL-AD8) + Vpx.

Cellular suspensions of uninfected, HIV-1 infected or TLR9 stimulated Axl+ DC were loaded on a 10 X Chromium controller (10X Genomix) according to manufacturer's protocol. Single-cell RNA-Seq libraries were prepared using Chromium Single Cell 3' v2 Reagent Kit (10X Genomics) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after performing an emulsion, single cells were trapped into single droplets containing gel beads coated with unique primers bearing 10X barcodes, unique molecular identifier (UMI) and poly(dT) sequences. Reverse transcription reactions were performed in single droplets to produce full-length cDNA. After disruption of emulsion and cDNA clean-up, pooled cDNA were amplified by PCR for 14 cycles to obtain sufficient material used for library preparation using the Chromium Single Cell 3' v2 reagents. Library quantification and quality assessment was performed by LabChip. Indexed libraries were subjected to next generation sequencing using an Illumina HiSeq2500 instrument.

### **Single-Cell RNAseq analysis – alignment of reads**

Single-cell gene expression was analyzed using the Cell Ranger Single Cell Software Suite (v2.1.0) to perform quality control, sample demultiplexing, barcode processing and single-cell 3' gene counting. Sequencing reads were aligned using a custom reference genome by concatenating the human GRCh38 genome (GenBank accession: GCA\_000001405.25) and the HIV-1 genome (pNL4.3 AD8 plasmid sequence). Annotation of the HIV-1 plasmid sequence was performed using the HIV-1 reference genome (accession: NC\_001802). UMI counts of cellular and HIV genes were obtained using STAR alignment algorithm.

### **Single-Cell RNAseq analysis – Cell calling, Clustering and differential analysis**

Further analyses were performed using the Seurat package (V3.1.1). Gene-cell matrices were merged to create one cross-sample gene-cell-barcode matrix. The matrix was log-transformed and filtered based on the number of genes detected per cells and the number of cells in which a gene is detected. Cells were filtered out when expressing less than 500 genes

and more than 5000 genes. Any cells with more than 6% of mitochondrial genes UMI counts and more than 50% of ribosomal UMI counts were also excluded. Only genes detected in at least 3 cells were considered.

To reduce data dimensionality highly variable genes (hvg) were selected with the `mean.var.plot` function setting the average expression in the interval  $[0.1, 8]$  and the scaled dispersion  $> 1$ . Principal Components (PC) were calculated with PCA dimensionality reduction from the set of human hvgs. The first 22 PCs were used for UMAP projection using 30 neighbors and distance cut-off of 0.3 and for clustering analysis using the Waltman and van Eck Algorithm (Waltman and van Eck, 2013 ; McInnes et al., 2020). Clusters were identified with the `FindNeighbors` and `FindClusters` function in Seurat with a resolution parameter of 0.3 and were validated using the implementation of the Silhouette method in the R package `cluster`. Differentially expressed genes (DEG) between clusters and against all clusters were identified by running the Seurat `“Find_All_Markers”` function using the MAST framework. DEG are selected if expressed in at least 10% of cells and with  $\log_2FC > 0.5$  and adjusted p-value  $< 0.05$  (Benjamini-Hochberg correction).

Heatmaps and Violin plots were plotted using Seurat. Signature scores were computed using the Seurat `“AddModuleScore”` and the gene signature of interest. Feature plots were plotted using minimum and maximum cutoff values for each feature respectively quantile 3 and quantile 97.

### Gene network inference

We used the R package SCENIC v1.1.1-9, which includes three main modules: GENIE3 for network inference from gene expression data, RcisTarget for identification of direct regulatory links, and AUCell for estimating regulon activity on each cell (Aibar et al., 2017).

The input to GENIE3 is a gene-cell expression matrix that has been previously filtered to keep only the genes that are detected in at least 20 cells (UMI count  $> 0$ ). Genes that are co-expressed with a TF are called modules. Note that GENIE3 identifies both positive and negative regulation links.

Spearman rank coefficient is computed for each putative TF-target link and only the positive correlations are retained ( $R^2 > 0.3$ ). The modules are screened with RcisTarget v1.2.1 using the motif-TF annotation, retrieved from `hg19-tss-centered-10kb-7species/mc9nr.feather`. The

output is a set of candidate target genes for each TF. Only the top scoring 10 TF are retained for each target gene. The gene sets obtained are called regulons.

An AUCell score is computed for each pair of cell-regulon. The score is computed by first ranking all the genes in a cell according to their expression, and then evaluating the position of the genes in the regulon in the ranked list by AUC. The shape of the distribution obtained was evaluated using the `AUC_exploreThresholds` function from the AUCell R package to define a threshold of positive cells where the regulon is active. Robustness of the generated regulon was evaluated by bootstrapping.

### **cmap analysis**

cmap analysis was performed using normalized and filtered gene-cell-barcode matrices from two scRNAseq experiments of Axl+ DC infected with HIV-1. For individual cells of Axl+ DC in EXP2, cmap generated enrichment scores that quantified the degree of enrichment (or “closeness”) to a given gene signatures (clusters of EXP1). The enrichment scores were scaled and assigned positions values to indicated EXP1 cluster signatures. A permutation test ( $p=1000$ ) between gene signatures was performed on each enrichment score to determine statistical significance.

### **Quantification of HIV-1 infection in scRNAseq**

Threshold of productively infected cells was determined in HIV-1(NL-AD8)+ Vpx 24h sample using rescaled viral UMI counts. The two distributions were predicted with the `nomalmixEM` function from R package `mixtools` v1.1.0 which defined a threshold as the maximum of the 99<sup>th</sup> quantile of the leftmost distribution and the 1<sup>st</sup> quantile of the rightmost distribution.

For spliced variants analysis we considered all viral reads. A read is classified as spliced if it aligns with a gap around the *tat* splicing junction with a tolerance of 5 bp, unspliced if it maps to an exon and to the contiguous intron for at least 3 bp. We assume that a UMI is sampled from a spliced transcript if it is supported by at least 2 reads and at least 80% of them are spliced.

Spearman rank correlation was computed between the normalized gene expression and the normalized viral UMI fraction, for every cellular gene and across all cells in H24-HIV sample.

### **CD4<sup>+</sup> T cells activation by DC**

For each experiment, DC populations and naïve CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from the same donor. Sorted DC were pelleted and resuspended in X-VIVO-15 media at  $0.4 \times 10^6$  cells/mL and 50µL were seeded in round bottom 96-well plates. Dilutions of viral supernatants for MOI of 2 were added up to 150uL and incubated overnight at 37 °C. Alternatively, CpG-A was added at 5µg/mL, CL264 was added at 10µg/mL onto DC and cells incubated overnight. Supernatant was then removed and previously CFSE stained autologous naïve CD4<sup>+</sup> T cells were added at a ratio of 1:10 (1 DC for 10 T cells) in the presence of Super Antigen TSST1 (0.125 to 0.5 ng/mL). After 48h or 72h of co-culture, supernatants were harvested and neutralized with NP40 10X and cells were fixed in 4% PFA in PBS. Cells were then stained with Live/Dead Near-IR Red stain, CD3 AF647 and CD25 PE (BD) and analyzed on a FACS Verse (BD).

Supernatants were processed for IL-2 quantification using BD CBA Flex Set Kit.

Data were analyzed using FlowJo v10 and Prism v7 for Mac (GraphPad).

### **Real-time quantitative PCR**

$4.10^5$  sorted DC were used ex-vivo or treated as described. Cells were lysed, RNA was extracted using RNeasy micro kit (Qiagen) or Single Cell RNA purification Kit (Norgen 51800) and reverse transcription was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) by following the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed using SYBR Green I Master (Roche)

The relative quantity of IFNB1 and MX1 mRNAs was calculated between IFNB1 or MX1 RNA Cp and RPS18 Cp by the  $2^{-\Delta Ct}$  method.

### **Cytokine quantification assay by CBA**

IP-10 (CXCL10), MIP1 $\alpha$  (CCL3), IL-8 (CXCL8) and IL-2 concentration were measured on non-diluted or 10-fold diluted supernatants using Human cytometric assay from BD according to the manufacturer's protocol. Data was acquired on a FACSVerse (BD) and analyzed in FlowJo v10 and GraphPad prism v7 for Mac.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using Prism v7 for Mac (GraphPad). Friedman test was used followed by Dunn's multiple comparisons tests and a p value lower than 0.05 was considered as significant (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## VII. References

Aibar, S., González-Blas, C.B., Moerman, T., Huynh-Thu, V.A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.-C., Geurts, P., Aerts, J., et al. (2017). SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat. Methods* *14*, 1083–1086.

Alcántara-Hernández, M., Lylek, R., Wagar, L.E., Engleman, E.G., Keler, T., Marinkovich, M.P., Davis, M.M., Nolan, G.P., and Idoyaga, J. (2017). High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* *47*, 1037-1050.e6.

Alcumbre, S.G., Saint-André, V., Di Domizio, J., Vargas, P., Sirven, P., Bost, P., Maurin, M., Maiuri, P., Wery, M., Roman, M.S., et al. (2018). Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* *19*, 63–75.

Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguette, N., and Benkirane, M. (2013). Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1. *Cell Rep.* *3*, 1036–1043.

Decalf, J., Desdouits, M., Rodrigues, V., Gobert, F.-X., Gentili, Marques-Ladeira, S., Chamontin, C., Mougél, M., Alencar, B., Benaroch, P., et al. (2017). Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages. *J. Virol.* *91*, e00147-17.

Dunphy, G., Flannery, S.M., Almine, J.F., Connolly, D.J., Paulus, C., Jønsson, K.L., Jakobsen, M.R., Nevels, M.M., Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2018). Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- $\kappa$ B Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol. Cell* *71*, 745-760.e5.

Freed, E.O., Englund, G., and Martin, M.A. (1995). Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* *69*, 3949–3954.

Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* *341*, 903–906.

Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al. (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nat. Commun.* *7*, 10680.

Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* *474*, 658–661.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* *455*, 674–678.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., McLaren, P.J., Telenti, A., Kräusslich, H.-G., and Martinez-Picado, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* *10*, e1004146.

Johnson, J.S., Lucas, S.Y., Amon, L.M., Skelton, S., Nazitto, R., Carbonetti, S., Sather, D.N., Littman, D.R., and Aderem, A. (2018). Reshaping of the Dendritic Cell Chromatin Landscape and Interferon Pathways during HIV Infection. *Cell Host Microbe* *23*, 366-381.e9.

Johnson, J.S., De Veaux, N., Rives, A.W., Lahaye, X., Lucas, S.Y., Perot, B.P., Luka, M., Garcia-Paredes, V., Amon, L.M., Watters, A., et al. (2020). A Comprehensive Map of the Monocyte-Derived Dendritic Cell Transcriptional Network Engaged upon Innate Sensing of HIV. *Cell Rep.* *30*, 914-931.e9.

Kane, M., Zang, T.M., Rihn, S.J., Zhang, F., Kueck, T., Alim, M., Schoggins, J., Rice, C.M., Wilson, S.J., and Bieniasz, P.D. (2016). Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host Microbe* *20*, 392–405.

Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013). The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* 39, 1132–1142.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.

Lamb, J., Crawford, E.D., Peck, D., Modell, J.W., Blat, I.C., Wrobel, M.J., Lerner, J., Brunet, J.-P., Subramanian, A., Ross, K.N., et al. (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929–1935.

Leylek, R., Alcántara-Hernández, M., Lanzar, Z., Lüdtke, A., Perez, O.A., Reizis, B., and Idoyaga, J. (2019). Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population. *Cell Rep.* 29, 3736-3750.e8.

Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010). A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467, 214–217.

Martín-Moreno, A., and Muñoz-Fernández, M.A. (2019). Dendritic Cells, the Double Agent in the War Against HIV-1. *Front. Immunol.* 10, 2485.

McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2020). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *ArXiv180203426 Cs Stat.*

Mörner, A., Björndal, Å., Albert, J., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Inoue, R., Thorstensson, R., Fenyö, E.M., and Björling, E. (1999). Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage. *J. Virol.* 73, 2343–2349.

Nazmi, A., Mukhopadhyay, R., Dutta, K., and Basu, A. (2012). STING Mediates Neuronal Innate Immune Response Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *Sci. Rep.* 2, 347.

Rhodes, J.W., Tong, O., Harman, A.N., and Turville, S.G. (2019). Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection. *Front. Immunol.* 10, 1088.

Ruffin, N., Gea-Mallorquí, E., Brouiller, F., Jouve, M., Silvin, A., See, P., Dutertre, C.-A., Ginhoux, F., and Benaroch, P. (2019). Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 21685–21693.

Schlitzer, A., McGovern, N., and Ginhoux, F. (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41, 9–22.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356, eaag3009.

Silvin, A., Yu, C.I., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J.-B., Cardinaud, S., Becker, C., Kwan, W.-H., Conrad, C., Maurin, M., et al. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141<sup>+</sup> dendritic cells. *Sci. Immunol.* 2, eaai8071.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. 14.

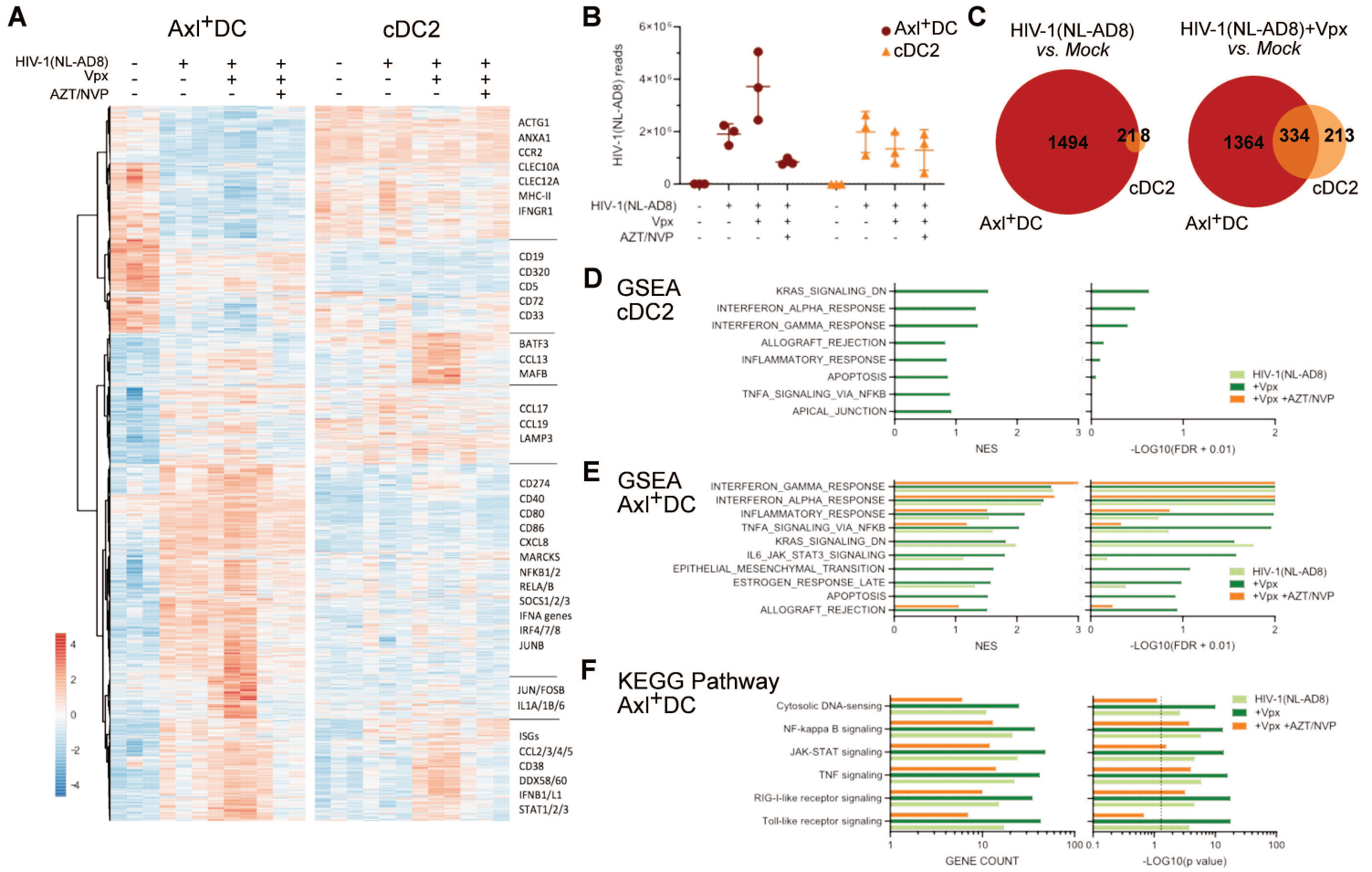
Waltman, L., and van Eck, N.J. (2013). A smart local moving algorithm for large-scale modularity-based community detection. *Eur. Phys. J. B* 86, 471.

Yin, X., Langer, S., Zhang, Z., Herbert, K.M., Yoh, S., König, R., and Chanda, S.K. (2020). Sensor Sensibility—HIV-1 and the Innate Immune Response. *Cells* 9, 254.



## VIII. Figures and legends

### Figure 1



**Figure1: Axl<sup>+</sup> DC exhibit a higher and wider innate immune response than cDC2 after HIV-1 exposure**

Bulk RNAseq was performed on purified Axl<sup>+</sup> DC (AXL<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>CD33<sup>int</sup>HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>neg</sup>) and cDC2 (CD1c<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>neg</sup>) infected or not for 24 h with HIV-1(NL-AD8), HIV-1(NL-AD8) + Vpx, and with or without AZT/NVP treatment.

**(A)** Heatmap of centered, reduced, and normalized expression of DEGs from each HIV-1 versus mock comparisons in Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 DEGs are selected with log<sub>2</sub>FC > 1 and adjusted p-value < 0.05 (Benjamini-Hochberg correction), n=3 independent donors

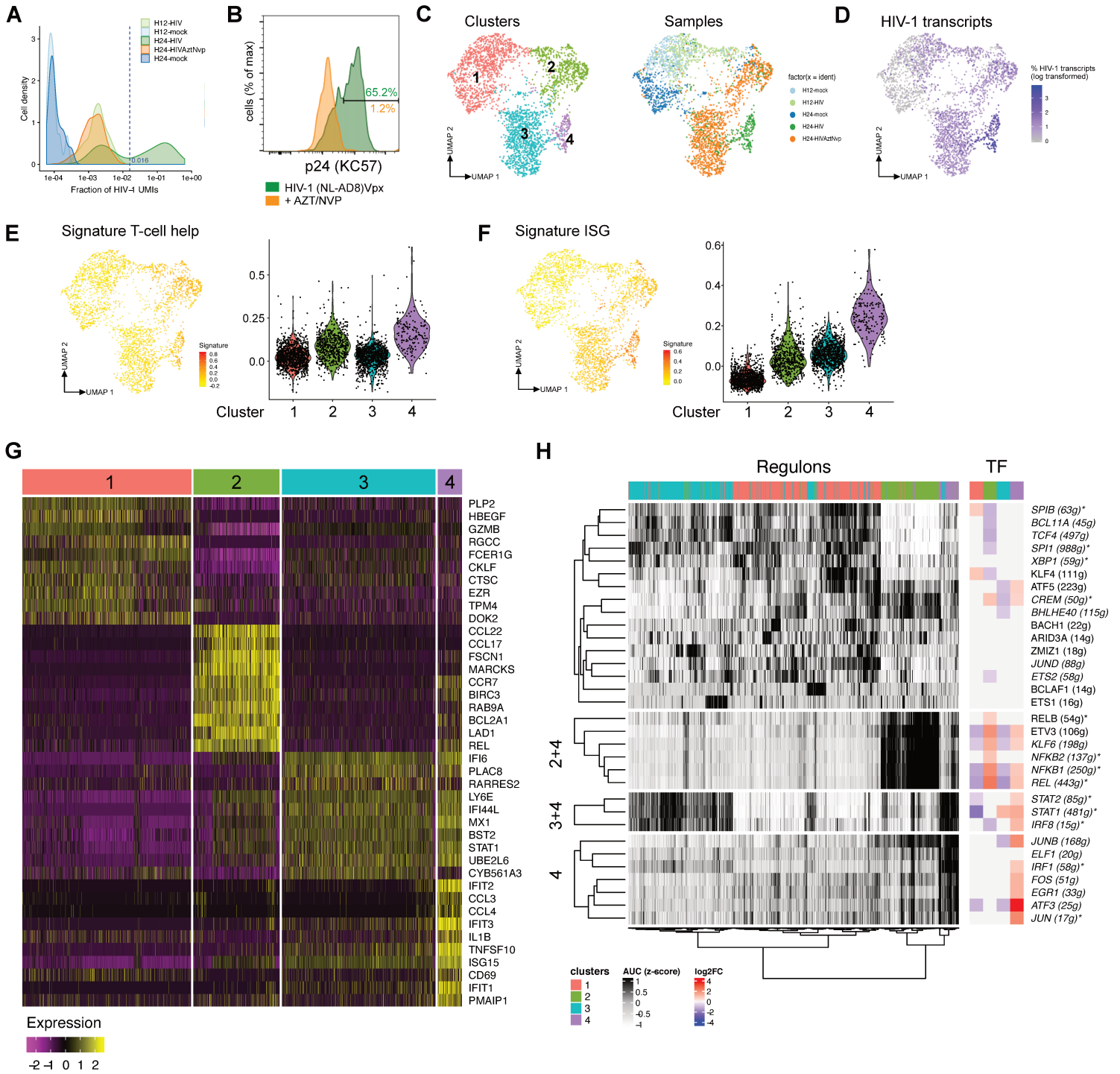
**(B)** Representative plot of quantification of HIV-1 total reads among infected or non-infected Axl<sup>+</sup> DC (red) and cDC2 (yellow), n= 3 independent donors. Individual donors are displayed with bars representing SD

**(C)** Venn diagram summarizing the number of upregulated DEGs obtained from HIV-1(NL-AD8) (left diagram) or HIV-1(NL-AD8) + Vpx (right diagram) versus mock comparisons in Axl<sup>+</sup> DC (red) or cDC2 (yellow).

**(D) (E)** Top 10 Hallmark enriched in GSEA analysis performed on ranked DEGs from each HIV-1 versus mock comparisons in Axl<sup>+</sup> DC **(D)** or cDC2 **(E)**. Bar plots represent normalized enriched score (NES) and FDR. Enrichment is considered significant with FDR < 0.25

**(F)** Top 10 pathways from KEGG database enriched in DEGs from HIV-1 treated versus mock comparisons in Axl<sup>+</sup> DC. Bar plots represent number of genes enriched (gene count) and FDR. Dashed line represents FDR cut-off of 0.05.

**Figure 2**



**Figure 2: HIV-1 exposure of Axl<sup>+</sup> DC leads to two different responses, distinct from the one induced by viral replication.**

Purified Axl<sup>+</sup> DC (AXL<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>CD33<sup>int</sup>HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>neg</sup>) were cultured for 12 or 24 hours in the presence or not of HIV-1(NL-AD8), HIV-1(NL-AD8) + Vpx with or without AZT/NVP treatment before being processed for single-cell RNA sequencing

**(A)** Distribution of the HIV-1 viral UMI (unique molecular identifier) fraction over the total UMI count across the cells. The dashed blue line sets the cut-off defining the separation between cells that are productively infected or not in the H24-HIV sample (HIV-1(NL-AD8)+Vpx) (see Methods).

**(B)** Representative histogram of p24 quantification (FACS) in Axl<sup>+</sup> DC infected with HIV-1(NLAD8) + Vpx (green) or HIV-1(NL-AD8) + Vpx and AZT/NVP (orange) for 48 hours.

**(C)** Dimensionality reduction by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of scRNAseq data (5 samples). UMAP representation (UMAP1 and UMAP2 components) are colored by cluster (left panel) or samples (right panel). (See methods for Cluster determination).

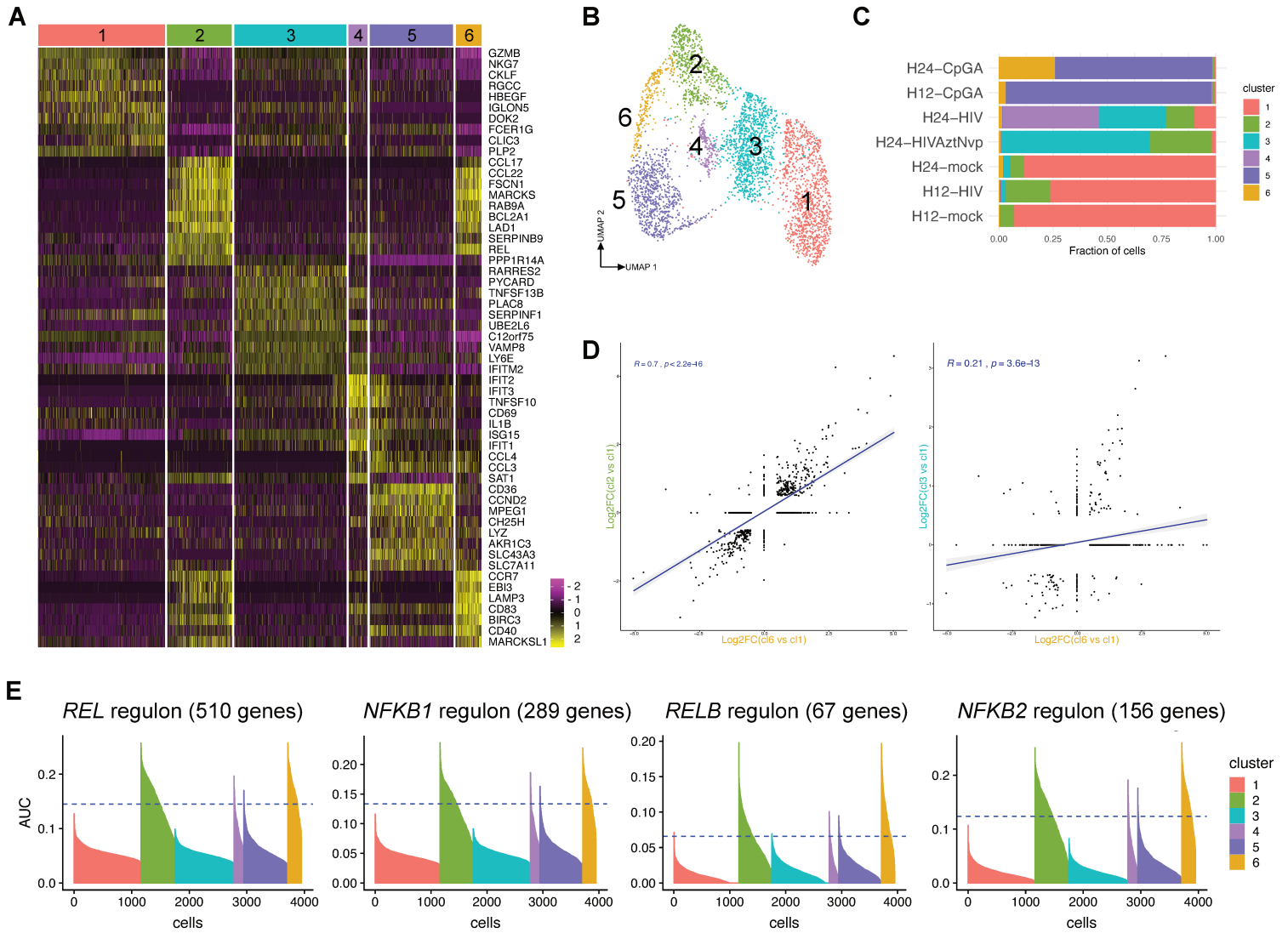
**(D)** UMAP feature plot of fraction of total HIV-1 UMI of scRNAseq data (5 samples). Fraction of viral UMI is scaled and log<sub>10</sub>-transformed

**(E) (F)** UMAP feature plot (left plot) and violin plot (right plot) of T cell Help Signature score **(E)** and ISG signature score **(F)** in individual cells and clusters from scRNAseq data.

**(G)** Heatmap representation of centered, reduced and scaled expression in each cell of the top 10 DEGs of each cluster (4 clusters total) versus all other clusters based on log<sub>2</sub>FC (DEGs found in more than one comparison or only reported once) (See Methods for Differential Analysis of scRNAseq)

**(H)** Heatmap representation of AUCell score in each cell (Right heatmap, see methods) obtain from gene network inference analysis. Rows represent regulons: a set of genes regulated by a TF (number of genes in the regulon are indicated within parenthesis). Left Heatmap represent TF log<sub>2</sub>FC from differential analysis of clusters comparison (1 cluster against all) from scRNAseq data.

**Figure 3**



**Figure 3: NFkB dependent response is possibly triggered by TLR sensing of HIV-1 in Axl<sup>+</sup> DC**

Axl<sup>+</sup> DC treated with CpG-A for 12h or 24h samples were added to previously describe scRNAseq data (see figure 2) for a total of 7 samples

**(A)** Heatmap representation of centered, reduced and scaled expression in each cell of the top 10 DEGs of each cluster (6 clusters total) versus all other clusters based on log<sub>2</sub>FC (DEGs found in more than one comparison or only reported once) (See Methods for Differential Analysis of scRNAseq)

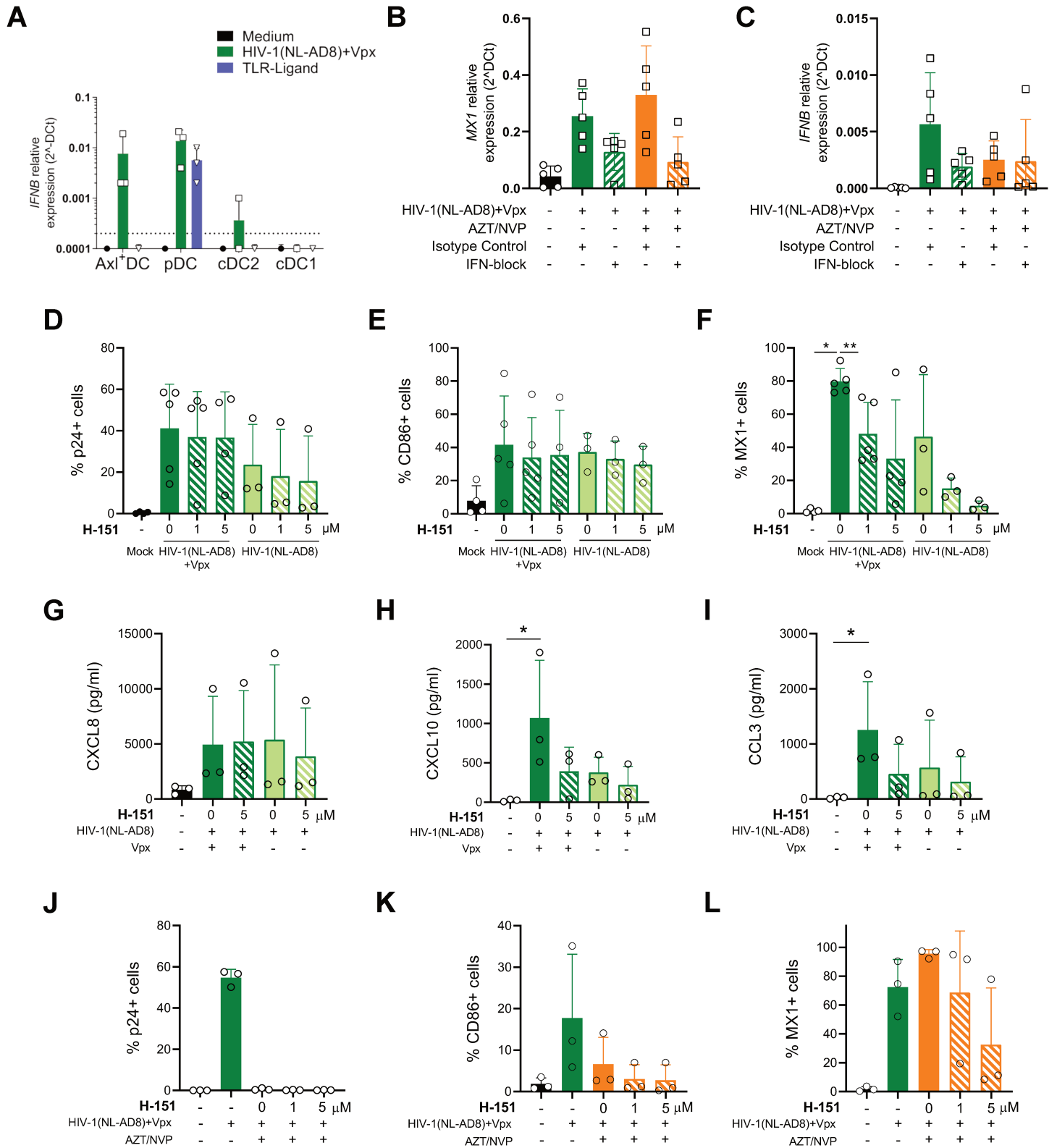
**(B)** Dimensionality reduction by UMAP of scRNAseq data (7 samples). UMAP representation (UMAP1 and UMAP2 components) is colored by clusters

**(C)** Representative barplot of the distribution of cells from samples in the different clusters.

**(D)** Representative scatter plots of correlations between DEGs log<sub>2</sub>FC obtain from cluster 2 and cluster 6 versus cluster 1 comparisons (Left panel) or between cluster 3 and cluster 6 versus cluster 1 comparisons (right panel). Blue line represents linear regression. Correlation coefficient and p-value are indicated at the top right corner.

**(E)** Representative waterfall plot of AUCell score in each cell obtained from network inference analysis. Colors represent clusters from clustering analysis and dashed lines define cutoff for positive AUCell score in each cell (See methods)

**Figure 4**



**Figure 4: Induction of ISG response in Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1 is dependent on STING before and after retro-transcription**

**(A)** FNB1 relative expression measured by RT-qPCR in the four DC subsets infected or not with HIV-1(NL-AD8) + Vpx or treated with TLR ligands (CpG-A for Axl<sup>+</sup> DC and pDC, and R848 for cDC1 and CDC2), n = 3 independent donors

**(B) (C)** MX1 **(B)** and INFB **(C)** relative expression measured by RT-qPCR in Axl<sup>+</sup> DC infected or not with HIV-1(NL-AD8) + Vpx and treated or not with AZT/NVP or a cocktail of type I IFN blocking antibodies, n= 5 independent donors

**(D-I)** Axl<sup>+</sup> DCs were treated with different doses of H-151 STING antagonist 30 min before infection with HIV-1(NL-AD8) + Vpx for 48 hours. Representative bar plot of expression of p24 **(D)**, CD86 **(E)** and MX1 **(F)** measured by FACS or quantification of CXCL8/IL-8 **(G)**, CXCL10/IP-10 **(H)** and CCL3/MIP1 $\alpha$  **(I)** by CBA assay. n = 4 or 5 for HIV-1(NLAD8) + Vpx samples and n= 3 for HIV-1(NLAD8) samples

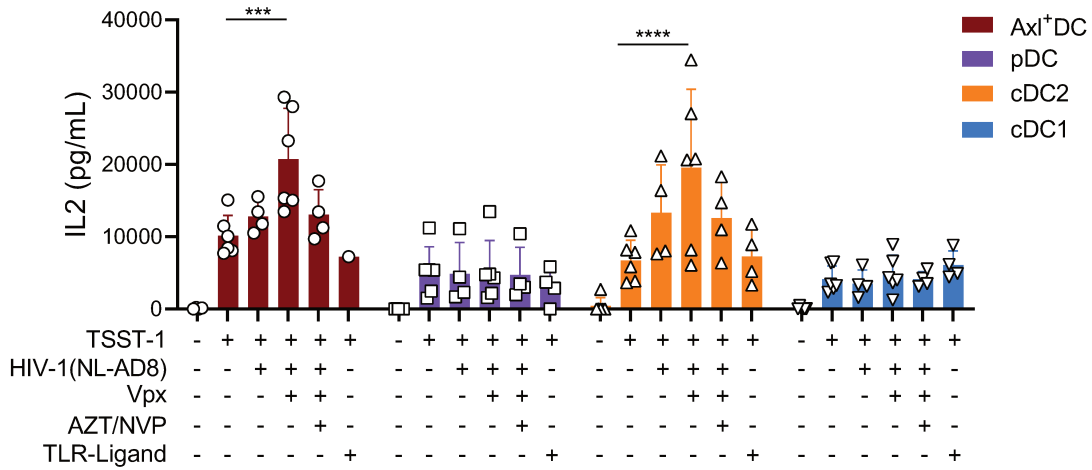
**(J-L)** Axl<sup>+</sup> DCs were treated with different doses of H-151 STING antagonist 30 min before infection with HIV-1(NL-AD8) + Vpx in the presence of AZT/NVP or not for 48 hours. Representative bar plot of expression of p24 **(J)**, CD86 **(K)** and MX1 **(L)** measured by FACS, n=3 independent donors

Individual donors are displayed with bars representing SD , \* p < 0.05, \*\* p < 0.01

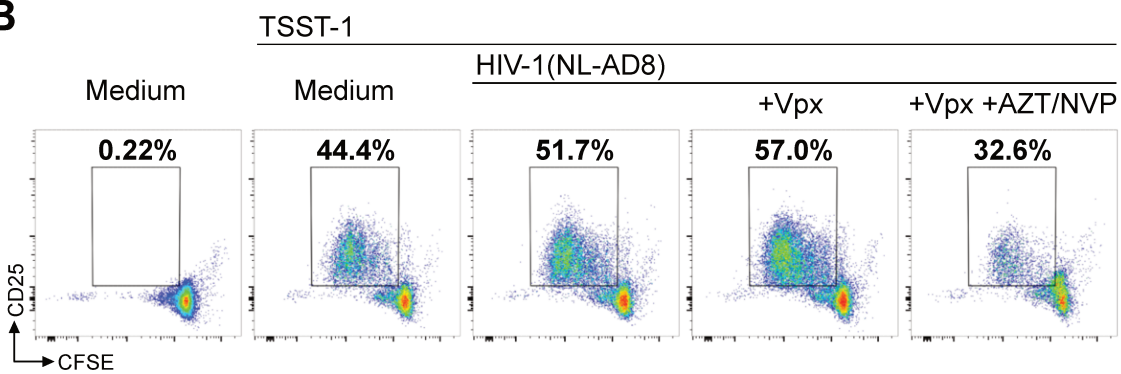


**Figure 5**

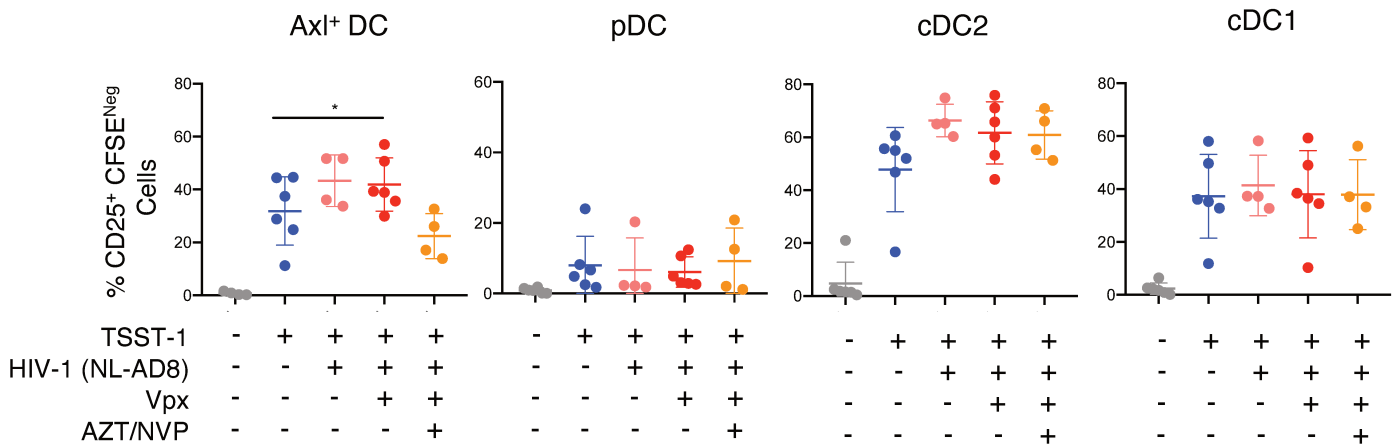
**A**



**B**



**C** Gated on Live CD3<sup>+</sup> Cells



**Figure 5: Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 exposed to HIV-1 are able to prime naive CD4<sup>+</sup> T cells**

The 4 sorted DC subsets were exposed to HIV-1(NL-AD8) complemented or not with Vpx and treated or not with AZT/NVP or were stimulated with TLR-L (CpG-A for Axl<sup>+</sup> DC and pDC, and R848 for cDC1 and cDC2). After O/N cultured and removal of supernatant, CFSE stained naive CD4<sup>+</sup> T cells were added in a 1:10 ration (1 DC for 10 T cells) in the presence of Super Antigen TSST1-1 and cultured for 48h or 72h for assessment of T cell proliferation

**(A)** Representative bar plot of Il-2 quantification by CBA in the supernatant of CD4<sup>+</sup> T cells co-cultured for 48 hours with uninfected or HIV-1 infected DC populations. Colors indicate subset of DC co-cultured with T cells. n= 4 independent experiment (except for SA alone and HIV-1(NL-AD8) + Vpx n = 6)

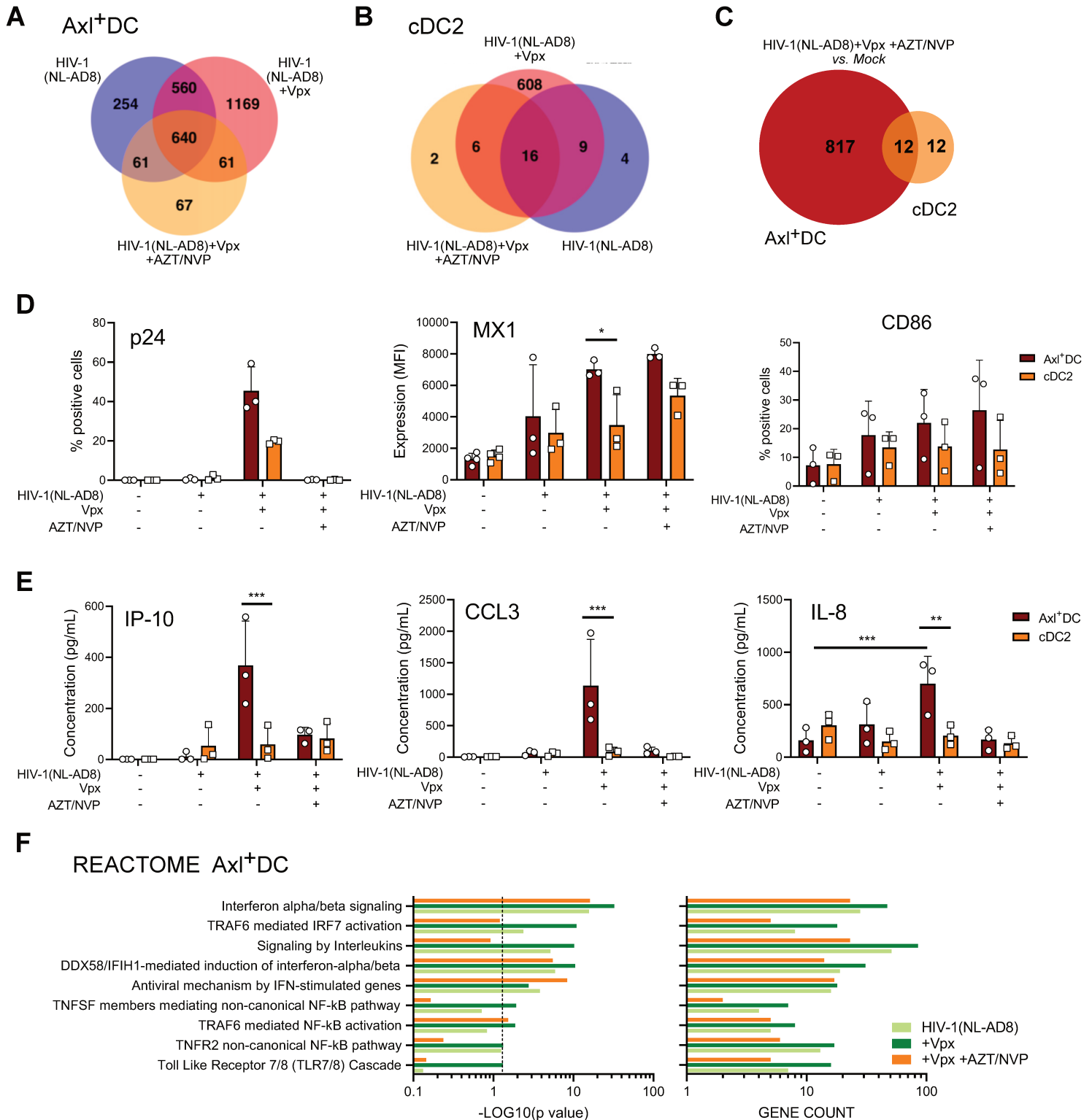
**(B)** CFSE and CD25 expression in CD4<sup>+</sup> T cells after 72h of co-culture with uninfected or HIV-1 infected Axl<sup>+</sup> DC

**(C)** Representative bar plot of proliferating CD4<sup>+</sup> T cells (gated as CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>lo/-</sup>CD25<sup>+</sup>) after 72 hours of co-culture with uninfected or HIV-1 infected DC populations. Names on top of graphs indicate subset of DC co-culture with T cells. Colors indicate HIV treatments.

n= 4 independent experiment (except for SA alone and HIV-1(NL-AD8) + Vpx n = 6)

Individual donors are displayed with bars representing SD \*p < 0.05, \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001 \*\*\*\* p < 0.0001

## Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 1: Related to Figure 1**

**(A-B)** Venn diagram summarizing the number of upregulated DEGs in Axl<sup>+</sup> DC **(A)** and cDC2 **(B)** obtained from each HIV-1 infected conditions versus mock comparisons.

**(C)** Venn diagram summarizing DEGs obtained from HIV-1(NL-AD8) + Vpx + AZT/NVP condition versus mock comparison in Axl<sup>+</sup> DC (red) and cDC2 (yellow)

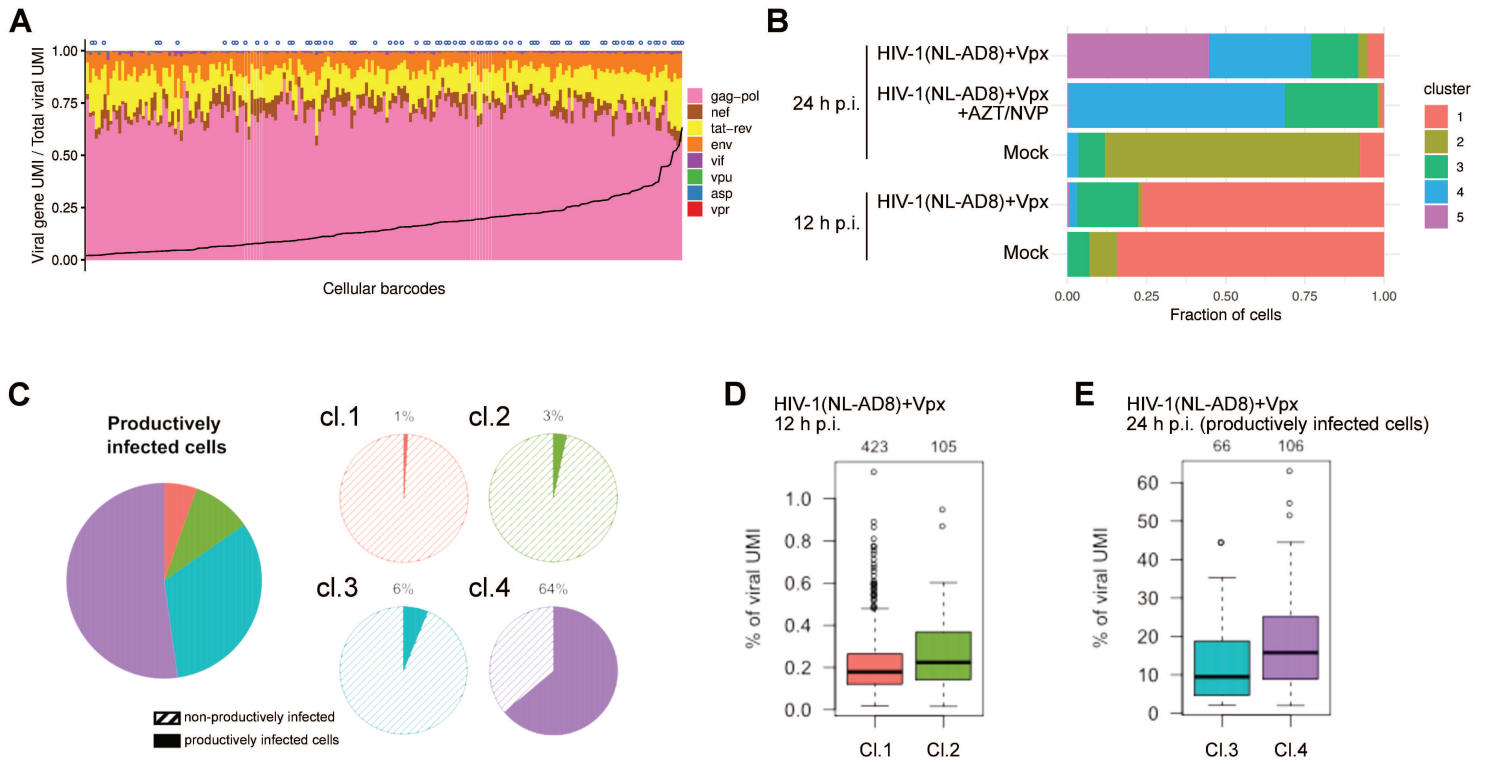
**(D-E)** Axl<sup>+</sup> DC and cDC2 were infected or not with HIV-1(NL-AD8) complemented or not with Vpx and treated or not with AZT/NVP for 48 hours. Representative bar plot of expression of p24, MX1 and CD86 **(D)** measured by FACS or quantification of CXCL10/IP-10, CCL3/MIP1 $\alpha$  and CXCL8/IL-8 **(E)** by CBA assay. n = 4,

**(F)** Top 10 pathways from REACTOME database enriched in DEGs from HIV-1 exposed Axl<sup>+</sup> DC versus mock comparisons. Bar plots represent number of genes enriched (gene count) and FDR. Dashed line represents FDR cut-off of 0.05.

Individual donors are displayed with bars representing SD

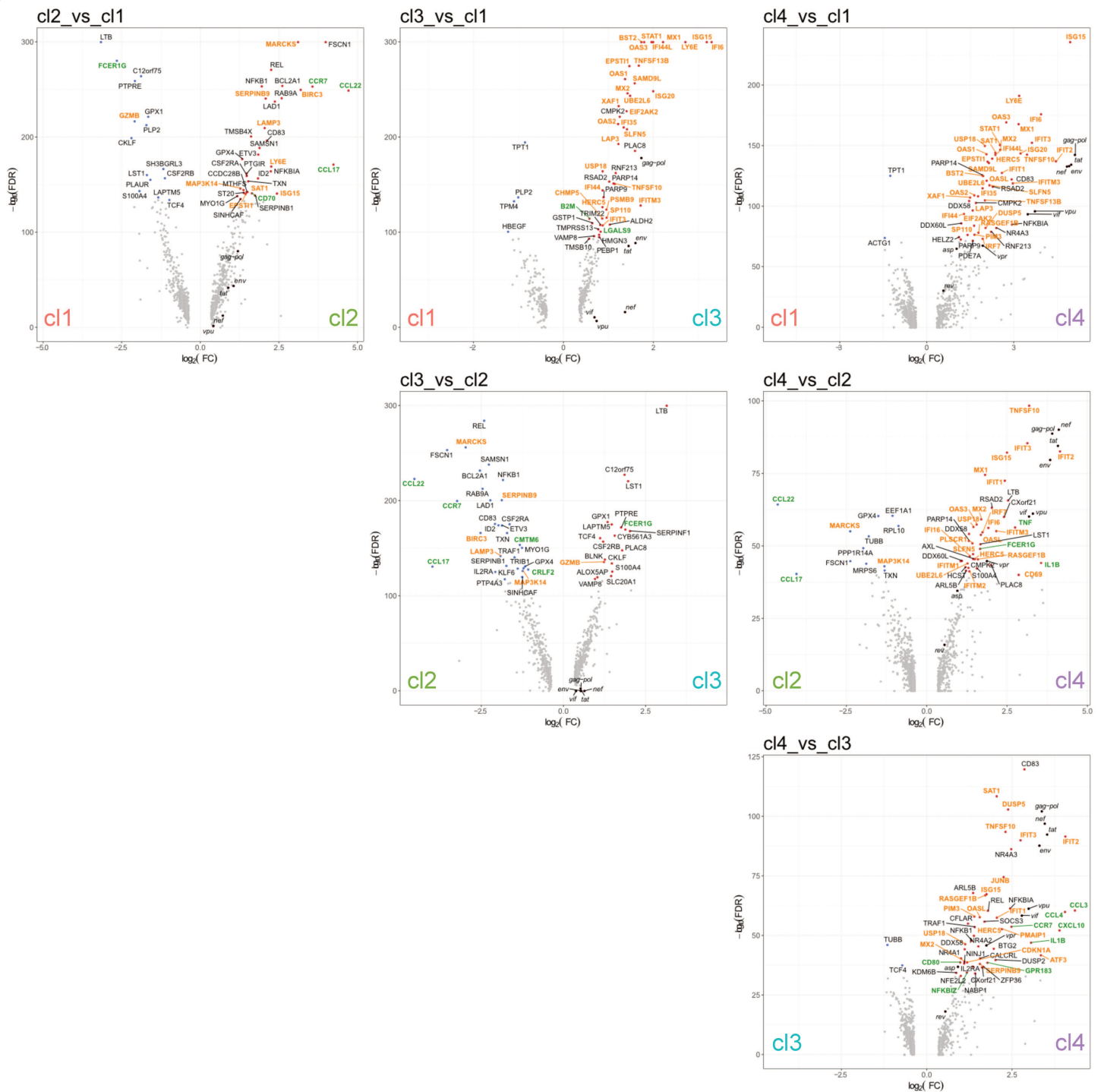
\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001

## Supplementary Figure 2A-E



## Supplementary Figure 2F

F



**Supplementary Figure 2: Related to Figure 2**

**(A)** Representation of fraction of each viral gene (UMI) in total viral UMI for each cell. A column corresponds to a cell, the black line indicates increasing viral UMI fraction in cells and the blue dot represent presence of HIV-1 RNA spliced variants in the cell.

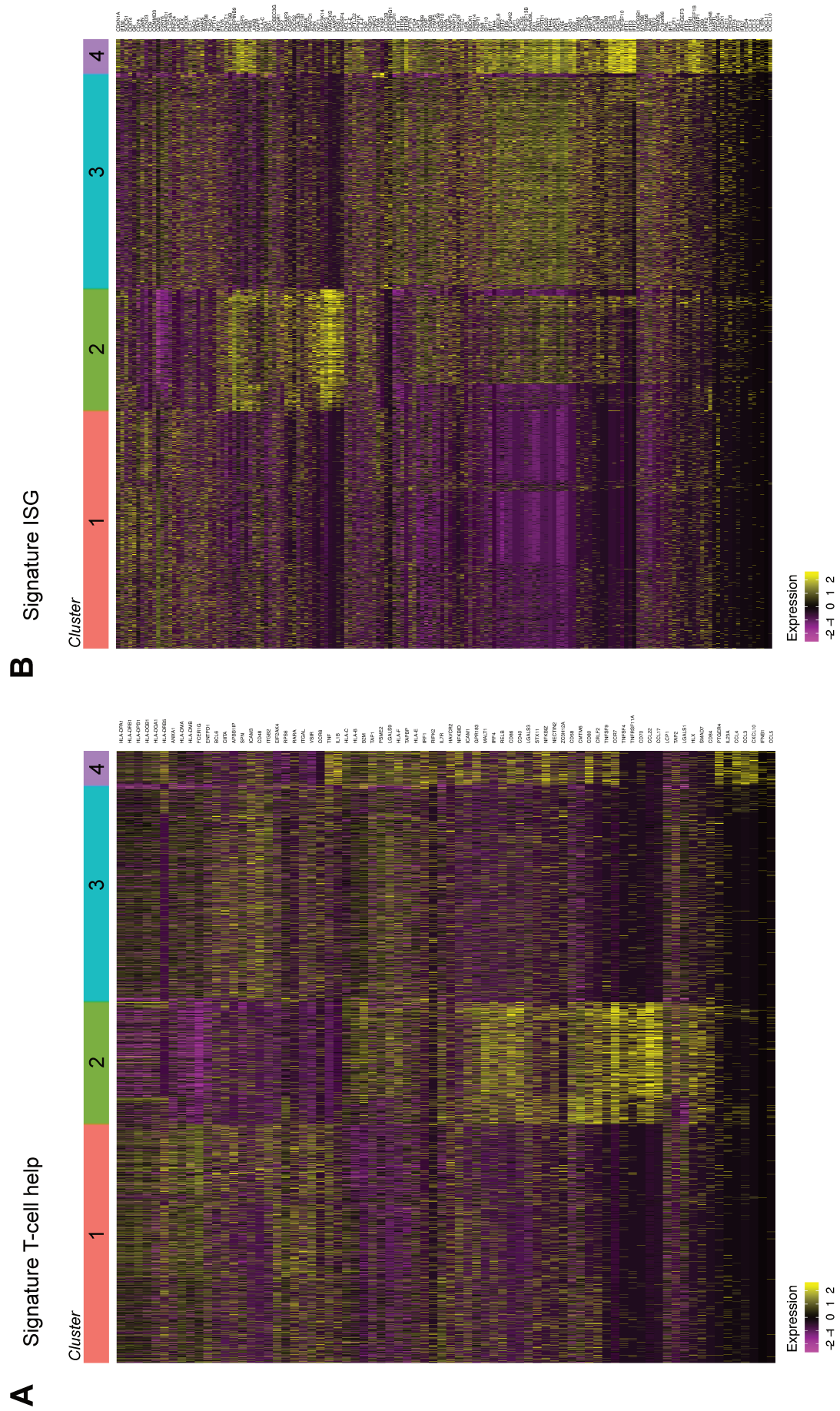
**(B)** Representative bar plot of the distribution of cells from samples (5 samples from scRNAseq) in the different clusters.

**(C)** Pie chart representing the distribution of productively infected cells (defined through cutoff of Fig1A) in the different clusters (left) or within clusters (right charts).

**(D-E)** Box plot of percentages of viral UMI in cells from sample HIV-1(NL-AD8) + Vpx 12h found in clusters 1 and 2 (D), or in productively infected cells from sample HIV-1(NL-AD8) + Vpx 24h found in clusters 3 and 4 (E)

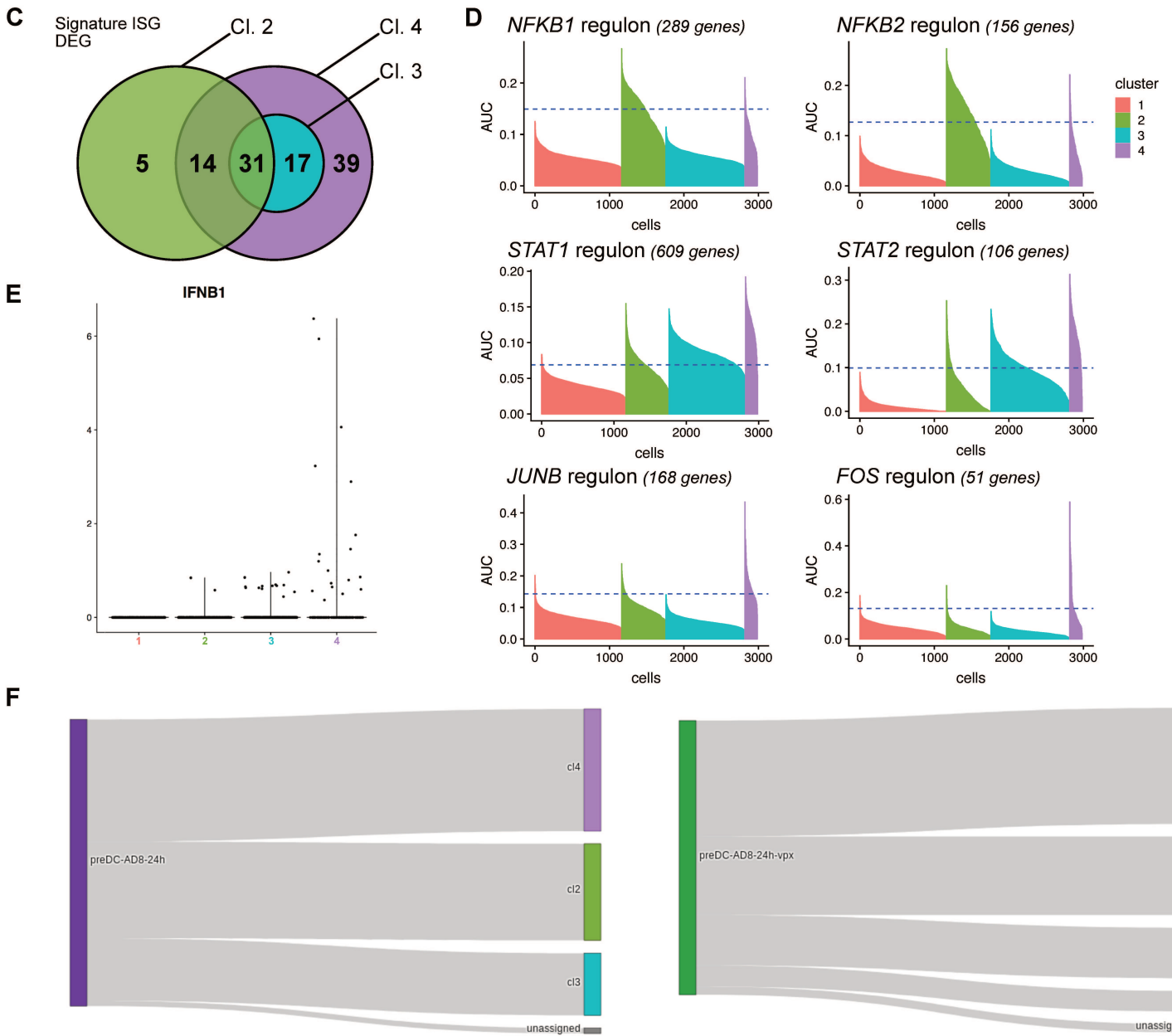
**(F)** Volcano plot representation of DEGs log<sub>2</sub>FC and FDR from each cluster comparison 2 by 2. For example cl2\_vs\_cl1 indicates that upregulated genes are from cl2 (right side of volcano plot) and downregulated genes are from cl1 (left side of volcano plot). Blue dots represent TOP 50 most significant upregulated DEGs. Red dots indicate TOP 50 most significant downregulated DEGs. Genes colored in green are associated to the T cell Help signatures, genes colored in orange are ISG, and black italic genes are HIV-1 genes.

## Supplementary Figure 3A-B





### Supplementary Figure 3 C-F



**Supplementary Figure 3: Related to Figure 2**

**(A-B)** Heatmap representation of centered, reduced and scaled expression in each cell of ISGs **(A)** or T cell help genes **(B)** within DEGs from all cluster comparisons 2 by 2.

**(C)** Venn diagram summarizing the number of upregulated ISGs in DEGs obtained from comparison of cl2, cl3 and cl4 versus cl1 from scRNAseq dataset presented in Figure 2.

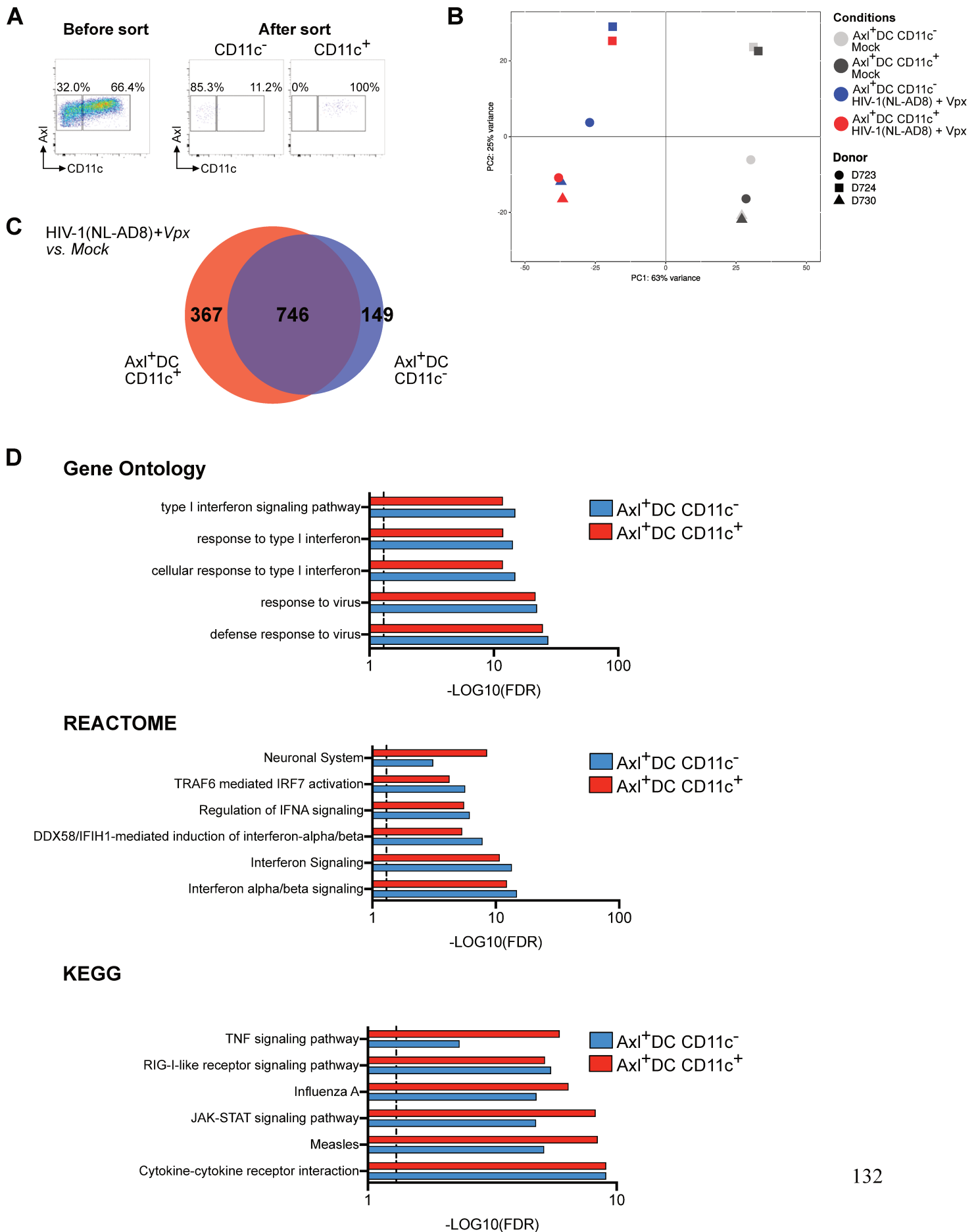
**(D)** Representative waterfall plot of AUCell score in each cell obtained from network inference analysis (See methods). Colors represent clusters from clustering analysis (5 samples Figure 2C) and dashed line define cutoff for positive AUCell score in each cell (See methods)

**(E)** Violin plot representative of OFNB1 expression in each cell of scRNAseq (5 samples)

**(F)** Second scRNAseq was performed to test the impact of Vpx in Axl<sup>+</sup> DC responses.

Representative graph of cell assignment using cmap. Violet indicates cells from HIV-1 sample and green indicates cells from HIV-1 + Vpx sample. Each gray line represent a cell assigned from those samples to the clusters obtained from the 1<sup>st</sup> experiment (clusters defined in Figure 2)

## Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4: Axl<sup>+</sup> DC response to HIV-1 is independent of CD11c expression**

Bulk RNAseq was performed on purified CD11c<sup>hi</sup> Axl<sup>+</sup> DC and CD11c<sup>lo</sup> Axl<sup>+</sup> DC exposed to HIV-1(NL-AD8) + Vpx or not for 24hours.

**(A)** CD11c and AXL expression in Axl<sup>+</sup> DC before sorting or after sorting cells by flow cytometry

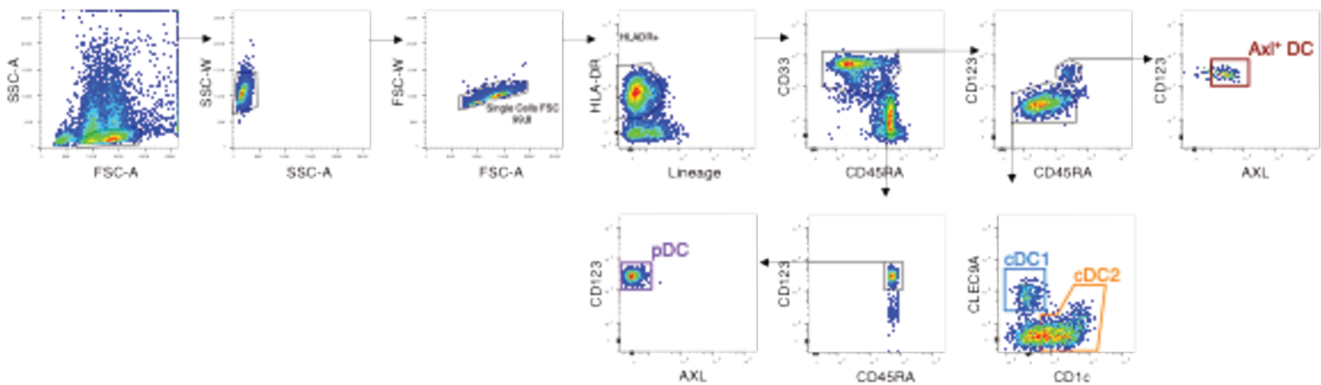
**(B)** PCA plot representation of distribution of samples within the first 2 principal components, n = 3 independent donors

**(C)** Venn diagram summarizing DEGs from HIV-1(NL-AD8) + Vpx condition versus mock comparison in CD11c<sup>hi</sup> Axl<sup>+</sup> DC (red) and CD11c<sup>lo</sup> Axl<sup>+</sup> DC (blue)

**(D)** Top 5 pathways from GO (Biological processes), REACTOME and KEGG databases enriched in DEGs obtained from HIV-1(NL-AD8) + Vpx versus mock comparisons in CD11c<sup>hi</sup> Axl<sup>+</sup> DC (red) or CD11c<sup>lo</sup> Axl<sup>+</sup> DC (red). Bar plots represent FDR. Dashed line represents FDR cut-off of 0.05.

# **DISCUSSION**

Les cellules dendritiques (DC) du sang comportent quatre sous populations : les pDC, les cDC1, les cDC2 et les Axl<sup>+</sup> DC. La plupart des études qui ont analysé les relations entre DC et VIH utilisent un modèle de DC différenciées in vitro, les MDDC ou une population de DC primaires très hétérogènes, les DC CD11c<sup>+</sup>. Ces dernières comprennent les cDC1, cDC2 et une partie des Axl<sup>+</sup> DC dans des proportions différentes. De ce fait, il est difficile de tirer des conclusions d'expériences fonctionnelles sans analyser séparément les populations de DC. Jusqu'à présent, très peu d'études se sont intéressées à la réponse antivirale de chaque sous-population de DC et celles-ci n'ont jamais pris en compte les Axl<sup>+</sup> DC (Silvin et al., 2017 ; Johnson et al., 2011). En effet, les Axl<sup>+</sup> DC n'ont été que récemment décrites chez l'homme et leur rôle dans un contexte infectieux n'a pas encore été étudié. Elles ont été caractérisées sur le plan ontogénique et par leur réponse cytokinique à des ligands de récepteurs *Toll-like* (TLR) (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017). Ainsi, nos travaux sur les relations entre les Axl<sup>+</sup> DC et le VIH-1 et sur l'impact du virus sur la biologie de ces cellules revêtent un intérêt particulier. Ils complètent et approfondissent les données obtenues sur les relations des autres sous-types de DC avec le VIH-1 et démontrent que les Axl<sup>+</sup> DC sont douées de fonctions importantes et spécifiques vis-à-vis du virus.



**Figure 12 : Stratégie d'identification et de tri des 4 sous-populations de DC par cytométrie en flux**

Nos deux études utilisent deux terminologies différentes pour désigner les mêmes cellules : les pré-DC et les Axl<sup>+</sup> DC alors qu'elles ont été triées de la même façon en employant les mêmes marqueurs de surface (Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD45RA<sup>int</sup> CD33<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> AXL<sup>+</sup>) (Figure 12). Ceci est dû à la variation de leur nom dans la littérature. Initialement appelées AS DC (pour leurs marqueurs Axl et Siglec6) ou pré-DC (pour précurseurs de DC conventionnelles) dans les premières études qui les ont décrites précisément, nous les retrouvons désormais sous le nom

d'Axl<sup>+</sup> DC, puis plus récemment de tDC pour transitional DC (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017 ; Leylek et al., 2019).

Les capacités des Axl<sup>+</sup> DC à se différencier en cDC1 et cDC2 dans des conditions de culture *in vitro* ont mené à les nommer pré-DC (See et al., 2017). Cependant, et malgré nos multiples efforts pour adapter les conditions expérimentales, nous n'avons pas pu établir de différenciation des pré-DC en cDC1 *in vitro*, alors que l'expression de CD1c, caractéristique des cDC2, est bien induite. En lien avec ces résultats, nous avons conséquemment fait le choix de renommer nos pré-DC en Axl<sup>+</sup> DC. En effet, AXL est le marqueur de surface que nous utilisons dans notre stratégie de tri pour distinguer efficacement les Axl<sup>+</sup> DC des pDC qui sont Axl<sup>-</sup>. Les Axl<sup>+</sup> DC et les pDC expriment en commun un ensemble de protéines de surface (HLADR, CD123) mais ont des niveaux différents de CD33, CD45RA, AXL, Siglec-1 et Siglec-6 qui permettent de les isoler. L'absence de contamination de pDC dans nos populations purifiées d'Axl<sup>+</sup> DC est confirmée en tirant parti de leurs propriétés respectives. En effet, les pDC résistent à l'infection par le VIH-1 tandis que les Axl<sup>+</sup> DC y sont susceptibles. À l'inverse les pDC produisent de l'IFN-I après une stimulation via TLR9, ce dont les Axl<sup>+</sup> DC sont incapables, probablement à cause de l'absence d'expression d'IRF7. De fait, notre stratégie de tri par cytométrie, réalisée sur des cellules sanguines enrichies en DC par tri magnétique, s'avère efficace.

Nos études montrent que les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 développent des fonctions et des réponses spécifiques en comparaison à celle des autres sous-types de DC.

Dans les parties suivantes, nous résumerons brièvement les résultats que nous discuterons ensuite en suivant les étapes du cycle viral chez les Axl<sup>+</sup> DC, et enfin nous nous intéresserons aux singularités de leurs réponses interférons et inflammatoires.

## **1. Spécificités d'infection, de transmission et de réponse des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1**

Nous avons effectué deux études concernant les relations entre le VIH-1 et les Axl<sup>+</sup> DC. La première étude visait à observer si les Axl<sup>+</sup> DC pouvaient être infectées par le virus, si elle pouvaient produire de nouveaux virus, comment elles les produiraient et enfin si elles étaient capables de transmettre le VIH-1 à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Dans notre seconde étude, nous nous sommes intéressés aux réponses induites dans les Axl<sup>+</sup> DC lors de la détection du VIH-1. Nos travaux ont généralement été menés en comparant les Axl<sup>+</sup> DC avec les autres sous-

populations de DC du sang. Nos résultats indiquent que les Axl<sup>+</sup> DC (i) pourraient participer à la propagation de l'infection et qu'elles (ii) joueraient un rôle dans la mise en place d'une réponse antivirale.

(i) L'expression constitutive de Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC leur permet de capturer efficacement le VIH-1 et de faciliter l'infection. Les Axl<sup>+</sup> DC semblent également plus susceptibles à l'infection que les cDC2. Les virus produits sont infectieux et peuvent être transmis *in cis* aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'activation des Axl<sup>+</sup> DC les rend résistantes à la fusion des virus et donc à l'infection. Néanmoins, la capture des particules virales par Siglec-1 permet aux Axl<sup>+</sup> DC activées de transmettre le virus *in trans* aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Enfin, le bourgeonnement des nouveaux virus dans les Axl<sup>+</sup> DC s'effectue dans des compartiments semblables aux VCC des macrophages infectés ; alors que dans les cDC2, l'assemblage viral a lieu au niveau de la membrane plasmique.

(ii) L'exposition des Axl<sup>+</sup> DC au VIH-1 déclenche une réponse IFN et inflammatoire. Contrairement aux cDC2 ou aux MDDC, ces réponses sont observées chez les Axl<sup>+</sup> DC, et ce même avec une faible réplication du virus et avant rétro-transcription de l'ARN viral. L'analyse transcriptomique au niveau de la cellule unique (scRNAseq pour *Single cell RNA sequencing*) a révélé une diversité fonctionnelle des Axl<sup>+</sup> DC en réponse au VIH-1. En effet, les réponses IFN et inflammatoire semblent distinctes et pourraient être activées par des voies de détection du virus différentes.

Les Axl<sup>+</sup> DC sont donc différentes des autres populations de DC dans leur relation avec le VIH-1 lors de nombreuses étapes du cycle viral. Les premières différences sont observées au niveau de la capture grâce à l'expression spécifique de Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC.

## 2. Capture des particules virales par les Axl<sup>+</sup> DC

### a. Rôle de Siglec-1

Le récepteur Siglec-1 est spécifique des gangliosides présents au niveau de la membrane du VIH-1. Il s'agit du plus long récepteur de la famille des siglecs, ce qui lui conférerait une efficacité particulière dans la capture des pathogènes (Crocker et al., 2007). L'analyse de la localisation de Siglec-1 et du VIH-1 sur des Axl<sup>+</sup> DC au niveau ultra-structural montre que le



récepteur est impliqué dans la capture du virus à la surface des cellules. Le récepteur pourrait ainsi participer au maintien de l'interaction entre les Axl<sup>+</sup> DC et le VIH-1 et permettrait de compenser la faible densité du récepteur CD4 et des corécepteurs CXCR4 et CCR5 à la surface des cellules. Récemment, l'analyse des différentes populations de cellules myéloïdes des muqueuses génitales a révélé la présence de cellules Siglec-1<sup>+</sup> dans ces tissus (Rhodes et al., 2021). L'expression de Siglec-1 y est retrouvée à la surface de macrophages et de DC dérivées de monocytes et est essentielle à la capture du VIH-1 et à l'infection *ex vivo*. Des cellules Siglec-1<sup>+</sup> contenant des particules virales ont également été mises en évidence dans les tissus génitaux d'une patiente infectée par le VIH-1 avec une virémie détectable (Perez-Zsolt et al., 2019a). Ces observations montrent l'importance *ex vivo* et *in vivo* du récepteur dans l'infection par le VIH-1. Cependant, l'identification et la description des cellules des muqueuses génitales ne concluent pas sur l'expression d'AXL. Les Axl<sup>+</sup> DC sont les seules DC du sang à exprimer Siglec-1 au niveau basal. La présence d'Axl<sup>+</sup> DC dans ces tissus n'est donc pas exclue, mais reste à établir précisément.

Nous retrouvons également une expression de Siglec-1 à la surface des DC conventionnelles après activation des cellules. Il se pourrait donc que les DC activées migrent dans les muqueuses et puissent capturer les particules de VIH-1.

#### **b. Rôle d'AXL**

AXL est un récepteur de surface de la famille des TAM (Tyro3, Axl et Mer). Les récepteurs TAM détectent les cellules apoptotiques grâce à leurs ligands Gas6 et la protéine S qui forment un pont entre les TAM et les phosphatidylsérines présentes à la surface des cellules en apoptose (Lemke and Rothlin, 2008). Les récepteurs TAM sont des inhibiteurs de la réponse interféron et inflammatoire, car ils sont capables d'activer les protéines régulatrices SOCS1 et SOCS3 (Rothlin et al., 2007). Certains virus, dont le VIH-1, incorporent des phosphatidylsérines dans leur enveloppe, ce qui permettrait l'activation des TAM (Moller-Tank and Maury, 2014 ; Callahan et al., 2003 ; Chua et al., 2019). Cette activation est responsable de l'inhibition de la réponse antivirale chez les DC de la souris et faciliterait leur infection par des particules virales du VIH-1 pseudotypées avec VSVG par exemple (Bhattacharyya et al., 2013). Les TAM, dont AXL, sont également essentiels à l'entrée des virus de la dengue ou de Zika chez l'homme (Meertens et al., 2017 ; Meertens et al., 2012 ; Strange et al.).

Ainsi, AXL pourrait participer à la capture du VIH-1 par l'intermédiaire des phosphatidylsérines présentes à la membrane du virus, ce qui faciliterait l'infection des Axl<sup>+</sup> DC. Les capacités du VIH-1 à se lier à AXL à la surface des Axl<sup>+</sup> DC restent cependant à démontrer. De plus, l'absence de capture du VIH-1 par les Axl<sup>+</sup> DC après un blocage de Siglec-1 est en défaveur de l'implication d'autres récepteurs. En revanche, AXL, par sa capacité à induire une signalisation intracellulaire, pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse des Axl<sup>+</sup> DC.

En plus des récepteurs et corécepteurs à la protéine d'enveloppe du VIH-1 CD4, CXCR4 et CCR5, les Axl<sup>+</sup> DC sont équipées d'autres protéines capables d'interagir avec le VIH-1 ou d'autres virus, et qui pourraient permettre de faciliter leur fusion ou leur entrée des.

### **3. Fusion du VIH-1 dans les sous-types de DC**

Les différences de susceptibilité à l'infection par le VIH-1 des sous-populations de DC sont associées à des différences dans les capacités de fusion des DC avec le virus. Les cDC1 sont résistantes à l'infection par le VIH-1 et fusionnent peu avec le virus (moins de 20 % de fusion). De leur côté, les pDC sont aussi résistantes à l'infection, mais une partie des cellules fusionnent avec le virus (environ 40 %). Les pDC expriment SAMHD1, mais son inhibition par Vpx ne permet pas d'établir l'infection (Silvin et al., 2017). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres mécanismes de restriction dans les pDC ou des régulations de SAMHD1 qui leur confèrent une résistance à Vpx. Les pDC sont également résistantes à l'infection par le virus de la grippe. Il serait intéressant de comparer les mécanismes moléculaires impliqués dans la restriction des pDC à l'infection par différents virus. L'analyse de ces mécanismes seraient sans doute utile pour le développement de nouveaux traitements antiviraux.

La fusion des particules virales avec les cellules cibles est une étape indispensable à l'infection par le VIH-1. Elle peut avoir lieu à la membrane plasmique ou au niveau des endosomes, comme montré chez les macrophages (Wilgenburg et al., 2014). Ces derniers sont également capables d'internaliser le VIH-1 indépendamment des protéines d'enveloppe à travers la phagocytose ou la macropinocytose (Maréchal et al., 2001). Cependant, la fusion virale est nécessaire dans ces compartiments pour infecter les cellules et engager une réponse immunitaire. Les pDC seraient capables de détecter le VIH-1 dans les endosomes indépendamment de la fusion. En effet, l'inhibition de la fusion par la drogue antivirale T-20

n'affecte pas la production d'IFN $\alpha$  par les pDC (Pritschet et al., 2012). Ces différents mécanismes d'entrée du virus ne sont probablement pas exclusifs et pourraient avoir lieu en même temps dans les cellules exposées au VIH-1. Par conséquent, les Axl<sup>+</sup> DC et les autres DC pourraient à la fois détecter les particules internalisées dans les endosomes et celles qui fusionnent à la membrane plasmique ou dans des compartiments intracellulaires.

Une fois que le VIH-1 a fusionné avec les Axl<sup>+</sup> DC, les composants de la particule virale, tels que la capsid et les ARN viraux pénètrent dans les cellules et peuvent être détectés par différents PRR.

#### **4. Détection précoce des particules virales par les Axl<sup>+</sup> DC**

Nos résultats montrent qu'il existe une hétérogénéité dans la réponse des Axl<sup>+</sup> DC au VIH-1. La détection du virus enclenche une réponse ISG et une réponse inflammatoire dans des Axl<sup>+</sup> DC différentes. Nous montrons que ces réponses sont enclenchées par la détection du VIH-1 avant la rétro-transcription avec l'utilisation de drogues antirétrovirales. Après rétro-transcription et réplication virale, ces mêmes réponses sont activées, tout en étant accentuées. Ainsi, la production d'IFN-I et de cytokines comme CCL3 ou CCL5 est observée dans les Axl<sup>+</sup> DC qui produisent de nouveau virus. Les résultats de scRNAseq montrent une hétérogénéité fonctionnelle des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1. La corrélation positive de l'expression des gènes de la réponse inflammatoire détectée dans une partie de Axl<sup>+</sup> DC avec ceux de la réponse à une stimulation des Axl<sup>+</sup> DC par un ligand de TLR9 suggère une détection du VIH-1 par les TLRs de la voie endosomale. En parallèle, nous montrons que la réponse ISG est dépendante de l'activité de STING avant et après rétro-transcription. Cette réponse serait donc induite par une détection cytosolique du VIH-1 dans les Axl<sup>+</sup> DC. Ainsi, l'hétérogénéité fonctionnelle des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 serait due à des mécanismes de détection virale différents.

##### **a. Détection par les TLR**

Les Axl<sup>+</sup> DC expriment TLR9. Nos données de RNAseq indiquent également une expression de TLR7, à l'inverse de TLR8 et TLR3 qui ne sont pas exprimés (nos analyses n'ont pas réussi à détecter l'expression de TLR9). L'expression de TLR7 par les Axl<sup>+</sup> DC est confirmée indirectement du fait de leur sécrétion d'IL12 après stimulation par un ligand de TLR7/8 (See et

al., 2017). La validation de l'expression des TLR endosomaux par qPCR dans les Axl<sup>+</sup> DC est donc nécessaire pour pouvoir établir leur profil d'expression en comparaison aux autres DC.

Nos résultats montrent une analogie entre la réponse inflammatoire observée chez certaines Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 et la réponse obtenue après stimulation de TLR9. TLR9 reconnaît les ADN non méthylés et n'aurait donc pas de rôle dans la détection de l'ARN viral. Cependant, il a été montré que TLR9 était impliqué dans la réponse au virus de la dengue, qui est aussi un virus à ARN (Jenn-Haung et al., 2018). En effet, l'infection par le virus de la dengue induirait un relargage de l'ADN mitochondrial qui serait détecté par TLR9. Ainsi, la détection du VIH-1 dans les Axl<sup>+</sup> DC par TLR9 pourrait être indirecte et pourrait impliquer des acides nucléiques qui ne proviennent pas du virus et qui restent à identifier.

Les TLR endosomaux TLR7, TLR8 et TLR9 partagent des mécanismes de signalisation qui impliquent MyD88 et l'activation de NFκB. Les réponses similaires observées chez les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 ou stimulées par un ligand de TLR9 pourraient également être expliquées par une détection de l'ARN viral par TLR7 ou TLR8 après internalisation du virus. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des antagonistes des différents TLR endosomaux. Toutefois, même si nous observons une diminution de la sécrétion de quelques cytokines inflammatoires dans les Axl<sup>+</sup> DC traitées avec des antagonistes des TLR et infectées par le VIH-1, le contrôle de la spécificité des antagonistes utilisés nous a empêché de conclure sur l'implication des TLR endosomaux dans la détection virale. En effet, même avec un inhibiteur spécifique commun à TLR7 et TLR8, la sécrétion de CCL3, CCL4 et l'expression de MX1 étaient diminués après stimulation par CpG-A, un ligand de TLR9.

Néanmoins, la réponse inflammatoire est activée dans les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 même après inhibition de la rétrotranscription. Cela peut suggérer une possible détection pendant l'internalisation des particules virales et avant leur relargage dans le cytoplasme. La description des compartiments intracellulaires qui seraient impliqués dans ce mécanisme reste à établir. À l'inverse des Axl<sup>+</sup> DC, il semblerait que les cDC2 ne soient pas capables de détecter les particules virales avant la rétro-transcription. La comparaison des mécanismes d'entrée du VIH-1 dans les cDC2 et les Axl<sup>+</sup> DC pourrait permettre d'identifier les compartiments engagés pendant l'internalisation du virus et d'examiner plus précisément le rôle de Siglec-1.

De plus, nous montrons par scRNAseq que peu de transcrits viraux sont détectés dans les Axl<sup>+</sup> DC qui activent une réponse inflammatoire dépendante de NFκB similaire à une réponse induite par les TLR et qui sont donc dépourvues de réplication virale. En lien avec nos

observations de l'inhibition de la fusion virale après activation des TLR, il serait important d'examiner plus précisément les mécanismes mis en place lors d'une stimulation des TLR pendant le cycle viral.

La réponse inflammatoire des Axl<sup>+</sup> DC non-infectées pourrait également être activée par la détection de signaux provenant de cellules infectées dans la même culture. Ces signaux seraient détectés par des TLR ou d'autres PRR, ce qui induirait une activation du facteur de transcription NFκB et la maturation des DC. De plus, un mécanisme d'internalisation de débris de cellules infectées par le VIH-1 est proposé dans d'autres DC. En effet, les cDC1 pourraient présenter des antigènes viraux issus de la mort des cDC2 infectées (Silvin et al., 2017).

Les pDC sont capables de détecter l'infection virale à partir d'un contact avec une cellule infectée (Webster et al., 2016). La formation d'une synapse entre une pDC et une cellule infectée permet le transfert d'ARN viral qui activent TLR7 et la sécrétion d'IFN-I (Assil et al., 2019). Ce mécanisme a été mis en évidence dans un contexte d'infection par les virus de l'hépatite C, de la dengue ou de Zika. Les mécanismes de transport des PAMP entre les deux cellules pourraient impliquer des vésicules extracellulaires, des virus immatures ou des acides nucléiques libres (Assil et al., 2015). Les contacts cellulaires seraient également nécessaires à la production d'IFN-III par les cDC2 en réponse au virus de l'hépatite C (Zhang et al., 2013).

Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient donc interagir avec des cellules infectées par le VIH-1 ce qui enclencherait leur maturation et la réponse inflammatoire. Cette interaction reste à décrire, ainsi que les PAMP et PRR qui seraient impliqués.

#### **b. Rôle de STING dans la détection précoce**

Nous montrons que la réponse ISG enclenchée par la détection du VIH-1 dans les Axl<sup>+</sup> DC est dépendante de l'activité de STING ; alors que la réponse inflammatoire ne l'est pas. STING est également impliqué dans la détection du virus avant la rétro-transcription dans les Axl<sup>+</sup> DC. À l'inverse, dans les MDDC, la détection du VIH-1 par cGAS et l'activation de STING nécessitent la rétro-transcription de l'ARN viral en cDNA et la translocation de la capsid dans le noyau (Johnson et al., 2018 ; Lahaye et al., 2018). Malgré l'utilisation de deux drogues antirétrovirales (l'azidothymidine – AZT et la névérapine – NVP), nous ne pouvons pas exclure la persistance d'un résidu d'activité de rétro-transcription qui activerait la voie cGAS/STING. Néanmoins, il est probable que la détection du virus avant la rétro-transcription dans les Axl<sup>+</sup> DC puisse avoir lieu grâce à des mécanismes dépendants de STING, mais indépendants de cGAS.

Nos analyses de la réponse transcriptomique des Axl<sup>+</sup> DC suggèrent l'implication de PRR cytosoliques spécifique de l'ARN viral, comme RIG-I. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré une interaction entre STING et RIG-I (Ishikawa and Barber, 2008). Ce complexe RIG-I/STING serait stabilisé pendant l'infection virale et aurait un rôle dans la réponse interféron au virus de l'encéphalite japonaise dans les neurones (Nazmi et al., 2012). L'activité de STING, à travers la détection de l'ARN viral par RIG-I, suggère une expression basale du PRR dans les Axl<sup>+</sup> DC et une décapsidation rapide dans le cytosol. L'étude du profil d'expression des différents PRR dans les Axl<sup>+</sup> DC au niveau protéique et de leur interaction avec STING est nécessaire pour valider les processus de détection indépendants de cGAS.

En plus de la détection d'acides nucléiques viraux, il serait possible que STING soit également activé par la fusion virale, comme montré dans le cas du virus de la grippe chez les DC (Holm et al., 2016). Les macrophages humains dérivés de monocytes sont également capables de détecter la fusion virale (Decalf et al., 2017). En effet, ils activent une réponse interféron après fusion du VIH-1 indépendamment de la rétro-transcription ou de la présence d'ARN viraux dans les particules. Cependant ce mécanisme n'est pas encore précisément décrit et l'implication de STING, ou non, n'est pas établie.

Alors que nous montrons pour la première fois l'implication de STING dans la réponse précoce du VIH-1 dans les Axl<sup>+</sup> DC, la réponse des MDDC infectées par le VIH-1 nécessite la complémentation avec Vpx et implique la voie cGAS/STING et la présence de cDNA proviral (Manel et al., 2010 ; Johnson et al., 2020). En effet, une fois libérés dans le cytoplasme des Axl<sup>+</sup> DCs, les ARN du VIH-1 sont rétro-transcrits. Le cycle viral se poursuit avec le transfert du cDNA proviral dans le noyau où il s'intègre dans le génome de l'hôte. C'est la machinerie cellulaire qui permet la transcription de l'ADN proviral et l'export des nouveaux ARNm viraux dans le noyau. Les cDNA et ARNm produits peuvent être détectés par les PRR cytosoliques comme cGAS.

## 5. Détection du virus après intégration

Nous montrons que les Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1 produisant des virus sont également productrices d'IFN-I, contrairement aux cDC1 et cDC2 qui ne sont pas capables de sécréter de l'IFN-I après l'infection par le virus. Cette sécrétion induit une augmentation de l'intensité de la

réponse ISG déjà enclenchée par la détection précoce du virus. La production d'IFN-I par les Axl<sup>+</sup> DC est spécifique de l'infection par le VIH-1 et n'est pas induite par la stimulation des TLR avec un ligand synthétique. Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient, par conséquent, être mieux équipées que les DC conventionnelles pour détecter la production virale et mettre en place une réponse antivirale.

L'expression des senseurs à ARN cytosolique RIG-1 et MDA-5 est induite par la signalisation de l'IFN-I, ce sont donc des ISG. Nos données de RNAseq confirment l'augmentation de leur expression après infection par le VIH-1 chez les Axl<sup>+</sup> DC. RIG-I et MDA5 pourraient donc être capables de détecter les ARN néo-synthétisés, responsables de l'augmentation de la réponse ISG.

Il est proposé que les MDDC, macrophages et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par le VIH-1, sont capables de détecter des ARN viraux non épissés dès leur sortie du noyau, afin d'induire une réponse interféron et inflammatoire (Akiyama et al., 2018 ; McCauley et al., 2018). Ces ARN seraient détectés dans les cellules à travers un mécanisme indépendant de l'activité de STING ou RIG-I, mais dépendant de MAVS (Akiyama et al., 2018). Cependant, cela n'est montré que dans des macrophages dérivés de monocytes et ne repose sur la seule expression de CD169 par les cellules activées. Les mécanismes impliqués dans la détection des ARN viraux contenant des introns restent donc à établir dans les cellules myéloïdes et les lymphocytes.

Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient également être capables de détecter ces ARN après intégration et transcription de l'ADN viral. De plus, le mécanisme proposé dans les macrophages pourrait expliquer l'indépendance de la réponse inflammatoire de la voie de signalisation de STING, que nous observons dans les Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1.

La traduction des ARNm viraux néo-synthétisés par la machinerie cellulaire permet la synthèse des protéines virales et l'assemblage de nouveaux virus.

## **6. Assemblage viral dans les Axl<sup>+</sup> DC**

L'analyse ultra-structurale des Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1 a révélé l'accumulation de particules virales matures et immatures dans des compartiments semblables aux VCC, mis en évidence chez les macrophages (Rodrigues et al., 2017). Il s'agit de la première identification de VCC dans des DC. L'expression constitutive de Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC pourrait

expliquer la présence de ces compartiments. En effet, Siglec-1 s'accumule dans les VCC des macrophages et serait à l'origine de leur formation après infection par le VIH-1 (Hammonds et al., 2017). Cependant, les mécanismes de formations des VCC sont encore mal décrits et les compartiments pourraient préexister dans les macrophages avant l'infection (Deneka et al., 2007). La comparaison des profils transcriptomiques des Axl<sup>+</sup> DC et des macrophages infectés par le VIH-1 pourrait permettre une description plus précise des mécanismes impliqués dans la formation, le maintien et l'accumulation du virus dans les VCC.

BST-2 (ou téthérine) est un facteur de restriction impliqué dans l'accroche du VIH-1 nouvellement synthétisé à la membrane plasmique des cellules infectées, ce qui empêche leur libération dans le milieu extracellulaire (Van Damme et al., 2008 ; Neil et al., 2008). BST-2 est un ISG qui est localisé à la membrane limitante des VCC dans des macrophages infectés par le VIH-1 (Chu et al., 2012 ; Gaudin et al., 2013). Il pourrait également avoir une fonction de PRR et induire une réponse inflammatoire après reconnaissance du VIH-1 (Galão et al., 2012 ; les fonctions de BST-2 dans l'induction d'une réponse inflammatoire sont résumées par Sauter, 2014). Les Axl<sup>+</sup> DC et les macrophages pourraient donc être capables de détecter le VIH-1 à l'étape de l'assemblage viral, notamment dans les VCC via BST-2. L'assemblage viral implique une réorganisation de la machinerie cellulaire qui pourrait relocaliser des PRR cytosoliques vers le site de production du virus et induire une détection des virus en cours de bourgeonnement. Cependant, aucune analyse précisant la localisation des différents PRR cytosoliques et des protéines virales n'a été effectuée pour pouvoir confirmer cette hypothèse.

Ainsi, les Axl<sup>+</sup> DC sont capables de détecter le VIH-1 durant la majorité des étapes du cycle viral. Les différences dans la détection du VIH-1 induisent à la fois une réponse ISG et inflammatoire qui permettraient aux Axl<sup>+</sup> DC d'induire un état antiviral et une activation du système immunitaire adaptatif.

## **7. Réponses des Axl<sup>+</sup> DC après exposition et infection par le VIH-1**

### **a. Sécrétion de cytokines par les Axl<sup>+</sup> DC**

Les Axl<sup>+</sup> DC sont particulièrement efficaces pour mettre en place une réponse cytokinique après l'infection par le VIH-1, en comparaison aux DC conventionnelles. Elles sécrètent



notamment de l'IFN-I et des cytokines inflammatoires.

La sécrétion d'IFN-I les rapprochent fonctionnellement des pDC. Dans ces dernières, la production d'IFN-I n'implique qu'une petite proportion de cellules et est montrée comme un processus aléatoire par l'encapsulation d'une unique pDC et d'un ligand TLR dans une micro-gouttelette (Wimmers et al., 2018). Par la suite, il s'agit d'une boucle d'amplification positive qui permet l'induction de la sécrétion d'IFN par la majorité des pDC.

Dans les MDDC exposées au VIH-1, la détection du virus avant la rétro-transcription entrainerait une ouverture de la chromatine des gènes d'IFN et d'ISG, ce qui permettrait ensuite une forte réponse IFN induite par la détection du virus post-intégration (Johnson et al., 2018). Nous montrons que les Axl<sup>+</sup> DC sont capables de détecter le VIH-1 avant la rétro-transcription et qu'elles induisent une réponse ISG plus faible qu'après détection de la réplication virale.

Ainsi, malgré leur rareté, les Axl<sup>+</sup> pourraient jouer un rôle d'initiateur de la sécrétion d'IFN-I qui serait ensuite amplifié par d'autres cellules, comme dans les pDC ; ou bien, elles pourraient amorcer une réponse IFN précoce qui sera amplifiée par la production virale comme dans les MDDC. Dans un contexte physiologique, elles pourraient donc participer à l'augmentation de la quantité d'IFN-I détectée dans le plasma de patients infectées par le VIH-1 (Hardy et al., 2013 ; Stacey et al., 2009).

Parallèlement à la production d'IFN-I, nous détectons *in silico* et *in vitro* une sécrétion des cytokines CCL3, CCL4 et CCL5 par les Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1. Ces cytokines sont capables d'induire le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Zhou et al., 2011 ; Castellino et al., 2006). En se liant à leur récepteur CCR5, qui est aussi un corécepteur du VIH-1, elles peuvent également avoir une fonction suppressive de l'infection (Cocchi et al., 1995). À travers la sécrétion de ces molécules, les Axl<sup>+</sup> DC pourraient à la fois permettre la propagation du virus par transfert aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais aussi activer une réponse T cytotoxique qui éliminerait les cellules infectées.

#### **b. Les Axl<sup>+</sup> DC partagent des caractéristiques fonctionnelles avec les pDC**

Les Axl<sup>+</sup> DC partagent des marqueurs de surface avec les pDC, dont CD123 qui est utilisé pour isoler les pDC du sang. Il est proposé que les capacités de présentation antigénique des pDC précédemment rapportés soient finalement dues à une contamination de la population par les Axl<sup>+</sup> DC (See et al., 2017 ; Villani et al., 2017 ; Alcántara-Hernández et al., 2017).

Pareillement à l'hétérogénéité fonctionnelle que nous décrivons chez les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1, les pDC exposées au virus de la grippe présentent une diversité de réponses (Alcumbre et al., 2018). En plus de la sécrétion d'IFN-I, d'autres pDC pourraient induire la prolifération des lymphocytes grâce à un processus de maturation en plusieurs étapes. Cette fonction d'activation des lymphocytes n'est pas due à une contamination par les Axl<sup>+</sup> DC, les pDC ayant été isolés comme pDC Axl<sup>-</sup>. En revanche, le programme de maturation des pDC semblent spécifiques au virus de la grippe. En effet, après exposition au VIH-1, les pDC n'expriment que très peu de molécules de co-stimulation (Silvin et al., 2017). Seule l'exposition des pDC à des particules du VIH-1 pseudotypées avec l'enveloppe du virus de la grippe permet d'induire la maturation des pDC en comparaison au VIH-1 avec son enveloppe naturelle (O'Brien et al., 2016). Notre étude de la réponse des lymphocytes T induites par les sous-populations de DC exposées au VIH-1 confirme ces résultats par l'incapacité des pDC à activer la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs dans des conditions de co-culture *in vitro* après infection. L'activation et la maturation des pDC sont donc dépendantes du virus et de son enveloppe. Il serait dès lors intéressant de comparer les réponses des Axl<sup>+</sup> DC, également capables de sécréter de l'IFN-I et d'induire une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, exposées à différents virus pour établir si les mécanismes que nous observons sont spécifiques à un pathogène ou s'ils sont universels.

La diversité de réponses que nous décrivons dans les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 suggère une hétérogénéité préexistante dans la population.

### c. Absence de prédisposition fonctionnelle des Axl<sup>+</sup> DC

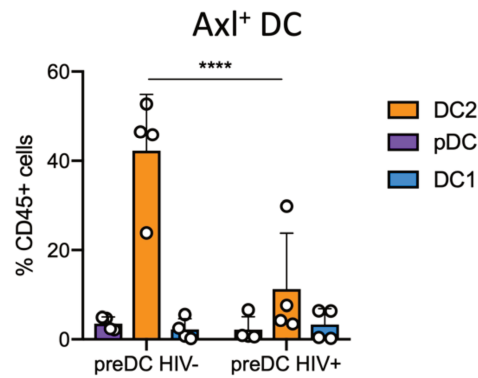
Les Axl<sup>+</sup> DC peuvent être divisées en fonction de l'expression de CD11c. Il convient alors de définir les Axl<sup>+</sup> CD11c<sup>lo</sup>DC et les Axl<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC (Alcántara-Hernández et al., 2017). Les Axl<sup>+</sup>CD11c<sup>lo</sup> DC seraient semblables aux pDC et les CD11c<sup>+</sup>Axl<sup>+</sup> semblables au DC conventionnelles. Les Axl<sup>+</sup> DC auraient donc un phénotype transitionnel qui leur vaudrait le nom de « *transitional DC* » ou tDC (Leylek et al.) . Cependant, chez l'homme, aucune différence fonctionnelle significative dans la sécrétion d'IFN ou la prolifération de lymphocytes en MLR ne permet de réellement différencier ces deux populations. De la même manière, notre analyse par RNAseq des deux populations d'AXL<sup>+</sup> DC exclut la possibilité d'une prédisposition des cellules à induire l'une ou l'autre des réponses que nous décrivons. Outre l'expression de CD11c, la population d'Axl<sup>+</sup> DC semble fonctionnellement homogène.

L'exemple des populations d'Axl<sup>+</sup> DC CD11c<sup>+</sup> ou CD11c<sup>0</sup> illustre les limites de l'étude des sous-types de cellules du système immunitaire et pose la question de la définition de l'hétérogénéité d'une population cellulaire.

L'étude de l'ontogénie des Axl<sup>+</sup> DC a décrit ces cellules comme de potentiels précurseurs des DC conventionnelles (See et al., 2017). Cependant, la fonction progénitrice des Axl<sup>+</sup> DC reste à établir dans un contexte infectieux.

## 8. Devenir des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1

Dans des conditions *in vitro*, les Axl<sup>+</sup> DC sont capables de se différencier en cDC2 (Breton et al., 2015 ; See et al., 2017 ; Villani et al., 2017). Cependant, leur capacité à se différencier en cDC1 n'est pas encore validé de façon robuste et pourrait dépendre des protocoles utilisés ou de la façon d'isoler les cellules. Comme mentionné précédemment, nos résultats de différenciation *in vitro* confirment l'absence ou le peu de différenciation des Axl<sup>+</sup> DC en cDC1. Nous avons tenté, à de multiples reprises, d'adapter le protocole de différenciation *in vitro*, mais aucune solution n'est apparue satisfaisante dans la génération de cDC1 à partir des Axl<sup>+</sup> DC, contrairement au cDC2 (CD1c<sup>+</sup> DC). Ces résultats suggèrent plutôt un rôle des Axl<sup>+</sup> DC en tant que précurseuses des cDC2. Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient donc être des précurseuses des cDC2 dans le sang ou un stade immature de ces dernières. Nous avons donc voulu étudier le devenir des Axl<sup>+</sup> DC après exposition au VIH-1. Nous montrons une diminution significative de la proportion de cDC2 obtenue à partir d'Axl<sup>+</sup> DC exposées au virus (Figure 12). Parallèlement, aucune différenciation en cDC1 ou pDC n'est observée, même en absence d'infection. Ainsi, il semblerait que les Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1 perdent leur capacité à se différencier en cDC2. Ces résultats sont à considérer avec précaution, en effet l'analyse de la différenciation ne repose que sur l'expression d'un nombre limité de marqueur (CD141, CD1c et CD123) et nécessiteraient une étude plus approfondie.



**Figure 13 : Différentiation in vitro des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1**

Les Axl<sup>+</sup> DCs sont triées puis exposées ou non au VIH-1 over-night. Après exposition au virus, les cellules sont lavées puis cultivées en présence de feeder cells (MS5) et de cytokines FLT3-L, SCF et GM-SCF pour promouvoir leur différenciation. Après 5 jours de culture les DC sont récoltées et analysées par FACS pour évaluer la présence de pDC (violet), de cDC2 (jaune) ou de cDC1 (bleu). Le graphique représente le pourcentage de pDC, cDC2 ou cDC1 obtenues après différenciation d' Axl<sup>+</sup> DC in vitro. N = 4 donneurs indépendant \*\*\*\*p < 0.0001 (Two-Way ANOVA)

Nos études démontrent pour la première fois un rôle des Axl<sup>+</sup> DC dans un contexte infectieux. Après avoir rencontré le VIH-1, les Axl<sup>+</sup> DC sont capables d'engager un programme de maturation qui leur est propre et qui leur procure des spécificités fonctionnelles par rapport aux autres DC. Nous montrons que, contrairement aux autres DC, l'expression de Siglec-1 à la surface des Axl<sup>+</sup> DC est nécessaire à la capture du VIH-1, à leur infection et à leur capacité de transmission du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une fois le VIH-1 détecté, les Axl<sup>+</sup> DC activent une réponse inflammatoire dépendante de NFκB et/ou une réponse ISG dépendante des STAT et des IRF. L'activation de ces deux réponses est modulée par l'implication de différentes voies de détection virale et par les étapes du cycle de réplication du virus. Les Axl<sup>+</sup> DC forment donc une population de sentinelles du système immunitaire unique. Leur présence dans le sang leur permettrait d'être rapidement recrutées aux sites d'infection et ainsi participer à la fois à la propagation virale et à la mise en place d'une réponse immunitaire.

## 9. Perspectives

Nous avons mis en évidence la diversité des fonctions des Axl<sup>+</sup> DC exposées au VIH-1. Nous avons montré que des voies différentes de détection du virus activent une réponse inflammatoire et une réponse ISG dans différentes Axl<sup>+</sup> DC. Nos résultats proviennent d'une analyse de la réponse des Axl<sup>+</sup> DC à un instant précis ; leur interprétation est donc limitée par une dimension temporelle. En effet, les processus de maturation cellulaire ne sont pas synchronisés dans le temps. Il n'est donc pas possible d'exclure une potentielle succession de l'activation de ces réponses dans les Axl<sup>+</sup> DC au cours du cycle de réplication du virus. De fait, l'activation simultanée de la réponse ISG et inflammatoire dans les Axl<sup>+</sup> DC qui produisent des virus est une première indication de la régulation temporelle des réponses. Une étude précise de la cinétique des réponses des Axl<sup>+</sup> DC et des autres DC permettrait de décrypter plus précisément le rôle des DC dans les différentes phases de l'infection par le VIH-1. Néanmoins, nos résultats décrivent pour la première fois une fonction des Axl<sup>+</sup> DC après exposition à un pathogène et amènent d'autres questions.

Nous suggérons que différents mécanismes de détection expliqueraient la diversité de la réponse. Cependant, les senseurs spécifiquement impliqués dans la détection du virus chez les Axl<sup>+</sup> DC restent à identifier. La quantité de cellules qu'il est possible d'isoler à partir du sang est très limitée et empêche toute manipulation de l'expression des gènes des Axl<sup>+</sup> DC pour des stratégies de perte de fonction. L'utilisation d'Axl<sup>+</sup> DC générées *in vitro* ou de lignées cellulaires aux propriétés similaires permettrait de contourner cette limitation technique. Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient être différenciées à partir d'IPSC (« *Induced Pluripotent Stem Cell* ») par exemple, mais cette technique présuppose une compréhension extensive des facteurs de transcription et des signaux indispensables à la différenciation des Axl<sup>+</sup> DC chez l'homme qui ne sont pas encore bien décrits.

Les Axl<sup>+</sup> DC possèdent des caractéristiques uniques de transmission et de réponse au VIH-1 que nous démontrons *ex vivo*. L'identification des Axl<sup>+</sup> DC dans les tissus, au niveau des sites d'infections et la validation de leur fonction *in vivo* est nécessaire pour appuyer leur importance dans la physiopathologie de l'infection par le VIH-1. Récemment, les populations de cellules myéloïdes des muqueuses génitales de l'homme ont été décrites (Rhodes et al., 2021). Cependant, la stratégie d'identification des cellules utilisées par cytométrie en flux n'inclut par le marqueur AXL. La présence de cellules HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD1c<sup>-</sup> XCR1<sup>-</sup> en petite

quantité pourrait contenir des Axl<sup>+</sup> DC (XCR1 étant un marqueur des cDC1), mais cela reste à confirmer.

Le modèle de macaque infecté par le SIVmac pourrait constituer une alternative intéressante à l'étude des tissus humains. Ce modèle d'étude permettrait également une description plus précise du rôle physiologique des Axl<sup>+</sup> DC. Cependant, l'analogie entre les Axl<sup>+</sup> DC chez l'homme et chez le macaque n'est pas encore complètement établie. Nous avons collaboré avec une équipe spécialisée dans l'infection des macaques par le SIVmac, mais avons rencontré des difficultés dans l'identification précise des Axl<sup>+</sup>DC chez le singe dues à l'absence d'anticorps spécifique d'AXL chez le macaque.

Néanmoins, malgré des considérations techniques à surmonter, la description de la localisation des Axl<sup>+</sup> DC dans les tissus, au niveau basal ou infectieux, ainsi que celle des mécanismes impliqués dans la détection et les réponses des Axl<sup>+</sup> DC dans différentes infections pourrait permettre de mieux comprendre les différentes étapes de la mise en place de la réponse immunitaire.

Finalement, nous avons montré que les Axl<sup>+</sup> DC infectées par le VIH-1 étaient capables d'induire une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La mise en place de l'activation des lymphocytes T est indispensable à l'efficacité d'un vaccin. Il est intéressant de remarquer que de nouvelles stratégies vaccinales cherchent à cibler Siglec-1 exprimé à la surface des macrophages de la zone marginale des ganglions lymphatiques, qui sont en contact de nombreux lymphocytes T (van Dinther et al., 2018 ; Affandi et al., 2020). Au sein de la population de DC, spécialisée dans la présentation antigénique, Siglec-1 est exprimé spécifiquement par les Axl<sup>+</sup> DC. Ainsi, Les Axl<sup>+</sup> DC pourraient être une autre cible intéressante de ces stratégies vaccinales. Plus largement, cela suggère un rôle important des Axl<sup>+</sup> DC dans la mise en place d'une réponse immunitaire en dehors d'un contexte d'infection par le VIH-1.

## **REFERENCES**

Affandi, A.J., Grabowska, J., Olesek, K., Venegas, M.L., Barbaria, A., Rodríguez, E., Mulder, P.P.G., Pijffers, H.J., Ambrosini, M., Kalay, H., et al. (2020). Selective tumor antigen vaccine delivery to human CD169+ antigen-presenting cells using ganglioside-liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 27528–27539.

Aibar, S., González-Blas, C.B., Moerman, T., Huynh-Thu, V.A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.-C., Geurts, P., Aerts, J., et al. (2017). SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat. Methods* 14, 1083–1086.

Akira, S., and Kishimoto†, T. (1992). IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunol. Rev.* 127, 25–50.

Akiyama, H., Miller, C.M., Ettinger, C.R., Belkina, A.C., Snyder-Cappione, J.E., and Gummuluru, S. (2018). HIV-1 intron-containing RNA expression induces innate immune activation and T cell dysfunction. *Nat. Commun.* 9, 3450.

Alcántara-Hernández, M., Leylek, R., Wagar, L.E., Engleman, E.G., Keler, T., Marinkovich, M.P., Davis, M.M., Nolan, G.P., and Idoyaga, J. (2017). High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* 47, 1037-1050.e6.

Alculumbre, S.G., Saint-André, V., Di Domizio, J., Vargas, P., Sirven, P., Bost, P., Maurin, M., Maiuri, P., Wery, M., Roman, M.S., et al. (2018). Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* 19, 63–75.

Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis e Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8 $\alpha$ + dendritic cells. *Blood* 101, 305–310.

Amigorena, S. (1999). Présentation antigénique par les cellules dendritiques. *médecine/sciences* 15, 931.

An, P., and Winkler, C.A. (2010). Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* 26, 119–131.

Anderson, D.A., Dutertre, C.-A., Ginhoux, F., and Murphy, K.M. (2021). Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 101–115.

Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- $\beta$  promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 17264–17269.

Andrew, A., and Strebel, K. (2010). HIV-1 Vpu targets cell surface markers CD4 and BST-2 through distinct mechanisms. *Mol. Aspects Med.* 31, 407–417.

Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.-C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* 26, 3025–3037.



Arrighi, J.-F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J.-M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., and Piguet, V. (2004). DC-SIGN-mediated Infectious Synapse Formation Enhances X4 HIV-1 Transmission from Dendritic Cells to T Cells. *J. Exp. Med.* 200, 1279–1288.

Assil, S., Webster, B., and Dreux, M. (2015). Regulation of the Host Antiviral State by Intercellular Communications. *Viruses* 7, 4707–4733.

Assil, S., Coléon, S., Dong, C., Décembre, E., Sherry, L., Allatif, O., Webster, B., and Dreux, M. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe* 25, 730-745.e6.

Bakshani, C.R., Morales-Garcia, A.L., Althaus, M., Wilcox, M.D., Pearson, J.P., Bythell, J.C., and Burgess, J.G. (2018). Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. *Npj Biofilms Microbiomes* 4, 14.

Balan, S., Saxena, M., and Bhardwaj, N. (2019). Chapter One - Dendritic cell subsets and locations. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, C. Lhuillier, and L. Galluzzi, eds. (Academic Press), pp. 1–68.

Baldwin, A.S. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649–683.

Balka, K.R., Louis, C., Saunders, T.L., Smith, A.M., Calleja, D.J., D’Silva, D.B., Moghaddas, F., Tailleur, M., Lawlor, K.E., Zhan, Y., et al. (2020). TBK1 and IKK $\epsilon$  Act Redundantly to Mediate STING-Induced NF- $\kappa$ B Responses in Myeloid Cells. *Cell Rep.* 31, 107492.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811.

Barouch, D.H., Ghneim, K., Bosche, W.J., Li, Y., Berkemeier, B., Hull, M., Bhattacharyya, S., Cameron, M., Liu, J., Smith, K., et al. (2016). Rapid Inflammasome Activation following Mucosal SIV Infection of Rhesus Monkeys. *Cell* 165, 656–667.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Daguette, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 877–883.

Behrens, R.T., Aligeti, M., Pocock, G.M., Higgins, C.A., and Sherer, N.M. (2017). Nuclear Export Signal Masking Regulates HIV-1 Rev Trafficking and Viral RNA Nuclear Export. *J. Virol.* 91, e02107-16.

Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor–viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* 115,

3265–3275.

Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., and Jouve, M. (2010). HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 1–10.

Berg, L.M. van den, Ribeiro, C.M.S., Zijlstra-Willems, E.M., Witte, L. de, Fluitsma, D., Tigchelaar, W., Everts, V., and Geijtenbeek, T.B.H. (2014). Caveolin-1 mediated uptake via langerin restricts HIV-1 infection in human Langerhans cells. *Retrovirology* 11, 1–9.

Bertram, K.M., Botting, R.A., Baharlou, H., Rhodes, J.W., Rana, H., Graham, J.D., Patrick, E., Fletcher, J., Plasto, T.M., Truong, N.R., et al. (2019). Identification of HIV transmitting CD11c + human epidermal dendritic cells. *Nat. Commun.* 10, 2759.

Betancor, G., Dicks, M.D.J., Jimenez-Guardeño, J.M., Ali, N.H., Apolonia, L., and Malim, M.H. (2019). The GTPase Domain of MX2 Interacts with the HIV-1 Capsid, Enabling Its Short Isoform to Moderate Antiviral Restriction. *Cell Rep.* 29, 1923-1933.e3.

Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143, 1283–1288.

Bhattacharyya, S., Zagórska, A., Lew, E.D., Shrestha, B., Rothlin, C.V., Naughton, J., Diamond, M.S., Lemke, G., and Young, J.A.T. (2013). Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe* 14, 136–147.

Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5.

Biron, C.A. (2001). Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  as Immune Regulators—A New Look. *Immunity* 14, 661–664.

Bloch, N., O'Brien, M., Norton, T.D., Polsky, S.B., Bhardwaj, N., and Landau, N.R. (2014). HIV Type 1 Infection of Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells Is Restricted by High Levels of SAMHD1 and Cannot be Counteracted by Vpx. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30, 195–203.

Boggiano Cesar, Manel Nicolas, and Littman Dan R. (2007). Dendritic Cell-Mediated trans-Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity Is Independent of DC-SIGN. *J. Virol.* 81, 2519–2523.

Borish, L.C., and Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, S460–S475.

Borrow P, Lewicki H, Hahn B H, Shaw G M, and Oldstone M B (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 68, 6103–6110.

Botting, R.A., Rana, H., Bertram, K.M., Rhodes, J.W., Baharlou, H., Nasr, N., Cunningham, A.L.,

and Harman, A.N. (2017). Langerhans cells and sexual transmission of HIV and HSV. *Rev. Med. Virol.* 27, e1923.

Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12, 1365–1371.

Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Pühr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., et al. (2015). Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 212, 401–413.

Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., and Kräusslich, H.-G. (2006). The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2641–2646.

Callahan, M.K., Popernack, P.M., Tsutsui, S., Truong, L., Schlegel, R.A., and Henderson, A.J. (2003). Phosphatidylserine on HIV Envelope Is a Cofactor for Infection of Monocytic Cells. *J. Immunol.* 170, 4840–4845.

Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1992). Vigorous Cytopathic Infection to CD4+ T Cells. 257, 6.

Carty, M., Guy, C., and Bowie, A.G. (2021). Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem. Pharmacol.* 183, 114316.

Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8 + T cells to sites of CD4 + T cell–dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890–895.

Cervera, L., Gòdia, F., Tarrés-Freixas, F., Aguilar-Gurrieri, C., Carrillo, J., Blanco, J., and Gutiérrez-Granados, S. (2019). Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7367–7384.

Chakrabarti, A., Jha, B.K., and Silverman, R.H. (2011). New Insights into the Role of RNase L in Innate Immunity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 49–57.

Chan Robin, Uchil Pradeep D., Jin Jing, Shui Guanghou, Ott David E., Mothes Walther, and Wenk Markus R. (2008). Retroviruses Human Immunodeficiency Virus and Murine Leukemia Virus Are Enriched in Phosphoinositides. *J. Virol.* 82, 11228–11238.

Chauveau, L., Donahue, D.A., Monel, B., Porrot, F., Bruel, T., Richard, L., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2017). HIV Fusion in Dendritic Cells Occurs Mainly at the Surface and Is Limited by Low CD4 Levels. *J. Virol.* 91.

Checkley, M.A., Luttge, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *J. Mol. Biol.* 410, 582–608.

Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* 17, 1142–1149.

Chu, H., Wang, J.-J., Qi, M., Yoon, J.-J., Chen, X., Wen, X., Hammonds, J., Ding, L., and Spearman, P. (2012). Tetherin/BST-2 Is Essential for the Formation of the Intracellular Virus-Containing Compartment in HIV-Infected Macrophages. *Cell Host Microbe* 12, 360–372.

Chua, B.A., Ngo, J.A., Situ, K., and Morizono, K. (2019). Roles of phosphatidylserine exposed on the viral envelope and cell membrane in HIV-1 replication. *Cell Commun. Signal.* 17, 1–9.

Ciancanelli, M.J., Huang, S.X.L., Luthra, P., Garner, H., Itan, Y., Volpi, S., Lafaille, F.G., Trouillet, C., Schmolke, M., Albrecht, R.A., et al. (2015). Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 348, 448–453.

Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* 135, 37–48.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$  as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. *Science* 270, 1811–1815.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., et al. (1986). Human immunodeficiency viruses. *Science* 232, 697–697.

Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sørensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B.-C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., et al. (2013). Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med.* 210, 1049–1063.

Colletti, N.J., Liu, H., Gower, A.C., Alekseyev, Y.O., Arendt, C.W., and Shaw, M.H. (2016). TLR3 Signaling Promotes the Induction of Unique Human BDCA-3 Dendritic Cell Populations. *Front. Immunol.* 7.

Collman, R., Hassan, N.F., Walker, R., Godfrey, B., Cutilli, J., Hastings, J.C., Friedman, H., Douglas, S.D., and Nathanson, N. (1989). Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J. Exp. Med.* 170, 1149–1163.

Colomer-Lluch, M., Ruiz, A., Moris, A., and Prado, J.G. (2018). Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front. Immunol.* 9.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5, 1219–1226.

Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N.R. (1997). Change in

Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1–Infected Individuals. *J. Exp. Med.* 185, 621–628.

Craigie, R., and Bushman, F.D. (2012). HIV DNA Integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006890.

Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguette, N., and Benkirane, M. (2013). Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1. *Cell Rep.* 3, 1036–1043.

Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255–266.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ + dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283–1292.

Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767.

Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.

Decalf, J., Desdouits, M., Rodrigues, V., Gobert, F.-X., Gentili, Marques-Ladeira, S., Chamontin, C., Mougel, M., Alencar, B., Benaroch, P., et al. (2017). Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages. *J. Virol.* 91, e00147-17.

Deckers, J., Hammad, H., and Hoste, E. (2018). Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front. Immunol.* 9.

Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.M., Cogniaux, J., Jacob, G.S., Howard, S.C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A., and Jean, F. (1994). The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J. Biol. Chem.* 269, 12240–12247.

Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* 177, 329–341.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Marzio, P.D., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661–666.

van Dinther, D., Veninga, H., Revet, M., Hoogterp, L., Olesek, K., Grabowska, J., Borg, E.G.F., Kalay, H., van Kooyk, Y., and den Haan, J.M.M. (2018). Comparison of Protein and Peptide Targeting for the Development of a CD169-Based Vaccination Strategy Against Melanoma. *Front. Immunol.* 0.

Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K.G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M.L., Hebbeler, A.M., and Greene, W.C. (2010). Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell* 143, 789–801.

Doyle, T., Goujon, C., and Malim, M.H. (2015). HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 403–413.

Dress, R.J., Dutertre, C.-A., Giladi, A., Schlitzer, A., Low, I., Shadan, N.B., Tay, A., Lum, J., Kairi, M.F.B.M., Hwang, Y.Y., et al. (2019). Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D + lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat. Immunol.* 20, 852–864.

Dress, R.J., Liu, Z., and Ginhoux, F. (2020). Towards the better understanding of myelopoiesis using single-cell technologies. *Mol. Immunol.* 122, 186–192.

Duncan, C.J.A., Williams, J.P., Schiffner, T., Gärtner, K., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Russell, R.A., Frater, J., and Sattentau, Q.J. (2014). High-Multiplicity HIV-1 Infection and Neutralizing Antibody Evasion Mediated by the Macrophage-T Cell Virological Synapse. *J. Virol.* 88, 2025–2034.

Dunphy, G., Flannery, S.M., Almine, J.F., Connolly, D.J., Paulus, C., Jønsson, K.L., Jakobsen, M.R., Nevels, M.M., Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2018). Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol. Cell* 71, 745-760.e5.

Dutertre, C.-A., Becht, E., Irac, S.E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P.Y., van den Hoogen, L.L., Leong, J.Y., Lee, B., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 51, 573-589.e8.

Eisenbarth, S.C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 89–103.

Eisenbarth, S.C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. 15.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* 272, 872–877.

Fong Lawrence, Mengozzi Manuela, Abbey Nancy W., Herndier Brian G., and Engleman Edgar G. (2002). Productive Infection of Plasmacytoid Dendritic Cells with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Triggered by CD40 Ligation. *J. Virol.* 76, 11033–11041.

Fonteneau Jean-François, Larsson Marie, Beignon Anne-Sophie, McKenna Kelli, Dasilva Ida,

- Amara Ali, Liu Yong-Jun, Lifson Jeffrey D., Littman Dan R., and Bhardwaj Nina (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells and Concomitantly Induces the Bystander Maturation of Myeloid Dendritic Cells. *J. Virol.* 78, 5223–5232.
- Francis, A.C., and Melikyan, G.B. (2018). Single HIV-1 Imaging Reveals Progression of Infection through CA-Dependent Steps of Docking at the Nuclear Pore, Uncoating, and Nuclear Transport. 20.
- Franz, K.M., Neidermyer, W.J., Tan, Y.-J., Whelan, S.P.J., and Kagan, J.C. (2018). STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E2058–E2067.
- Freed, E.O. (1998). HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology* 251, 1–15.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496.
- Freed, E.O., Englund, G., and Martin, M.A. (1995). Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* 69, 3949–3954.
- Galão, R.P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., and Neil, S.J.D. (2012). Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NF $\kappa$ B-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host Microbe* 12, 633–644.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500–503.
- Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013a). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* 341, 903–906.
- Gao, D., Wu, J., Wu, Y.-T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013b). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* 341, 903–906.
- Garcia, J.A., Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R.B. (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* 7, 3143–3147.
- Garcia, M.A., Nelson, W.J., and Chavez, N. (2018). Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a029181.
- Gaudin, R., Cunha de Alencar, B., Jouve, M., Bèrre, S., Le Bouder, E., Schindler, M., Varthaman, A., Gobert, F.-X., and Benaroch, P. (2012). Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages. *J. Cell Biol.* 199, 467–479.
- Gaudin, R., Berre, S., Alencar, B.C. de, Decalf, J., Schindler, M., Gobert, F.-X., Jouve, M., and

Benaroch, P. (2013). Dynamics of HIV-Containing Compartments in Macrophages Reveal Sequestration of Virions and Transient Surface Connections. *PLOS ONE* 8, e69450.

Gea-Mallorquí, E., Zablocki-Thomas, L., Maurin, M., Jouve, M., Rodrigues, V., Ruffin, N., and Benaroch, P. (2020). HIV-2-Infected Macrophages Produce and Accumulate Poorly Infectious Viral Particles. *Front. Microbiol.* 0.

Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 465–479.

Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* 100, 587–597.

German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood' (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy* 43, 203–222.

Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L., and Reizis, B. (2010). Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 33, 905–916.

Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260.

Ginhoux, F., and Guillems, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (2010). *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men (Massachusetts Medical Society).

Goujon, C., Jarrosson-Wuillème, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2006). With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV MAC. *Gene Ther.* 13, 991–994.

Goujon, C., Rivière, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Bernaud, J., Rigal, D., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2007). SIV SM /HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. *Retrovirology* 4, 1–11.

Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562.

Gousset, K., Ablan, S.D., Coren, L.V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D.E., and Freed, E.O. (2008). Real-Time Visualization of HIV-1 GAG Trafficking in Infected Macrophages. *PLOS Pathog.* 4, e1000015.



Grales-Reyes, G.E., Iwata, A., Albring, J., Wu, X., Tussiwand, R., Kc, W., Kretzer, N.M., Briseño, C.G., Durai, V., Bagadia, P., et al. (2015). Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 $\alpha$  + conventional DC clonogenic progenitor. *Nat. Immunol.* 16, 708–717.

Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R.M. (1998). Immature Dendritic Cells Selectively Replicate Macrophagetropic (M-Tropic) Human Immunodeficiency Virus Type 1, while Mature Cells Efficiently Transmit both M- and T-Tropic Virus to T Cells. *J. Virol.* 72, 2733–2737.

Gringhuis, S.I., Hertoghs, N., Kaptein, T.M., Zijlstra-Willems, E.M., Sarrami-Forooshani, R., Sprokholt, J.K., van Teijlingen, N.H., Kootstra, N.A., Booiman, T., van Dort, K.A., et al. (2017). HIV-1 blocks the signaling adaptor MAVS to evade antiviral host defense after sensing of abortive HIV-1 RNA by the host helicase DDX3. *Nat. Immunol.* 18, 225–235.

Groeger, S., and Meyle, J. (2019). Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 0.

Grouard, G., Rissoan, M.-C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.-J. (1997). The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. *J. Exp. Med.* 185, 1101–1112.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.

Guilliams, M., Thierry, G.R., Bonnardel, J., and Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434–451.

Guo, H., König, R., Deng, M., Riess, M., Mo, J., Zhang, L., Petrucelli, A., Yoh, S.M., Barefoot, B., Samo, M., et al. (2016). NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response, Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses. *Cell Host Microbe* 19, 515–528.

Haase, A.T. (2005). Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 783–792.

Hammonds, J.E., Beeman, N., Ding, L., Takushi, S., Francis, A.C., Wang, J.-J., Melikyan, G.B., and Spearman, P. (2017). Siglec-1 initiates formation of the virus-containing compartment and enhances macrophage-to-T cell transmission of HIV-1. *PLOS Pathog.* 13, e1006181.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141<sup>hi</sup> Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103<sup>+</sup> Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60–73.

Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.-P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 17453–17458.

Hardy, G.A.D., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., et al. (2013). Interferon- $\alpha$  Is the Primary Plasma Type-I IFN in HIV-1 Infection and Correlates with Immune Activation and Disease Markers. *PLOS ONE* 8, e56527.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269–279.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.

Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 93, 599–609.

Herzner, A.-M., Hagmann, C.A., Goldeck, M., Wolter, S., Kübler, K., Wittmann, S., Gramberg, T., Andreeva, L., Hopfner, K.-P., Mertens, C., et al. (2015). Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat. Immunol.* 16, 1025–1033.

Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIV sm closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.

Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., and McElrath, M.J. (2007). Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity* 26, 257–270.

Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al. (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nat. Commun.* 7, 10680.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777.

Hopfner, K.-P., and Hornung, V. (2020). Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 501–521.

Horuk, R. (1994). The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol. Today* 15, 169–174.

Hou, W., Wang, X., Ye, L., Zhou, L., Yang, Z.-Q., Riedel, E., and Ho, W.-Z. (2009). Lambda Interferon Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages. *J. Virol.* 83, 3834–3842.

Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of

macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661.

Hubbard, J.J., Greenwell-Wild, T., Barrett, L., Yang, J., Lempicki, R.A., Wahl, S.M., Asmuth, D.M., Murphy, R.L., Pollard, R.B., and Kottlilil, S. (2012). Host Gene Expression Changes Correlating With Anti-HIV-1 Effects in Human Subjects After Treatment With Peginterferon Alfa-2a. *J. Infect. Dis.* 205, 1443–1447.

Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345, 356–359.

Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448–457.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788–792.

Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Kräusslich, H.-G., Eils, R., Rohr, K., Bräuchle, C., Müller, B., and Lamb, D.C. (2009). Dynamics of HIV-1 Assembly and Release. *PLOS Pathog.* 5, e1000652.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.

Iwamoto, A., Hosoya, N., and Kawana-Tachikawa, A. (2010). HIV-1 tropism. *Protein Cell* 1, 510–513.

Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.-S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1125–1138.

Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., Archer, J., Hatch, S.C., Erkizia, I., Blanco, J., Borràs, F.E., Puertas, M.C., Connor, J.H., Fernández-Figueras, M.T., et al. (2009). Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113, 2732–2741.

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., et al. (2012a). Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1. *PLOS Biol.* 10, e1001315.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Puertas, M.C., Rodriguez-Plata, M.T., Zangger, N., Erikson, E., Pino, M., Erkizia, I., Glass, B., Clotet, B., et al. (2012b). Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol.* 10, e1001448.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., McLaren, P.J., Telenti, A., Kräusslich, H.-G., and Martinez-Picado, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* 10, e1004146.

Izquierdo-Useros Nuria, Blanco Julià, Erkizia Itziar, Fernández-Figueras Maria Teresa, Borràs Francesc E., Naranjo-Gómez Mar, Bofill Margarita, Ruiz Lidia, Clotet Bonaventura, and Martinez-Picado Javier (2007). Maturation of Blood-Derived Dendritic Cells Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture and Transmission. *J. Virol.* 81, 7559–7570.

Jakobsen, M.R., Bak, R.O., Andersen, A., Berg, R.K., Jensen, S.B., Jin, T., Laustsen, A., Hansen, K., Ostergaard, L., Fitzgerald, K.A., et al. (2013). PNAS Plus: From the Cover: IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4571–E4580.

Janeway, C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13, 11–16.

Jayappa, K.D., Ao, Z., and Yao, X. (2012). The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 70–85.

Jenn-Haung, L., Mei-Yi, W., Chuan-Yueh, H., Chien-Hsian, W., Li-Feng, H., Chia-Ying, Y., Po-Yuan, K., Shue-Fen, L., Shih-Jen, L., and Ling-Jun, H. (2018). Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells. *EMBO Rep.* 19, e46182.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557–569.

Johnson, J.S., Lucas, S.Y., Amon, L.M., Skelton, S., Nazitto, R., Carbonetti, S., Sather, D.N., Littman, D.R., and Aderem, A. (2018). Reshaping of the Dendritic Cell Chromatin Landscape and Interferon Pathways during HIV Infection. *Cell Host Microbe* 23, 366-381.e9.

Johnson, J.S., De Veaux, N., Rives, A.W., Lahaye, X., Lucas, S.Y., Perot, B.P., Luka, M., Garcia-Paredes, V., Amon, L.M., Watters, A., et al. (2020). A Comprehensive Map of the Monocyte-Derived Dendritic Cell Transcriptional Network Engaged upon Innate Sensing of HIV. *Cell Rep.* 30, 914-931.e9.

Johnson, T.R., Johnson, C.N., Corbett, K.S., Edwards, G.C., and Graham, B.S. (2011). Primary Human mDC1, mDC2, and pDC Dendritic Cells Are Differentially Infected and Activated by Respiratory Syncytial Virus. *PLOS ONE* 6, e16458.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207, 1247–1260.

Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O., and Benaroch, P. (2007). HIV-1 Buds and Accumulates in “Nonacidic” Endosomes of Macrophages. *Cell Host Microbe* 2, 85–95.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.-J. (2001). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J. Exp. Med.* 194, 863–870.

Kane, M., Zang, T.M., Rihn, S.J., Zhang, F., Kueck, T., Alim, M., Schoggins, J., Rice, C.M., Wilson, S.J., and Bieniasz, P.D. (2016). Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host Microbe* 20, 392–405.

Kanki, P.J., Travers, K.U., Marlink, R.G., Essex, M.E., MBoup, S., Gueye-NDiaye, A., Siby, T., Thior, I., Sankalé, J.-L., Hsieh, C.-C., et al. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *The Lancet* 343, 943–946.

Kaplan A H, Zack J A, Knigge M, Paul D A, Kempf D J, Norbeck D W, and Swanstrom R (1993). Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J. Virol.* 67, 4050–4055.

Kaufmann, S.H.E. (2019). Immunology's Coming of Age. *Front. Immunol.* 10, 684.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469.

Kawamura, T., Gulden, F.O., Sugaya, M., McNamara, D.T., Borris, D.L., Lederman, M.M., Orenstein, J.M., Zimmerman, P.A., and Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8401–8406.

Kochs, G., and Haller, O. (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 2082–2086.

Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175.

Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 869–882.

Ku, P.-I., Bendjennat, M., Ballew, J., Landesman, M.B., and Saffarian, S. (2014). ALIX Is Recruited Temporarily into HIV-1 Budding Sites at the End of Gag Assembly. *PLOS ONE* 9, e96950.

Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–659.

Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013a). The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* 39, 1132–1142.

Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013b). The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* 39, 1132–1142.

Lahaye, X., Gentili, M., Silvin, A., Conrad, C., Picard, L., Jouve, M., Zueva, E., Maurin, M., Nadalin, F., Knott, G.J., et al. (2018). NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation. *Cell* 175, 488-501.e22.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.

Lamb, J., Crawford, E.D., Peck, D., Modell, J.W., Bhat, I.C., Wrobel, M.J., Lerner, J., Brunet, J.-P., Subramanian, A., Ross, K.N., et al. (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929–1935.

Lane, H.C., Davey, V., Kovacs, J.A., Feinberg, J., Metcalf, J.A., Herpin, B., Walker, R., Deyton, L., Davey, R.T., Falloon, J., et al. (1990). Interferon- $\alpha$  in Patients with Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Ann. Intern. Med.* 112, 805–811.

Langer, S., Hammer, C., Hopfensperger, K., Klein, L., Hotter, D., De Jesus, P.D., Herbert, K.M., Pache, L., Smith, N., van der Merwe, J.A., et al. (2019). HIV-1 Vpu is a potent transcriptional suppressor of NF- $\kappa$ B-elicited antiviral immune responses. *ELife* 8, e41930.

Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubber, C.A., Fejer, G., Freudenberg, M.A., Davey, G.M., Vremec, D., Kallies, A., et al. (2010). Mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs and human BDCA3<sup>+</sup> DCs are major producers of IFN- $\lambda$  in response to poly IC. *J. Exp. Med.* 207, 2703–2717.

Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D., and Doms, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5215–5220.

Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* 212, 385–399.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86, 973–983.

Lemke, G., and Rothlin, C.V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 327–336.

León, B., López-Bravo, M., and Ardavín, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531.

Lester, S.N., and Li, K. (2014). Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *J. Mol. Biol.* 426, 1246–1264.

Lew, D.J., Decker, T., and Darnell, J.E. (1989). Alpha interferon and gamma interferon stimulate transcription of a single gene through different signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5404–5411.

Leylek, R., Alcántara-Hernández, M., Lanzar, Z., Lüdtke, A., Perez, O.A., Reizis, B., and Idoyaga, J. (2019). Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population. *Cell Rep.* 29, 3736-3750.e8.

Li, X., Deng, M., Petrucelli, A.S., Zhu, C., Mo, J., Zhang, L., Tam, J.W., Ariel, P., Zhao, B., Zhang, S., et al. (2019). Viral DNA Binding to NLRC3, an Inhibitory Nucleic Acid Sensor, Unleashes STING, a Cyclic Dinucleotide Receptor that Activates Type I Interferon. *Immunity* 50, 591-599.e6.

Loré, K., Smed-Sörensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J.R., and Koup, R.A. (2005). Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 201, 2023–2033.

Los, M., Schenk, H., and Baeuerle, P.A. (1995). IL-2 gene expression and NF- $\kappa$ B activation through CD28 requires reactive oxygen production by. 10.

Ma, F., Li, B., Yu, Y., Iyer, S.S., Sun, M., and Cheng, G. (2015). Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING. *EMBO Rep.* 16, 202–212.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougai, S., Clapham, P.R., and We, R.A. (1986). Gene Encodes the AIDS Virus Receptor expressed in the Immune System and the Brain. 16.

Malim, M.H., and Emerman, M. (2008). HIV-1 Accessory Proteins— Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. 11.

Mamede, J.I., Cianci, G.C., Anderson, M.R., and Hope, T.J. (2017). Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E7169–E7178.

Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010). A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467, 214–217.

Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99–103.

Marchetti, G., Bellistri, G.M., Borghi, E., Tincati, C., Ferramosca, S., La Francesca, M., Morace, G., Gori, A., and Monforte, A. d'Arminio (2008). Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 22, 2035–2038.

Maréchal, V., Prevost, M.-C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.-M., and Schwartz, O. (2001). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *J. Virol.* 75, 11166–11177.

Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C.C., Dia, M.C., Gueye, E.H., et al. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587–1590.

Martin, J.C., Chang, C., Boschetti, G., Ungaro, R., Giri, M., Grout, J.A., Gettler, K., Chuang, L., Nayar, S., Greenstein, A.J., et al. (2019). Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* 178, 1493-1508.e20.

Martín-Moreno, A., and Muñoz-Fernández, M.A. (2019). Dendritic Cells, the Double Agent in the War Against HIV-1. *Front. Immunol.* 10, 2485.

Matikainen, S., Sirén, J., Tissari, J., Veckman, V., Pirhonen, J., Severa, M., Sun, Q., Lin, R., Meri, S., Uzé, G., et al. (2006). Tumor Necrosis Factor Alpha Enhances Influenza A Virus-Induced Expression of Antiviral Cytokines by Activating RIG-I Gene Expression. *J. Virol.* 80, 3515–3522.

Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.-I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 Distinguishes Two Subsets of Human Plasmacytoid Dendritic Cells with Distinct Phenotype and Functions. *J. Immunol.* 182, 6815–6823.

Mc Dermott, R., Ziyhan, U., Spehner, D., Bausinger, H., Lipsker, D., Mommaas, M., Cazenave, J.-P., Raposo, G., Goud, B., de la Salle, H., et al. (2002). Birbeck Granules Are Subdomains of Endosomal Recycling Compartment in Human Epidermal Langerhans Cells, Which Form Where Langerin Accumulates. *Mol. Biol. Cell* 13, 317–335.

McCauley, S.M., Kim, K., Nowosielska, A., Dauphin, A., Yurkovetskiy, L., Diehl, W.E., and Luban, J. (2018). Intron-containing RNA from the HIV-1 provirus activates type I interferon and inflammatory cytokines. *Nat. Commun.* 9, 5305.

McCune, J.M. (2001). The dynamics of CD4 + T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410, 974–979.

McDonald, D. (2003). Recruitment of HIV and Its Receptors to Dendritic Cell-T Cell Junctions. *Science* 300, 1295–1297.

McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159, 441–452.



McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J.P., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* 69, 4737–4745.

McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2020). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *ArXiv180203426 Cs Stat.*

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 87–103.

Medzhitov, R. (2002). Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 296, 298–300.

Medzhitov, R. (2017). Ruslan Medzhitov. *Curr. Biol.* 27, R577–R578.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.

Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* 12, 544–557.

Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M.L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* 18, 324–333.

Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H.-J., Hellman, J., et al. (2007). MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J. Virol.* 81, 8180–8191.

Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* 272, 1167–1170.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.

Moller-Tank, S., and Maury, W. (2014). Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* 468–470, 565–580.

Monroe, K.M., Yang, Z., Johnson, J.R., Geng, X., Doitsh, G., Krogan, N.J., and Greene, W.C. (2014). IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV. *Science* 343, 428–432.

Moris, A., Nobile, C., Buseyne, F., Porrot, F., Abastado, J.-P., and Schwartz, O. (2004). DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103, 2648–2654.

Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host Microbe* 9, 235–242.

Mörner, A., Björndal, Å., Albert, J., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Inoue, R., Thorstensson, R., Fenyö, E.M., and Björling, E. (1999). Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage. *J. Virol.* 73, 2343–2349.

Muesing, M.A., Smith, D.H., Cabradilla, C.D., Benton, C.V., Lasky, L.A., and Capon, D.J. (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313, 450–458.

Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217–1226.

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., et al. (2014). Inhibition of Two Temporal Phases of HIV-1 Transfer from Primary Langerhans Cells to T Cells: The Role of Langerin. *J. Immunol.* 193, 2554–2564.

Nazmi, A., Mukhopadhyay, R., Dutta, K., and Basu, A. (2012). STING Mediates Neuronal Innate Immune Response Following Japanese Encephalitis Virus Infection. *Sci. Rep.* 2, 347.

Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.

Nguyen, A.V., and Soulika, A.M. (2019). The Dynamics of the Skin’s Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1811.

Nguyen Dzung H. and Hildreth James E. K. (2000). Evidence for Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selectively from Glycolipid-Enriched Membrane Lipid Rafts. *J. Virol.* 74, 3264–3272.

Nisole, S., and Saïb, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 1–20.

Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldler, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932–942.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.-P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes. *J. Virol.* 79, 5386–5399.

Nowarski, R., Gagliani, N., Huber, S., and Flavell, R.A. (2013). Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 1, 77–84.

Nutt, S.L., and Chopin, M. (2020). Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell

Differentiation and Function. *Immunity* 52, 942–956.

O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Baranda, S.J., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., et al. (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- $\alpha$ -producing and partially matured phenotype. *J. Clin. Invest.* 121, 1088–1101.

O'Brien, M., Manches, O., Wilen, C., Gopal, R., Huq, R., Wu, V., Sunseri, N., and Bhardwaj, N. (2016). CD4 Receptor is a Key Determinant of Divergent HIV-1 Sensing by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS Pathog.* 12, e1005553.

de Oliveira Mann, C.C., Orzalli, M.H., King, D.S., Kagan, J.C., Lee, A.S.Y., and Kranzusch, P.J. (2019). Modular Architecture of the STING C-Terminal Tail Allows Interferon and NF- $\kappa$ B Signaling Adaptation. *Cell Rep.* 27, 1165-1175.e5.

Ono, A., and Freed, E.O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13925–13930.

Orenstein J M, Meltzer M S, Phipps T, and Gendelman H E (1988). Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J. Virol.* 62, 2578–2586.

Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2336–2340.

Pena-Cruz, V., Agosto, L.M., Akiyama, H., Olson, A., Moreau, Y., Larrieux, J.-R., Henderson, A., Gummuluru, S., and Sagar, M. (2018). HIV-1 replicates and persists in vaginal epithelial dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 128, 3439–3444.

Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2009). Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell* 139, 499–511.

Perez-Zsolt, D., Cantero-Pérez, J., Erkizia, I., Benet, S., Pino, M., Serra-Peinado, C., Hernández-Gallego, A., Castellví, J., Tapia, G., Arnau-Saz, V., et al. (2019a). Dendritic Cells From the Cervical Mucosa Capture and Transfer HIV-1 via Siglec-1. *Front. Immunol.* 10, 825.

Perez-Zsolt, D., Martinez-Picado, J., and Izquierdo-Useros, N. (2019b). When Dendritic Cells Go Viral: The Role of Siglec-1 in Host Defense and Dissemination of Enveloped Viruses. *Viruses* 12, 8.

Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., et al. (2013). IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 958–969.

Pettit S C, Moody M D, Wehbie R S, Kaplan A H, Nantermet P V, Klein C A, and Swanstrom R (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.* 68, 8017–8027.

Pino, M., Erkizia, I., Benet, S., Erikson, E., Fernández-Figueras, M.T., Guerrero, D., Dalmau, J., Ouchi, D., Rausell, A., Ciuffi, A., et al. (2015). HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* 12, 37.

Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.-L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., et al. (2010). Characterization of human DNCR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 $\alpha$ + dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1261–1271.

Prévost-Blondel, A., Roth, E., Rosenthal, F.M., and Pircher, H. (2000). Crucial Role of TNF- $\alpha$  in CD8 T Cell-Mediated Elimination of 3LL-A9 Lewis Lung Carcinoma Cells In Vivo. *J. Immunol.* 164, 3645–3651.

Pritschet, K., Donhauser, N., Schuster, P., Ries, M., Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., Pöhlmann, S., Holland, G., Bannert, N., et al. (2012). CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* 423, 152–164.

Puryear, W.B., Akiyama, H., Geer, S.D., Ramirez, N.P., Yu, X., Reinhard, B.M., and Gummuluru, S. (2013). Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog.* 9, e1003291.

Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002). Human Macrophages Accumulate HIV-1 Particles in MHC II Compartments. *Traffic* 3, 718–729.

Rehwinkel, J., and Gack, M.U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 537–551.

Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 50, 37–50.

Relloso, M., Puig-Kröger, A., Pello, O.M., Rodríguez-Fernández, J.L., Rosa, G. de la, Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2002). DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- $\beta$ , and Anti-Inflammatory Agents. *J. Immunol.* 168, 2634–2643.

Rhodes, J.W., Tong, O., Harman, A.N., and Turville, S.G. (2019). Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection. *Front. Immunol.* 10, 1088.

Rhodes, J.W., Botting, R.A., Bertram, K.M., Vine, E.E., Rana, H., Baharlou, H., Vegh, P., O’Neil, T.R., Ashhurst, A.S., Fletcher, J., et al. (2021). Human anogenital monocyte-derived dendritic cells and langerin+cDC2 are major HIV target cells. *Nat. Commun.* 12, 2147.

Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 588–593.

Rodrigues, P.F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G.E., Ivanek, R., and Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* 19, 711–722.

Rodrigues, V., Ruffin, N., San-Roman, M., and Benaroch, P. (2017). Myeloid Cell Interaction with HIV: A Complex Relationship. *Front. Immunol.* 8, 1698.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83–93.

Rotger, M., Dang, K.K., Fellay, J., Heinzen, E.L., Feng, S., Descombes, P., Shianna, K.V., Ge, D., Günthard, H.F., Goldstein, D.B., et al. (2010). Genome-Wide mRNA Expression Correlates of Viral Control in CD4+ T-Cells from HIV-1-Infected Individuals. *PLOS Pathog.* 6, e1000781.

Rothlin, C.V., Ghosh, S., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B.A., and Lemke, G. (2007). TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell* 131, 1124–1136.

Rowland-Jones, S.L., and Whittle, H.C. (2007). Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat. Immunol.* 8, 329–331.

Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine W A, and Rosen C A (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63, 1–8.

Ruffin, N., Gea-Mallorquí, E., Brouiller, F., Jouve, M., Silvin, A., See, P., Dutertre, C.-A., Ginhoux, F., and Benaroch, P. (2019). Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 21685–21693.

Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting Edge: The Toll Pathway Is Required for Resistance to Gram-Positive Bacterial Infections in *Drosophila*. *J. Immunol.* 168, 1542–1546.

Saharia, K.K., and Koup, R.A. (2013). T Cell Susceptibility to HIV Influences Outcome of Opportunistic Infections. *Cell* 155, 505–514.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.

Sandgren, K.J., Smed-Sörensen, A., Forsell, M.N., Soldemo, M., Adams, W.C., Liang, F., Perbeck, L., Koup, R.A., Wyatt, R.T., Hedestam, G.B.K., et al. (2013). Human Plasmacytoid Dendritic Cells Efficiently Capture HIV-1 Envelope Glycoproteins via CD4 for Antigen Presentation. *J. Immunol.* 191, 60–69.

Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T.R., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., et al. (2014). Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601–605.

Sauter, D. (2014). Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Front. Microbiol.* 0.

Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., III, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP Is Essential for the Development of Mouse Type I Interferon-producing Cells and for the Generation and Activation of CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 196, 1415–1425.

Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970–983.

Schlitzer, A., McGovern, N., and Ginhoux, F. (2015a). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41, 9–22.

Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R.B., Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015b). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* 16, 718–728.

Schmidt, S., Schenkova, K., Adam, T., Erikson, E., Lehmann-Koch, J., Sertel, S., Verhasselt, B., Fackler, O.T., Lasitschka, F., and Keppler, O.T. (2015). SAMHD1's protein expression profile in humans. *J. Leukoc. Biol.* 98, 5–14.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.

Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.

Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell* 110, 521–529.

Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.

Schwartz, O., Maréchal, V., Gall, S.L., Lemonnier, F., and Heard, J.-M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* 2, 338–342.

Sedaghat, A.R., German, J., Teslovich, T.M., Cofrancesco, J., Jie, C.C., Talbot, C.C., and Siliciano, R.F. (2008). Chronic CD4+ T-Cell Activation and Depletion in Human Immunodeficiency Virus

Type 1 Infection: Type I Interferon-Mediated Disruption of T-Cell Dynamics. *J. Virol.* 82, 1870–1883.

Sedger, L.M., and McDermott, M.F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 453–472.

See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S.E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., et al. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 356, eaag3009.

See, P., Lum, J., Chen, J., and Ginhoux, F. (2018). A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front. Immunol.* 9.

Segura, E., and Amigorena, S. (2015). Chapter One - Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 1–31.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653–660.

Shi, H.-X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.-Y., Wei, B., Shan, Y.-F., Zhu, L.-H., and Wang, C. (2010). Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2424–2436.

Silvin, A., Yu, C.I., Lahaye, X., Imperatore, F., Brault, J.-B., Cardinaud, S., Becker, C., Kwan, W.-H., Conrad, C., Maurin, M., et al. (2017). Constitutive resistance to viral infection in human CD141<sup>+</sup> dendritic cells. *Sci. Immunol.* 2, eaai8071.

Simmons, D.P., Wearsch, P.A., Canaday, D.H., Meyerson, H.J., Liu, Y.C., Wang, Y., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2012). Type I IFN Drives a Distinctive Dendritic Cell Maturation Phenotype That Allows Continued Class II MHC Synthesis and Antigen Processing. *J. Immunol.* 188, 3116–3126.

Sittig, S.P., Bakdash, G., Weiden, J., Sköld, A.E., Tel, J., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Schreiber, G. (2016). A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm.* 2016, e3605643.

Smed-Sörensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.-L., and Koup, R.A. (2005). Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* 79, 8861–8869.

Solis, M., Nakhaei, P., Jalalirad, M., Lacoste, J., Douville, R., Arguello, M., Zhao, T., Laughrea, M., Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (2011). RIG-I-Mediated Antiviral Signaling Is Inhibited in HIV-1 Infection by a Protease-Mediated Sequestration of RIG-I. *J. Virol.* 85, 1224–1236.

Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J., and Crowe, S. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and

integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 70, 3863–3869.

Speck R F, Wehrly K, Platt E J, Atchison R E, Charo I F, Kabat D, Chesebro B, and Goldsmith M A (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* 71, 7136–7139.

Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *J. Virol.* 83, 3719–3733.

Steinman, R.M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 1–22.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE : I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162.

Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5132–5136.

Strange, D.P., Jiyarom, B., Pourhabibi Zarandi, N., Xie, X., Baker, C., Sadri-Ardekani, H., Shi, P.-Y., and Verma, S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *MBio* 10, e01372-19.

Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.

Stylianou, E., Aukrust, P., Bendtzen, K., Müller, F., and Frøland, S.S. (2000). Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)—possible immunosuppressive role of IFN- $\alpha$  in HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 119, 479–485.

Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* 339, 786–791.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 471–485.

Swiecki, M., Omattage, N.S., and Brett, T.J. (2013). BST-2/tetherin: Structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol. Immunol.* 54, 132–139.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.



Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39, 925–938.

Tang, Y., Zhong, G., Zhu, L., Liu, X., Shan, Y., Feng, H., Bu, Z., Chen, H., and Wang, C. (2010). Herc5 Attenuates Influenza A Virus by Catalyzing ISGylation of Viral NS1 Protein. *J. Immunol.* 184, 5777–5790.

Tang-Huau, T.-L., Gueguen, P., Goudot, C., Durand, M., Bohec, M., Baulande, S., Pasquier, B., Amigorena, S., and Segura, E. (2018). Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat. Commun.* 9, 2570.

Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 152–164.

Tincati, C., Douek, D.C., and Marchetti, G. (2016). Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Res. Ther.* 13, 19.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Yasuda, S., Sugimoto, A., Yagi, T., Azuma, M., Yagita, H., Akagawa, K., and Takemori, T. (1997). Efficient Virus Transmission from Dendritic Cells to CD4+T Cells in Response to Antigen Depends on Close Contact through Adhesion Molecules. *Virology* 239, 259–268.

Turville, S.G., Arthos, J., Mac Donald, K., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D., and Cunningham, A.L. (2001). HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 98, 2482–2488.

Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 3, 975–983.

Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stössel, H., Romani, N., Piatak, M., et al. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170–2179.

Tussiwand, R., Everts, B., Grajales-Reyes, G.E., Kretzer, N.M., Iwata, A., Bagaitkar, J., Wu, X., Wong, R., Anderson, D.A., Murphy, T.L., et al. (2015). Klf4 Expression in Conventional Dendritic Cells Is Required for T Helper 2 Cell Responses. *Immunity* 42, 916–928.

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host Microbe* 3, 245–252.

Vermeire, J., Roesch, F., Sauter, D., Rua, R., Hotter, D., Van Nuffel, A., Vanderstraeten, H.,

Naessens, E., Iannucci, V., Landi, A., et al. (2016). HIV Triggers a cGAS-Dependent, Vpu- and Vpr-Regulated Type I Interferon Response in CD4 + T Cells. *Cell Rep.* 17, 413–424.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *14*.

Villar, J., and Segura, E. (2020). Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. *Trends Immunol.* 41, 1062–1071.

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176, 47–58.

Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 607–618.

Waltman, L., and van Eck, N.J. (2013). A smart local moving algorithm for large-scale modularity-based community detection. *Eur. Phys. J. B* 86, 471.

Wang, C., Sun, W., Ye, Y., Bomba, H.N., and Gu, Z. (2017). Bioengineering of Artificial Antigen Presenting Cells and Lymphoid Organs. *Theranostics* 7, 3504–3516.

Wang Jian-Hua, Janas Alicia M., Olson Wendy J., and Wu Li (2007). Functionally Distinct Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mediated by Immature and Mature Dendritic Cells. *J. Virol.* 81, 8933–8943.

Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 15, 98–108.

Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* 90, 10050–10053.

Weiner, D.B., Huebner, K., Williams, W.V., and Greene, M.I. (1991). Human Genes Other than CD4 Facilitate HIV-1 Infection of Murine Cells. *Pathobiology* 59, 361–371.

Welsch, S., Groot, F., Kräusslich, H.-G., Keppler, O.T., and Sattentau, Q.J. (2011). Architecture and Regulation of the HIV-1 Assembly and Holding Compartment in Macrophages. *J. Virol.* 85, 7922–7927.

White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013). The Retroviral Restriction Ability of SAMHD1, but Not Its Deoxynucleotide Triphosphohydrolase Activity, Is Regulated by Phosphorylation. *Cell Host Microbe* 13, 441–451.

- Wiley, R.D., and Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 738–743.
- Wilgenburg, B. van, Moore, M.D., James, W.S., and Cowley, S.A. (2014). The Productive Entry Pathway of HIV-1 in Macrophages Is Dependent on Endocytosis through Lipid Rafts Containing CD4. *PLOS ONE* 9, e86071.
- Williams, J.W., Tjota, M.Y., Clay, B.S., Vander Lugt, B., Bandukwala, H.S., Hrusch, C.L., Decker, D.C., Blaine, K.M., Fixsen, B.R., Singh, H., et al. (2013). Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* 4, 2990.
- Wimmers, F., Subedi, N., van Buuringen, N., Heister, D., Vivié, J., Beeren-Reinieren, I., Woestenenk, R., Dolstra, H., Piruska, A., Jacobs, J.F.M., et al. (2018). Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Commun.* 9, 3317.
- Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D., and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.* 106, 446–453.
- Woods, M.W., Kelly, J.N., Hattlmann, C.J., Tong, J.G., Xu, L.S., Coleman, M.D., Quest, G.R., Smiley, J.R., and Barr, S.D. (2011). Human HERC5 restricts an early stage of HIV-1 assembly by a mechanism correlating with the ISGylation of Gag. *Retrovirology* 8, 1–18.
- Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 859–868.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* 339, 826–830.
- Xiao, H., Killip, M.J., Staeheli, P., Randall, R.E., and Jackson, D. (2013). The Human Interferon-Induced MxA Protein Inhibits Early Stages of Influenza A Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome in the Cytoplasm. *J. Virol.* 87, 13053–13058.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- $\beta$  Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *J. Immunol.* 169, 6668–6672.
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., et al. (2017). Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J. Immunol.* 198, 1553–1564.
- Yin, X., Langer, S., Zhang, Z., Herbert, K.M., Yoh, S., König, R., and Chanda, S.K. (2020). Sensor Sensibility—HIV-1 and the Innate Immune Response. *Cells* 9, 254.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K.,

Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730–737.

Yonezawa Akihito, Morita Rimpei, Takaori-Kondo Akifumi, Kadowaki Norimitsu, Kitawaki Toshio, Hori Toshiyuki, and Uchiyama Takashi (2003). Natural Alpha Interferon-Producing Cells Respond to Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Alpha Interferon Production and Maturation into Dendritic Cells. *J. Virol.* 77, 3777–3784.

Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., et al. (2013). Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)+ dendritic cells are a potent producer of interferon- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57, 1705–1715.

Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141+ Dendritic Cells Induce CD4+ T Cells To Produce Type 2 Cytokines. *J. Immunol.* 193, 4335–4343.

Yu, H., Zhang, P., Yin, X., Yin, Z., Shi, Q., Cui, Y., Liu, G., Wang, S., Piccaluga, P.P., Jiang, T., et al. (2015). Human BDCA2+CD123+CD56+ dendritic cells (DCs) related to blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm represent a unique myeloid DC subset. *Protein Cell* 6, 297–306.

Zhang, H., Gregorio, J.D., Iwahori, T., Zhang, X., Choi, O., Tolentino, L.L., Prestwood, T., Carmi, Y., and Engleman, E.G. (2017). A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 1988–1993.

Zhang, S., Kodys, K., Li, K., and Szabo, G. (2013). Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon- $\lambda$  and Amplify Interferon- $\alpha$  in Response to Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 144, 414-425.e7.

Zhang, Y., Yu, F., Li, J., Tong, Y., Zhang, Y., and Yu, Z. (2014). The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 466–471.

Zhao, C., Collins, M.N., Hsiang, T.-Y., and Krug, R.M. (2013). Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus–host battle. *Trends Microbiol.* 21, 181–186.

Zhou, Z., Hamming Ole J., Ank Nina, Paludan Søren R., Nielsen Anders L., and Hartmann Rune (2007). Type III Interferon (IFN) Induces a Type I IFN-Like Response in a Restricted Subset of Cells through Signaling Pathways Involving both the Jak-STAT Pathway and the Mitogen-Activated Protein Kinases. *J. Virol.* 81, 7749–7758.

Zhou, Z., Longchamps, N.B. de, Schmitt, A., Zerbib, M., Vacher-Lavenu, M.-C., Bomsel, M., and Ganor, Y. (2011). HIV-1 Efficient Entry in Inner Foreskin Is Mediated by Elevated CCL5/RANTES that Recruits T Cells and Fuels Conjugate Formation with Langerhans Cells. *PLOS Pathog.* 7, e1002100.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.

Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50, 1317-1334.e10.

(1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333–348.

# **ANNEXE**

À la suite de notre publication parue dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) en 2019, j'ai participé à l'écriture d'un résumé de notre article sous la forme d'une nouvelle qui a été publiée dans la revue *Médecines/sciences*

## NOUVELLE

### Une nouvelle population de cellules dendritiques sanguines aux propriétés particulières vis-à-vis du VIH-1

Flavien Brouiller<sup>1,2</sup>, Nicolas Ruffin<sup>1</sup>, Philippe Benaroch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Curie, PSL\* research university, Inserm U932, 12 rue Lhomond, 75005 Paris, France.

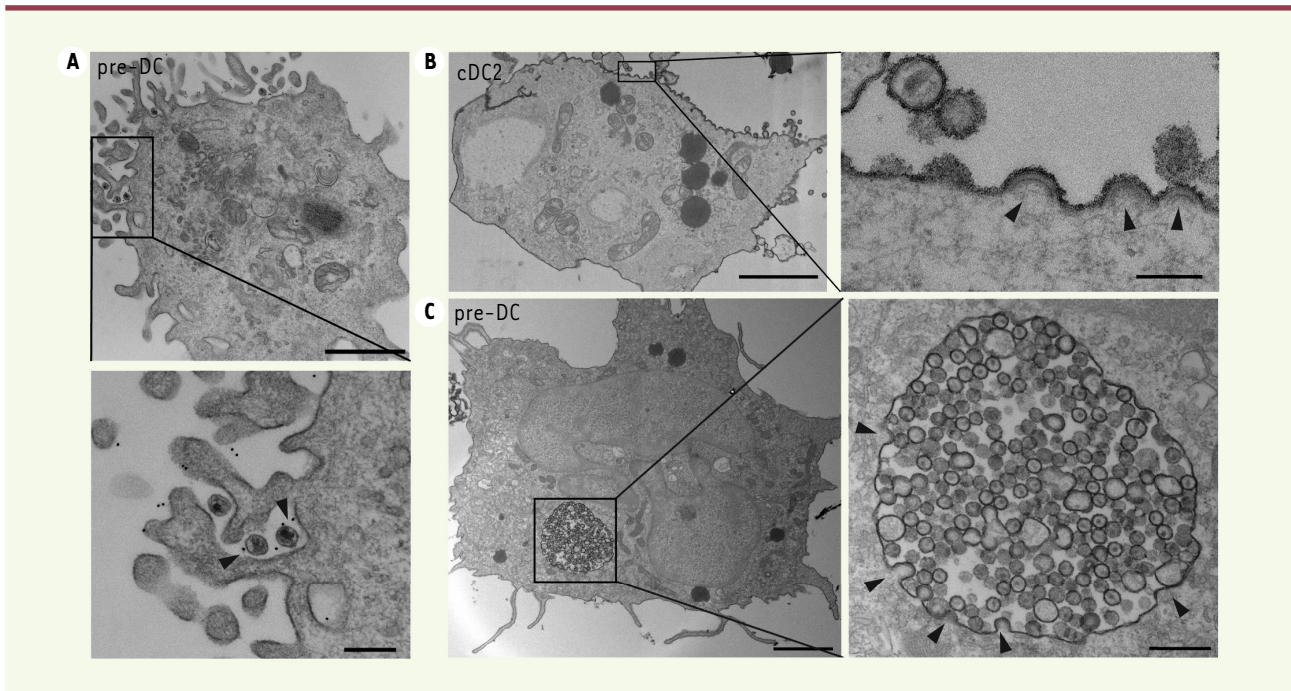
<sup>2</sup>Sorbonne université, ED394, Paris, France. [philippe.benaroch@curie.fr](mailto:philippe.benaroch@curie.fr)

> En 2018, environ 38 millions de personnes dans le monde vivaient infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dont 1,7 million de personnes nouvellement infectées (source ONUSIDA). En dépit des politiques de prévention et de l'efficacité des nouveaux traitements anti-rétroviraux, l'infection par le VIH demeure un enjeu majeur de santé publique.

Le VIH infecte des populations de cellules qui expriment à leur surface la molécule CD4, nécessaire à l'entrée du virus : lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, macrophages, et cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC). Ces dernières ont un rôle clé dans la réponse anti-virale. En effet, elles ont la capacité de rapidement détecter la présence de microorganismes pathogènes, et de produire alors des cytokines. Elles sont également cruciales pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, en présentant des antigènes dérivés des

pathogènes aux lymphocytes T, ce qui déclenche leur activation [1]. Les DC sont moins susceptibles à l'infection par le VIH que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou les macrophages, mais seraient néanmoins aussi impliquées dans la propagation de l'infection par transmission du VIH à d'autres cellules [2, 3]. Il est désormais admis que la transmission du virus de cellule à cellule est très efficace [4]. La transmission du virus par les DC peut s'effectuer, soit directement par contact entre cellules et passage de virions d'une DC infectée à une cellule voisine (infection « en *cis* »), soit après capture, sans infection, des particules virales par la DC, qui les transmet ensuite à d'autres cellules par contact (infection « en *trans* ») [2]. Dans ce cas, les DC capturent les particules virales grâce à leur récepteur Siglec-1 (CD169), qui présente une forte affinité pour des gangliosides abondants sur l'enveloppe des virions [5].

L'hétérogénéité des DC présentes dans le sang a pu être finement analysée récemment grâce aux techniques de protéomique et de transcriptomique sur cellule unique. Ces études ont révélé la présence d'une nouvelle population de DC exprimant Siglec-1 de façon constitutive, appelées pré-DC (ou AS-DC) [6, 7], qui seraient des précurseurs des DC conventionnelles (cDC), également présentes dans le sang. Ces dernières contiennent deux sous-populations de cellules (cDC1 et cDC2) spécialisées dans la présentation antigénique aux lymphocytes T [1]. Enfin, les DC plasmacytoïdes (pDC) constituent une sous-population de DC spécialisées dans la production de grandes quantités d'interférons de type I en réponse à la détection de pathogènes [8]. Jusqu'ici, aucune fonction particulière n'avait été attribuée aux pré-DC. La présence de Siglec-1 à leur surface et la capacité de



**Figure 1.** Les pré-DC capturent le VIH via Siglec-1 et produisent de nouveaux virions dans des compartiments d'apparence intracellulaire. **A.** Analyse par microscopie électronique et immuno-marquage des pré-DC exposées au VIH-1 pendant deux heures, fixées, et marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre Siglec-1 (révélation par la protéine A couplée à des particules d'or de 5 nm de diamètre). Une coupe Epon (inclusion dans la résine) est représentée, avec un agrandissement en dessous. Les flèches indiquent un marquage spécifique de Siglec-1 à l'interface entre le virus et les invaginations de la membrane plasmique. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m (image du haut) ou 0,5  $\mu$ m (image agrandie). **B-C.** Coupes Epon des cDC2 (B) et des pré-DC (C) infectées par le VIH-1 à 48 heures. Les cellules ont été fixées en présence de rouge de ruthénium pour marquer les membranes en contact avec le milieu extracellulaire. Les flèches indiquent des bourgeonnements viraux. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m ou 0,15  $\mu$ m (images agrandies) (figure adaptée d'après [9]).

ce récepteur à se lier au VIH nous ont incités à analyser les relations des pré-DC avec le VIH et à les comparer à celles des autres sous-populations de DC [9].

### Les pré-DC sont susceptibles à l'infection par le VIH

Pour cette étude, nous avons purifié, à partir d'échantillons de sang de donneurs sains, les quatre sous-populations de DC définies précédemment, à savoir les pré-DC, cDC1, cDC2, et pDC, par une combinaison de tris par billes magnétiques et cytométrie en flux. En exposant ces sous-populations au VIH-1 *in vitro*, nous avons montré que les pré-DC, et dans une moindre mesure les cDC2, sont susceptibles à l'infection par le VIH qui utilise le corécepteur CCR5 (*C-C motif chemokine receptor 5*) pour son entrée dans ces cellules (tropisme R5). Néanmoins, seules les pré-DC sont infectées

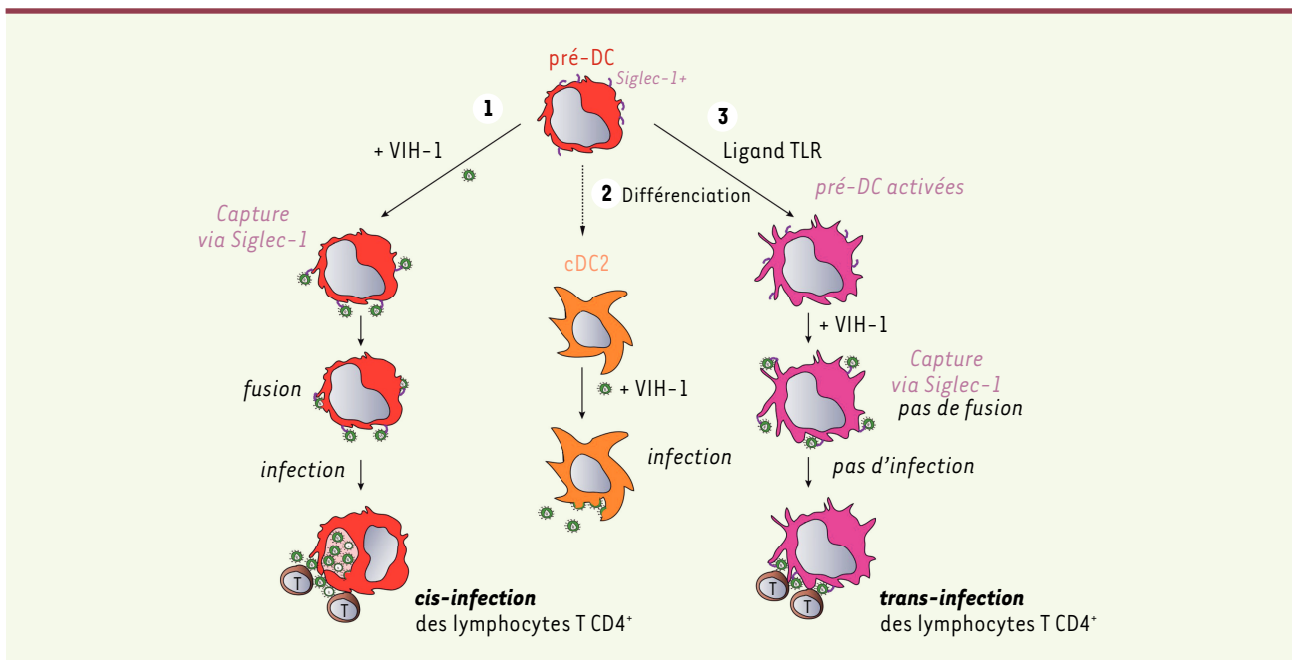
par le VIH, qui utilise alors le corécepteur CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor 4*) pour son entrée dans ces cellules (tropisme X4). Dans ce dernier cas surtout, l'infection des pré-DC est dépendante de Siglec-1, ce qui n'est pas le cas pour les cDC2. Les pré-DC comme les cDC2 expriment le facteur SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*), qui restreint l'infection. En contrecarrant l'effet de SAMHD1 grâce à la protéine Vpx du VIH-2, on augmente fortement les taux d'infection des pré-DC avec les deux types de VIH-1 (tropismes R5 et X4).

Nous montrons notamment par microscopie électronique et immuno-marquages (Figure 1A) que Siglec-1 est également essentiel pour la capture des particules virales par les pré-DC. En effet, l'emploi d'un anticorps spécifique de Siglec-1 inhibe à la fois

la capture des particules virales par ces cellules et leur infection. Une fois infectées, les pré-DC et les cDC2 sont toutes deux capables de produire des nouveaux virions, qu'elles libèrent dans le milieu extérieur.

Les sites de production virale ont été étudiés par une analyse ultra-structurale, qui a révélé qu'ils sont totalement distincts dans les deux sous-types de DC (Figures 1B, 1C). Dans les cDC2 infectées par le VIH, les bourgeonnements viraux s'effectuent de façon très polarisée et uniquement à la membrane plasmique (Figure 1B), comme c'est le cas dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés. En revanche, dans les pré-DC infectées, les sites de bourgeonnements viraux sont concentrés dans la membrane limitante de compartiments apparemment intracellulaires, contenant dans leur lumière de nombreuses





**Figure 2. Les pré-DC possèdent des propriétés uniques vis-à-vis de l'infection par le VIH.** Différentes situations sont observées. **1.** Les pré-DC peuvent capturer VIH-1 via Siglec-1, fusionner avec le virus, et devenir infectées. Elles produisent alors de nouveaux virus dans des compartiments d'apparence intracellulaire. Les nouveaux virus sont efficacement transmis en *cis* aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. **2.** Les pré-DC peuvent se différencier en cDC2, susceptibles à l'infection par le VIH-1 (tropisme R5). Les cDC2 infectées produisent de nouveaux virus à leur membrane plasmique. **3.** Après activation, les pré-DC résistent à l'infection par le VIH-1. Elles peuvent néanmoins encore capturer les particules virales via Siglec-1, et les transmettent efficacement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés. TLR : *Toll-like receptor* (figure adaptée d'après [9]).

particules virales. Ces compartiments sont connectés au milieu extérieur, comme c'est le cas dans les macrophages infectés [10]. Cela est attesté par la présence au niveau des membranes de ces compartiments et des particules virales, d'un colorant ajouté au moment de la fixation des cellules, le rouge de ruthénium, qui souligne les membranes d'une ombre grisée, sans les traverser (Figure 1C).

Ainsi, les pré-DC exposées à des particules de VIH-1 sont capables de les capturer *via* Siglec-1, d'être infectées, et de produire de nouvelles particules virales qui s'accumulent dans la lumière de compartiments intracellulaires de façon similaire à ce qui est observé dans les macrophages primaires infectés par le virus. Les pré-DC peuvent se différencier en cDC2 qui, après leur infection par le virus, se comportent comme des lymphocytes T en produisant de nouveaux virions.

**Activées ou non, les pré-DC sont capables de transmettre le VIH-1 à d'autres cellules**

En raison de leur susceptibilité au VIH-1 et de leur expression constitutive de Siglec-1, les pré-DC pourraient participer à la propagation du virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Nous avons montré que l'infection est transmise à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés lorsqu'ils sont co-cultivés avec des pré-DC infectées (infection en *cis*). Les pré-DC infectées sont donc capables de produire des particules virales infectieuses.

Le VIH-1 parvient à fusionner avec 80 % des pré-DC fraîchement purifiées. Néanmoins, il est totalement incapable de fusionner lorsque les pré-DC ont été activées au préalable par des ligands des récepteurs *Toll-like*. Ainsi, les pré-DC activées sont totalement résistantes à l'infection, mais elles s'avèrent toujours capables de capturer, *via* Siglec-1, des particules virales, qu'elles parviennent

à transmettre à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (infection en *trans*).

En employant le VIH-1 comme microorganisme pathogène modèle, notre étude a permis la première caractérisation fonctionnelle d'une population de DC, les pré-DC, jusque-là définie essentiellement d'un point de vue ontogénique. L'expression constitutive de Siglec-1 par les pré-DC leur confère des propriétés uniques de capture, d'infection et de transmission du VIH-1 par rapport aux autres sous-populations de DC sanguines (Figure 2). Il reste désormais à analyser le rôle des pré-DC dans la mise en place de la réponse immunitaire antivirale et dans le maintien des différentes sous-populations de DC au cours de l'infection, ainsi qu'à étudier les mécanismes de fusion avec des particules virales mis en jeu dans ces différentes sous-populations. ♦

**A new population of blood precursors of dendritic cells endowed with specific properties regarding HIV-1**

## REMERCIEMENTS

Ces travaux de recherche ont été soutenus par les subventions suivantes, attribuées à Philippe Benaroch : ANRS (agence nationale de recherche contre le SIDA et les hépatites virales) ECTZ72276, Sidaction (Ensemble contre le SIDA) 2018-1-AEQ-11984, ANR (agence nationale pour la recherche) ANR-10-IDEX-0001-02 PSL et ANR-11-LABX-0043. Nicolas Ruffin a bénéficié de bourses post-doctorales de l'ANRS et de la FRM (fondation pour la recherche médicale). Flavien Brouiller bénéficie d'une bourse doctorale de Sorbonne Université.

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Schlitzer A, Mcgovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 2015 ; 41 : 9-22.
- Graneli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, et al. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 1998 ; 72 : 2733-7.
- McIlroy D, Autran B, Cheynier R, et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 1995 ; 69 : 4737-45.
- Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol* 2008 ; 6 : 815-26.
- Izquierdo-Useros N, Lorzate M, McLaren PJ, et al. HIV-1 capture and transmission by dendritic cells: The role of viral glycolipids and the cellular receptor Siglec-1. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1004146.
- See P, Dutertre CA, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* 2017 ; 366 : pii: eaag3009. doi: 10.1126/science.aag3009.
- Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 2017 ; 356 : pii: eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573.
- Müller-Trutwin M, Hosmalin A. Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol Cell Biol* 2005 ; 83 : 578-85.
- Ruffin N, Gea-Mallorquí E, Brouiller F, et al. Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019 ; 116 : 21685-93.
- Hammonds JE, Beeman N, Ding L, et al. Siglec-1 initiates formation of the virus-containing compartment and enhances macrophage-to-T cell transmission of HIV-1. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006181.



**m/s**  
médecine/sciences

**Abonnez-vous  
à médecine/sciences**

Bulletin d'abonnement page 426  
dans ce numéro de m/s



